



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE POSTGRADO

**DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DETECCIÓN SENSIBLE Y
ESPECÍFICO DE *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *Pseudomonas syringae* pv.
morsprunorum EN CEREZOS**

Tesis/AFE para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo y al Grado de
Magíster en Ciencias Agropecuarias

DANIELA PAZ DÍAZ LEAL

Director de Tesis
Nicola Fiore

Codirector de Tesis
Alan Zamorano C.

Profesores Consejeros
Marcela Esterio G.
María Loreto Prat Del R.

SANTIAGO – CHILE
2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS ESCUELA
DE POSTGRADO

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DETECCIÓN SENSIBLE Y
ESPECÍFICO DE *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *Pseudomonas syringae* pv.
***morsprunorum* EN CEREZOS**

Tesis/AFE para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo y al Grado de
Magíster en Ciencias Agropecuarias

(NOMBRE ESTUDIANTE)

DIRECTOR DE TESIS Nicola Fiore Ingeniero Agrónomo, Dr. Cs. Agr.		Calificaciones 6,8
CODIRECTOR DE TESIS Alan Zamorano C. Bioquímico, Dr. Cs. Agr.		7,0
PROFESORES CONSEJEROS Marcela Esterio G. Ingeniero Agrónomo, Mg.		6,4
María Loreto Prat Del R. Ingeniero Agrónomo, Mg., Dr..		6,8

Santiago, Chile
2022

INDICE

Contenido

RESUMEN.....	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN.....	7
HIPÓTESIS	9
OBJETIVOS	9
Objetivo General	9
Objetivos Específicos	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
Ubicación del estudio:	10
Objetivo específico 1: Diseñar partidores para la detección, a través de la técnica LAMP, de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> y <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>	10
Siembra de aislados bacterianos	10
Extracción de DNA de las colonias aisladas.....	11
Identificación de aislados de <i>Pss</i> y <i>Psm</i>	12
Análisis bioinformático	¡Error! Marcador no definido.
Identificación de genes específicos a través de RAST	14
Diseño de partidores	¡Error! Marcador no definido.
Objetivo específico 2: Validar la técnica LAMP con aislados bacterianos purificados.....	15
Optimización de protocolo LAMP.....	¡Error! Marcador no definido.
Muestreo de huertos.....	15
Extracción y procesamiento de muestras	¡Error! Marcador no definido.
Identificación de aislados por medio de técnicas moleculares y pruebas de fluorescencia.....	16
Pruebas de especificidad.....	16
Pruebas de sensibilidad.....	17
Objetivo específico 3: Validar la técnica LAMP directo en material vegetal sin aislar previamente las bacterias.....	17
Comparación de técnicas de detección	18
RESULTADOS.....	20

Objetivo 1: Diseñar partidores para la detección, a través de la técnica LAMP, de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> y <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>	20
Siembra de aislados bacterianos	20
Determinación de fluorescencia de aislados bacterianos	¡Error! Marcador no definido.
Análisis multilocus	20
Análisis bioinformático por CLC Genomic Workbench	¡Error! Marcador no definido.
Análisis MLSA	¡Error! Marcador no definido.
Average Nucleotide Identity (ANI)	23
Identificación de aislados secuenciados	¡Error! Marcador no definido.
Identificación de regiones genéticas por RAST	25
Identificación de genes específicos	¡Error! Marcador no definido.
Prueba y selección de genes específicos	¡Error! Marcador no definido.
Objetivo específico 2: Validar la técnica LAMP con aislados bacterianos purificados	¡Error! Marcador no definido.
Optimización de protocolo LAMP	¡Error! Marcador no definido.
Toma de muestras para ensayo de especificidad	¡Error! Marcador no definido.
Obtención de colonias y selección	¡Error! Marcador no definido.
Análisis por PCR 16S rRNA	¡Error! Marcador no definido.
Identificación de aislados bacterianos	¡Error! Marcador no definido.
Ensayo de especificidad	28
Ensayo de sensibilidad	29
Validación de partidores PCR	¡Error! Marcador no definido.
DISCUSIÓN	31
BIBLIOGRAFÍA	37
APÉNDICE	42

RESUMEN

Las bacterias *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) y *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* (Psm) afectan al cerezo, especialmente a plantas jóvenes, y causan pérdidas económicas importantes a nivel mundial. Para contrarrestar esta situación, una de las medidas es poder contar con herramientas sensibles y específicas que permitan realizar una identificación rápida. Este trabajo tiene como objetivo desarrollar un protocolo de detección basado en la técnica molecular denominada Loop-mediated isothermal amplification (LAMP). A partir de la secuencia del genoma de aislados bacterianos obtenidos de material vegetal de cerezo sintomático, colectados en cuatro regiones del país, en conjunto con secuencias disponibles de Genbank, se identificaron regiones genómicas únicas para cada una de las bacterias, las que se utilizaron para el diseño de partidores específicos para LAMP. Éstos se validaron utilizando aislados purificados de diferentes *Pseudomonas*, incluidos Pss y Psm, determinando la sensibilidad y especificidad de la técnica. Se completó la validación detectando las bacterias directamente en material vegetal, sin previa purificación de los aislados. En conclusión, el protocolo LAMP desarrollado en este proyecto permite la identificación sensible y específica de Pss y Psm.

Palabras claves: Análisis filogenético; Análisis multilocus de secuencia (MLSA); Average Nucleotide Identity (ANI); PCR; Secuenciación masiva.

ABSTRACT

Pseudomonas syringae pv. *syringae* (Pss) and *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* (Psm) cause disease on cherry trees, particularly in young plants, and are responsible of significant economic losses worldwide. To face this situation, is necessary to develop sensitive and specific tools that allow a rapid identification in the field. This project aims to develop a detection protocol based on the molecular identification technique called Loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Using the genome sequence of bacterial isolates obtained from symptomatic cherry trees collected in four regions of the country, combined with sequences available from Genbank, unique genomic regions were identified for each of the bacteria, which were used for the design of specific primers for LAMP. These were validated using purified isolates of different *Pseudomonas*, including Pss and Psm, to determine sensitivity and specificity of the technique. The validation was completed by detecting bacteria directly on plant material, without prior purification of the isolates. In conclusion, the LAMP protocol developed in this project allows the sensitive and specific identification of Pss and Psm.

Keywords: Average Nucleotide Identity (ANI); Multilocus sequence analysis (MLSA); Next Generation Sequencing (NGS); PCR; Phylogenetic Analysis.

INTRODUCCIÓN

El cáncer bacterial es la enfermedad más común en cerezos, y su agente causal es *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Hattingh y Roos, 1995; Kazempour *et al.*, 2007; Spotts *et al.*, 2010; Balaž *et al.*, 2016). Afecta en mayor medida a plantas de cerezo jóvenes y su amplia difusión en Chile, durante la última década, se debe al aumento considerable de la superficie plantada con cerezo, en respuesta al aumento de la exportación de fruta, especialmente a China. Este último punto resulta relevante. Si los niveles de exportación de cerezas en la temporada 2019/20 fueron de 228.548 toneladas (iQonsulting, 2020), en la temporada 2020/21 se alcanzó un total de 352.949 toneladas (iQonsulting, 2021), lo que significa una variación del 54,4% con respecto al periodo anterior, a pesar de las dificultades derivadas de la situación sanitaria mundial. Dado el importante papel que el cerezo posee en el contexto de la economía nacional, resulta primordial garantizar un elevado status fitosanitario que permita satisfacer la demanda actual.

Si bien están disponibles varias estrategias de control de Pss, la aplicación de productos cúpricos en diferentes formatos (Lemus *et al.*, 2020), también conocidos como Compuestos Antimicrobianos Basados en Cobre (CABC), sigue manteniendo un rol protagónico, con resultados no siempre aceptables. Por ejemplo, en la zona centro-sur, con el uso de CABC, ha sido posible extender la vida útil de los huertos de cerezo infectados solo por un corto periodo de tiempo (10 años), durante el cual ha sido necesario arrancar desde el 3 al 20% de las plantas (Lemus y Osorio, 2019). Por otro lado, se ha visto que un huerto infectado desde el momento de la plantación y sin un manejo adecuado puede perder hasta el 40% de plantas al tercer año (INIA, 2017). Finalmente, es innegable que el uso de CABC acarrea problemas tales como fitotoxicidad, desarrollo de cepas bacterianas resistentes a cobre y contaminación del medioambiente (Beltrán *et al.*, 2020). A la ecuación se suma una nueva variable, que es la presencia de *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* (Psm) raza 1, recientemente documentada en Chile (García *et al.*, 2021) y que también ha sido asociada al cáncer bacterial (Vicente *et al.*, 2004; Kennelly *et al.*, 2007; Kałużna *et al.*, 2009; Bultreys y Kałużna, 2010; Neale *et al.*, 2021). Los síntomas causados por cada una de estas bacterias son prácticamente idénticos. Los cancros, especialmente en plantas jóvenes, son ligeramente hundidos y presentan una coloración más oscura con respecto a otras zonas del tronco no afectadas (Spotts *et al.*, 2010). Estos se pueden observar tanto en el tronco como en ramas y ramillas, y al progresar comprometen el desarrollo de la planta en su totalidad. Otros síntomas son las necrosis de hojas y botones florales (Kennelly *et al.*, 2007), exudación de goma (Latorre, 2008), lesiones en frutos (Spotts *et al.*, 2010), muerte de ramas y ramillas, incluso de brazos completos de la planta, atizonamiento de flores y brotes, manchas foliares necróticas rodeadas de halos necróticos, y problemas en el desarrollo, como brotación retardada o escaso crecimiento estacional (Latorre, 2008). También se ha observado manchas hidrópicas en hojas con posterior perforación de la lámina foliar (Kennelly *et al.*, 2007). Los síntomas comienzan a aparecer a fines de invierno y varían dependiendo del cultivar, edad del árbol, tejido afectado, cepa bacteriana y condiciones ambientales al momento de la infección (Millas y France, 2017). La infección se produce por heridas o lesiones en los tejidos de la planta, ya sea por heladas o por el uso de herramientas de poda (Lemus y Osorio, 2019), lo que promueve la diseminación de la bacteria en huertos infectados.

Los bancos de datos de las secuencias genómicas incluyen grandes cantidades de informaciones pertenecientes a bacterias fitopatógenas. Las secuencias están disponibles y facilitan la realización de la identificación hasta el nivel de patovar. Sin embargo, es muy común observar errores en las secuencias, sobre todo en aquellas que se generaron alrededor de diez años atrás, debido fundamentalmente a las limitaciones de las técnicas de secuenciación. Esto, como esperable, ha causado errores de identificación y, en el caso de géneros taxonómicos más complejos como es *Pseudomonas*, la situación ha sido aún más crítica a tal punto que se ha cuestionado el sistema de clasificación usado para definir especies y patovares, obligando a replantear también el criterio de uso de las técnicas tradicionalmente empleadas para la identificación, como las biológicas, bioquímicas y de análisis macro-morfológicos. Específicamente, en la base de datos Genbank se encuentran secuencias de varias especies y patovares, pertenecientes al género *Pseudomonas*, que han sido clasificadas de manera incorrecta (Gomila *et al.*, 2017; Tran *et al.*, 2017). Es claro entonces que, si la clasificación proporcionada por bases de datos es incorrecta, es posible realizar errores en el desarrollo de nuevos métodos de detección, que requieren de precisión en su diseño. En base a ello, es urgente reclasificar los diferentes aislados encontrados en distintas bases de datos para su uso como genomas de referencia y para el diseño de partidores específicos usados en métodos de detección moleculares. Actualmente, los métodos de clasificación basados en comparaciones genómica, como el análisis de secuencias multilocus (Multilocus sequence analysis - MLSA) que consideran de 3 a 4 genes *housekeeping*, han ayudado a clarificar la filogenia del complejo *Pseudomonas* (Mulet *et al.*, 2010; Bull *et al.*, 2011; Berge *et al.*, 2014). Resultados previos entregados por Gomila *et al.* (2015) mostraron la validez de la técnica y su utilidad para la reclasificación y categorización de aislados bacterianos, muchos de ellos mal categorizados previamente. Otra de las aproximaciones para la clasificación taxonómica es el uso de ANI (del inglés *Average Nucleotide Identity*), que permite comparar genomas completos, generando un punto estándar de separación de especies entre 95%-96% (Chun *et al.*, 2018; Lee, 2019). Estas nuevas aproximaciones taxonómicas, derivadas del uso de la técnica Next Generation Sequencing (NGS), ayudan a la reclasificación de aislados y diseño de métodos de detección más certeros, basados en la genómica.

Debido al gran problema causado por Pss y Psm en huertos de cerezo en Chile, es que resulta importante desarrollar herramientas de detección tempranas que además de ser específicas para ambas especies, también sean más sensibles y rápidas que los métodos actuales. Para ello, es esencial contar con información genómica de diferentes aislados, incluyendo los locales, para el diseño de partidores más eficientes. En este contexto, las NGS (del inglés *Next Generation Sequencing*) han permitido reducir tiempos y costos de trabajo, entregando excelentes resultados. Si bien hoy existen múltiples métodos de detección, LAMP ofrece ciertas ventajas con respecto a otros métodos moleculares desarrollados hasta la fecha. Este método cuenta con 4 partidores, 2 internos y 2 externos, diseñados para amplificar 6 regiones genómicas específicas bajo condiciones isotérmicas gracias al uso de una ADN polimerasa proveniente de *Bacillus stearothermophilus* (Notomi *et al.*, 2000). Se ha observado, en otras especies de *Pseudomonas*, la factibilidad de la técnica y los buenos resultados obtenidos, siendo altamente específica y sensible a nivel de detección (Li *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2011; Ash *et al.*, 2014; Meng *et al.*, 2016; Ruinelli *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2020). Es con una detección temprana en los huertos, bajo el uso de nuevos métodos moleculares más específicos y de mayor despliegue que los actuales, que puede evitarse

una diseminación mayor de patógenos, en especial cuando observamos el ingreso de nuevas bacterias patógenas, como lo es Psm, que implica un mayor riesgo para el desarrollo productivo de los huertos de cerezo en Chile. Bajo este escenario se desarrolla y propone la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

La técnica Loop-mediated isothermal Amplification (LAMP) permite la identificación específica de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* directamente en material vegetal, sin aislar previamente las bacterias.

OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar la técnica LAMP para la detección de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*.

Objetivos Específicos

1. Diseñar partidores para la detección, a través de la técnica LAMP, de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*.
2. Validar la técnica LAMP con aislados bacterianos purificados.
3. Validar la técnica LAMP en material vegetal sin aislar previamente las bacterias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio:

El estudio se realizó en el laboratorio de Fitovirología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile (33°34'08,0"S 70°38'00,9"O). Además, incluyó las visitas a huertos localizados en las regiones Metropolitana, Libertador Bernardo O'Higgins, Maule y Ñuble.

Objetivo específico 1: Diseñar partidores para la detección, a través de la técnica LAMP, de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*.

El diseño de partidores específicos para la detección de Pss y Psm es un paso fundamental en el desarrollo del presente proyecto, que se sustenta en la identificación previa de genomas correspondientes a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, considerando las relaciones filogenéticas del grupo al cual corresponden estas bacterias. Lo anterior permite encontrar genes específicos para el diseño de un set de 4 partidores utilizados en la técnica LAMP.

Aislamiento y purificación de cepas bacterianas

La mayor parte de las bacterias seleccionadas para el diseño de partidores se aislaron desde ramillas de cerezo con síntomas y desde tres asintomáticas. También se aislaron bacterias desde hospederos diferentes al cerezo, en cuanto se quería disponer de cepas locales de *Pseudomonas* pertenecientes a diferentes especies bacterianas y/o patovares. Tanto los hospederos como las zonas de muestreo se encuentran enlistadas en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Hospederos y zonas de muestreo para aislar las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* y utilizadas para el diseño de los partidores.

Hospedero	Zona de muestreo
<i>Prunus avium</i>	San Fernando, R. de O'Higgins
<i>Prunus avium</i>	San Fernando, R. de O'Higgins
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Linares, R. del Maule
<i>Solanum lycopersicum</i>	Quillota, R. de Valparaíso
<i>Prunus avium</i>	San Fernando, R. de O'Higgins
<i>Prunus avium</i>	San Fernando, R. de O'Higgins
<i>Actinidia deliciosa</i> (Kiwi)	Chillán, R. de Ñuble
<i>Prunus avium</i>	San Fernando, R. de O'Higgins
<i>Prunus avium</i>	Curicó, R. del Maule
<i>Prunus avium</i>	Curicó, R. del Maule

Materiales. Para el aislamiento y purificación de las bacterias se utilizaron placas Petri con el medio sólido KB (King *et al.*, 1954) [por cada litro en agua destilada y desionizada se utilizó 20 gramos de triptona, 1,5 gramos de fosfato dipotásico (K_2HPO_4), 1,5 gramos de sulfato de magnesio pentahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 15 mL de glicerol y 15 gramos de agar purificado], mechero bunsen y asa de siembra. Los medios fueron preparados en botellas de borosilicato de 250 mL y se esterilizaron en autoclave.

Metodología. Desde cada placa Petri con KB, se colectó una colonia para su purificación siempre en KB. La placa se dejó en incubación a 28°C por 24-48 horas a la espera del crecimiento de nuevas colonias. Después de este periodo las placas se conservaron a 4°C para análisis posteriores.

Extracción de DNA de las colonias aisladas

Materiales. Se emplearon placas Petri con el sustrato sólido KB en las cuales crecieron las colonias bacterianas, el asa de siembra, tubos falcón de 15 mL, mechero bunsen, medio LB líquido [por cada litro de agua destilada y desionizada se utilizó 10 gramos de triptona, 5 gramos de cloruro de sodio (NaCl) y 5 gramos de extracto de levadura]. También se utilizó el medio líquido LB. Se utilizó el kit de extracción comercial GeneJet DNA purification kit (Cat. N° K0721, ThermoFisher Scientific, MA, USA).

