



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS AISLADAS DE  
TUBÉRCULOS DE PAPA (*Solanum tuberosum*) CON SÍNTOMAS DE  
PUDRICIÓN BLANDA, COLECTADAS EN SANARE, ESTADO LARA

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO  
Presentado ante la Ilustre Universidad  
Central de Venezuela, por la bachiller  
Raiza de los Ángeles Barrios Díaz como  
requisito parcial para optar por el título  
de Licenciada en Biología  
Tutora: Prof. Maira Oropeza

Agosto 2015

## I. RESUMEN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una especie originaria de la faja templada de Los Andes Suramericanos, perteneciente a la familia de las solanáceas. Los cultivos de papa pueden verse afectados por diferentes enfermedades causadas por distintos organismos entre ellos destacan bacterias fitopatógenas como *Ralstonia solanacearum* y *Pectobacterium carotovorum*, ambas causantes de la pudrición de tubérculos. Para el control de estas enfermedades es primordial el diagnóstico inequívoco de los patógenos causantes de la enfermedad, por esta razón en esta investigación el objetivo fue realizar la identificación de bacterias patógenas aisladas de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) con síntomas de pudrición blanda colectados en la población de Sanare, Edo. Lara. Para ello, se implementaron técnicas microbiológicas, bioquímicas y moleculares, ubicando a los aislados por sus características fisiológicas en el género *Pectobacterium*; sin embargo, las pruebas moleculares mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con iniciadores específicos no permitieron la identificación de la especie. La amplificación de secuencias repetitivas permitió diferenciar al aislado LMV10 de los aislados LMV11 y LMV12; estos dos últimos presentaron resultados similares en las pruebas bioquímicas y perfiles de bandas idénticos en las amplificaciones por PCR. Las pruebas de patogenicidad demostraron que la variedad 'Arbolona Negra'

es resistente a los aislados bacterianos estudiados, mientras que la variedad 'Granola' es altamente susceptible. Los postulados de Koch se cumplieron cabalmente; los aislados inoculados en microtubérculos reprodujeron los síntomas de pudrición y al re-aislarlos fueron identificados como *Pectobacterium* sp.

## **II. AGRADECIMIENTOS**

Primeramente a Dios por permitirme lograr mis metas, a pesar de los obstáculos, doy gracias por cada uno de ellos, pues me enseñaron que con esfuerzo todo es posible.

Enormemente a mis padres, Genoveva Díaz y Reinaldo Barrios, por traerme a este mundo, por apoyarme en cada sueño, por enseñarme que la humildad es la riqueza más grande de la que puede gozar un ser humano, a ellos debo todo lo que soy y lo que seré en mi vida.

A mi tutora la Dra. Maira Oropeza, quien desde el primer día se convirtió en mi amiga, una madre, un gran ejemplo a seguir, una mujer de gran corazón y justa que creyó en mí y me ayudó a hacer realidad este sueño.

A mi familia LMV, lo mejor que me pudo pasar al final de la carrera fue llegar a ese laboratorio, donde se hace ciencia en familia, y cada experiencia y conocimiento es compartido, sin duda el laboratorio más VIP al que pude haber pertenecido.

A mi amiga Maybe, una persona que Dios puso en mi camino para demostrarme que las risas, la complicidad, el compañerismo y la amistad, nos permiten superar los grandes obstáculos de la vida y así mismo lograr las grandes metas que nos proponemos.

A mi novio Junior Mendoza por su comprensión, su paciencia y sus palabras de aliento cada vez que me veía desesperanzada, sin ti no habría podido enfocarme más en mis sueños.

A mis amigos de “Química” Mayira, Rocío, Javier, John, Gimmy, Maria, Daniela, a quienes admiro enormemente y además me apoyaron desde los inicios de la carrera cuando más los necesitaba.

A todas las personas que conocí en la Facultad de Ciencias, por cada palabra de aliento, por cada minuto dedicado a compartir sus conocimientos y su amistad conmigo, no puedo nombrarlas porque son demasiadas y no quisiera dejar a nadie por fuera, pero quienes estuvieron allí lo saben y les agradezco enormemente tanto cariño.

A mi bella casa de estudios la Universidad Central de Venezuela, pues era allí donde desde pequeña soñé convertirme en una profesional.

Por último y no menos importante a mi Ángel mi pequeño biólogo, mi mejor compañero y amigo, la fuente de mi inspiración y de mi perseverancia, por la paciencia, por su gran amor sin condición, por comprender que las vacaciones, los días sin clases y hasta los fines de semana, eran para pasarlos en la universidad conmigo, por enseñarme que en la vida nada es imposible y que no importa en qué orden sucedan las cosas pues lo

importante es luchar por lo que se quiere, mil gracias mi príncipe, mi carrera te la debo y es para ti.

### III. INDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	Pág.
I. RESUMEN	2
II. AGRADECIMIENTOS	4
III. INDICE DE CONTENIDO	7
IV. INDICE DE TABLAS	9
V. INDICE DE FIGURAS	10
VI. ABREVIATURAS	12
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	16
2.1 El cultivo de la papa	16
2.2 Cultivo <i>in vitro</i> de papa	20
2.3 Pudrición blanda en papa. Agentes causales	25
2.4 Características diferenciales de <i>Pectobacterium carotovorum</i> ssp. <i>Carotovorum</i>	29
2.5 Características diferenciales de <i>Ralstonia solanacearum</i>	31
2.6 Técnicas microbiológicas, bioquímicas y moleculares para la identificación de bacterias fitopatógenas	33
2.6.1. Microbiológicas	33
2.6.2. Bioquímicas	34
2.6.3. Moleculares	41
2.7 Pruebas de patogenicidad y postulados Koch	45
3. OBJETIVOS	48
3.1. General	48
3.2. Específicos	48
4. METODOLOGÍA	49
4.1 Material Vegetal	49
4.2 Cepas bacterianas	49
4.3 Caracterización morfológica y microbiológica	50
4.4 Caracterización bioquímica	51
4.5 Caracterización molecular	52
4.5.1 PCR universal ADN ribosomal 16S	56
4.5.2 PCR iniciadores específicos	57
4.5.3 Amplificación de regiones repetitivas	60
4.6 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Solanum tuberosum</i> variedades 'Granola' y 'Arbolona Negra' como sistema para estudios de la interacción planta-patógeno.	63
4.6.1 Micropropagación de las variedades 'Arbolona Negra' y 'Granola'.	63
4.6.2 Microtuberización de las variedades 'Arbolona Negra' y 'Granola'	63

4.6.3 Pruebas de patogenicidad	63
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
5.1 Material vegetal	65
5.2 Cepas bacterianas	65
5.3 Caracterización morfológica y microbiológica	67
5.4 Caracterización bioquímica	68
5.5 Caracterización molecular	72
5.5.1. 16S Extracción del ADN	72
5.5.2. Amplificación de la región del RNA ribosomal	75
5.5.3. Amplificación con iniciadores específicos	75
5.5.4. Amplificación de regiones repetitivas	79
5.6 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Solanum tuberosum</i> variedades 'Granola' y 'Arbolona Negra' como sistema para estudios de patogenicidad y postulados de Koch	84
5.6.1 Micropropagación de las variedades 'Arbolona Negra' y 'Granola'.	85
5.6.2 Microtuberización de las variedades 'Arbolona Negra' y 'Granola'	86
5.7 Pruebas de patogenicidad en microtubérculos de 'Arbolona Negra' y 'Granola'	87
5.8 Postulados de Koch	99
6. DISCUSIÓN GENERAL	101
7. CONCLUSIONES	103
8. RECOMENDACIONES	105
9. BIBLIOGRAFÍA	106

#### IV. INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Balance de la producción de papa en el país, según (INN, 2010).	19
Tabla 2. Características bioquímicas de <i>Pectobacterium carotovorum</i> ssp. <i>carotovorum</i> (Schaad y col., 2001).	29
Tabla 3. Características bioquímicas de <i>Pectobacterium</i> (Garrity y col., 2005).	30
Tabla 4. Características fisiológicas más importantes de <i>R. solanacearum</i> (Chavarro y col., 2004).	32
Tabla 5. Pruebas bioquímicas empleadas por Schaad y col. (2001) y sus principios para la identificación de bacterias del género <i>Erwinia</i> y sus distintas especies.	39
Tabla 6. Mezcla de reacción PCR 16S.	56
Tabla 7. Mezcla de reacción PCR específica para <i>R. solanacearum</i> .	57
Tabla 8. Mezcla de reacción PCR específica para <i>B. gladioli</i> .	58
Tabla 9. Mezcla de reacción amplificación por PCR del gen <i>pel</i> .	59
Tabla 10. Mezcla de reacción amplificación por PCR de la región ITS.	60
Tabla 11. Mezcla de reacción amplificación ERIC-PCR.	61
Tabla 12. Características bioquímicas de los aislados LMV10, LMV11, LMV12 y de la cepa control <i>R. solanacearum</i> .	70
Tabla 13. Concentración y pureza de los ADNs extraídos.	71
Tabla 14. Tamaño de los productos de la amplificación de la región ITS (Tomada de Toth y col. (2.000)	80
Tabla 15. Tamaño de las bandas obtenidas mediante la amplificación de la región ITS	80
Tabla 16. Resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad en tubérculos de ambas variedades de papa inoculados con las cepas problema y el control positivo <i>R. solanacearum</i> .	87

## V. INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prueba de patogenicidad en tubérculos comerciales.	65
Figura 2. Tinción Gram.	66
Figura 3. A: Colonias de 24 horas de crecimiento en AN. B: Colonias de 24 horas de crecimiento en Agar YDC.	67
Figura 4. Crecimiento de las colonias en medio selectivo Agar McConkey.	68
Figura 5. Agar Kliger A: 0hpi, B: 24hpi y C: 48hpi.	69
Figura 6. Registro fotográfico de la electroforesis de los extractos de ADN total de los aislados LMV10, LMV11 y LMV12 con los tres métodos de extracción.	72
Figura 7. Registro fotográfico de electroforesis de las amplificaciones por PCR	74
Figura 8. 8a) PCR con iniciadores específicos GLA-f y GLA-r. 8b) PCR con iniciadores específicos Oli1 y Y2	76
Figura 9. PCR con iniciadores específicos Y1PEL y Y2PEL.	78
Figura 10a. Registro fotográfico de electroforesis de las amplificaciones de la región ITS, empleando los iniciadores G1 y L1.	81
Figura 11. Registro fotográfico de electroforesis de las amplificaciones mediante ERIC-PCR, empleando los iniciadores ERIC1 y ERIC2	83
Figura 12. 12a) vitroplantas variedad 'Arbolona Negra'(AN) y variedad 'Granola' (G). 12b) vitroplantas cultivadas en medio semi-sólido suplementado con Nitrato de Plata variedad 'Arbolona Negra'(AN) y variedad 'Granola' (G).	85
Figura 13. Microtubérculos variedad 'Arbolona Negra' y variedad 'Granola'.	86
Figura 14. Ensayo de patogenicidad en microtubérculos de las variedades 'Arbolona Negra' y 'Granola' inoculados con el aislado LMV10.	90
Figura 15. Ensayo de patogenicidad en microtubérculos de las variedades 'Arbolona Negra' y 'Granola' inoculados con el aislado LMV11.	91
Figura 16. Ensayo de patogenicidad en microtubérculos de las variedades 'Arbolona Negra' y 'Granola' inoculados con el aislado LMV12.	92
Figura 17. Progreso de la enfermedad en microtubérculos de las variedades 'Arbolona Negra' y 'Granola' inoculados con <i>R. solanacearum</i> .	93
Figura 18. Reporte de la enfermedad a las 120 horas en microtubérculos de las variedades 'Granola' inoculados con los	94

aislados LMV10, LMV11, LMV12 y *R. solanacearum*.

Figura 19. Reporte de la enfermedad a las 120 horas en microtubérculos de las variedades 'Arbolona Negra' inoculados con los aislados LMV10, LMV11, LMV12 y <i>R. solanacearum</i> .	95
Figura 20. Microtubérculos sin inóculo de las variedades 'Granola' (mallas verdes) y 'Arbolona Negra' (mallas amarillas) a las 120h.	96
Figura 21. Incidencia en la variedad 'Arbolona Negra' y 'Granola'.	98
Figura 22. A: Tinción Gram; B: Prueba de la Oxidasa, C: Prueba de la Catalasa.	100
Figura 23. Colonias re-aisladas de los microtubérculos, arriba LMV11 y LMV12; abajo LMV10.	100

## **VI. ABREVIATURAS**

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>BA</b>	Benciladenina
<b>Col</b>	Colaboradores
<b>CTAB</b>	Bromuro de Cetiltrimetilamonio
<b>Dntp</b>	Dinucleótido trifosfato
<b>ERIC</b>	Región consenso repetida de Enterobacterias
<b>ERIC</b>	Secuencia Consenso Intergénica Repetitivas de Enterobacteria.
<b>Hpi</b>	Horas post inoculación
<b>IBE</b>	Instituto de Biología Experimental
<b>IBE</b>	Instituto de Biología Experimental
<b>INN</b>	Instituto Nacional de Nutrición
<b>ITS</b>	Región Intergénica Espaciadora
<b>KOH</b>	Hidróxido de Potasio
<b>LMV</b>	Laboratorio de Mejoramiento Vegetal
<b>LMV10</b>	Aislado número 10 del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal
<b>LMV11</b>	Aislado número 11 del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal
<b>LMV12</b>	Aislado número 12 del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal

<b>MS</b>	Murashige y Skoog (1962)
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>OF</b>	Oxido-Fermentación
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b><i>Pel</i></b>	Gen <i>pel</i> que codifica para la pectato liasa
<b>PHB</b>	poli- $\beta$ -hidroxiburato
<b>PROINPA</b>	Productores Independientes del Páramo
<b>rDNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico ribosomal
<b>REP</b>	Repetitive Extragenic Palindromic
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>Subsp</b>	Sub-especie
<b>UCV</b>	Universidad Central de Venezuela

## 1. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una especie originaria de la faja templada de los Andes Suramericanos, perteneciente a la familia de las solanáceas. Su origen se centra en el Perú donde la papa es el principal cultivo en superficie sembrada. Los cultivos de papa pueden verse afectados por diferentes enfermedades causadas por distintos organismos tales como hongos, virus y bacterias, de las cuales las bacterias fitopatógenas viven generalmente en la proximidad de las plantas sobre las que son capaces de causar daños y habitualmente no son patógenas del hombre ni de los animales. La pudrición blanda es una enfermedad que afecta principalmente tubérculos en almacenamiento o al momento de la siembra. La sintomatología varía desde una lesión oscura y hundida en las yemas y en lenticelas, hasta la completa descomposición del tubérculo, acompañada de olor fétido (Alarcón y col., 2011). Esta enfermedad es causada principalmente por bacterias como *Ralstonia solanacearum*, *Bulkordelia gladioli* y *Pectobacterium carotovorum*, las cuales tienen una distribución mundial, y por lo general están presentes donde hay cultivo de papa.