Metodología. Con el asa se colectaron dos colonias por placa. Cada una de ellas se sembró en 4 mL de medio LB líquido en tubos Falcon de 15 mL (una colonia por tubo), que se mantuvieron en agitación a 28°C por 16 horas. Al día siguiente se comprobó el crecimiento bacteriano por el cambio de color del medio. Como control negativo, se utilizó un tubo sin bacterias. Los tubos se centrifugaron por 3 minutos a 14000 rpm con el fin de sedimentar las bacterias. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 180 µL de la solución de digestión del kit de extracción del DNA. Se añadió 20 µL de proteinasa K a la solución y se sometió a vortex para homogeneizar el contenido del tubo, resuspendiendo el pellet. La muestra se incubó en un baño termostático a 56°C, agitando en vortex cada dos minutos, durante 10 minutos, hasta que las células estuviesen completamente lisadas. A esta solución se le añadió 20 µL de RNasa A, homogeneizando la solución por medio de vortex por 15 segundos e incubando a temperatura ambiente por 10 minutos. Posterior a ello, se añadió 200 µL de solución de lisis a la muestra, mezclando por vortex por 15 segundos. Después, se agregó 400 µL de etanol al 50%, mezclando nuevamente por medio de vortex. La solución obtenida se traspasó a una columna de purificación GeneJET Genomic DNA que se encontraba dentro de un tubo de colección, la que se procedió a centrifugar por 3 minutos a 14000 rpm, para posteriormente separar la columna del tubo y eliminar el sobrenadante del mismo, colocando la columna en un nuevo tubo de colección. A este set se añadió 500 µL de Washing Buffer I, centrifugando a 14000 rpm por 3 minutos, y nuevamente eliminando el sobrenadante colectado en el tubo, para finalmente colocar la columna en el mismo tubo de colección usado. El siguiente paso consistió en añadir 500 µL de Washing Buffer II a la columna de purificación, centrifugando por 3 minutos a máxima velocidad, eliminando el sobrenadante y traspasando la columna a un tubo Eppendorf de 1,5 mL, al cual se le añadió 200 µL de buffer de elución, incubando a temperatura ambiente por 2 minutos y centrifugando a máxima velocidad por 3 minutos. Finalmente, la columna de purificación se eliminó y el DNA suspendido se conservó a -20°C para su uso posterior.

Identificación de aislados bacterianos chilenos de Pss y Psm y obtención del genoma completo de los aislados identificados

Ya que los métodos tradicionales utilizados para la identificación de bacterias, tales como los medios de cultivo diferenciales, no permiten una identificación correcta y específica de aislados, es necesario utilizar otras herramientas para su caracterización. Es por esto que se realizaron 3 filtros de identificación de los aislados obtenidos. Inicialmente se hizo un análisis morfológico de colonias en medio de cultivo diferencial KB para *Pseudomonas*, seguido de PCR para el gen 16S rRNA, a fin de identificar los aislados a nivel de género. Finalmente se realizó el análisis MLSA, con el fin de determinar la especie y el patovar de cada aislados. Una vez identificados, se seleccionaron 10 aislados (1 por cada placa) para la secuenciación de su genoma.

Materiales. Para las pruebas de fluorescencia se utilizaron placas KB, mientras que para PCR se utilizaron partidores universales para el gen 16S rRNA, y los partidores de genes conservados (*housekeeping*) para *Pseudomonas*, *gyrB*, *rpoD*, *pfk*, *acn*, *gapA* gene, *pgi* y *cts* (Sarkar y Gutmann, 2004) (Cuadro 2), junto con agua destilada, tampón 10X (buffer PCR), MgCl₂, dNTPs y Taq Polimerasa, que en conjunto completaban el mix PCR para cada amplificación. Además, se utilizó un termociclador para realizar el ciclo de amplificación. Para el análisis bioinformático se empleó el software CLC Genomic Workbench en su versión 7.5.1, con el fin de identificar los productos de amplificación, construir los contigs y los árboles filogenéticos, y así completar los análisis

MLSA y Average Nucleotide Identity by BLAST (ANIb). Se utilizó también de *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), a través de la herramienta BLASTn, para la identificación de los fragmentos de las secuencias de genes *housekeeping*. Además, se utilizó la base de datos de Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para extraer secuencias disponibles que enriquecieran el análisis comparativo.

Metodología. Cada reacción de PCR se realizó utilizando un volumen final de 30 μL que contenía 3 μL de Buffer PCR 10X, 1,5 μL de MgCl_2 (50 μM), 1 μL de dNTPs (10 μM), 1 μL del cada partidor mencionado en los materiales de la presente sección, 0,2 μL de Taq Polimerasa (Invitrogen) y 1,5 μL de DNA templado (20 $\text{ng}/\mu\text{L}$). Cada reacción se llevó a cabo en un termociclador (Applied Biosystems®, modelo Veriti) con un protocolo que contempló las siguientes etapas: una incubación de 3 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos que iniciaban a partir de la desnaturalización de 1 minuto a 94°C, apareamiento de los partidores por 30 segundos (donde para los partidores de los genes *acn* y *pgi* la temperatura seleccionada fue de 60°C, para *cts* de 56°C, para *gapA* de 62°C, para *gyrB*, *pfk* y *rpoD* fue de 63°C, y para 16S rRNA de 54°C), que continuó con la elongación por 90 segundos a 72°C y con una extensión final de 72°C durante 7 minutos seguida por la reducción de la temperatura a 10°C por un tiempo indefinido para conservación de las moléculas de DNA sintetizadas. Los productos de amplificación se visualizaron en un gel de agarosa y aquellos que estaban a la altura esperada se enviaron a la empresa Psomagen Inc. (EEUU), donde se secuenciaron con el método Sanger. Los aislados identificados como *Pseudomonas syringae* se prepararon y enviaron nuevamente a Psomagen Inc. para la subsecuente secuenciación genómica mediante la plataforma Illumina. Las colonias se almacenaron a -80°C en tubos Eppendorf de 1,5 mL para su uso posterior. Para el análisis bioinformático inicialmente se analizaron por BLASTn las secuencias obtenidas de cada uno de los 10 aislados bacterianos de Cuadro 1, obtenidas por PCR con los partidores indicados en el Cuadro 2. Esto permitió tener una aproximación de la especie/patovar a la que corresponde cada aislado. Concatenando estas secuencias de genes *housekeeping*, se realizó el MLSA para los 10 aislados bacterianos, usando, para comparación, las diferentes secuencias obtenidas desde Genbank. El criterio de selección de secuencias desde Genbank cumplió con las siguientes características: que se encontraran clasificadas dentro de esta base de datos como *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* o *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, o que pertenecieran al filogrupo de *Pseudomonas syringae* de acuerdo a los criterios de clasificación entregados por Gomila *et al.* (2017). Luego, se analizaron las lecturas del genoma obtenidos a partir de la plataforma Illumina por medio del programa CLC Genomic Workbench, a fin de construir los contigs, los que corresponden al ordenamiento de las lecturas superpuestas de la secuencia analizada, correspondiente a una región de la secuencia del genoma de las especies analizada. Desde los genomas obtenidos y caracterizados como Pss o Psm mediante MLSA, se realizó el análisis ANIb, añadiendo también aislados caracterizados como referencia para cada especie, obtenidos desde Genbank; tal es el caso de las cepas B728a (Número de acceso en GenBank: NC_007005.1), PSM CFBP2116, ICMP18884 (Número de acceso ICMP: T10-06115) y PST DC3000 (Número de acceso GenBank: AE016853.1).

Cuadro 2. Parejas de partidores usados para la identificación de los 10 aislados obtenidos.

Partidor	Secuencia partidor (5' - 3')	Amplicón (bp)	Cita bibliográfica
27F 1492R (gen 16S rRNA)	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG TACGGYTACCTTGTTACGACTT	1465	Lane (1991)
gyrB-Fps gyrB-Rps	MGGCGGYAAGTTCGATGACAAAYTC TRATBKCAGTCARACCTTCRCGSGC	630	Sarkar y Gutmann (2004)
rpoD-Fp rpoD-Rps	AAGGCGARATCGAAACCAAGC GGAACWKGCGCAGGAAGTCGGCAC	570	
acn-Fp acn-Rp	ACATCCCGCTCGACGCYCTGGCC GTGGTGTCTGTTGGGAACCGAGCGTG	590	
pfk-Fp pfk-Rp	ACCMTGAACCCCKGCGCTGGA ATRCCGAAVCCGAHCTGGGT	570	
gapA-Fps gapA-Rps	CGCCATYCGCAACCCG CCCAYTCGTTGTCGTACCA	620	
pgi-Fp pgi-Rp	TGCAGGACTTCAGCATGCGCGAAGC CGAGCCGCCCTGSGCCAGGTACCAG	650	
cts-Fp cts-Rp	AGTTGATCATCGAGGGCGCWGCC TGATCGGTTTGATCTCGCACGG	610	

Diseño de partidores para la detección de Pss y Psm por LAMP y PCR

Materiales. Para la búsqueda de genes específicos de Pss y Psm se utilizaron los genomas secuenciados de los aislados seleccionados, los que se subieron a la plataforma “The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology versión 2.0” (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>) para determinar potenciales regiones genómicas para el diseño de partidores. Para diseñar partidores para LAMP se utilizó el software PrimerExplorer en su versión web correspondiente a

la quinta versión (V5) (<https://primerexplorer.jp/lampv5e/>), junto con los archivos FASTA de cada uno de los genes obtenidos a partir del análisis RAST del paso previo.

Metodología. Por medio de la plataforma, a través de la función *Comparison sequence based* se realizaron comparaciones seleccionando un genoma de referencia (aquel designado para la búsqueda) contra 4 genomas de diferentes o iguales bacterias subidos a la plataforma o anexados a ella a partir de otras bases de datos. Los criterios utilizados para la comparación de genomas incluían una similitud mayor al 99% para aislados del mismo patovar y bajo un 80% de similitud para bacterias de distintos patovares. Para diseñar los partidores de LAMP se subieron cada una de las secuencias obtenidas del análisis por RAST del paso previo como archivo FASTA, bajo los siguientes parámetros de configuración: Parameter set (Automatic Judgment), Desing option (default), Select range (Ignore range), Length F1c/B1c (15-25), Length F2/B2 (15-28), Length F3/B3 (15-28), Tm F1c/B1c (62°C-68°C), Tm F2/B2 (60°C-66°C), Tm F3/B3 (60°C-66°C), Parameter condition (GC rich), GC rate (%) (40%-60%). Distances, dG treshold y limitations se mantuvieron por default.

Objetivo específico 2: Validar la técnica LAMP y PCR con aislados bacterianos purificados.

Se colectó material vegetal para preparar una colección de aislados bacterianos asociados al cerezo. Los partidores diseñados se testearon con los distintos aislados bacterianos, incluidas las dos patovares de interés para este proyecto, Pss y Psm. Con ellos, también, se determinó la especificidad y sensibilidad de la técnica LAMP en comparación con otros métodos de detección tradicionales como el PCR.

Muestreo de huertos

Materiales. Para realizar el muestreo en ramillas y raíces se utilizó una tijera de poda, pala, cuchillo, bolsas de muestreo y alcohol 70%, este último para la desinfección de las herramientas utilizadas.

Metodología. El muestreo de huertos se llevó a cabo en cuatro regiones del país. El primero en la región Metropolitana, en un huerto ubicado en la localidad de Pomaire, comuna de Melipilla. El segundo muestreo se realizó en la región del Libertador Bernardo O'Higgins, en cuatro huertos, tres de ellos ubicados en Placilla y uno en Chimbarongo. El tercer muestreo se realizó en la región del Maule, en dos huertos ubicados en Romeral, tres en Río Claro y uno en Molina. El cuarto muestreo se realizó en la región de Ñuble, en un huerto ubicado en San Nicolás y el otro en el Manzano. Estos huertos tenían antecedentes de presencia de cáncer bacterial y al momento del muestreo también se encontraron síntomas de la enfermedad. De cada región se obtuvieron 20 ramillas, a excepción del huerto ubicado en la RM, donde además se obtuvo 10 muestras de raíces, con el fin de ampliar el número de aislados colectados. También en este último se realizó dos muestreos en dos diferentes temporadas (inicios de invierno e inicios de primavera), de modo de determinar la diferencia en los aislados de cada temporada, considerando los periodos de mayor o menor replicación de las diferentes especies bacterianas asociadas al cultivo. Exceptuando las

raíces, se obtuvieron submuestras desde corteza y floema. En el marco del muestreo, también se buscaron y caracterizaron aislados pertenecientes al género *Pseudomonas*.

Aislamiento de bacterias y extracción de DNA desde colonias bacterianas

Materiales. Para realizar el aislamiento se utilizó agua destilada estéril y mortero con pistilo. Durante el procesamiento de cada muestra se usaron placas Petri y medio sólido KB para la siembra de bacterias.

Métodos. Cada una de las muestras, tanto de raíces como ramillas, se maceró en un mortero, agregando 3 mL de agua destilada a cada muestra. El macerado sin diluir y dos diluciones del mismo (1/10 y 1/100) se sembraron en medio KB, contabilizando un total de 3 placas por muestra. El material vegetal sembrado no fue desinfectado previo a la siembra, con el fin de mantener intacta la flora bacteriana saprófita presente. Se seleccionaron colonias de acuerdo a su morfología, desde las cuales se realizó extracción de DNA utilizando el mismo protocolo descrito en el punto *extracción de DNA de las colonias aisladas*.

Identificación de aislados por medio de técnicas moleculares y pruebas de fluorescencia

Materiales. Para identificar los aislados bacterianos se utilizaron los partidores para el gen 16S rRNA listados en el Cuadro 2 junto con agua destilada, tampón 10X (Buffer PCR), MgCl₂, dNTPs y Taq Polimerasa, que en conjunto completaban el mix PCR para cada amplificación. Además, se utilizó Termociclador Veriti para completar cada reacción (Applied Biosystems, CA, USA). Además, los aislados bacterianos pertenecientes al género *Pseudomonas* obtenidos desde los huertos muestreados, más aquellos (31) proporcionados por el Dr. Boris Sagredo del Centro de Estudios Avanzados en Fruticultura (CEAF) en Rengo, región de O'Higgins (CEAF), en el marco del proyecto ANILLO ACTO 190001, se identificaron con los partidores específicos validados (Gfa1, HopAU1) (Apéndice 21).

Métodos. Cada una de las colonias seleccionadas, de las cuales se extrajo DNA, se analizó por PCR para el gen 16S rRNA, siguiendo el mismo protocolo especificado en la actividad de *Identificación de colonias bacterianas aisladas por medio de métodos moleculares y de fluorescencia* del objetivo 1. Con ello, se logró identificar el género de cada uno de los aislados, contabilizando un total de 30 géneros diferentes de bacterias a usar para la prueba de especificidad. Además, se completó la identificación de los aislados por medio de pruebas de fluorescencia en KB.

Optimización de protocolo LAMP

Materiales. Cada reacción contenía agua destilada (agua Y), MgSO₄, 10X Isothermal Amplification Buffer, dNTPs, *Bst* 2.0 DNA Polymerase (8000 U/mL) y los 4 partidores diseñados para Pss y Psm. Cada reacción se llevó a cabo en un termociclador (Applied Biosystems®, modelo Veriti).

Metodología. Se realizó la optimización del protocolo LAMP, probando distintas concentraciones de magnesio (MgSO₄) (desde 2 mM hasta 8 mM), el tiempo de reacción (desde 30 hasta 60

minutos), la temperatura de amplificación (62°C o 65°C), la adición o no de Formamida (5%), y diferentes concentraciones de partidores (1,6 µL (FIP/BIP)/0,2 µL (F3/B3), 0,8 µL (FIP/BIP)/0,4 µL (F3/B3), 1,4 µL (FIP/BIP)/0,4 µL (F3/B3), 1 µL (FIP/BIP)/1 µL (F3/B3). A la reacción se incorporó 2,5 µL de 10X Isothermal Amplification Buffer, 3,5 µL de dNTPs, 10,5 µL de agua destilada y 1,5 µL de DNA.

Pruebas de especificidad

Materiales. Se utilizaron los aislados bacterianos identificados, junto con agua destilada, tampón 10X (Buffer PCR), MgCl₂, dNTPs, Taq Polimerasa y los partidores externos (F3 y B3) diseñados en este trabajo para cada una de las bacterias estudiadas (Pss y Psm), completando el set de reactivos para la reacción de PCR. Además, para la reacción LAMP se utilizó agua destilada (agua Y), MgSO₄, 10X Isothermal Amplification Buffer, dNTPs, *Bst* 2.0 DNA Polymerase (8000 U/mL) y los 4 partidores diseñados para cada set de partidores, tanto de Pss como Psm. Ambos procesos se llevaron a cabo en un Termociclador Veriti (Applied Biosystems, CA, USA).

Métodos. Para determinar la especificidad se realizaron análisis PCR y LAMP, donde se incluyeron 30 géneros bacterianos distintos, incluyendo dentro de estos el género *Pseudomonas*. Para ello además se emplearon los aislados de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, identificados en el Cuadro 4, como controles positivos y negativos (de acuerdo al análisis). Considerando el diseño de partidores, la amplificación se llevó a cabo a 65°C en caso de PCR y de LAMP.

Pruebas de sensibilidad

Materiales. Se utilizó un nanofotómetro Epoch (Biotek) para la medición de concentración de DNA de cada extracto. De cada muestra se obtuvieron diluciones seriadas con agua destilada estéril.

Métodos. Para determinar la sensibilidad del método LAMP y su comparación análoga a PCR se utilizaron los aislados enlistados del Cuadro 4, a los cuales se midió la concentración de DNA de la muestra en ng/µL. Cada muestra, independiente de su concentración inicial, se llevó a una concentración de 10 ng/µL, y a partir de esta se obtuvieron 10 diluciones seriadas con concentraciones de 1 ng/µL, 100 pg/µL, 10 pg/µL, 1 pg/µL, 100 fg/µL, 10 fg/µL, 1 fg/µL, 100 ag/µL, 10 ag/µL y 1 ag/µL. Cada una de las diluciones se utilizó para encontrar el límite de detección de cada técnica por medio de LAMP y PCR.

Objetivo específico 3: Validar la técnica LAMP en material vegetal sin aislar previamente las bacterias.

La factibilidad del análisis molecular concluye con la amplificación de Pss y Psm en material vegetal sin aislamiento previo, comparando las técnicas LAMP con PCR. Con la puesta a punto de este protocolo se pretende detectar Pss y Psm evitando el aislamiento de las bacterias.