La identificación de bacterias patógenas se puede realizar mediante pruebas que van desde una Tinción de Gram así como pruebas bioquímicas que permiten conocer el comportamiento fisiológico del patógeno hasta pruebas moleculares en las cuales es posible aislar ADN o genes de interés para el

estudio a realizar. De igual manera se puede comprobar la patogenicidad del organismo evaluando los postulados que Robert Koch estableció en el año 1882, para estudiar a los microorganismos patógenos.

La pudrición blanda de los tubérculos ocasionada por *Pectobacterium carotovorum* se caracteriza por la maceración del tejido parenquimatoso que origina una pudrición blanca, cremosa o marrón. A veces la acompaña un olor fétido que se debe a la acción secundaria de otros microorganismos, que por lo general son activos a 25°C.

Mientras que la pudrición causada por *Ralstonia solanacearum* es denominada pudrición parda de la papa, éstas son Gram negativas, oxidasa y catalasa positivas, capaces de acumular poli-β-hidroxiburato (PHB) y reducir nitratos. Incapaces de crecer a 40°C, crecen poco o nada en NaCl 2% (Fonseca, 2014).

En este trabajo se explican los distintos criterios y la integración de pruebas microbiológicas, bioquímicas, moleculares y de patogenicidad en la identificación de bacterias patógenas aisladas de tubérculos de papa con síntomas de pudrición blanda colectados en la población de Sanare, Edo. Lara.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. El cultivo de la papa**

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una especie originaria de la faja templada de Los Andes Suramericanos, perteneciente a la familia de las solanáceas.

En el Perú, su centro de origen, la papa es el principal cultivo en superficie sembrada. Es la base de la alimentación de la zona Andina, y es producido por 600 mil pequeñas unidades agrarias. De las 5000 variedades de papa que se cultivan en el mundo, alrededor de 4000 se encuentran en el Perú (Chávez, 2008).

Desde el punto de vista morfológico, el tubérculo de papa, es un tallo modificado y engrosado, donde se acumulan los nutrientes de reserva para la planta. Posee una yema central de forma plana y circular. No posee escamas ni cualquier otra capa de protección. La reproducción de este tipo de plantas se hace por plantación del mismo tubérculo, el cual es denominado semilla para fines prácticos.

Es una planta herbácea, tuberosa, perenne a través de sus tubérculos, caducifolia (ya que pierde sus hojas y tallos aéreos en la estación fría), de tallo erecto o semi-decumbente, que puede medir hasta 1 m de altura. Presenta tres tipos de tallos, uno aéreo, circular o angular en sección transversal, sobre el cual se disponen las hojas compuestas y dos tipos de tallos subterráneos: los rizomas y los tubérculos (Dimitri, 1987).

A continuación, se detalla la ubicación de la papa en un sistema jerárquico de categorías taxonómicas, según Badillo y col. (2005): Reino: Vegetal; División: Magnoliophyta; Subdivisión: Angiospermae; Clase: Magnoliopsida; Subclase: Asteridae; Orden: Solanales; Familia: Solanaceae; Subfamilia: Solanaideae; Género: *Solanum*; Especie: *Solanum tuberosum* L.

La especie *Solanum tuberosum* se divide en dos grupos: *tuberosum* y *andigena*. La subespecie *tuberosum* es la papa más cultivada en el mundo especialmente en Norte América y Europa, mientras el cultivo de la subespecie *andigena* ocurre en el Centro y Sur América.

En Venezuela, la variedad 'Granola', es comercializada ampliamente en la actualidad pese a su susceptibilidad a muchas enfermedades. Esta variedad fue descrita por Von Dcursen en 1997, como una planta de mediano a alto tamaño, tallo bastante grueso, suficientemente extendido de color morado pálido, hojas grandes de color verde claro, folíolos primarios bastante grandes y estrechos con nervaduras superficiales, floración abundante, inflorescencias pequeñas, flores de color rojo-violeta intenso. Follaje de desarrollo algo lento al principio, pero más tarde se recupera y cubre bien el terreno, la maduración es semi-tardía, con alto rendimiento de tubérculos, de mediano contenido de materia seca. Los tubérculos son de forma oval-redondeada, piel amarilla, bastante áspera, carne amarilla con ojos bastante profundos, buena calidad culinaria, carne firme y de color puro después de la cocción. Los brotes son pequeños de color morado-rojizo intenso, poco

pilosos, yema terminal bastante grande y abierta de color rojo-violeta intenso, yemas laterales de mediano tamaño.

En Los Andes Venezolanos, aún se cultiva 'Arbolona Negra', variedad nativa que se encuentra agrupada dentro de las comúnmente conocidas "papas negras". Es cultivada en algunas comunidades el estado Mérida, tales como Gavidia, Pueblo Llano y en el Páramo del Pajarito. Posee una flor de color morado intenso. La corteza de los tubérculos es de color oscuro y son papas muy resistentes a enfermedades y a heladas. Su maduración se da de 7 a 9 meses, una vez que ha transcurrido este tiempo sus tubérculos son cosechados y comercializados. 'Arbolona Negra' se caracteriza por poseer una alta calidad y diversidad en sabores y texturas, además de ser resistente a numerosos patógenos.

En Venezuela, el cultivo de la papa es de gran importancia social y económica, según los datos del Instituto de Nutrición Nacional de la República Bolivariana de Venezuela, la producción de papa en Venezuela está representada como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Balance de la producción de papa en el país, según (INN, 2010).

<b>Producción</b>	<b>512.544 Ton/año</b>
<b>Importación</b>	41.723 Ton/año
<b>Exportación</b>	0 Ton/año
<b>Disponibilidad total</b>	554.267 Ton/año
<b>Pérdidas</b>	76.882 Ton/año
<b>Consumo humano</b>	477.385 Ton/año
<b>Disponibilidad por persona (Kg/año)</b>	16,6
<b>Gramos por día (Bruto/Neto)</b>	45,4/38,1

En los Estados Centrales, Aragua y Carabobo, la siembra se inicia en los meses de noviembre y diciembre mientras que en los Estados Lara y Trujillo, inician su siembra de febrero a abril y en los Estados Andinos de Mérida y Táchira, se siembra papa durante todo el año.

La producción de semillas de *Solanum tuberosum*, es de suma importancia para garantizar la calidad y cantidad de los tubérculos producidos en el país. Las necesidades de semilla de papa certificada en el país han variado de 16 a 32 mil toneladas/año, siendo ésta importada anteriormente de Canadá, Alemania, Holanda y en menor proporción de Colombia principalmente; en la actualidad es importada desde Argentina y además en Venezuela, específicamente en el Estado Mérida Municipio Rangel se construyó el laboratorio de PROINPA (Productores Independientes del Páramo), en el cual haciendo uso del cultivo *in Vitro* producen minitubérculos de papa que son entregados a los agricultores como una semilla calificada, libre de

patógenos. A partir de la década de los noventa se incrementó el costo de la semilla certificada y el uso de material de plantío proveniente de campos destinados a la producción de papa para consumo. Esta situación ha afectado seriamente la producción de papa, reflejándose en el elevado costo de esta actividad productiva, baja rentabilidad y también en una disminución importante del área sembrada anualmente en ciertas regiones del país (Coraspe y col., 2002).

## **2.2. Cultivo *in vitro* de papa como sistema para las pruebas de patogenicidad y cumplimiento de los postulados de Koch.**

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es una herramienta biotecnológica, a partir de la cual es posible la multiplicación y obtención de cultivos sanos, basándose en la totipotencia celular, la cual se refiere a la capacidad de regeneración que posee un organismo completo a partir de una célula vegetal.

Las células y tejidos que crecerán y se desarrollarán, dependerá de los objetivos del cultivo de tejidos. En el establecimiento de un cultivo *in vitro* es de gran importancia el medio a utilizar y las condiciones ambientales que se establezcan, las cuales van a depender directamente de la especie de la planta que se quiera propagar. En el año 1962, Murashige y Skoog desarrollaron un medio de cultivo compuesto por sales minerales, vitaminas,

azúcar, agua y agar, el cual ha sido utilizado por numerosos investigadores en el establecimiento de plantas *in vitro*.

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* comprende tres sistemas de regeneración como lo son, la micropropagación, la organogénesis y la embriogénesis somática.

La micropropagación consiste en la producción de plantas completas a partir de inóculos con potencialidad de la planta madre, tales como meristemas, yemas o segmentos de tallo con una o dos yemas, en los cuales al ser colocados bajo condiciones de asepsia en tubos de ensayos u otros recipientes es posible controlar las condiciones tanto ambientales como nutricionales para obtener plantas genéticamente idénticas a la planta madre. La micropropagación constituye uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura.

El proceso de micropropagación comprende las fases que se mencionan a continuación:

Fase 0: Pre-adaptación del material parental a condiciones homogéneas que favorezcan la multiplicación vegetativa *in vitro*. Fase 1 (Inducción): es la primera etapa del cultivo durante la cual se induce el desarrollo del explante con potencialidad. En esta fase se pueden utilizar algunas hormonas como las citoquininas. Fase 2 (Multiplicación): los vástagos inducidos en la primera fase son multiplicados por medio de la inducción de brotes adventicios para aumentar el número de plantas que se derivan de una sola planta madre.

Fase 3 (Enraizamiento): los tallos productos de la fase 1 y 2 son tratados ahora para inducir la formación de raíces y producir plantas completas. Fase 4 (Aclimatación): esta es la etapa más difícil del cultivo, cuando las plántulas salen del ambiente estéril y rico en nutrientes para iniciar su desarrollo en tierra. Esta fase requiere de condiciones adecuadas y grandes cuidados, para que las plántulas no mueran por pérdida o exceso de agua, o bien por el ataque de microorganismos.

La organogénesis es una técnica que consiste en el desarrollo de yemas o de meristemas radicales a partir de los explantes directamente o a partir de los callos. Mientras que la embriogénesis somática se refiere a la inducción de estructuras bipolares con un eje radical-apical a partir de células que no son producto de fusión de gametos. Estas estructuras no poseen conexión vascular con el tejido materno y deben ser capaces de crecer y formar plantas normales.

Todos estos sistemas de regeneración *in vitro* han sido establecidos en diferentes variedades de papa; en particular, mediante la micropropagación se obtienen grandes poblaciones de plantas genéticamente idénticas y completamente libres de patógenos. Estas ventajas hacen que la obtención de vitroplantas a través de la micropropagación provea un material vegetal idóneo para realizar estudios de patogenicidad.

Otras ventajas de emplear el cultivo *in vitro* para estos estudios al compararlo con condiciones naturales son: 1) control de condiciones climáticas 2)

estudio de gran número de variables en un espacio reducido, 3) fácil manipulación. Entonces la identificación del patógeno y determinación del inóculo apropiado, el establecimiento del cultivo *in vitro* de la especie vegetal y el re-aislamiento y re-inoculación de vitroplantas testigo (postulados de Koch), son los componentes clave de este diseño experimental.

En el 2012, Moreno estudió los efectos de la composición del medio de cultivo y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa *Solanum tuberosum* L., obteniendo los mejores resultados al micropropagar en medio líquido MS (1962), las distintas variedades en agitación orbital continua bajo luz blanca por 4 semanas y posteriormente pasando estas vitroplantas a medio líquido MS con 50 g/L de sacarosa y 5 mg/L de BA en agitación orbital continua y fotoperiodo de 8h luz, con lo cual pudo obtener en 2 meses un número considerable de microtubérculos, que además tenían un tamaño adecuado para su posterior utilización en pruebas de patogenicidad.

Alva y Oropeza en el 2013, en un estudio para evaluar los efectos de la consistencia del medio de cultivo y del nitrato de plata en la micropropagación de dos cultivares de papa *Solanum tuberosum*, concluyeron que el uso de medio semi-sólido suplementado con 2mg/L de sacarosa permite disminuir los síntomas ocasionados por la producción de etileno y además obtener vitroplantas con un mayor área foliar de ambas variedades de papa, los cuales son útiles en el estudio de las interacciones planta-patógeno o en pruebas de patogenicidad.

Alvez en el 2014, estableció un sistema para el estudio de la interacción entre *Saccharum* sp. y *Xanthomonas albilineans*. Para esto, empleó la variedad venezolana de caña de azúcar V99-245, susceptible a la escaldadura foliar de la caña de azúcar causada por *X. albilineans*. Se probaron 3 metodologías de inoculación de las vitroplántulas con lo cual se pudieron observar los síntomas de la enfermedad y se logró aislar de nuevo el patógeno de las plantas inoculadas, confirmando los postulados de Koch. Demostró las ventajas de trabajar con un tejido libre de patógenos, y en un ambiente homogéneo, independientemente de las condiciones climáticas.

### **2.3. Pudrición blanda en papa. Agentes causales.**

Los cultivos de papa pueden verse afectados por diferentes enfermedades causadas por distintos organismos tales como hongos, virus y bacterias, de las cuales las bacterias fitopatógenas viven generalmente en la proximidad de las plantas sobre las que son capaces de causar daños y habitualmente no son patógenas del hombre ni de los animales. Actualmente, existen más de 60 especies reconocidas que incluyen alrededor de 300 subespecies y patovares.

La papa es afectada por tres especies del género *Erwinia*, tales como *E. carotovora* subsp. *atroséptica* cuyo rango de hospederos está restringido a climas fríos, *E. chysanthemi* que es patógena de numerosos cultivos tropicales y sub-tropicales, incluyendo rubros extensivos como el maíz, la

piña y el arroz; mientras que *E. carotovora* subsp. *carotovora* (= *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) está distribuida en zonas tropicales y templadas.