Comparación de técnicas de detección

Materiales. Se utilizó una muestra de tejido vegetal de cerezo (hoja) obtenida desde cerezos variedad Colt provenientes de *in vitro*, junto con aislados positivos para Pss (S2) y Psm (11116B2) para realizar inoculaciones artificiales, los que se sembraron en medio LB líquido durante 16 horas a 28°C con agitación. La extracción de DNA se realizó mediante el protocolo modificado propuesto por Zhang *et al.* (1998). Los reactivos utilizados para PCR fueron agua destilada para biología molecular, tampón 10X (Buffer PCR), MgCl₂, dNTPs y Taq Polimerasa, junto con los partidores F3 y B3 diseñados en este trabajo. Para LAMP se empleó agua destilada para biología molecular, MgSO₄, 10X Isothermal Amplification Buffer, dNTPs, *Bst* 2.0 DNA Polymerase (8000 U/mL) y los 4 partidores diseñados para cada set de partidores Pss y Psm. Cada reacción se llevó a cabo en un termociclador (Applied Biosystems®, modelo Veriti).

Métodos. Se pesaron 0,5 g de tejido foliar de cerezo. A cada muestra se agregó una solución de bacterias, que se mantuvo creciendo en medio LB líquido durante la noche, con concentraciones de 10⁷ cfu/mL, 10⁶ cfu/mL, 10⁵ cfu/mL, 10⁴ cfu/mL y 10³ cfu/mL para cada bacteria, incorporando adicionalmente dos muestras de tejido foliar sin inóculo de bacterias. La muestra se maceró en mortero con nitrógeno líquido hasta formar un polvo, el que se traspasó a un tubo falcón de 15 mL y se le agregaron 4 mL de Grinding buffer. La muestra se centrifugó durante 30 minutos a 13000 g a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se agregó a cada tubo 4 mL de Buffer de extracción, 80 µL de proteinasa K y 440 µL de NaLS al 10%, el que se mezcló por inversión. Se incubaron los tubos durante 1 hora a 55°C y luego se centrifugaron 10 minutos a 7500 rpm a 4°C. El sobrenadante obtenido en cada tubo se agregó a un nuevo tubo que contenía 2,5 mL de isopropanol y se mantuvo a -20°C durante la noche. Posteriormente se centrifugó a 7500 rpm por 15 minutos para dejar precipitar el pellet. Luego de esto, se eliminó el sobrenadante y se agregó 3 mL de buffer TE, donde se resuspendió el pellet con ayuda de una pipeta estéril, añadiendo además 50 µL de RNAsas y 75 µL de SDS al 20%, que se mezcló por medio de inversión para evitar burbujas. Lo anterior se llevó a incubación a 37°C por 1 hora, y posteriormente se agregó al tubo 525 µL de NaCl 5M más 420 µL de CTAB/NaCl, mezclado por medio de movimientos circulares. Estos se incubaron por 10 minutos a 65°C. A cada tubo se le agregó 2 mL de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 y 2 mL de fenol, agitando enérgicamente por 20 segundos, y luego se centrifugaron por 10 minutos a 6500 rpm. La fase superior se agregó a un nuevo set de tubos con 4 mL de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 y se agitó nuevamente por 20 segundos. Se llevaron nuevamente a centrifuga por 10 minutos a 6500 rpm y la fase superior se agregó a un nuevo set de tubos con 2,5 mL de isopropanol, el cual se mantuvo a -20°C durante la noche. El extracto obtenido se llevó a centrifuga por 30 minutos a 13000 g para hacer precipitar el pellet y se eliminó el sobrenadante obtenido. Posteriormente se agregó 1 mL de etanol al 70% en cada tubo, agitando ligeramente para desprender el pellet sin romperlo, lo que se centrifugó por 10 minutos a 13000 g, eliminado más tarde el sobrenadante. A cada tubo se agregó 100 µL de buffer TE para disolver el pellet, lo que se almacena finalmente a -20°C. Los extractos de DNA obtenidos fueron utilizados para análisis PCR y LAMP. El protocolo de amplificación de PCR contempló una incubación a 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos que iniciaban a partir de la desnaturalización a 94°C por 45 segundos, apareamiento de los partidores por 30 segundos a una temperatura de 65°C, que continuó con la elongación por 45 segundos a 72°C y con una extensión final de 72°C durante 7 minutos seguida por la reducción de la temperatura a 10°C por un tiempo indefinido para enfriamiento y conservación de las moléculas

de DNA sintetizadas. Para LAMP el protocolo de amplificación está constituido por una única etapa de amplificación a 65°C por 60 minutos, seguido de un aumento de la temperatura a 85°C por 5 minutos para evitar la degradación de la enzima posterior a la amplificación, finalizando con una reducción de la temperatura a 10°C por tiempo indefinido para la conservación de las muestras. En ambos casos se visualizaron los resultados de la amplificación a través de un gel de agarosa al 1,2%.

RESULTADOS

Objetivo 1: Diseñar partidores para la detección, a través de la técnica LAMP, de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*

Aislamiento y purificación de cepas bacterianas

Se obtuvo un total de 10 placas KB con aislados bacterianos. Cada placa presentó crecimiento de colonias correspondientes a las indicadas en el Cuadro 3, sin registrarse contaminación en ninguna de ellas o en el blanco. De estos, solo 6 de los 10 aislados presentaron fluorescencia (9298.1, 11116B1, S2, H07.18, 11117YB4, b191) (Apéndice 1).

Cuadro 3. Código de las colonias crecida en KB que presentaban morfología típica de las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*. Se detalla hospedero y zona de muestreo.

Código colonia	Hospedero	Zona de muestreo
11116B1	<i>Prunus avium</i>	San Fernando, R. de O'Higgins
9298.1	<i>Prunus avium</i>	San Fernando, R. de O'Higgins
44527	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Linares, R. del Maule
133398	<i>Solanum lycopersicum</i>	Quillota, R. de Valparaíso
11116B2	<i>Prunus avium</i>	San Fernando, R. de O'Higgins
11117YB4	<i>Prunus avium</i>	San Fernando, R. de O'Higgins
M11	<i>Actinidia deliciosa</i> (Kiwi)	Chillán, R. de Ñuble
b191	<i>Prunus avium</i>	San Fernando, R. de O'Higgins
S2	<i>Prunus avium</i>	Curicó, R. del Maule
H07.18	<i>Prunus avium</i>	Curicó, R. del Maule

Identificación de aislados bacterianos chilenos y obtención del genoma completo de los aislados identificados

Análisis multilocus (MLSA)

Desde el análisis multilocus, realizado a partir del DNA de cada una de las 10 colonias en estudio, se obtuvo amplificación en 4 (*gyrB*, *rpoD*, *pgi*, *cts*) de los 7 genes para cada uno de los 10 aislados,

mientras que los genes *acn*, *pfk* y *gapA* solo se encontraron presentes en algunos de estos (Apéndice 2). Por lo tanto, se enviaron a secuenciación los productos de amplificación de los 4 genes obtenidos por la totalidad de los aislados bacterianos, incluyendo además el gen 16S rRNA, para el cual todos los aislados seleccionados también presentaron amplificación.

Utilizando únicamente las secuencias de los genes *Housekeeping gyrB*, *rpoD*, *pgi*, *cts* se esquematizó el árbol filogenético para el MLSA que se aprecia en la figura 1, el que además de incluir los 10 aislados, también incluía 34 secuencias provenientes desde el NCBI, obtenidas desde diferentes estudios, aisladas desde diferentes cultivos y zonas geográficas (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Se observa la formación de un cluster de los aislados S2, H07.18, 9298.1, 11116B1 y 11117YB4, todos ellos cercanos a especies referenciales para la patovar Pss (EUPS2) mientras que los restantes aislados se encuentran a diferentes distancias de este grupo. En base a estos resultados parciales es que se identifica que al menos estos 5 aislados son Pss, mientras que los aislados 44527 y M11 pertenecen a la especie *Pseudomonas syringae*, sin poder definir con exactitud el patovar por la falta de análisis bioquímicos confirmatorios. En cuanto a los aislados 133398, b191 y 11116B2, se logró determinar la identidad de ellos a través de MLSA y análisis bioquímicos, como indicado en el Cuadro 4.

Average Nucleotide Identity by BLAST (ANIb)

Considerando los resultados obtenidos desde el MLSA para los 4 genes incluidos en el análisis y la parcialidad de la identidad de los aislados en base a este análisis, se realizó el análisis ANIb, esquematizado en un árbol filogenético, a partir del genoma de las secuencias identificadas parcialmente como Pss, incluyendo 4 de los 5 aislados de Pss de este trabajo (no se incluyó el aislado 11117YB4 en cuanto similar a los otros 4 por MLSA y por proceder de mismo hospedero y misma localidad que algunos de los otros 4). A ello se le sumaron los aislados b728a (Número de acceso Genbank: NC_007005.1) y PSS-B31D (Número de acceso Genbank: ??????) como aislados de referencia de Pss. Para contribuir aún más a la diversidad en el análisis ANIb se agregaron 3 genomas de especies pertenecientes al género *Pseudomonas* obtenidas a través de NCBI, que corresponden a PSS B64 (Número de acceso Genbank: CM001763.1), GCA_001401075.1 (Número de acceso Genbank: LJRK01000151.1) y GCA_002917175.1 (Número de acceso Genbank: NZ_MLEV00000000.1) junto a los aislados M11, 44527, 11116B2 y 133398. Se observa nuevamente que los aislados chileno de Pss se unen en un mismo cluster juntos con los aislado de referencia para Pss. Además, este cluster se separa claramente de los otros en los cuales hay otras bacterias no Pss (Figura 2).

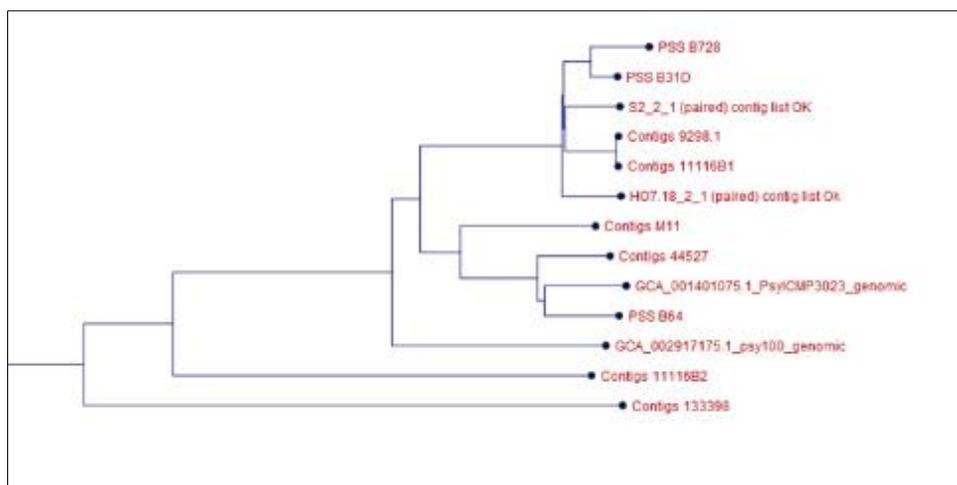


Figura 2. Árbol filogenético del genoma completo de aislados de *Pseudomonas*. Incluye los aislados S2, 9298.1, 11116B1, HO7.18, M11, 44527, 11116B2, 133398 (Cuadro 4) junto a genomas obtenidos desde el NCBI. Genomas de referencia: B728a (Número de acceso Genbank: NC_007005.1), PSS-B31D.

Por medio de este análisis, que permite la búsqueda de regiones homólogas entre los genomas comparándolas a una referencia e indicando valores de identidad para cada fragmento, se logró determinar y ratificar la identidad de los aislados estudiados en base a un punto de corte de separación de especies que corresponde al 95% de identidad. La formación de este cluster de bacterias correspondientes a Pss, que contiene los aislados 9298.1, 11116B1, HO7.18 y S2, junto a b728a y PSS-B31D, junto con el análisis MLSA y filogenia de genoma completo, ratifican la identidad de 4 de los aislados en estudio (9298.1, 11116B1, HO7.18 y S2) como Pss (Figura 3).

Para confirmar la identidad del aislado 11116B2 como *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* se realizó un nuevo ANIb, que incluía el mencionado aislado, una bacteria referencial para la

especie Psm (PSM CFBP2116), 2 aislados identificados como Psm chilenos (no son parte de este estudio), junto con aislados referenciales para las especies Psa (ICMP18884), Pss (b728a), Pst (DC3000), *P. s. pv. avellanae*, *P. s. pv. veroni* (parte de la colección de bacterias del Laboratorio de Fitovirología de la Universidad de Chile) y un aislado supuestamente perteneciente al grupo *Pseudomonas syringae*. Los resultados de este análisis permiten confirmar la identidad del aislado 11116B2 como Psm con el 99,42% de identidad respecto a la secuencia de referencia (Figura 4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
PSS B31D	1	99.52	94.76	94.14	94.60	98.57	88.65	85.82	94.89	98.56	76.44	95.10	98.54	98.51	
PSS B728	2	98.52		94.83	94.13	94.63	98.52	88.58	85.86	94.89	98.51	76.43	94.99	98.45	98.39
PSS B64	3	94.76	94.83		94.31	97.04	94.73	88.48	85.68	97.98	94.72	76.35	98.09	94.71	94.69
GCA_002917175.1_pay100_genomic	4	94.14	94.13	94.31		94.21	94.14	89.04	85.73	94.36	94.14	76.29	94.81	94.15	94.14
GCA_001401075.1_PsytICMP3023_genomic	5	94.60	94.63	97.94	94.21		94.70	88.39	85.65	97.85	94.68	76.29	98.02	94.65	94.63
Contigs 11116B1	6	98.57	98.52	94.73	94.14	94.70		88.65	85.77	94.91	99.94	76.37	95.06	98.57	98.48
Contigs 11116B2	7	88.65	88.58	88.48	89.04	88.39	88.65		86.81	88.51	88.64	76.09	88.51	88.60	88.00
Contigs 133398	8	85.82	85.86	85.68	85.73	85.66	85.77	86.81		85.79	85.78	76.29	85.94	85.83	85.83
Contigs 44527	9	94.89	94.89	97.98	94.38	97.85	94.91	88.51	85.79		94.91	76.45	98.27	94.82	94.84
Contigs 9298.1	10	98.56	98.51	94.72	94.14	94.68	99.94	88.64	85.76	94.91		76.39	95.06	98.57	98.48
Contigs b191	11	76.44	76.43	76.35	76.29	76.29	76.37	76.09	76.29	76.45	76.39		76.37	76.48	76.42
Contigs M11	12	95.10	94.99	98.09	94.81	98.02	95.06	88.61	85.94	98.27	95.06	76.37		95.04	95.04
B2_2_1 (paired) contig list OK	13	98.54	98.45	94.71	94.15	94.68	98.57	88.60	85.83	94.82	98.57	76.48	95.04		98.48
H07.18_2_1 (paired) contig list OK	14	98.51	98.39	94.69	94.16	94.63	98.48	88.60	85.83	94.84	98.48	76.42	95.04	98.49	

Figura 3. Average Nucleotide Identity realizado con 9 aislados obtenidos en este trabajo (S2, H07.18, 11116B1, 9298.1, 11116B2, 133398, 44527, M11 y b191) junto con 2 aislados de referencia para Pss y 3 aislados pertenecientes al grupo *Pseudomonas syringae*.

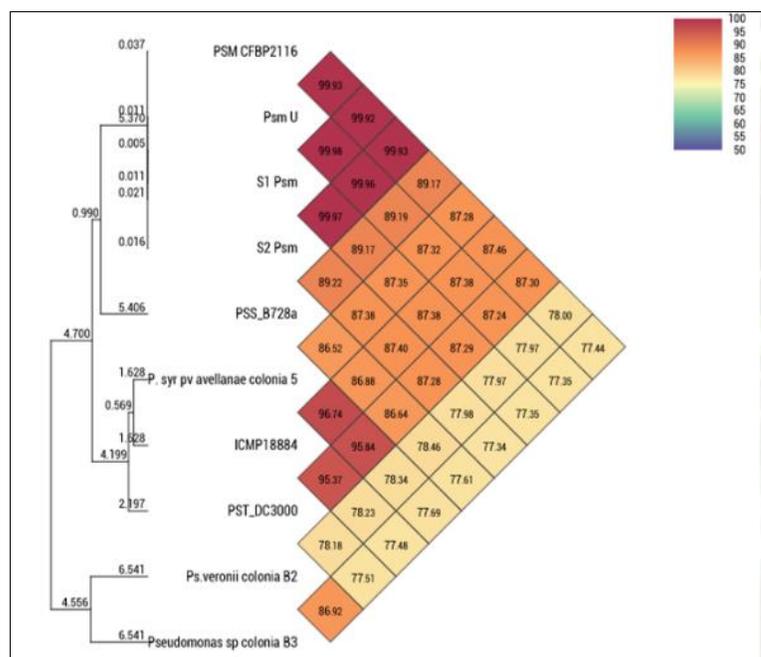


Figura 4. Average Nucleotide Identity para Psm a partir del aislado 11116B2 (Psm U, en la figura) contra el genomas de referencia de Psm (PSM CFBP2116), incluyendo además genomas de referencia para Pss (b728a), Psa (ICMP18884), Pst (DC3000), *Ps. pv. avellanae*, *Ps. pv. veroni*, sumado a aislados chilenos de Psm.

En base a los análisis anteriormente realizados es que se concluye que existen 4 aislados identificados como Pss (9298.1, S2, H07.18 y 11116B1). Si bien no se contaba con la secuenciación del genoma completo del aislado 11117YB4, se logró identificar mediante análisis MLSA la identidad de este aislado como Pss. Además, se confirmó la presencia de Psm (11116B2), y se logró identificar *Pseudomonas fluorescens* (b191), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (133398) y dos aislados que pertenecen al grupo *Pseudomonas syringae* (M11 y 44527). No fue posible determinar fehacientemente la identidad de M11 como de 44527 en base a los estudios realizados, lo que requerirá de pruebas futuras, ya que no se puede descartar que estos aislados, parte del filogrupo I, no correspondan a Pss (Cuadro 4).

Cuadro 4. Identificación de los 10 aislados en estudio (indicados inicialmente en el Cuadro 1) de acuerdo a este estudio.