*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* y *P. chrysanthemi* pueden causar pudrición blanda en el tubérculo, pero sólo *carotovorum* y *chrysanthemi* causan pierna negra. La patogénesis es temperatura dependiente. *P. carotovorum* spp *carotovorum* causa pierna negra a temperaturas menores a 25°C; mientras que *P. chrysanthemi* lo hace a temperaturas mayores (Pérombelon, 2002).

*Ralstonia solanacearum* y *Pectobacterium carotovorum*, ambas causantes de la pudrición de tubérculos; son las dos bacterias responsables de las enfermedades más importantes que se presentan en los cultivos de papa venezolanos; sin embargo, no existe una regulación clara y articulada acerca del flujo de estos patógenos, por ejemplo para utilización de suelos ni para portadores asintomáticos, así como tampoco hay metodologías moleculares implementadas para el diagnóstico y control de estas enfermedades como tampoco restricciones gubernamentales específicas para el tráfico de material vegetal que pueda propagar estas especies patógenas.

La pudrición blanda es una enfermedad que afecta principalmente tubérculos en almacenamiento o al momento de la siembra. La sintomatología varía desde una lesión oscura y hundida en las yemas y en lenticelas, hasta la

completa descomposición del tubérculo, acompañada de olor fétido (Alarcón y col., 2011).

Generalmente, *Pectobacterium carotovorum* está en estado de latencia en las lenticelas de los tubérculos. El desarrollo de la enfermedad se debe a la acción de enzimas extracelulares producidas por estas bacterias como pectato liasa, poligalacturonasa, celulasa y proteasa, que degradan los componentes de la pared celular de las plantas. La actividad de las pectato liasas, ha sido principalmente correlacionada con la patogenicidad y la virulencia de estas bacterias fitopatógenas.

Para que ocurra la multiplicación de *Pectobacterium* en el tejido de los tubérculos, los factores inhibitorios (agua, disponibilidad de nutrientes y resistencia del huésped) deben ser controlados. El principal factor que desvía de latencia a desarrollo de la enfermedad, es la presencia del agua en los tubérculos, lo cual dispara una cascada de eventos que conducen a la llegada de la pudrición. Una película de agua conduce, dependiendo de la temperatura, a anaerobiosis dentro del tubérculo. Una vez disminuido el oxígeno dentro de los tubérculos por la respiración de los tejidos, este no se renueva por difusión desde el aire debido a la película de agua. La anaerobiosis afecta los sistemas de resistencia del huésped dependientes del oxígeno (fitoalexinas, fenoles, radicales libres, etc.). Además inhibe la lignificación y suberización de la pared celular que ofrecen protección hacia la degradación por las enzimas pécticas (Pérombelon, 2002).

Los tallos generalmente adquieren una coloración oscura, y debido a ello la enfermedad se denomina pierna negra o pata negra. La pudrición puede iniciarse en las lenticelas o heridas y propagarse rápidamente por el tubérculo (Elphistone, 1987). Los tallos que provienen de tubérculos-semillas infectados desarrollan síntomas distintos según el clima. Bajo clima seco, las hojas se vuelven cloróticas, el tallo se parte y se seca. Bajo condiciones de alta humedad, puede haber marchitamiento y follaje clorótico con márgenes enrollados hacia arriba. En presencia de agua libre se desarrolla una pudrición negra y mucosa que se extiende sobre la superficie del suelo y puede avanzar rápidamente en dirección apical. Un corte transversal por encima de la lesión, puede revelar los haces vasculares oscurecidos y taponados por una deposición gomosa que causa marchitez. En los tallos aéreos puede aparecer la pudrición negra (desconectada de la base) cuando la infección se inicia por daños mecánicos o por insectos y la transmisión se realiza por las gotas de lluvia o por los insectos. En este caso se le denomina pudrición aérea. La incidencia en el campo, se presenta comúnmente en forma de manchas que coinciden con las zonas más bajas y húmedas. Dado que *R. solanacearum* y *P. carotovorum* podrían ser las bacterias causantes de los síntomas que muestran los tubérculos colectados en Sanare; en esta investigación se hizo énfasis en la descripción de estas dos bacterias patógenas.

#### **2.4. Características diferenciales de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.**

*Pectobacterium carotovorum* es una especie de la familia Enterobacteriaceae. Anteriormente era denominada *Erwinia carotovora*, ya que pertenece al género *Erwinia*, cuyo nombre proviene de Erwin Smith, el primer fitobacteriólogo, pero su nombre fue modificado debido a sus características pectolíticas. Las especies del género *Erwinia*, tienen una distribución mundial, y por lo general se presentan donde hay cultivos de papas. Todas las especies de este género de bacterias son patógenas para las plantas y se dividen en dos grupos:

- *Erwinia amylovora*: provoca enfermedades necróticas a los árboles frutales.
- *Erwinia carotovora*: provoca la podredumbre blanda de la papa.

La clasificación científica aceptada actualmente para las especies de este género corresponde a: Reino: *Bacteria*; Filo: *Proteobacteria*; Clase: *Gammaproteobacteria*; Orden: *Enterobacteriales*; Familia: *Enterobacteriaceae*; Género: *Pectobacterium*.

Los miembros de este género corresponden a bacilos Gram negativos flagelados que presentan colonias irregulares y blancas en medio YDC. Todas las especies son anaerobias facultativas, catalasa positiva, oxidasa

negativa, fermentadoras de glucosa, reductoras de nitrato y utilizan L-arabinosa, D-glucosa, Lactosa, no producen urea y son indol negativas.

La pudrición blanda de los tubérculos ocasionada por *Pectobacterium carotovorum*, se caracteriza por la maceración del tejido parenquimatoso que origina una pudrición blanca, cremosa o marrón. A veces la acompaña un olor fétido que se debe a la acción secundaria de otros microorganismos, que por lo general son activos a 25°C.

En la Tabla 2 se muestran las características bioquímicas de *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* según Schaad y col. (2001):

Tabla 2. Características bioquímicas de *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* (Schaad y col., 2001):

Prueba	Reacción
Fermentación de glucosa (OFG)	+
Catalasa	+
Oxidasa	-
Crecimiento a 37°C	+
Reducción de azúcares a partir de sacarosa	-
Actividad fosfatasa	-
Sensibilidad a la eritromicina	-
Producción de Indol	-
Formación de ácidos a partir de carbohidratos:	
• Sorbitol	-
• Citrato	+
• Rafinosa	+
• Lactosa	+

Según el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1998), el género *Pectobacterium* posee las características bioquímicas que se nombran a continuación en la tabla 3:

Tabla 3. Características bioquímicas de *Pectobacterium* (Garrity y col., 2005)

Prueba	Reacción
Tinción Gram	-
Fermentadoras de azúcares	+
Crecimiento entre 27°C a 30°C	+
Productoras de ácidos a partir de:	
Fructosa	+
D-galactosa	+
D-glucosa	+
D-manosa	+
Sacarosa	+
D-ribosa	+
Urea	-
Catalasa	+
Oxidasa	-

### 2.5. Características diferenciales de *Ralstonia solanacearum*.

*Ralstonia solanacearum*, es un patógeno de gran importancia en las zonas tropicales y subtropicales, ya que afecta más de 200 plantas en todo el mundo, y cada día las especies susceptibles, van en aumento (Fonseca, 2014). En cultivos de papa causa la enfermedad conocida como pudrición parda de la papa o marchitez bacteriana, siendo ésta la enfermedad bacteriana más grave de la papa en las regiones cálidas del mundo y con frecuencia restringe la producción de este cultivo. En países como Venezuela, la bacteria se ha detectado en los cultivos de papa en los

estados Lara, Monagas, Mérida y en tomate en los estados Aragua, Carabobo, Cojedes, Yaracuy y Guárico don-de también se ha detectado en los cultivos de banano (Hernandez y col., 2005).

*Ralstonia solanacearum* pertenece a la subdivisión  $\beta$  de las proteobacterias (Poueymiro y Genin, 2009), inicialmente fue descrita por primera vez como *Bacillus solanacearum* (Smith, 1896). Desde entonces, ha sufrido modificaciones recibiendo las denominaciones en orden cronológico de *Burkholderia solanacearum* y *Pseudomonas solanacearum*, especie que incluía además las especies *Ralstonia pickettii* y *Ralstonia autropha* y *Pseudomonas fluorescentes* antes de la separación en dos grupos ubicando a *Pseudomonas fluorescentes* en un género aparte (Remenant y col., 2010), antes de la clasificación actual: Clase: *Beta proteobacteria*; Orden: *Burkholderiales*; Familia: *Burkholderiaceae*; Género: *Ralstonia*; Especie: *Ralstonia solanacearum*.

Las especies de *R. solanacearum* son bacterias Gram negativas, bacilos de 0.5 a 0.7 por 1.5 a 2.5  $\mu\text{m}$ , oxidasa y catalasa positivas, capaces de acumular poli- $\beta$ -hidroxiburato (PHB) y reducir nitratos. Incapaces de crecer a 40°C, crecen poco o nada en NaCl 2%. Los cultivos son negativos para la prueba de arginina dihidrolasa, licuefacción de gelatina e hidrólisis de esculina o almidón. Las colonias son no fluorescentes. Las colonias de *R. solanacearum* son de crecimiento medio, blancas, de márgenes lisos, brillantes, circulares o irregulares y convexos (Fonseca, 2014).

Tabla 4. Características fisiológicas más importantes de *R. solanacearum* (Chavarro y col., 2004).

Prueba	Reacción
Coloración Gram	-
Gránulos de Poly-B-Hidroxybutirato	+
Prueba de KOH	+
Oxidación de glucosa	+
Oxidasa	+
Tolerancia a soluciones de NaCl al 0.5%	-
Tolerancia a soluciones de NaCl al 2%	-
Tolerancia a soluciones de NaCl al 4%	-
Catalasa	+
Hidrólisis	-
Simmons citrato	+
Hidrólisis de almidón	-
Reducción de nitratos	+
Arginina deshidrolasa	+/-
Utilización de arginina	-

## 2.6) Técnicas microbiológicas, bioquímicas y moleculares para la identificación de bacterias fitopatógenas.

### 2.6.1. Microbiológicas

Los organismos superiores tienen rasgos anatómicos tan diferentes que pueden ser fácilmente utilizados en su clasificación, a diferencia de los microorganismos, los cuales bajo el microscopio son tan similares que se dificulta su clasificación. Los microorganismos difieren en propiedades bioquímicas, fisiológicas y/o serológicas. Sin embargo, aun cuando la morfología celular dice poco sobre las relaciones filogenéticas, sigue siendo

útil para la identificación bacteriana. Por ejemplo: la presencia de endosporas y su localización resulta muy útil en la identificación de bacilos esporulados.

La identificación morfológica de las bacterias se logra examinando una lámina sometida a un proceso de tinción diferencial. Estos criterios morfológicos encabezan las primeras etapas del proceso de identificación bacteriana. Entre los tipos de tinciones más utilizados se encuentra la tinción Gram, la mayor parte de las bacterias, teñidas con Gram, se clasifican como Gram positivas o Gram negativas. Además existen otros tipos de tinciones como la tinción ácido resistente, la cual se aplica a otro tipo de bacterias, como por ejemplo micobacterias.

Las bacterias Gram positivas poseen una capa gruesa de peptidoglicano a diferencia de las bacterias Gram negativas, las cuales contienen una capa mucho más delgada, únicamente de peptidoglicano (sólo de 10% - 20%) y está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas (Santambrosio y col., 2009). La diferencia esencial entre esos dos tipos de células está por tanto en su resistencia a la decoloración; la cual se debe probablemente al hecho de que en el caso de bacterias Gram negativas, la mezcla de alcohol/acetona es un solvente lipídico y disuelve la membrana exterior de la pared de la célula (y también puede dañar la membrana citoplásmica a la que se une peptidoglicano). La delgada capa de peptidoglicano es incapaz de retener el complejo cristal violeta-yodo y la célula se decolora. Las células Gram positivas, a causa de

sus paredes celulares más espesas (tienen más peptidoglicano y menos lípido), no son permeables al disolvente, provocando que el complejo cristal violeta-yodo quede atrapado dentro de la pared celular. Después de la decoloración las células Gram positivas son todavía azules, pero las Gram negativas son incoloras. Para poner de manifiesto las células Gram negativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la safranina o la fucsina básica. Después de la coloración de contraste las células Gram negativas son rojas, mientras que las Gram positivas permanecen azules (Santambrosio y col., 2009).

La identificación microbiológica de las bacterias, se realiza mediante el uso de distintos medios de cultivos, tales como los medios selectivos los cuales son utilizados para favorecer el crecimiento de ciertas bacterias contenidas en una población microbiana. El fundamento de estos medios consiste en facilitar nutricionalmente el crecimiento de una población microbiana específica. En el caso de los medios inhibidores, se les añaden sustancias que impiden el crecimiento de una población microbiana. Los medios inhibidores podrían considerarse como una variante más restrictiva de los medios selectivos. Los medios inhibidores se consiguen habitualmente por adición de sustancias antimicrobianas o de cualquier otra que inhiba completamente el desarrollo de una población determinada. Un medio inhibidor es el MacConkey que permite el crecimiento de bacterias Gram negativas e impide el crecimiento de las Gram positivas.

### **2.6.2. Bioquímicas**

La identificación de bacterias no puede estar limitada sólo a las características morfológicas, es importante conocer sus rasgos metabólicos y fisiológicos, los cuales están al alcance mediante la realización de diferentes pruebas bioquímicas. Las pruebas bioquímicas han sido utilizadas para diferenciar bacterias. Estas pruebas se fundamentan en demostrar si el microorganismo es capaz de fermentar azúcares, la presencia de enzimas, la degradación de compuestos, la producción de compuestos coloreados, etc. Hasta las bacterias más relacionadas pueden separarse en dos especies diferentes con base en pruebas bioquímicas.