Muestra	Identidad
1116B2	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>
133398	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
44527	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. no asignado
11116B1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
9298.1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
S2	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
H07.18	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
b191	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
11117YB4	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
M11	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. no asignado

Diseño de partidores para la detección de Pss y Psm por LAMP y PCR

Utilizando los genomas validados de los 10 aislados colectados, es que se realizó la búsqueda de regiones genómicas específicas para cada bacteria. Se llevaron a cabo cuatro comparaciones de genomas, 2 de las cuales se realizaron a partir del aislado S2 (Pss), el que se contrastó contra los aislados 11116B2, 11116B1, 9298.1, 44527, M11, H07.18 y B728a (aislado de referencia de Pss), mientras que las 2 restantes se hicieron para identificar genes específicos de Psm, para lo cual se utilizó el aislado 11116B2 y se comparó contra 2 aislados de Psm obtenidos desde la base de datos PATRIC 3.6.12 (<https://www.patricbrc.org/>), sumado a los aislados 11116B1, S2, H07.18, 9298.1, 44527 y M11 (Apéndice 3).

Mediante el análisis y comparación de genomas, y en base a los criterios establecidos explicados en materiales y métodos, es que se escogió un set de genes, tanto para Pss como Psm, los cuales se encuentran identificados en el Cuadro 5. El resto de los genes obtenidos en la búsqueda se incorporan en el Apéndice 4.

Cuadro 5. Genes obtenidos a través de la búsqueda por RAST de las secuencias incorporadas.

Bacteria	Gen	N° identificación RAST
Pss	Glutathione-dependent formaldehyde-activating enzyme	205918.102.peg.784
Psm	Type III effector HopAU1	129138.39.peg.1039

Para seleccionar los genes con mayor potencial se diseñaron partidores PCR para cada uno de los genes anteriormente mencionados, los que se probaron contra los 10 aislados chilenos mencionados en el Cuadro 4. Los análisis PCR mostraron una mayor eficiencia en la detección de Pss para las parejas de partidores Gfa1_F3/B3 y Gfa4_F3/B3 (ambos diseñados a partir del gen *Glutathione-dependent formaldehyde-activating enzyme*) y para Psm con la pareja de partidores HopAU1_F3/B3 (diseñado a partir del gen *Type III effector HopAU1*), cuyos resultados se mencionan en el Cuadro 6. En el Apéndice 5 y 6 se encuentran los geles de estos análisis. Para la detección de las bacterias a través de LAMP se diseñaron los partidores internos (FIP y BIP) de cada gen que, juntos con los partidores para PCR (los denominados F3/B3), permitieron el desarrollo de esta técnica (Cuadro 7). Son estos los partidores que se utilizaron para las sucesivas pruebas de especificidad y sensibilidad tanto para PCR como LAMP.

Cuadro 6. Resultados PCR de los 10 aislados chilenos, identificados a partir de los partidores específicos para detección de Pss y Psm.

		11116B1	9298.1	S2	H07.18	11117YB4	M11	11116B2	44527	133398	b191
Parejas de partidores	Gfa1 (Pss)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	Gfa4 (Pss)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	HopAU1 (Psm)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Cuadro 7. Listado de partidores PCR y LAMP diseñados para Pss y Psm.

Bacteria	Partidores	Secuencia partidores (5' - 3')	Tamaño del amplicón PCR (bp)
Pss	Gfa1_F3	CACTGCATAACCACGCCTG	227
	Gfa1_FIP	GATTGACTACCGCGATGACGGGGTTGCAGTAAA TGCTGGAAACC	
	Gfa1_BIP	CAGCCAAACTGACCATCATTGATGGACCATACAT GTGGGCACCACATTC	
	Gfa1_B3	AATCCAGACCGTGGAACGC	
	Gfa4_F3	TTTGCAGGCGGCACTCT	237
	Gfa4_FIP	AGGTTTGCCGTCATCGCGGTTTTTTTTTTTATCAA TGATGGTCAGTTTGGCT	
	Gfa4_BIP	GCATTTACTGCAACCGCAGGCTTTTTTTTTTGGTT GAGGTCAAAGTCGATGCTC	
	Gfa4_B3	ACATTCTTTGCAGGCGTGAC	
Psm	HopAU1_F3	GGCCTGAAGCGGCTGAGT	339
	HopAU1_FIP	TGTTTATTTGACCAGCCGGCAAGAGTTTTTTTTTT CTGTCTTTGGAACCCTCCTGTG	
	HopAU1_BIP	AAGCCCGTTCAATCAGTTAGTGCATTTTTTTTTTT ATTCATGAGAGCATGACGCTTCT	
	HopAU1_B3	CTGTTTGCGTGATGCCACT	

Objetivo específico 2: Validar la técnica LAMP y PCR con aislados bacterianos purificados.

Identificación de aislados por medio de técnicas moleculares y pruebas de fluorescencia

En los huertos se colectaron 107 muestras de cerezo con y sin sintomatología asociada a Pss/Psm, y se usaron 3 tipos de materiales vegetales (cancros, raíces y ramillas). Se seleccionó un total de 246 colonias, algunas de las cuales se observan en la figura del Apéndice 7. Considerando la calidad final de las secuencias obtenidas por secuenciación Sanger se seleccionaron 131 aislados a ser utilizados para probar la selectividad del método, los cuales se categorizaron de acuerdo a su género, obteniendo un total de 30 géneros listados en el Apéndice 8. Con los partidores validados

dentro de los 10 aislados chilenos, se realizó el análisis PCR para la detección de Pss y Psm entre los aislados bacterianos pertenecientes al género *Pseudomonas* procedentes del muestreo en huertos (Apéndice 8) y aquellos procedentes de la colección de bacterias del CEAF.

Cuadro 7. Resultados PCR de los 10 aislados chilenos, identificados a partir de los partidores específicos para detección de Pss y Psm.

En cuanto a los 30 aislados de *Pseudomonas*, parte del muestreo de huertos, el resultado mostró que de las 30 bacterias clasificadas como *Pseudomonas* sp., 3 de ellas (D100, D101 y D106) mostraron amplificación para la pareja de partidores Gfa1 (Apéndice 9). Para validar estos resultados, se realizó un MLSA a partir de 3 genes *housekeeping* (*gyrB*, *cts* y *pgi*), incluyendo los 10 aislados chilenos y las 34 secuencias obtenidas de Genbank previamente utilizadas para el MLSA, donde estos 3 aislados que amplificaron con Gfa1 se unen al cluster de bacterias identificadas como Pss (Apéndice 10). Los mismos partidores Gfa1 amplificaron únicamente los aislados identificados por el CEAF como *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Apéndice 11) y no se encontraron Psm entre las bacterias proporcionadas por el CEAF.

Optimización de protocolo LAMP

La optimización del protocolo para LAMP mostró un mejor funcionamiento a concentraciones de MgSO_4 de 6 mM, sin embargo, se observó amplificación en igual medida a 8 mM, de una mayor intensidad de banda que a 6 mM, pero con inhibición en la amplificación algunas muestras. Se estandarizó el tiempo de amplificación a 60 minutos, y la temperatura a 65°C. Si bien a 62°C existía amplificación se observaba bandas más difusas y de menor intensidad de banda, con bandas inespecíficas que distaban de posición entre muestras de la misma especie. La adición de formamida a la reacción permitió reducir la formación de estructuras secundarias, sin embargo, a pesar de validar elementos dentro del protocolo de amplificación, no se logró repetitividad en los resultados obtenidos bajo estas condiciones. Se observó amplificación para Psm utilizando 1 μL de cada partidor, lo que corresponde a una concentración de 1 μM . De los dos grupos de partidores para Pss, solo amplificaron los correspondientes a Gfa4, utilizando la concentración de 0,2 μM de los externos (F3 y B3) y 1,6 μM de los internos (FIP y BIP).

Pruebas de especificidad

Los resultados de PCR para Pss mostraron, que la pareja de partidores Gfa1 es específica, amplificando solo los 5 aislados chilenos anteriormente identificados como Pss (11117YB4, 11116B1, 9298.1, S2 y H07.18), junto con el aislado M11, perteneciente al filogruppo 1 de *Pseudomonas* y ninguno de los géneros mencionados en el Apéndice 8 (ver también geles en Apéndice 12). Mismo caso ha ocurrido con la pareja de partidores Gfa4 para los 10 aislados chilenos (Apéndice 13), sin observarse amplificación en ninguno de los 30 género listados en el Apéndice 8 (Apéndice 14). Para Psm, el PCR tampoco amplificó a ninguno de los 30 géneros incluidos en los análisis (Apéndice 15).

En el caso del LAMP, se realizó la prueba contra los 10 aislados chilenos mencionados en el Cuadro 3. Los resultados muestran que para Psm se obtuvo amplificación únicamente en el aislado 11116B2 correspondiente a *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* (Apéndice 16). Mientras que en el caso de Pss se observó amplificación en el conjunto de aislados Pss (9298.1, 11116B1, 11117YB4, H07.18 y S2) así como también en M11 (*P. syringae* no identificado) y 133398 (Pst). Sin embargo, a pesar de esto, la amplificación observada en 133398 muestra un patrón de bandas diferente con respecto a lo que presentan los aislados Pss y M11 (Apéndice 18).

Pruebas de sensibilidad

Para el ensayo de sensibilidad con PCR, en el caso de los aislados de Pss, se observó amplificación hasta la 3^a o la 4^a dilución, correspondientes a una concentración de entre 100 picogramos por μL hasta 10 picogramos por μL (Apéndice 19). Para el único aislado de Psm (11116B2) se procedió de manera similar, logrando detectar hasta 100 picogramos por μL (Apéndice 20).

En el caso de LAMP para Pss, la amplificación mostró resultados no concluyentes, ya que existe amplificación de manera no consecutiva en las diferentes alícuotas de distintas concentraciones. Además, no se logró obtener un resultado replicable a pesar de los múltiples ensayos. Similares condiciones se observaron en Psm, donde no se logró establecer el límite de detección debido a que no existió amplificación consecutiva de las alícuotas de DNA a diferentes concentraciones de esta bacteria (Apéndice 21).

Objetivo específico 3: Validar la técnica LAMP en material vegetal sin aislar previamente las bacterias

Comparación de técnicas de detección

Se compararon las técnicas de detección por PCR y LAMP, para identificar cuál de estas tenía más ventajas de uso bajo los estándares establecidos en este trabajo. Se obtuvo una mayor sensibilidad de la técnica LAMP con respecto al PCR, siendo capaz de detectar hasta 10^3 ufc/mL de bacterias, tanto con Pss como Psm, resultados que se observan en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Sensibilidad de las técnicas de detección PCR y LAMP. Se señala, junto a cada método de detección, si la amplificación de bacterias desde material vegetal resultó positiva (+) o negativa (-).

		10 ⁷ ufc/mL	10 ⁶ ufc/mL	10 ⁵ ufc/mL	10 ⁴ ufc/mL	10 ³ ufc/mL	Bco (muestra vegetal sin bacterias)
PCR	Pss	+	+	-	-	-	-
	Psm	+	+	-	-	-	-
LAMP	Pss	+	+	+	+	+	-
	Psm	+	+	+	+	+	-

DISCUSIÓN

La clasificación filogenética de especies dentro del género *Pseudomonas* ha sido objeto de múltiples estudios, y solo recientemente se ha logrado claridad en cuanto a esta. Hace unas décadas, la caracterización de especies, junto con las propuestas para la clasificación, se basaba en las pruebas fisiológicas, bioquímicas, serológicas y biológicas (Gomila *et al.*, 2017) y, además, el número de especies era limitado. Los primeros estudios en utilizar las técnicas moleculares de clasificación filogenéticas están ligados a la designación de especies por el gen 16S rRNA (Moore *et al.*, 1996). Sin embargo, el uso de un solo gen aún presentaba deficiencias en la clasificación, en especial debido a que las variaciones de las secuencias del gen 16S rRNA no permite discriminar entre especies bacterianas (Gomila *et al.*, 2017). Más aún, la clasificación a nivel de patovar, sobre todo dentro de la especie *Pseudomonas syringae*, también ha sido cuestionada, dado que esta clasificación está basada en el resultado de los ensayos de patogenicidad utilizando un determinado rango de hospederos (Young *et al.*, 1978), lo que en especies polífagas como Pss, resulta confuso y complejo. Además, se debe acotar que una gama genéticamente diversa de patógenos tiene muchas veces hospederos muy similares, o presentan un rango de superposición de hospederos (Bull *et al.*, 2011). Si bien hace unos años el complejo de *Pseudomonas syringae* incluía más de 60 patovares definidos en base al rango de hospederos (Young *et al.*, 1978; Dye *et al.*, 1980; Young, 2010), con 9 genomaespecies designadas en base a sondas de hibridación (Gardan *et al.*, 1999), estas derivaron a la designación posterior de filogrupos basados en la similaridad de genes *housekeeping*, considerando así un enfoque molecular y genómico. La clasificación filogenética de especies dentro del grupo *Pseudomonas* logró mayor precisión gracias a la incorporación de análisis multilocus (MLSA) con base en genes *housekeeping*, sin embargo, aún con esto, la clasificación de especies resultaba confusa en algunos filogrupos, y el número de filogrupos variaba de estudio en estudio (Bull *et al.*, 2011; Berge *et al.*, 2014; Gomila *et al.*, 2015). Hoy en día los análisis basados en el genoma de las bacterias, junto con la incorporación de diferentes algoritmos como ANIb, que permite la comparación de genomas completos o casi completos o el cálculo de distancias de genoma a genoma (GGDC), han remplazado los modelos de hibridación y entregado mayor precisión a la clasificación filogenética dentro del complejo *Pseudomonas syringae*, confirmando la validez de los análisis MLSA. Considerando el trabajo realizado por Gomila *et al.* (2017), el presente estudio se enfocó en el uso combinado de las técnicas MLSA y ANIb en apoyo al desarrollo de los protocolos LAMP y PCR, específicos y sensibles, para la detección de Pss y Psm. La relación y cercanía filogenética de las diferentes especies bacterianas es un punto limitante para el diseño de partidores, debido a la similitud de su genoma. Es esperable que especies cercanas filogenéticamente compartan una mayor cantidad de genes que aquellas que se encuentran alejadas, aun perteneciendo a un mismo género. Es por lo anterior que el modelo generado por Gomila *et al.* (2017) permite definir con un alto grado de seguridad que Pss es parte del filogrupo I, dentro del cual también se encuentran *P. congelans*, *P. cerasi* y un clado A, que contiene a la cepa B728a, especie referencial de Pss, con un índice ANI sobre el 95%, considerando que el punto de corte establecido para este análisis es superior al 95% de identidad de las secuencias comparadas con respecto al genoma de referencia definido. En cuanto a Psm, perteneciente al filogrupo 4, el conjunto de los índices (ANIb, GGDC y MLSA) permiten separarlos de la especie *syringae*, en cuanto posee un índice ANIb de 89,4%. Es por esta razón que algunos autores sugieren el cambio

de género (y de nombre) de Psm a *Pseudomonas amygdali* pv. *morsprunorum* (Jung *et al.*, 2022). Tal y como permite concluir este estudio, el uso de estos algoritmos resulta útil para la clasificación taxonómica, logrando definir el grado de relación filogenética en base a su genoma, permitiendo delimitar el grupo de especies cercano filogenéticamente a cada cepa (Pss y Psm) que se deben considerar en la búsqueda de genes específicos como objetos de comparación.

Para análisis MLSA en *Pseudomonas* se ha considerado una gran gama de genes en literatura. En este trabajo se consideraron 7 genes previamente reportados por Sarkar y Guttman (2004), donde se utilizaron los genes *housekeeping cts* (citrate synthase), *gapA* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *rpoD* (RNA polymerase sigma factor 70), *pgi* (phosphoglucoisomerase), *gyrB* (DNA gyrase subunit B), *pfk* (phosphofruktokinase) y *acnI* (aconitate hydratase B). Estos genes fueron seleccionados inicialmente debido al rol clave que juegan en el metabolismo de carbohidratos o debido a que han sido utilizados previamente como marcadores filogenéticos, tal como es el caso de *gyrB* o *rpoD* (Sawada *et al.*, 1999).

El uso de ANIb y MLSA, gracias a su validación en diferentes estudios (Sarkar y Guttman, 2004; Mulet *et al.*, 2010; Berge *et al.*, 2014; Gomila *et al.*, 2015; Gomila *et al.*, 2017; Hulin *et al.*, 2018b; Hulin *et al.*, 2020), permitió identificar, utilizando dos Pss referenciales (B728a y PSS-B31D), a 5 aislados chilenos, cuyas secuencias se utilizaron para el diseño de partidores, junto con las cepas referentes. Se logró el mismo objetivo con la otra bacteria asociada al cáncer en cerezo, identificando la cepa 11116B2 como Psm a través de ANIb, con el 99,93% de similitud del genoma respecto a un aislado referencial de Psm (PSM CFBP2116). El aislado local de Psm también se utilizó para el diseño de partidores. La importancia del uso de aislados procedentes de huertos chilenos para el diseño de partidores, recae en dos factores: en primer lugar, y comprobado también por diferentes estudios filogenéticos realizados en *Pseudomonas* (Berge *et al.*, 2014; Gomila *et al.*, 2015; Gomila *et al.*, 2017), el uso de secuencias provenientes de distintas bases de datos no siempre resulta útil, debido a que la clasificación taxonómica de muchas de ellas solo se realizó a partir de pruebas fisiológicas, bioquímicas, serológicas y/o biológicas, no logrando identificar correctamente el aislado utilizado; en segundo lugar, el uso de aislados chilenos tiene como beneficio el desarrollo de partidores optimizados a las variantes chilenas. Tal y como se desarrolla en este trabajo, la identificación de aislados a través de análisis bioinformáticos cuales MLSA y ANIb, permite la identificación de los aislados con una mayor precisión, lo que entrega seguridad en que el uso de secuencias para el diseño de partidores sea inequívoco.