A pesar de que existe un gran número de pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias, a continuación se mencionan las que se utilizan con más frecuencia, estando clasificadas de acuerdo al tiempo de lectura de las mismas:

#### Pruebas que se utilizan en la identificación preliminar, con lectura inmediata.

- Catalasa: Comprobar la presencia de la enzima catalasa. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas.
- Oxidasa: Determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo-oxidasa que activa

la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones.

Pruebas rápidas, con lectura en menos de 6h:

- $\beta$ -galactosidasa: Demostrar la presencia de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. El compuesto orgánico O-nitrofenil-  $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) reacciona con las enzimas hidrolizantes ( $\beta$ -galactosidasa). El compuesto se transforma en ortonitrofenol, un derivado cromogénico de color amarillo.
- Ureasa: Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción del enzima ureasa. El nitrógeno es disociado como amoníaco. La ureasa actúa a nivel de los puentes C-N.
- Indol: Determinar la capacidad de un organismo de desdoblar el indol de la molécula de triptófano. El indol se combina con el aldehído que se encuentra tanto en el reactivo de Kovacs como en el de Ehrlich, para dar un color rojo en la capa de alcohol. La coloración se basa en la coloración pirrólica en el indol.

Pruebas lentas, con lectura de 18 a 48h:

- Óxido-Fermentación: Determinar el metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono o su falta de utilización. La utilización del hidrato de carbono puede ser mediante dos procesos metabólicos, fermentativo u oxidativo. Algunas bacterias pueden metabolizar el hidrato de carbono solo en condiciones aerobias, y otras en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas.
- Reducción de nitratos a nitritos: Determina la capacidad de un organismo de reducir el nitrato en nitritos.
- Rojo de metilo: El rojo de metilo es un indicador de pH. Actúa entre pH 4,2 y 6,3 variando desde rojo (pH 4,2) a amarillo (pH 6,3). Mediante esta prueba se comprueba la capacidad de un microorganismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa por la vía de la fermentación ácido-mixta. Se utiliza como parte de la identificación a nivel de especie de los bacilos entéricos Gram negativos.
- Agar hierro de Kligler: Determinar la capacidad de un organismo de atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción o no de gases, junto con la determinación de posible producción de ácido sulfhídrico (SH)<sub>2</sub>. El medio de Kligler contiene como hidratos de carbono la glucosa y la lactosa. Existe otro medio, el *triple sugar iron* (TSI) que posee un tercer hidrato de carbono, la sacarosa.

- Hidrólisis de la gelatina: Esta prueba muestra la capacidad de ciertos microorganismos para hidrolizar la gelatina a péptidos y aminoácidos, mediante la acción de enzimas específicas denominadas gelatinasas.
- Descarboxilasas: La descarboxilación es un proceso en el cual las descarboxilasas atacan el extremo carboxilo de los aminoácidos, formando la correspondiente amina. Los tres aminoácidos que se ensayan en la identificación de enterobacterias son arginina, lisina y ornitina. La descarboxilación de lisina y ornitina da cadaverina y putrescina (diaminas), mientras que la descarboxilación de arginina da citrulina por acción de una dehidrolasa. Esta prueba se debe realizar con un tubo control que contiene medio base sin aminoácido.
- Utilización de citrato: Esta prueba sirve para determinar si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando una alcalinización del medio.

Schaad y col. (2001), establecieron las pruebas bioquímicas que se muestran en la tabla 5, para la identificación de bacterias del género *Erwinia* y sus distintas especies.

Tabla 5. Pruebas bioquímicas empleadas por Schaad y col. (2001) y sus principios para la identificación de bacterias del género *Erwinia* y sus distintas especies.

<b>Prueba</b>	<b>Principio</b>	<b>Reacción</b>
Simmons Citrato (SC)	Utilización por parte del microorganismo del Citrato como única fuente de carbono.	+
Kliger	Capacidad del organismo de atacar un carbohidrato específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción de gases, y determinación de posible producción de (SH) <sub>2</sub> .	Capaz de utilizar tanto glucosa como lactosa.
Indol	Capacidad de un organismo de desdoblar el indol de la molécula de triptófano.	-
Motilidad	Determinar si un microorganismo es móvil o inmóvil.	+
OF	Al ser suplementado con hidratos de carbono, se usa para determinar el metabolismo oxidativo-fermentativo de las bacterias Gram negativas.	Anaeróbicos facultativos
Nitrato	Capacidad de un organismo de reducir el Nitrato.	-
Catalasa	Comprobar la presencia de la enzima Catalasa en el microorganismo.	+
Oxidasa	Comprobar la presencia de la enzima Oxidasa en el microorganismo.	-
Gelatina	Capacidad de un organismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) que licuan gelatina.	+
Urea	Determinar la presencia de la enzima ureasa en los microorganismos.	-

### **2.6.3. Moleculares**

Las técnicas moleculares que se han desarrollado en los últimos años han sido de gran utilidad en el estudio de agentes patógenos de plantas, animales y humanos.

Las técnicas moleculares, son capaces de proporcionar resultados precisos, fiables y reproducibles rápidamente y facilitar la toma temprana de decisiones para la gestión de la enfermedad (Narayanasamy y col., 2008).

Para la aplicación de técnicas moleculares, lo primero que debe obtenerse es un extracto de ADN bacteriano de calidad, lo cual se corrobora mediante electroforesis de este ADN en geles de agarosa y espectrofotometría.

Una de las técnicas moleculares ampliamente utilizadas en la identificación bacteriana es la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) técnica que consiste en amplificar una región del ADN, en el caso de la PCR universal aplicada en ADN bacteriano se amplifica la región del gen 16S ribosomal, la cual es una región altamente conservada en procariotas.

La PCR universal para la identificación bacteriana mediante el análisis de esta secuencia consta de dos etapas: la amplificación del ADN de la muestra y la posterior secuenciación del fragmento de PCR para la identificación del microorganismo. Las regiones del genoma que se utilizan deben cumplir con características fundamentales: a) estar presentes en todas las especies bacterianas; b) contener secuencias altamente conservadas a las cuales van dirigidos los iniciadores y c) incluir secuencias polimórficas para poder

diferenciar distintas especies. Luego de amplificar y secuenciar el fragmento, la secuencia obtenida se compara con aquellas depositadas en bases de datos públicas como el banco de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Poggi y col., 2009).

Darrase y colaboradores (1994), usando el gen de la pectatoliasa (*peI*) desarrollaron una prueba de PCR para *Erwinia carotovora*. El set de iniciadores permitió la amplificación de un fragmento de 434 pb en las cepas de *E. carotovora* y únicamente no pudieron detectar *E. carotovora* subsp. *betavasculorum*. Luego hicieron RFLP a los fragmentos amplificados utilizando 7 endonucleasas. Ellos además discuten el uso del RFLP de fragmentos amplificados en epidemiología y diagnóstico, ya que por ejemplo, *E. carotovora* subsp. *atroseptica* presentaba un grupo homogéneo mientras que las cepas de *E. carotovora* subsp. *carotovora* y *E. carotovora* subsp. *odorifera* exhibían diversidad genética que podía ser resultado de un origen no-monofilético.