La búsqueda de genes específicos, aún con la certeza otorgada por los análisis bioinformáticos incorporados en este trabajo, resulta compleja. Por medio de la plataforma RAST es posible reconocer una serie de genes que podrían ser usados para el diseño de partidores, sin embargo, no todos ellos resultan específicos para la especie, trabajo que se convierte particularmente complejo en el caso de Pss. Lo anterior se debe a varios factores, a destacar en primer lugar la gran cantidad de hospederos infectados por Pss, que aumenta si se considera solo la especie *Pseudomonas syringae*, la cual es capaz de causar enfermedad en aproximadamente 180 especies vegetales (Berge *et al.*, 2014). Considerar la especie *Pseudomonas syringae* y no solo la patovar Pss, es fundamental para la búsqueda de genes específicos, ello porque comparten un gran número de hospederos (entre la mayoría de los cuales no necesariamente se encuentra el cerezo) (Vicente *et al.*, 2004; Rossetti y Balestra, 2008), que sumado a la cercanía filogenética, implica que las especies incluida en el primer filogrupo, pueden llegar a compartir un gran número de genes, dificultando

la búsqueda de genes específicos (Gomila *et al.*, 2017). La complejidad aumenta si se consideran los genes pertenecientes a la isla de patogenicidad (TSIII), ya que se ha reportado la pérdida y ganancia de genes entre especies de *Pseudomonas*, lo que sucede tanto en Pss como Psm (Hulin *et al.*, 2018a). Es con ello que los genes específicos encontrados para ambas patovares son tales por haber superado los diversos filtros antes descritos, al momento de comparar los genomas de los 10 aislados chilenos (Cuadro 4) y los disponibles en Genbank. Si bien la bioinformática indica especificidad, se observa, para el análisis de PCR, que la pareja de partidores externos F3 y B3 de Gfa1, lograron amplificar un aislado (M11) que no ha sido identificado aún, pero que se conoce es parte del grupo de *Pseudomonas syringae*. Los análisis bioinformáticos (ANIb) muestran que las secuencias de Pss y M11 se encuentran muy cercanas al punto de separación de especies, y análisis comparativos entre los aislados chilenos de Pss y M11 muestran diferencias relativamente bajas en cuanto a la secuencia del gen *Glutathione-dependent formaldehyde-activating enzyme*, lo que aún no permite clarificar fehacientemente la información relativa en torno a M11. Ya que no existe claridad en la identidad de este aislado, a pesar de los análisis antes ejecutados, es posible que pueda existir amplificación para el gen, lo que se debe clarificar en futuros análisis. Incluso, si M11 no corresponde a Pss, hay que considerar que el gen utilizado para el diseño de partidores Gfa1 y Gfa4 (F3/B3) para la detección de Pss sintetiza una enzima asociada a la ruta de detoxificación del formaldehído (Apéndice 22), elemento que se genera en la planta como una respuesta de defensa ante la presencia de bacterias patógenas que colonizan el tejido vegetal (Van Ophem y Duine, 1994; Shafqat *et al.*, 1996; Gutheil *et al.*, 1997). Esta defensa se activa durante el proceso de infección, por lo que es posible que el gen esté presente también en otras *Pseudomonas*, pero con modificaciones en su secuencia. También cabe notar que, partiendo de una misma región genómica es posible diseñar un alto número de parejas de partidores, algunos de los cuales, a pesar de aparecer como específicos, al momento de su uso podrían no serlo, especialmente para la detección de bacterias dentro de un mismo filogrupo. En definitiva, los partidores Gfa1 han demostrado tener una especificidad mayor a partidores ya reportados para Pss (Sorensen *et al.*, 1998; Borschinger *et al.*, 2015; Yoshioka *et al.*, 2020), no observándose amplificación con ninguno de los aislados no Pss incorporados en el análisis, con la única excepción del aislado M11. Es importante recordar que M11 ha sido aislado desde kiwi, por lo tanto, es muy poco probable que estuviera presente también en cerezo. A pesar de lo anterior, y como proyección, es importante considerar el diseño de nuevas parejas de partidores para la detección de Pss en base al mismo gen, con el fin de reducir o limitar aún más estas posibles inespecificidades.

En cuanto a Psm, el elegido ha sido el gen de patogenicidad HopAU1, asociado a efectores del tipo III (TSIII), el cual en estudios de mutagénesis por transposones se ha visto incrementa los síntomas y favorece la multiplicación de la bacteria en planta. Este gen ya ha sido reportado en *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* R1 y R2 y se sabe ausente en especies como Pss (Hulin *et al.*, 2018). Aún no se ha logrado determinar la función específica que cumple este gen, específicamente en relación a la patogenicidad. Para la detección de Psm, se ha observado una alta especificidad de la pareja de partidores PCR, HopAU1 F3/B3, sin mostrar amplificación para ninguno de los 30 géneros incluidos y tampoco para los restantes 9 aislados chilenos incluidos en el estudio (Cuadro 4).

En cuanto a la sensibilidad, la concentración de DNA bacteriano detectado por la pareja de partidores HopAU1 F3/B3 fue de 100 pg/μL en el caso de Psm, mientras que con la pareja de

partidores Gfa1 F3/B3 se obtuvo amplificación hasta 10 pg/μL para algunos aislados de Pss. Comparativamente, en base a estudios ya publicados, se han reportado bajos niveles de detección en PCR (Yoshioka *et al.*, 2020), sin embargo, la detección se ha realizado desde aislamiento de colonias, reportando hasta 10³ cfu/mL. En el presente trabajo se realizó la detección desde extracciones de DNA, y si bien no es posible comparar los niveles entre ambos protocolos, la detección es considerada sensible para cada pareja de partidores (Gfa1 y HopAU1). Aunque se observaron límites de detección más bajos en algunos aislados de *Pseudomonas* presentes en este estudio (hasta 10 pg/ μL), esto obedece en mayor medida al operador y la realización misma del PCR, ya que las concentraciones de DNA se encuentran estandarizadas para cada aislado. En el caso de LAMP no se determinó el límite de sensibilidad para ninguno de los grupos de partidores (Gfa4, HopAU1), debido mayormente a la amplificación no consecutiva de las diferentes concentraciones de DNA probadas en este estudio. Esto último puede estar asociado a problemas en el diseño de los partidores internos (FIP y BIP) para cada grupo de partidores (Gfa4 y HopAU1), lo que generaría inhibición en la amplificación, lo que también explicaría por qué no se logró unificar un protocolo de amplificación LAMP. Es por ello que se generó la propuesta del grupo de partidores Gfa4 para Pss, listados en el Cuadro 8, que soluciona estas limitantes y muestra repetitividad en los resultados. Además, los protocolos establecidos con este grupo de partidores concuerdan con otros ya publicados (Niessen y Vogel, 2010; Duarte *et al.*, 2018; Kini *et al.*, 2021; Suzaki *et al.* 2021; Swarna *et al.*, 2022). Como se comenta en los resultados, el grupo de partidores Gfa4 (F3, FIP, BIP y B3) mostró amplificación para el aislado 133398, identificado como Pst, sin embargo, con la pareja de partidores Gfa4 (F3 y B3) no se observó esta amplificación. Esto indicaría que la amplificación de Pst en LAMP ocurriría debido a interferencias propias de los partidores internos (FIP y BIP) de Gfa4, que se evitarían posiblemente con el aumento en la concentración de formamida por muestra o el aumento de la temperatura en el protocolo de amplificación, opciones que se pondrán a prueba en futuras pruebas.

El muestreo de huertos fue el paso esencial para llevar a cabo las pruebas de especificidad para Pss y Psm: es vital conocer el pool de bacterias que confluyen en el hospedero para poder definir la especificidad de los partidores diseñados. Mientras mayor sea el pool de bacterias encontrado asociado al hospedero, es posible determinar una mayor especificidad de los partidores. Además del volumen que este conjunto posea, también es importante que sea variado, por lo que una mayor cantidad de tejidos muestreados ayuda a la diversificación de los aislados encontrados. Es por esto que para el muestreo de huertos se decidió realizar la mayor parte de los aislamientos a partir de ramillas en primavera, tejido por el cual logra penetrar a través de heridas o cortes de poda (Millas y France, 2017), pero también se escogieron tejidos secundarios, como canchales y raíces, para la diversificación de aislados, lo que permitió encontrar un mayor número de especies *Pseudomonas*, habitando especialmente zonas de tejido adyacente a canchales, y otros aislados comunes en suelo como *Bacillus*. Dentro del grupo de *Pseudomonas* identificados, en base a los análisis realizados inicialmente, no era posible definir la identidad de cada uno de ellos, sin embargo, resultaba necesario definir si dentro de las especies encontradas podrían existir Pss, lo que también sirve de evidencia y validación de las parejas de partidores Pss para PCR (Gfa1 y Gfa4) diseñados. Los análisis PCR de estas parejas de partidores mostraron que 3 aislados de este grupo (D100, D101 y D106) corresponden a Pss, resultados ratificados por el MLSA. Considerando las evidencias entregadas por 16S y la aparición de fluorescencia previa al PCR de las parejas de partidores

específicos, no fue posible determinar la identidad de estos aislados debido a las limitaciones en la técnica. Además, cabe acotar que ya no solo se conocen dos aislados fluorescentes (*P. fluorescens* y Pss), sino que se han reportado distintos aislados fluorescentes en Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), que no corresponden a ninguna de estas 2 bacterias, por lo que el uso de KB no necesariamente ayudaría a la detección específica de Pss. Estos resultados ratifican el valor que aportan a la detección las parejas de partidores diseñadas.

Son pocos los estudios realizados para detectar bacterias directamente desde material vegetal. Normalmente, se prefiere aislar las bacterias en medios de cultivos para analizar las colonias obtenidas. La importancia de detectar bacterias directamente en tejido vegetal, radica en la posibilidad de ofrecer un test confiable, rápido y barato a realizarse en terreno por personas no necesariamente especialistas en fitobacteriología (Martzy *et al.*, 2017, Kaygusuz *et al.*, 2019, Prasannakumar *et al.*, 2021, Vural *et al.*, 2022). Uno de los casos exitosos es presentado por Shin *et al.* (2018), los cuales evaluaron el uso de LAMP para la detección en terreno de *Erwinia amylovora*, agente causal del fuego bacteriano en peral y manzano, logrando detectar la bacteria en el huerto en plantas sintomáticas, aplicando un sencillo protocolo de extracción desde material vegetal. En nuestro trabajo se utilizó un protocolo modificado, que mostró ser útil para la extracción de DNA bacteriano, obteniendo amplificación tanto para Pss como Psm. Se observó que LAMP es capaz de detectar una menor concentración de bacterias en el tejido vegetal, a diferencia de PCR. Por lo que es necesario continuar con la optimización de LAMP para su uso futuro como técnica de terreno.

Actualmente existen dos investigaciones relacionadas a detección de Pss por LAMP. La primera, presentada por Gourdarzi y Mortazavi (2020) trata el desarrollo de un protocolo de detección basado en LAMP para Pss asociado a *Prunus*, con partidores diseñados a partir del gen SyrD, gen asociado a la secreción de la toxina siringomicina, involucrada en la defensa de la bacteria durante el proceso de infección. La selección de este gen resulta poco adecuada, considerando que, si bien hasta hace algunas décadas se creía que era específico a Pss, hoy se ha identificado en otras bacterias del filogrupo *Pseudomonas syringae* (Quigley *et al.*, 1993). Además, en la investigación se incluyen aislados de *Xanthomonas* sp. como control negativo, género en el que se conoce no está presente el gen, sin incluir controles positivos asociados al filogrupo I. Por otra parte, se encuentra la publicación encabezada por Kant *et al.* (2021), relacionada a detección de Pss por LAMP en poroto, que también entrega un gen conservado para el diseño de partidores, sin embargo, este gen es parte de la ruta de producción de siringomicinas (SalA) (Lu *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2007), por lo que es esperable que, bajo los argumentos expuestos anteriormente, exista una menor especificidad de partidores diseñados a partir de este gen. Se debe agregar que al igual que el primer trabajo mencionado en este párrafo, no se incluyen como controles bacterias del filogrupo I.

Actualmente, la posibilidad de contar con servicios de secuenciación precisos, rápidos y económicos, permite incorporar en el banco de datos genómicos también a las cepas locales de fitopatógenos y así optimizar los métodos de detección basados en PCR, con evidentes beneficios al momento de emitir un informe de análisis. La técnica de LAMP actualmente requiere personal mayormente capacitado para su ejecución, pero es sin dudas un método de detección altamente eficiente, que permitirá el desarrollo de ensayos confiables y de simple aplicación directamente en material vegetal y sin la necesidad de contar con equipos caros y sofisticados.

CONCLUSIONES

El desarrollo de métodos de detección con una base genómica, apoyado en la secuenciación masiva, permite la generación de bibliotecas de secuencias locales, que generan un marco de comparación contra genomas incorporados a bases de datos mundiales, permitiendo refinar la búsqueda de genes específicos y aumentar la fiabilidad de los resultados obtenidos. Con ello, es posible obtener herramientas más precisas que ayuden en la detección de cepas locales, y que resuelvan los problemas hoy asociados a errores del método, lo que ayudará a largo plazo a un control de las enfermedades asociadas a cerezo en Chile, donde el cáncer bacterial resulta la más común y generalizada en huertos de cerezo.

Tanto LAMP como PCR han demostrado ser herramientas específicas para la detección de Pss y Psm. Las parejas de partidores para PCR aquí desarrolladas discriminan entre Pss y Psm y no reaccionan con la mayoría de las bacterias epífitas y endófitas asociadas a las muestras de cerezo. Con respecto a la sensibilidad, PCR ha funcionado satisfactoriamente, mientras para LAMP, a pesar de resultados promisorios, es necesario seguir investigando. Esto significa optimizar la calidad de los partidores y afinar las herramientas de diseño y los protocolos de detección. A través de este trabajo se ha optimizado el PCR para la detección de Pss y Psm. Además, ha sido el primer paso hacia la obtención de kits de detección LAMP a utilizar directamente en campo, prescindiendo de personal altamente capacitado y de equipamiento sofisticado, reduciendo así tiempos de respuesta y costos de los análisis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ash, G.J., J.M. Lang, L.R. Triplett, B.J. Stodart, V. Verdier, C. Vera Cruz, P. Rott, J.E. Leach. 2014. Development of a genomics-based LAMP (loop-mediated isothermal amplification) assay for detection of *Pseudomonas fuscovaginae* from rice. *Plant Disease* 98(7):909-915.
2. Balaž, J., R. Iličić, V. Ognjanov, Z. Ivanović, T. Popović. 2016. Etiology of bacterial canker on young sweet cherry trees in Serbia. *Journal of Plant Pathology* 98(2):285-294.
3. Berge, O., C.L. Monteil, C. Bartoli, C. Chandeysson, C. Guilbaud, D.C. Sands, C.E. Morris. 2014. A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *PLOS ONE* 9(9): e105547.
4. Borschinger, B., C. Bartoli, C. Chandeysson, C. Guilbaud, L. Parisi, J.F. Bourgeay, E. Buisson, C.E. Morris. 2015. A set of PCRs for rapid identification and characterization of *Pseudomonas syringae* phylogroups. *Journal of Applied Microbiology* 120:714-723.
5. Bull, C.T., C.R. Clarke, R. Cai, B.A. Vinatzer, T.M. Jardini, S.T. Koike. 2011. Multilocus sequence typing of *Pseudomonas syringae sensu lato* confirms previously described genomospecies and permits rapid identification of *P. syringae* pv. *coriandricola* and *P. syringae* pv. *apii* causing bacterial leaf spot on parsley. *Phytopathology* 101:847–858.
6. Bultreys, A., M. Kažun. 2010. Bacterial cankers caused by *Pseudomonas syringae* on stone fruit species with special emphasis on the pathovars *syringae* and *morsprunorum* race 1 and race 2. *Journal of Plant Pathology* 92:21-33.
7. Chen, Z-D., H-J. Kang, A.L. Chai, Y-X. Shi, X-W. Xie, L. Li, B-J. Li. 2020. Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in planta. *European Journal of Plant Pathology* 156:739-750.
8. Chun, J., A. Oren, A. Ventosa, H. Christensen, D.R. Arahal, M.S. da Costa, M.E. Trujillo. 2018. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68:461–466.
9. Duarte, V., E. Fernández, M.G. Cunha, I. Pieretti, M. Hincapie, P. Roumagnac, J. Comstock, P. Rott. 2018. Comparison of loop-mediated isothermal amplification, polymerase chain reaction, and selective isolation assays for detection of *Xanthomonas albilineans* from sugarcane. *Tropical Plant Pathology* 43:351–359.
10. Dye, D., J. Bradbury, M. Goto, A. Hayward, R. Lelliott, M.N. Schroth. 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Review of Plant Pathology* 59(4):153–68.
11. García, H., E. Miranda, M. López, S. Parra, C. Rubilar, E. Silva-Moreno, J. Rubio, C. Ramos. 2021. First report of Bacterial Canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *Morsprunorum* Race 1 on sweet cherry in Chile. *Plant Disease* 105(10): 3287.
12. Gardan, L., H. Shafik, S. Belouin, R. Broch, F. Grimont, P.A. Grimont. 1999. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. *Nov* and *Pseudomonas cannabina* sp. *Nov*. (ex Sutic and Dowson 1959). *International Journal of Systematic Bacteriology* 49:469–478.
13. Gomila, M., A. Peña, M. Mulet, J. Lalucat, E. García-Valdés. 2015. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology* 6:214.

14. Gomila, M., A. Busquets, M. Mulet, E. García-Valdés, J. Lalucat. 2017. Clarification of Taxonomic Status within the *Pseudomonas syringae* Species Group Based on a Phylogenomic Analysis. *Frontiers in Microbiology* 8(2422).
15. Guordarzi, R., M.M. Mortazavi. 2020. Loop-mediated isothermal amplification: a rapid molecular technique for early diagnosis of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* of stone fruits. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 18:55.
16. Gutheil, W.G., E. Kasimoglu, P.C. Nicholson. 1997. Induction of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase activity in *Escherichia coli* and *Hemophilus influenza*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 238(3):693-696.
17. Hattingh, M.J. y I.M. Roos. 1995. *Compendium of Stone Fruit Diseases*. APS Press, American Phytopathological Society. EE.UU.
18. Hulin, M.T., A.D. Armitage, J.G. Vicente, E.B. Holub, L. Baxter, H.J. Bates, J.W. Mansfield, R.W. Jackson, R.J. Harrison. 2018a. Comparative genomics of *Pseudomonas syringae* reveals convergent gene gain and loss associated with specialization onto cherry (*Prunus avium*). *New Phytologist* 219:672-696.
19. Hulin, M.T., J.W. Mansfield, P. Brain, X. Xu, R.W. Jackson, R.J. Harrison. 2018b. Characterization of the pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* towards cherry and plum. *Plant Pathology* 67:1177–1193.
20. Hulin, M.T., R.W. Jackson, R.J. Harrison, J.W. Mansfield. 2020. Cherry picking by *pseudomonads*: After a century of research on canker, genomics provides insights into the evolution of pathogenicity towards stone fruits. *Plant Pathology* 69:962–978
21. INIA. 2017. INIA Rayentué realizó Día de Campo en control de Cáncer Bacteriano en huertos de cerezos. Disponible en <https://www.inia.cl/blog/2017/11/14/inia-rayentue-realizo-dia-de-campo-en-control-de-cancer-bacteriano-en-huertos-de-cerezos/>. Consultado en septiembre del 2021
22. iQonsulting. 2020. Anuario 2019/2020 Mercado Internacional de Cerezos. Disponible en <http://www.iqonsulting.com/files/Anuario-Cerezos-2020-iQonsulting-Final.pdf>. Consultado en septiembre del 2021.
23. iQonsulting. 2021. Anuario Cereza 2020/2021: Desafíos en el mercado Chino ante el aumento de la oferta. Disponible en http://www.iqonsulting.com/files/iQonsulting_Anuario_Cereza_2020_2021_89f66f60f80409447857933d5a24fe41.pdf. Consultado en septiembre del 2021
24. Jung H., H.-S. Kim, G. Han, J. Park, Y.-S. Seo. 2022. Comparative analyses of four complete genomes in *Pseudomonas amygdali* revealed differential adaptation to hostile environments and secretion systems. *The Plant Pathology Journal* 38(2):167-174.
25. Kałużna M., J. Puławska, P. Sobiczewski. 2009. The use of PCR melting profile for typing of *Pseudomonas syringae* isolates from stone fruit trees. *European Journal of Plant Pathology* 126:437–443.
26. Kaygusuz, D., S. Vural, A.Ö. Aytekin, S.J. Lucas, M. Elitas. 2019. DaimonDNA: A portable, low-cost loop-mediated isothermal amplification platform for naked-eye detection of genetically modified organisms in resource-limited settings. *Biosensors & Bioelectronics* 141:111409.
27. Kazempour, M.N., F. Jamie, S.A. Elahinia. 2007. Bacterial canker cause by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on stone fruits in Guilan, Province of Iran. *International Journal of Biology and Biotechnology* 4(4):373-378.

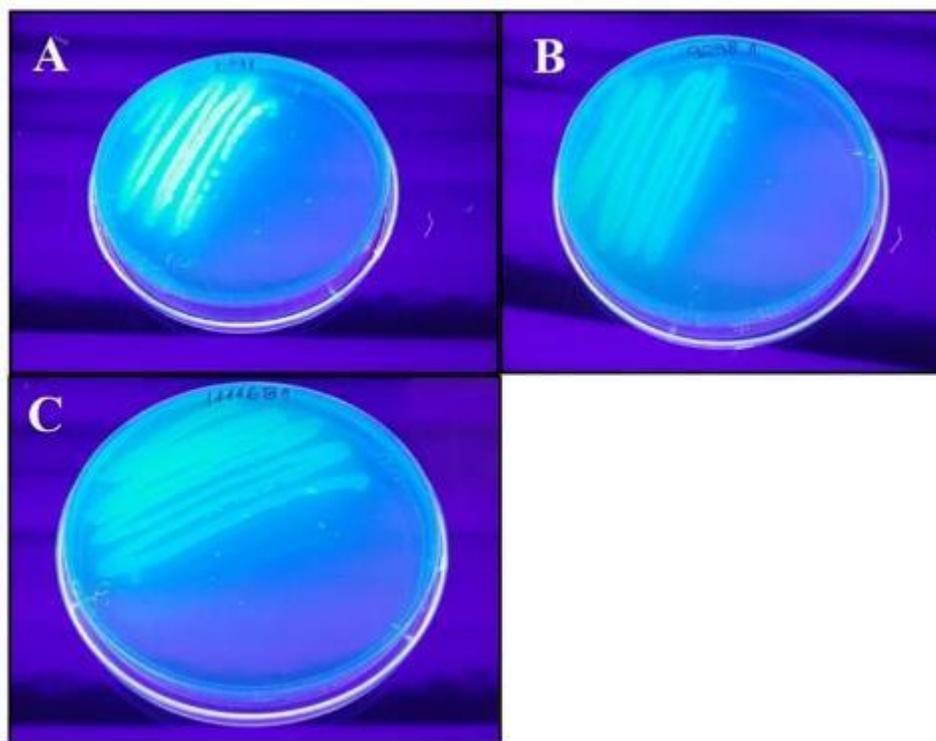
28. Kennelly, M.M., F.M Cazorla, A. de Vicente, C. Ramos, G.W. Sundin. 2007. *Pseudomonas syringae* diseases of fruit trees: progress toward understanding and control. *Plant Disease* 91(1):4-17.
29. Kini, K., I. Wonni, D. Siluéa, R. Koebnik. 2021. Development of two loop-mediated isothermal amplification (LAMP) genomics-informed diagnostic protocols for rapid detection of *Pantoea* species on rice. *MethodsX* 8:101216.
30. King, E.O., M.K. Ward, D.E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44:301-307.
31. Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA Sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*, John Wiley and Sons, New York, 115-175.
32. Latorre, B.A. 2008. Cerezos saludables. *Agronomía y Forestal UC* 34:8-11.
33. Lee, M.D. 2019. GtoTree: A user-friendly workflow for phylogenomics. *Bioinformatics* 35(20):4162–4164.
34. Lemus, S.G. y N.V. Osorio. 2019. Cáncer bacteriano en cerezo: Opciones de control de cancos. *Informativo N°67*:5.
35. Lemus, G., A. France, P. Millas, M. Beltrán, B. Sagredo, V. Osorio, J. Otárola, F. Correa, J. Donoso. 2020. Cáncer bacterial del cerezo: Epidemiología de la enfermedad y estrategias de control. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Centro Regional de Investigación Rayentué. *Boletín INIA N°420*:68.
36. Li, X., J. Nie, L. Ward, M. Madani, T. Hsiang, Y. Zhao, S.H. de Boer. 2009. Comparative genomics-guided loop-mediated isothermal amplification for characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Journal of Applied Microbiology* 107:717-726.
37. Lu, S.E., B.K. Scholz-Schroeder, D.C. Gross. 2002. Characterization of the *salA*, *syrF*, and *syrG* regulatory genes located at the right border of the Syringomycin gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 15(1):43-53.
38. Lu, S.E., N. Wang, J. Wang, Z.J. Chen, D. Gross. 2007. Oligonucleotide Microarray Analysis of the *SalA* Regulon Controlling Phytotoxin Production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 18(4):324-333.
39. Martzy, R., C. Kolm, K. Brunner, R.L. Mach, R. Krska, H. Šinkovec, R. Sommer, A.H. Farnleitner, G.H. Reischer. 2017. A loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of *Enterococcus* spp. In water. *Water Research* 122:62–69.
40. Meng, X-L., X-W. Xie, Y-X. Shi, A-L. Chai, Z-H. Ma, B-J. Li. 2016. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay based on *hrpZ* gene for rapid detection and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber leaves. *Journal of Applied Microbiology* 122:441-449.
41. Millas, P. y A. France. 2017. Fitopatología – Enfermedades en frutales: Cáncer bacterial en cerezo. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Ficha técnica n°60:2.
42. Moore, E.R.B., M. Mau, A. Arnscheidt, E.C. Böttger, R.A. Hutson, M.D. Collins. 1996. The determination and comparison of the 16S rRNA gene sequences of species of the genus *Pseudomonas (sensu stricto)* and estimation of the natural intrageneric relationships. *Systematic and Applied Microbiology* 19:478-492.
43. Mulet, M., J. Lalucat, E. García-Valdés. 2010. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology* 12:1513–1530.
44. Neale, H., M.T. Huilin, R.J. Harrison, R.W. Jackson, D.L. Arnold. 2021. Transposon mutagenesis of *Pseudomonas syringae* pathovars *syringae* and *morsprunorum* to identify genes involved in Bacterial Canker Disease of Cherry. *Microorganisms* 9(1328).

45. Niessen, L., R. Vogel. 2010. Detection of *Fusarium graminearum* DNA using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *International Journal of Food Microbiology* 140:183-191.
46. Notomi, T., H. Okayama, H. Masubushi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, T. Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification DNA. *Nucleic Acid Research* 28(12):63-69.
47. Prasannakumar, M.K., P.B. Parivallal, D. Pramesh, H.B. Mahesh, E. Raj. 2021. LAMP-based foldable microdevice platform for the rapid detection of *Magnaporthe oryzae* and *Sarocladium oryzae* in rice seed. *Scientific Reports* 11:178.
48. Quigley N.B., Y.Y. Mo, D.C. Gross. 1993. SyrD is required for syringomycin production by *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae* and is related to a family of ATP-binding secretion proteins. *Molecular Microbiology* 9(4):787–801.
49. Rossetti A., G.M. Balestra. 2008. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on Kiwifruit Plants: Epidemiological Traits and Its Control. 65-68 pp. In: Fatmi, M. et al. (eds). *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens – Identification, Epidemiology and Genomics. Springer, Dordrecht, Países Bajos.
50. Ruinelli, M., P.H.H. Schneeberger, P. Ferrante, A. Buhlmann, M. Scortichini, J.L. Vanneste, B. Duffy, J.F. Pothier. 2017. Comparative genomics-informed design of two LAMP assays for detection of the Kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and discrimination of isolates belonging to the pandemic biovar 3. *Plant Pathology* 66:140-149.
51. Sarkar, S. y D. Gutmann. 2004. Evolution of the Core Genome of *Pseudomonas syringae*, a Highly Clonal, Endemic Plant Pathogen. *Applied and Environmental Microbiology* 70(4):1999-2004.
52. Sawada, H., F. Suzuki, I. Matsuda, N. Saitou. 1999. Phylogenetic analysis of *Pseudomonas syringae* pathovars suggests the horizontal gene transfer of *argK* and the evolutionary stability of *hrp* gene cluster. *Journal of Molecular Evolution* 49:627-644.
53. Shafqat, J., M. Elahmad , O. Danielsson , MC Martinez , B. Persson , X. Pares , H. Jornvall. 1996. Pea formaldehyde-active class III alcohol dehydrogenase: Common derivation of the plant and animal forms but not of the corresponding ethanol-active forms (classes I and P). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(11):5595-5599.
54. Sorensen, K.N., K.H. Kim, J.Y. Takemoto. 1998. PCR detection of cyclic lipodepsinonapeptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 226-230.
55. Spotts, R.A., J. Olsen, L. Long, J.W. Pshceidt. 2010. Bacterial canker of sweet cherry in Oregon – Disease symptoms, cycle, and management. Oregon State University, Extension Service. Corvallis. Disponible en <https://catalog.extension.oregonstate.edu/sites/catalog/files/project/pdf/em9007.pdf> (Consultado en Septiembre del 2021).
56. Suzuki K., H. Sawada, G. Kisaki. 2021. Loop-mediated isothermal amplification of bacterial effector genes to detect *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovars 1 and 3. *Journal of General Plant Pathology* 88:2–9.
57. Swarna, K.R., A. Kamalakannan, C. Gopalakrishnan, S. Rajesh, S. Panneerselvam, P. Santosh. 2022. Loop-mediated isothermal amplification assay: A specific and sensitive tool

- for the detection of *Bipolaris oryzae* causing brown spot disease in rice. *Phytoparasitica* 50:543–553.
58. Takemoto, J.Y. 1992. Bacterial phytotoxin siringomycin and its interaction with host membranes. *Molecular Signal in Plant-Microbe Communication*. CRC Press, Boca Raton, FL. 247-160.
 59. Tran, P., M. Savka, H. Ming Gan. 2017. *In-silico* taxonomic classification of 373 genomes reveals species misidentification and new genospecies within the genus *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology* 8: 1296-1302.
 60. Van Ophem, P., D. Johannis. 1994. NAD- and co-substrate (GSH or factor)-dependent formaldehyde dehydrogenases from methylotrophic microorganisms act as a class III alcohol dehydrogenase. *FEMS Microbiology Letters* 116(1):87-93.
 61. Vicente, J., J.P. Alves, K. Russell, S.J. Roberts. 2004. Identification and discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from wild cherry in England. *European Journal of Plant Pathology* 110:337–351.
 62. Vural, S., A.F. Ergenç, A.Ö. Aytakin, S.J. Lucas, M. Elitas. 2022. A low-cost, portable, and practical LAMP device for point-of-diagnosis in the field. *Biotechnology and Bioengineering* 119:994–1003.
 63. Yoshioka, R., H. Uematsu, Y. Takikawa, H. Kajihara, Y. Inoue. 2020. PCR detection of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the causal agent of bacterial black node in barley and wheat, using newly designer primer set. *Journal of General Plant Pathology* 86:387-392.
 64. Young, J.M., D.W. Dye, J.F. Bradbury, C.G. Panagopoulos, C.F. Robbs. 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 21:153-177.
 65. Young, J.M. 2010. Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology* 92(1sup):S1.5–S1.14.
 66. Zhang, Y., J. Uyenoto, B. Kirpatrick. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various pathogens for PCR assays. *Journal of Virology Methods* 71:45-50.
 67. Zhao, X., L. Wang, Y. Li, Z. Xu, L. Li, X. He, Y. Lui, J. Wang, L. Yang. 2011. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27:181-184.

APÉNDICE

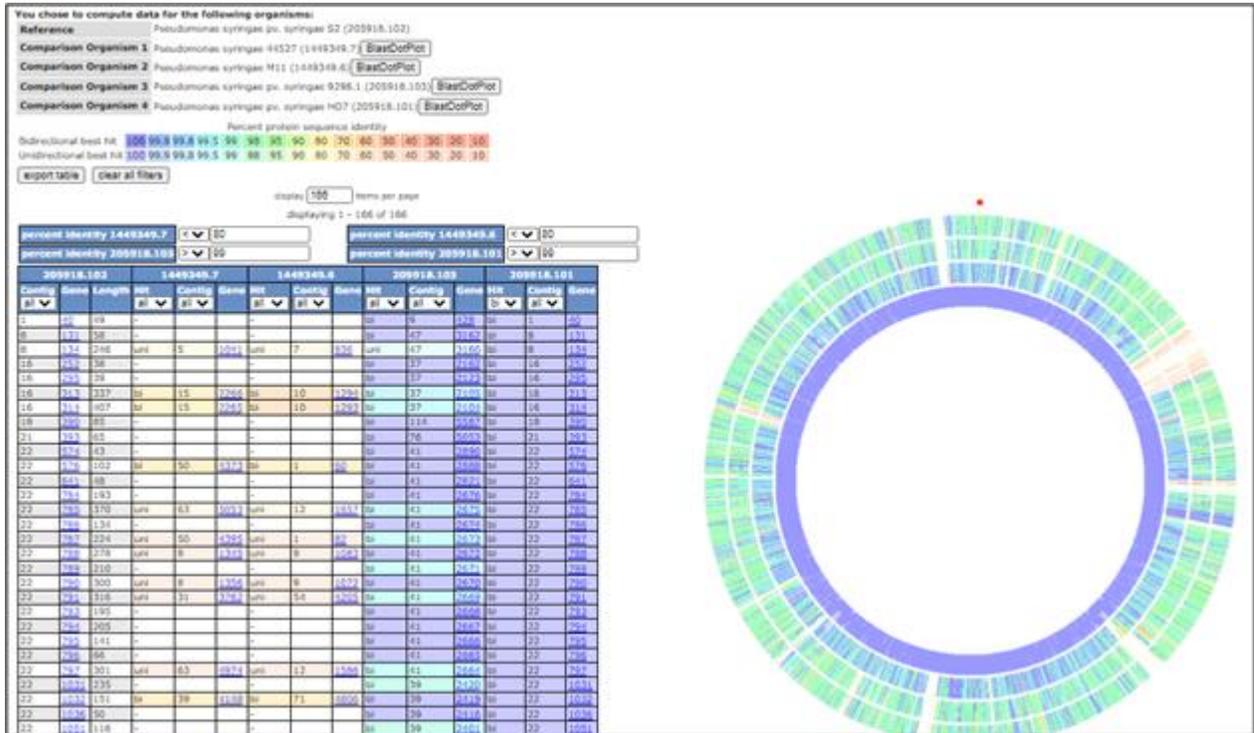
Apéndice 1. Placas Petri con medio KB sembradas con los aislados bacterianos 9298.1 (Pss), 11116B1 (Pss) y b191 (*P. fluorescens*) (Cuadro 1).



Apéndice 2. Resultados obtenidos a partir de PCR para análisis multilocus de los 10 aislados utilizados, donde el signo + indica amplificación y – la ausencia de esta.

Muestra	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>	<i>acn</i>	<i>pfk</i>	<i>gapA</i>	<i>pgi</i>	<i>cts</i>
1116B2	+	+	-	-	-	+	+
133398	+	+	+	+	-	+	+
44527	+	+	-	-	+	+	+
11116B1	+	+	-	+	-	+	+
9298.1	+	+	+	-	+	+	+
S2	+	+	-	+	+	+	+
H07.18	+	+	+	-	-	+	+
b191	+	+	+	+	+	+	+
11117YB4	+	+	+	-	+	+	+
M11	+	+	+	+	-	+	+
Blanco (Control negativo)	-	-	-	-	-	-	-

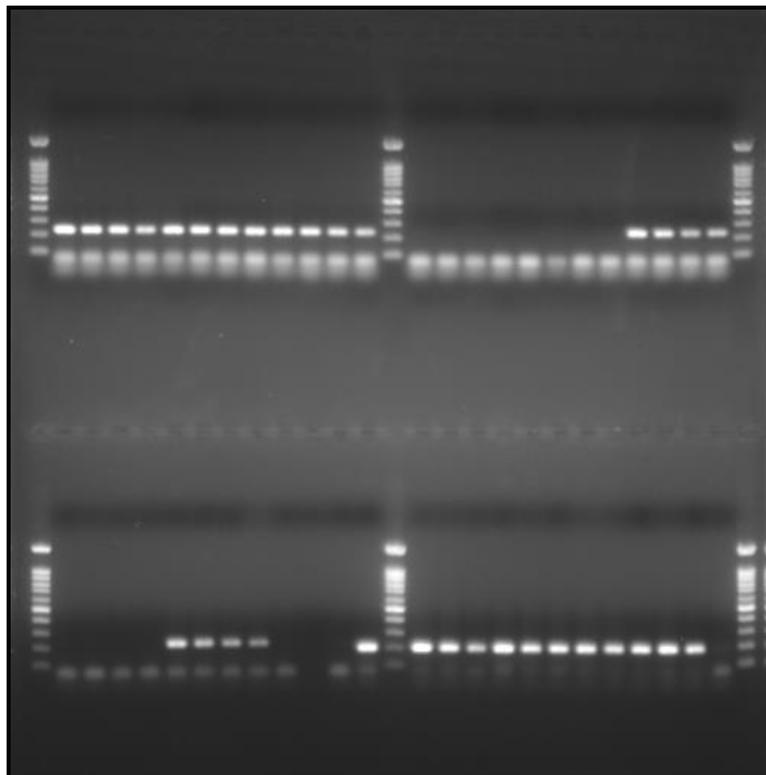
Apéndice 3. Comparación de genomas en RAST para la búsqueda de regiones genómicas específicas. En la comparación se observa el genoma de S2 usado como referencia para la comparación, junto con dos aislados chilenos parte del estudio identificados como Pss (9298.1 y H07.18) sumado a dos aislados de este estudio que pertenecen al grupo *Pseudomonas syringae* (M11 y 44527).



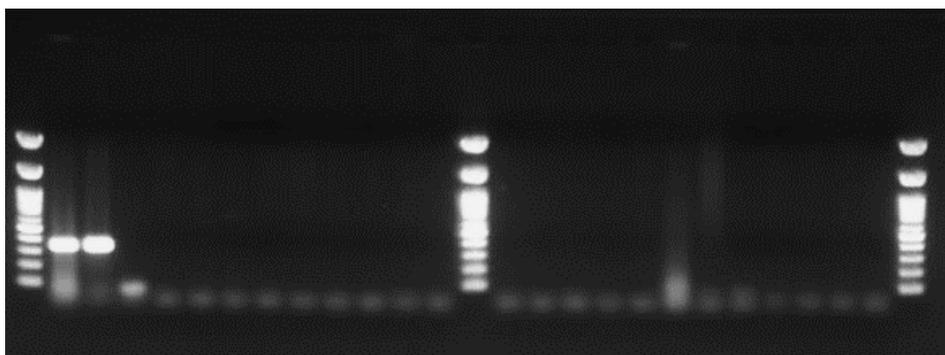
Apéndice 4. Listado adicional de genes específicos de Pss seleccionados desde la plataforma RAST.

Gen	N° identificación RAST
Alcohol deshidrogenase	205918.102.peg.1734
Cytochrome c, mono- and diheme variants	205918.102.peg.1052
Hypothetical protein	205918.102.peg.165
Hypothetical protein	205918.102.peg.393
Hypothetical protein	205918.102.peg.574
Hypothetical protein	205918.102.peg.789
Hypothetical protein	205918.102.peg.793 blr2255
Hypothetical protein	205918.102.peg.807
Hypothetical protein	205918.102.peg.808
Hypothetical protein	205918.102.peg.1141
Hypothetical protein	05918.102.peg.1188
Hypothetical protein	205918.102.peg.1738
Hypothetical protein	205918.102.peg.2969
Hypothetical protein	205918.99.peg.4339
Pectin lyase precursor	205918.102.peg.318
Putative membrane protein	205918.102.peg.786
Ser-tRNA(Ala) deacylase Gly-tRNA(Ala) deacylase	205918.102.peg.491
Small uncharacterized protein Bpro_4170	205918.102.peg.1166
Uncharacterized MFS-type transporter	205918.102.peg.492
Oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase / Dihydropteridine reductase (Oxy-NADPH)	205918.102.peg.794
Isovaleryl-CoA Deshydrogenase	205918.103.peg.236
Hypothetical protein	205918.99.peg.4072

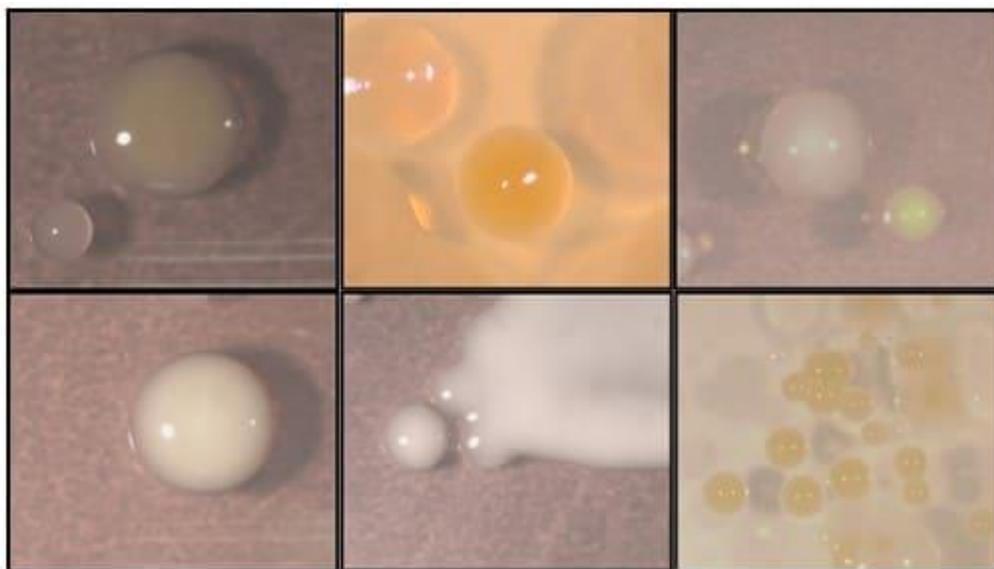
Apéndice 5. Resultados en gel para la amplificación de la pareja de partidores Gfa1, con una banda de 227 pb. En la foto se observan diluciones en 10x, 20x, 50x y 100x de las muestras S2, H07.18, 11116B1, 11116B2, 133398, M11, 44527 y 11117YB4 respectivamente, seguido de mix PCR (sin muestra), agua y blanco. Se observa amplificación únicamente en los aislados S2, H07.18, 11116B1, M11 y 11117YB4.



Apéndice 6. Resultados en gel para la amplificación de la pareja de partidores HopAU1, con una banda de 339 pb. En la foto se observan diluciones en 10x y 50x de 11116B2, 9298.1, S2, H07.18, 11116B1, M11, 44527, 133398, 11117YB4 y b191 respectivamente, seguido de 1 mix PCR (sin muestra), agua y blanco.



Apéndice 7. Morfología de las colonias aisladas desde muestras de material vegetal colectadas en huertos de cerezo.



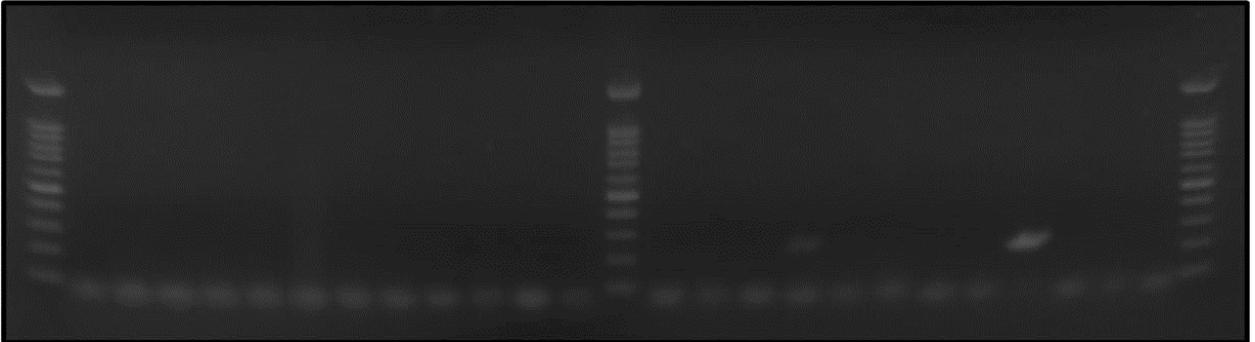
Apéndice 8. Resultados de secuenciación correspondientes a los géneros bacterianos obtenidos a partir del muestreo en huertos de cerezo.

Identificación por género	Número de aislados identificados
<i>Pantoea</i> sp.	3 aislados
<i>Rosenbergiella</i> sp.	2 aislados
<i>Fronidhabitans</i> sp.	1 aislado
<i>Microbacterium</i> sp.	3 aislados
<i>Rathayibacter</i> sp.	1 aislado
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	1 aislado
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	1 aislado
<i>Chitinophaga</i> sp.	1 aislado
<i>Rahnella</i> sp.	1 aislado
<i>Streptomyces</i> sp.	1 aislado
<i>Brachybacterium</i> sp.	1 aislado
<i>Chryseobacterium</i> sp.	2 aislados
<i>Brevundimonas</i> sp.	1 aislado

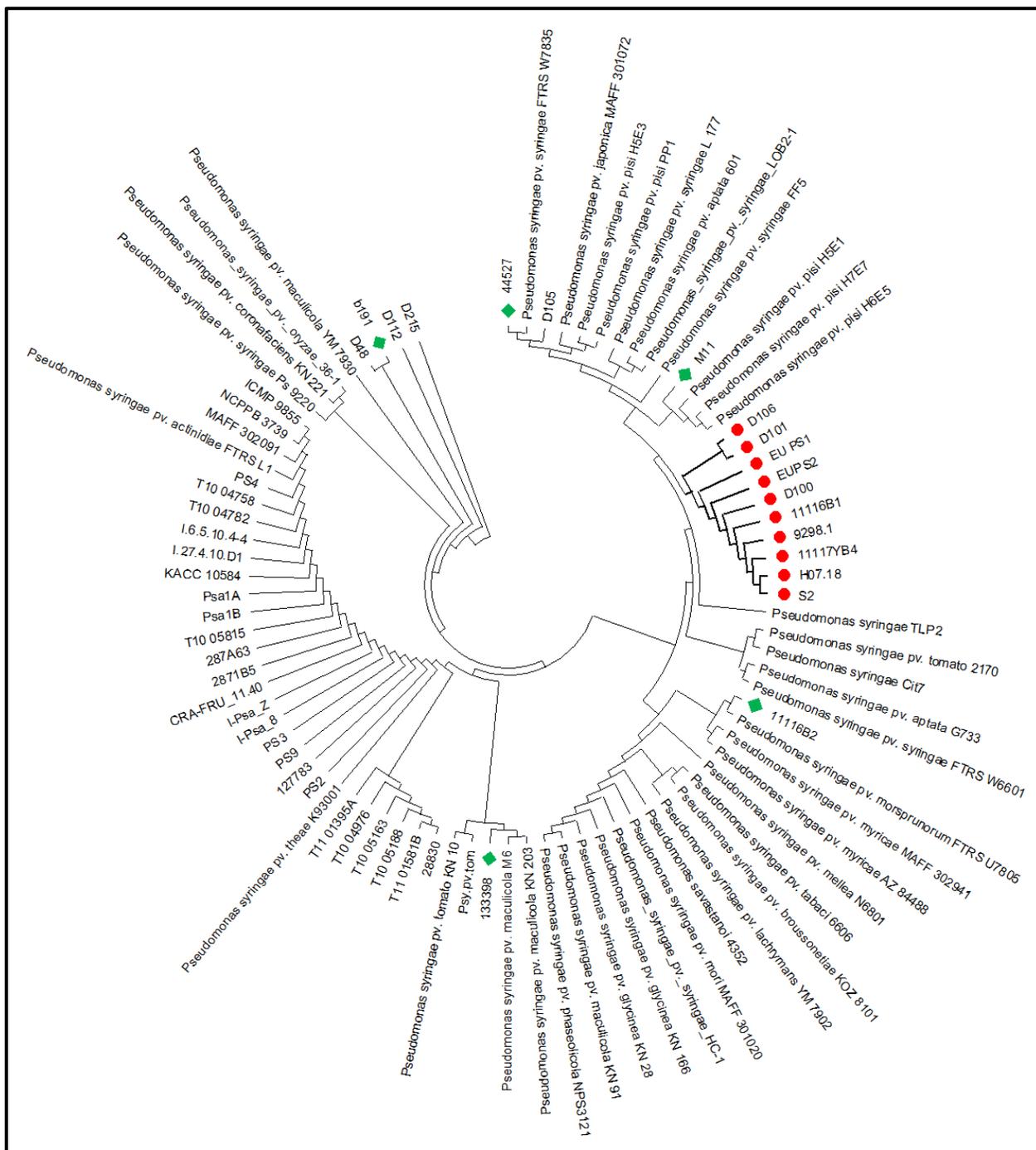
Apéndice 8. Continuación tabla.

<i>Flavobacterium</i> sp.	1 aislado
<i>Staphylococcus</i> sp.	1 aislado
<i>Rhizobiaceae</i> sp.	2 aislados
<i>Rhizobium</i> sp.	4 aislados
<i>Kocuria</i> sp.	2 aislados
<i>Bacillus</i> sp.	11 aislados
<i>Ensifer</i> sp.	2 aislados
<i>Unclassified Rhizobiaceae</i> sp.	1 aislado
<i>Xanthomonas</i> sp.	1 aislado
<i>Sphingopyxis</i> sp.	3 aislados
<i>Pseudomonas</i> sp.	30 aislados
<i>Arthrobacter</i> sp.	2 aislados
<i>Variovorax</i> sp.	2 aislados
<i>Curtobacterium</i> sp.	19 aislados
<i>Sphingomonas</i> sp.	21 aislados
<i>Terribacillus</i> sp.	2 aislados
<i>Agrobacterium</i> sp.	8 aislados

Apéndice 9. Resultados en gel para la amplificación de la pareja de primers Gfa1. En la imagen se observa la amplificación de 3 de los 30 aislados identificados como *Pseudomonas* sp., parte del muestreo de huertos.



Apéndice 10. Análisis MLSA a partir de 3 genes *housekeeping* (*pgi*, *gyrB* y *cts*) de los aislados amplificados por la pareja de partidores Gfa1. En la imagen se observa el cluster que conforman estos aislados junto con los aislados chilenos previamente identificados como Pss (11116B1, 9298.1, H07.18, S2 y 11117YB4) más los aislados referenciales a la especie Pss.



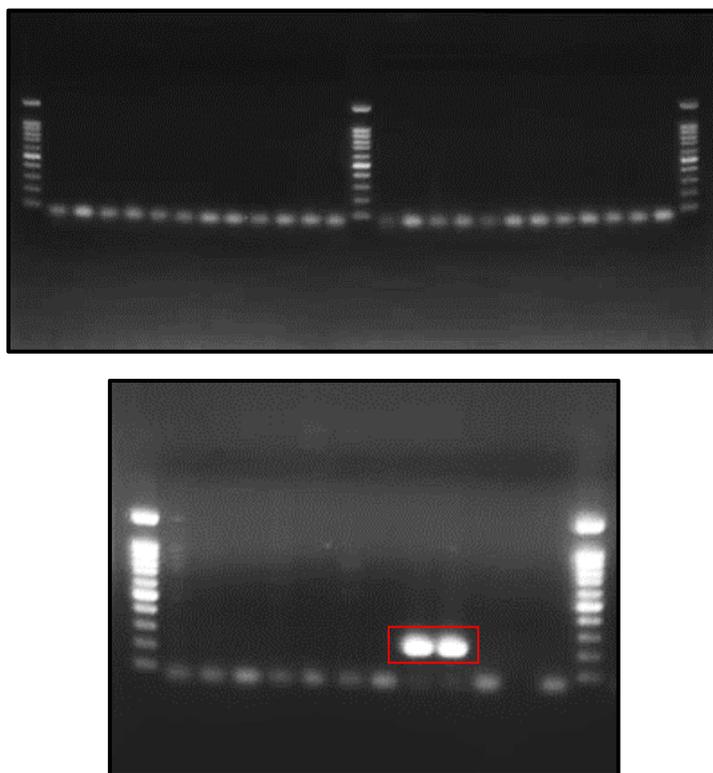
Apéndice 11. Resultados de los análisis PCR para la detección de Pss en los 31 aislados provenientes del CEAF utilizando la pareja de partidores Gfa1. La identificación por DNA-Seq y pruebas bioquímicas han sido realizada por el CEAF.

Código muestra	DNA-Seq	Pruebas Bioquímicas	PCR (Gfa1)
A1M129	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)	Candidato Pss	+
A1M140	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)	Candidato Pss	+
A1M160	<i>Pseudomonas</i> sp.	Candidato <i>P. viridiflava</i>	-
A1M163	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)	Candidato Pss	+
A1M171	<i>P. syringae</i> pv. <i>lapsa</i>	Candidato Pss	-
A1M198	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)	Candidato Pss	+
A1M200	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)	Candidato Pss	+
A1M201	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)	Candidato Pss	+
A1M211	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)	Candidato Pss	+
A1M212	<i>P. fluorescens</i> group (azotoformans)	No identificado	-
A1M242	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)	Candidato Pss	+
A1M244	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)	Candidato Pss	+
A1M246	<i>P. syringae</i> group	Candidato Pss	-
A1M249	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)	Pss	+
A1M250	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)	Pss	+
A1M253	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)	Pss	+
A1M254	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)	Pss	+
A1M256	<i>P. fluorescens</i> group	No identificado	-
A1M258	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)	Pss	+
A1M259	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)	Pss	+
A1M260	<i>P. putida</i> group	No identificado	-
A1M263	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)	Pss	+
A1M265	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)	Pss	+
A1M271	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)	Pss	+

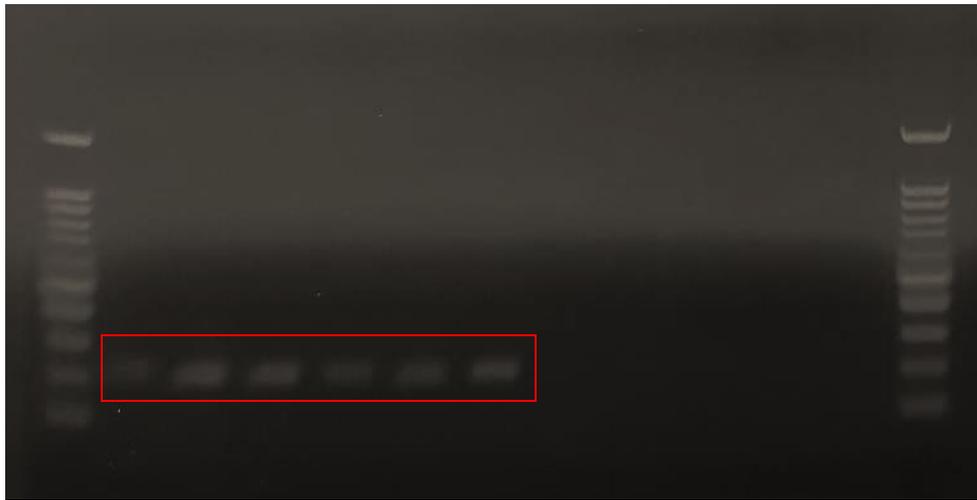
Apéndice 11. Continuación tabla.

A1M273	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)	Pss	+
A1M274	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)	Pss	+
A1M275	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)	Pss	+
A1M276	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)	Pss	+
A1M279	<i>P. fluorescens</i> group	No identificado	-
A1M3	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)	Candidato Pss	+
A2M176	<i>P. syringae</i> group (viridiflava)	Candidato <i>P. viridiflava</i>	-

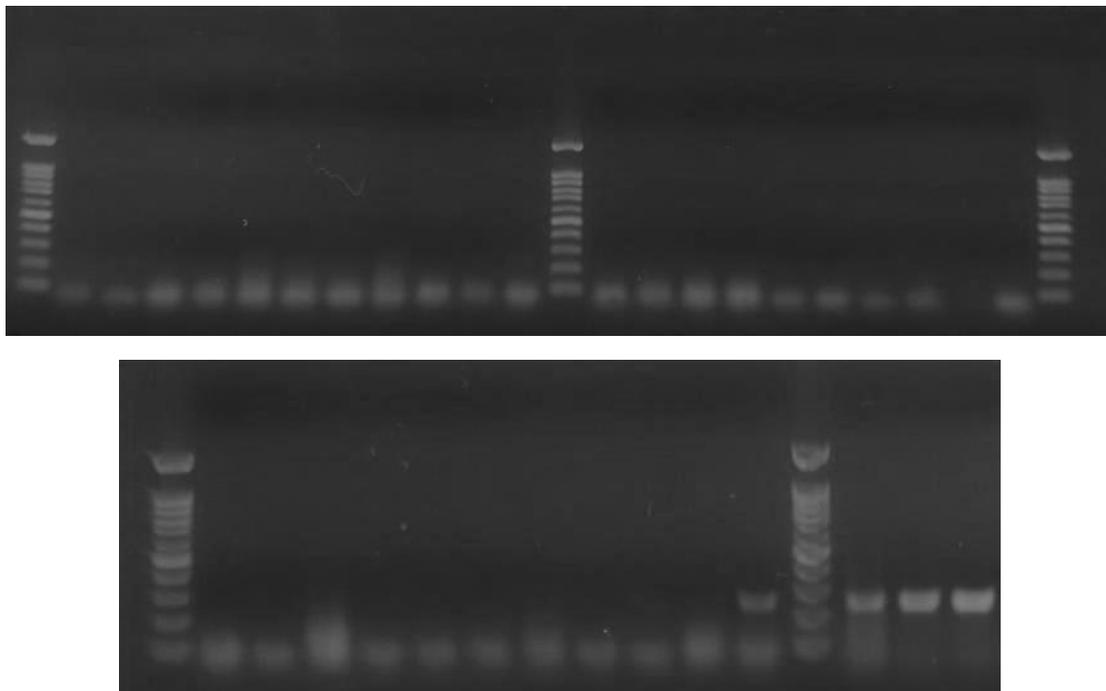
Apéndice 12. Ensayo de especificidad en Pss para PCR, realizado para la pareja de partidores Gfa1. La figura muestra amplificación únicamente en los dos controles positivos incorporados en el ensayo (S2 y H07.18).



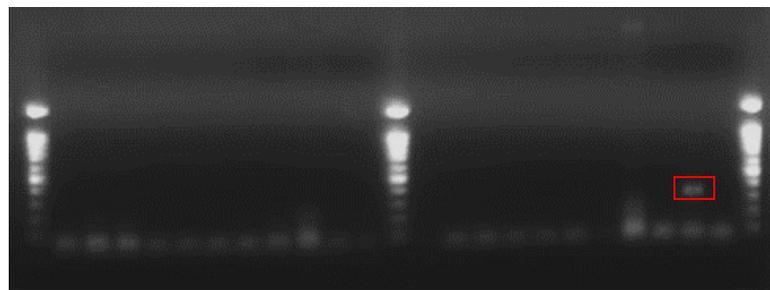
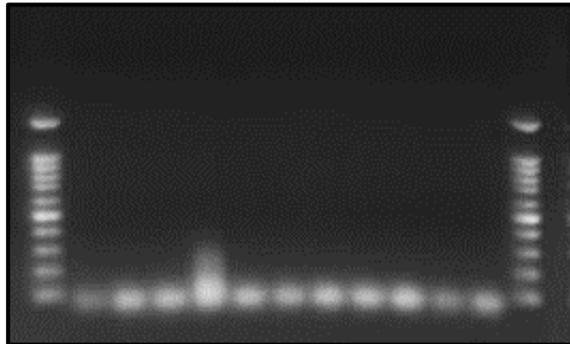
Apéndice 13. Ensayo de especificidad de Pss para PCR, con la pareja de partidores Gfa4. En la reacción se incluyen los 10 aislados chilenos. La imagen muestra la amplificación de los 5 aislados identificados como Pss, sumado a la amplificación del aislado M11.



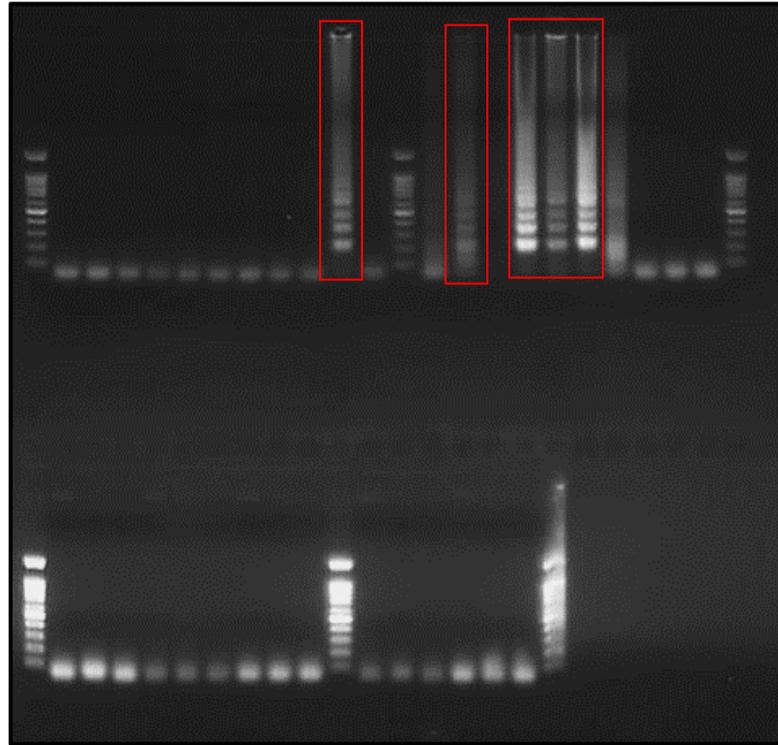
Apéndice 14. Ensayo de especificidad en Pss, para la pareja de partidores Gfa4. La figura muestra que no existe amplificación en ninguno de los 30 géneros incorporados al análisis, parte del Apéndice 9, solo amplificando aislados positivos correspondientes a S2, H07.18, 9298.1 y 11116B1.



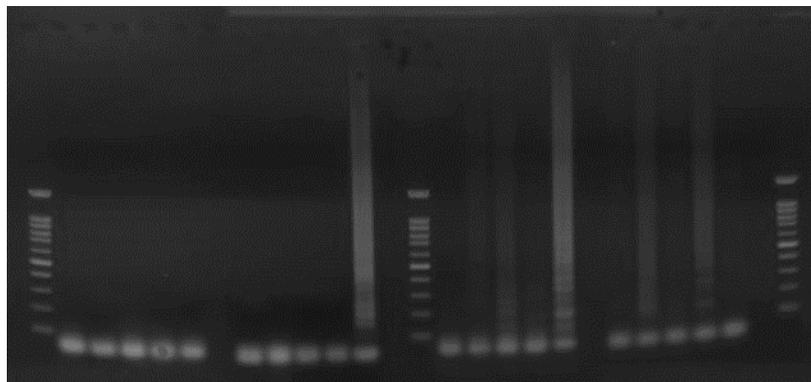
Apéndice 15. Ensayo de especificidad en Psm para PCR, realizado para la pareja de partidores HopAU1. La figura muestra amplificación únicamente en el control positivo incorporado en el ensayo (11116B2).



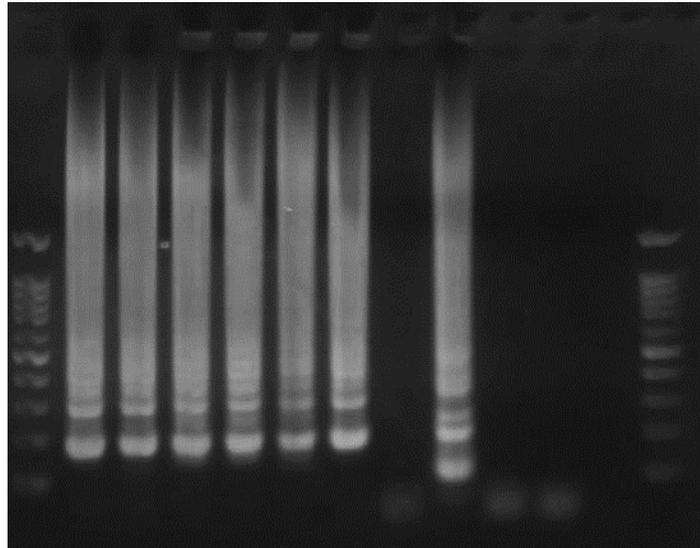
Apéndice 16. Ensayo de especificidad de Psm para LAMP, con el grupo de partidores HopAU1. En la reacción se incluyeron diferentes diluciones del aislado 1116B2, a las que se sumaron muestras de los restantes aislados identificados en el Cuadro 3. La figura muestra la amplificación únicamente en el aislado 1116B2 con sus respectivas diluciones (recuadro rojo).



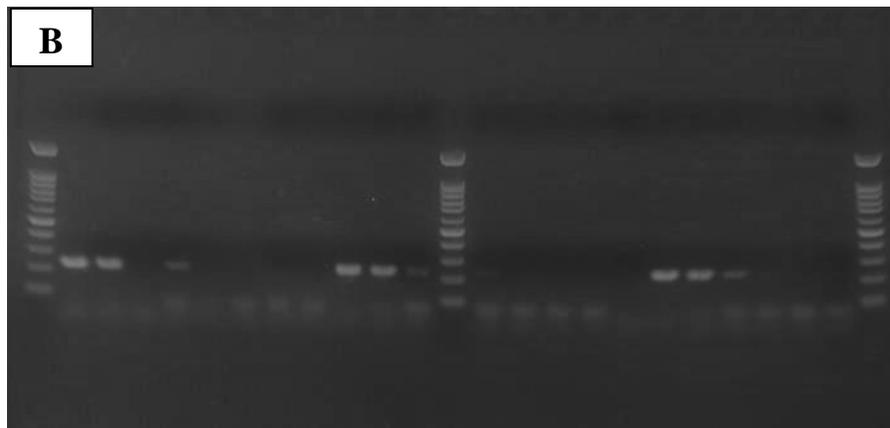
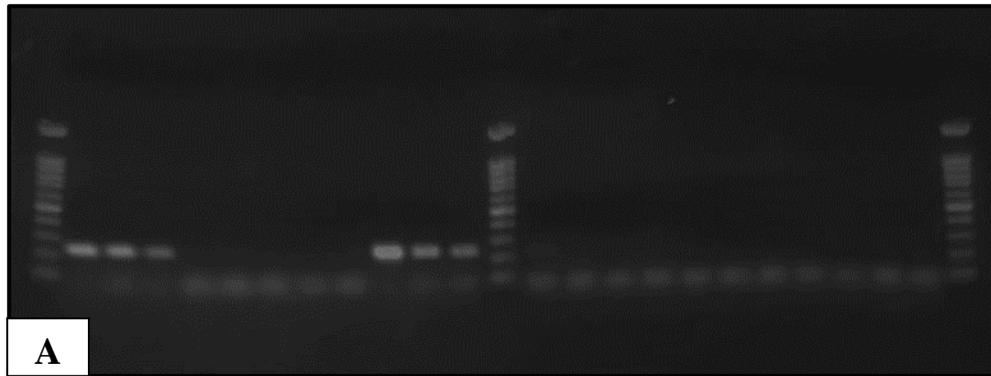
Apéndice 17. Ensayo de especificidad de Pss para LAMP, con del grupo de partidores Gfa1. En la reacción se incluyeron los diferentes aislados mencionados. La figura muestra la amplificación únicamente en los aislados identificados como Pss con sus respectivas diluciones.



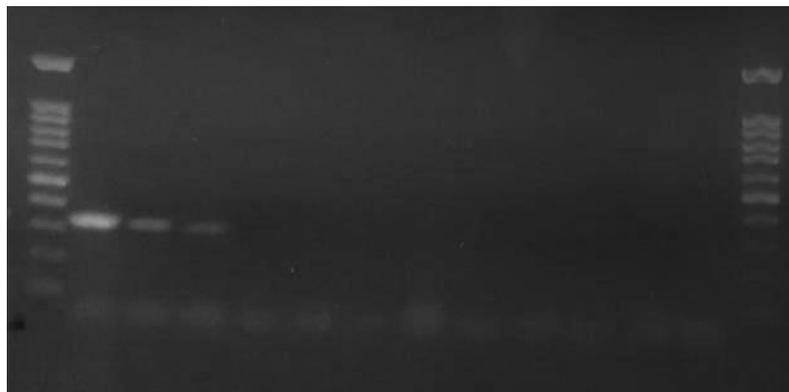
Apéndice 18. Ensayo de especificidad de Pss para LAMP, con el grupo de partidores Gfa4. En la reacción se incluyeron los 10 aislados chilenos. La figura muestra la amplificación de los 5 aislados identificados como Pss, sumado al aislado M11 y 133398.



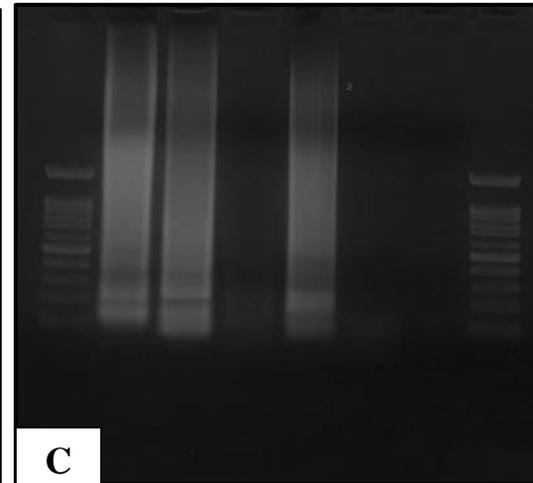
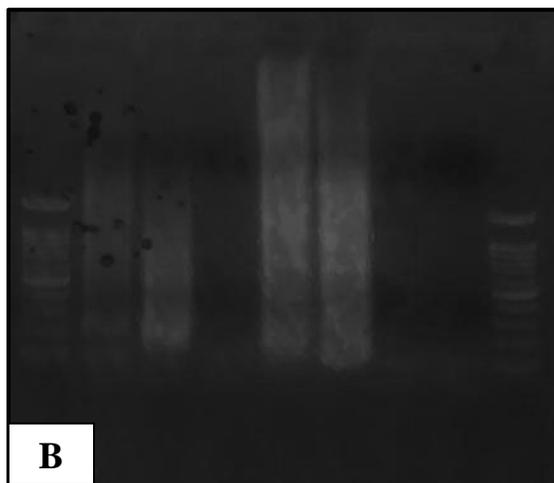
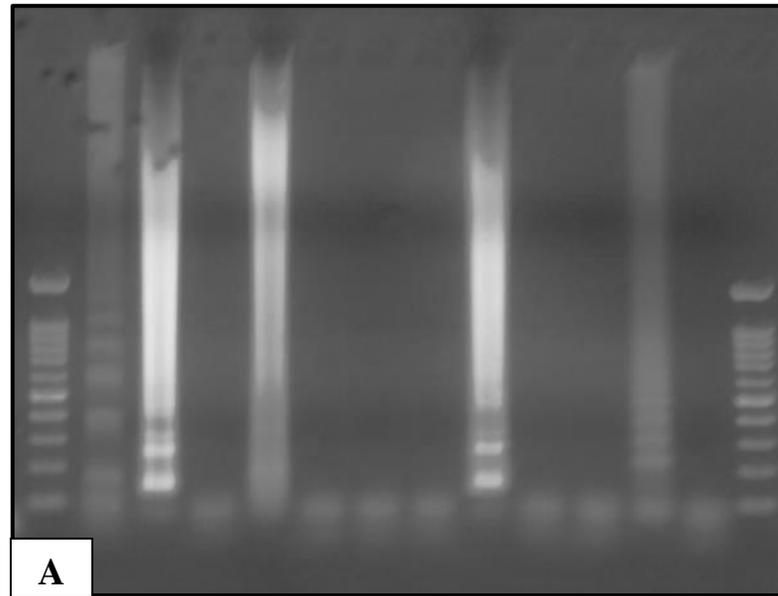
Apéndice 19. Ensayo de sensibilidad en Pss, realizado para la pareja de partidores Gfa1. La figura muestra la amplificación de hasta 100 pg/μL en el caso de H07.18 (Imagen A), de hasta 10 pg/μL en el caso de S2 (Imagen A), de hasta 10 pg/μL en el caso de 9298.1 (Imagen B), de hasta 10 pg/μL en 11116B1 (Imagen B) y de hasta 100 pg/μL en el caso de 11117YB4 (Imagen B).



Apéndice 20. Ensayo de sensibilidad en Psm, realizado para la pareja de partidores HopAU1. La figura muestra la amplificación de hasta 100 pg/ml en 11116B2.



Apéndice 21. Ensayo de sensibilidad en LAMP para Pss y Psm, con el grupo de partidores Gfa1 y HopAU1, respectivamente. En las imágenes se muestran las pruebas realizadas para ambas especies, donde se observa la amplificación no consecutiva de las diferentes alícuotas a distintas concentraciones de DNA. En la imagen A se observa sensibilidad en Pss y en la imagen B y C, sensibilidad en Psm.



Apéndice 22. Ruta metabólica de oxidación del Formaldehído II, en la que participa la enzima *gfa*.