Los estudios de variabilidad genética bacteriana están basados en las características del genoma de las enterobacterias, el cual contiene secuencias cortas repetidas y esparcidas, llamadas ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), secuencias REP (Repetitive Extragenic Palindromic), así como BOX-PCR los cuales son de naturaleza modular, y se componen de subsecuencias conservadas; las tres han sido usadas ampliamente en tipificación, análisis genético y en la identificación de brotes

infecciosos bacterianos (Rademaker y col., 1997). Estos análisis están basados en la amplificación de las secuencias de ADN a través de la PCR, usando iniciadores específicos para cada tipo de secuencia. El polimorfismo detectado resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones del ADN. Usando estas secuencias ha sido posible discriminar serotipos estrechamente relacionados de la misma especie y grupos de cepas relacionadas clonalmente, ya que poseen un gran poder discriminatorio (Versalovic y col., 1991).

Khan y colaboradores (2003) generaron un par de iniciadores de 24 mer al secuenciar la banda polimórfica derivada por URP-PCR que solo es compartida por las cepas de *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum*. El juego de iniciadores denominado (EXPCCF/EXPCCR) amplificó una banda de 0.55 kb en las 29 cepas de *P. carotovorum* subsp *carotovorum* y en tres cepas de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *wasabiae* pero no de las otras subespecies, ni de otras Erwinias u otros géneros bacterianos. El perfil de digestión con *Rsa* I de las bandas amplificadas, dividió las cepas de *P. carotovorum* subsp *carotovorum* en cinco grupos con un perfil único para la subespecie *wasabiae*.

Nazerian y colaboradores (2011), encontraron manchas de color café oscuro con lesiones acuosas extensas causadas por bacterias patógenas en plantas de okra que fueron colectadas en diferentes campos de Malasia en el 2010.

Mediante la amplificación por PCR del gen de pectato liasa (*pel*) y la amplificación del 16S-23S rRNA (ITS) con los iniciadores G1 y L1 obtuvieron fragmentos de 434, 535 y 570 pb, respectivamente. A partir de la similitud entre los resultados de las pruebas bioquímicas y su equivalencia con fuentes de estándares bacteriológicos del gen *pel* basada en PCR, y el análisis de RFLP de los productos de la PCR de la ITS, todos los aislamientos fueron identificados como *Pectobacterium carotovorum*. Siendo este el primer reporte de *P. carotovorum* en plantas de okra de Malasia.

En el año 2010 Zhu y colaboradores, aislaron treinta y dos cepas de *Pectobacterium carotovorum* ssp. de la col china y otras hortalizas. Estas cepas fueron objeto de observación morfológica, identificación bioquímica y fisiológica, así como análisis de la secuencia 16S rDNA. Todas las cepas excepto 5 manifiestan los mismos patrones de PCR. El análisis filogenético de las secuencias de 16S rDNA indicó que estas cinco cepas que eran agrupadas con *P. carotovorum* eran distintas de otras cepas de los grupos de *P. carotovorum*. Sin embargo, el análisis de ácidos grasos de células enteras y las características bioquímicas y fisiológicas sugirieron que estas cinco cepas todavía podrían ser identificadas como *P. carotovorum*. Ellos concluyeron que esas cinco cepas son probablemente de una nueva taxonomía evolutiva de *P. carotovorum* ssp.

Terta y colaboradores (2012), colectaron 22 aislados de *P. carotovorum* en Morocco e investigaron sus características fenotípicas y genéticas. Todos los

aislados fueron identificados como *P. carotovorum* por la galería API 20E y producían una banda de ADN de 434-bp del gen *pel* de la pectatoliasa en experimentos de PCR. Evaluaron la diversidad genética por ERIC-PCR, y los aislados se distribuyeron en dos grupos subdivididos en muchos pequeños sub-grupos. No encontraron una correlación entre el análisis ERIC-PCR, patrones de susceptibilidad ni área geográfica.

Kettani-Halabi y colaboradores (2013), presentan un método alternativo usando el gen regulador de respuesta *pmrA* (parte del Sistema de dos componentes (TCS) de esta bacteria para poder sobrevivir, colonizar y causar la enfermedad), para la identificación y análisis de las relaciones entre 29 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y otras subespecies de *Pectobacterium*. El análisis de la secuencia del gen *pmrA* permitió la identificación de las subespecies de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, y la comparación con ERIC-PCR y la secuenciación del 16S rDNA, demostró que hay una diversidad genética considerable en las razas de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

## **2.7. Pruebas de patogenicidad y postulados de Koch.**

La patogenicidad es la capacidad de ciertos organismos para iniciar el desarrollo de una enfermedad. Con la finalidad de comprobar la patogenicidad de los microorganismos se realizan pruebas que consisten en

inocular con la bacteria en estudio un organismo completamente sano y observar el avance progresivo de la enfermedad que causa el patógeno.

Haynes y col. (1997) estimaron la resistencia a la pudrición blanda en tubérculos de papa mediante la inoculación de rodajas de tubérculo con especies de *Erwinia* causantes de esta enfermedad. Encontraron que las variables más apropiadas para la medición de la resistencia a la pudrición blanda mediante este método fueron el diámetro del tejido macerado y las medidas de la pérdida proporcional de peso.

Nazeriam y colaboradores (2011) en pruebas de patogenicidad, esterilizaron las vainas de okra superficialmente con etanol al 70%, las lavaron con agua destilada estéril, cortaron en dos piezas, y las inocularon con 50µL de caldo con  $10^6$  UFC / ml de una suspensión bacteriana. Muestras inoculadas y no inoculadas (control) se colocaron en una cámara de crecimiento con una humedad relativa de 80-90% a 27°C. Los síntomas que se produjeron 48 h después de la inoculación fueron los mismos que en la infección natural, mientras que las muestras de control inoculadas con agua permanecieron sanas. Los postulados de Koch se cumplieron por el reaislamiento de las cepas causantes de la enfermedad.

Robert Koch en 1882, además de haber sido el primero en aislar bacterias puras en agar, estableció cuatro postulados que permitirían atribuir las enfermedades a los diferentes microorganismos aislados, en su caso fue el

agente causal de la tuberculosis *Mycobacterium tuberculosis*. A continuación se enumeran los cuatro criterios establecidos por Koch:

1. El microorganismo patógeno debe estar presente en todos los casos de enfermedad y ausente en organismos sanos.
2. El microorganismo sospechoso debe cultivarse en cultivo aséptico.
3. Las células de un cultivo aséptico del microorganismo aislado deben causar la enfermedad en organismos sanos.
4. El microorganismo debe ser reaislado y ser idéntico al original.

Los criterios expuestos anteriormente han sido utilizados hasta la actualidad para complementar el estudio de organismos causantes de enfermedades.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. GENERAL:**

Identificar bacterias patógenas aisladas de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) con síntomas de pudrición blanda colectados en la población de Sanare, Edo. Lara.

#### **3.2. ESPECÍFICOS:**

- Aislar bacterias patógenas de tubérculos de papa con síntomas de pudrición blanda colectados en Sanare, Estado Lara
- Caracterizar a nivel morfológico, microbiológico, bioquímico y molecular los aislados obtenidos.
- Identificación de las bacterias fitopatógenas aisladas
- Realizar pruebas de patogenicidad y demostrar los postulados de Koch en microtubérculos de las variedades 'Granola' y 'Arbolona Negra'.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Material Vegetal**

Se utilizaron tubérculos de papas variedad 'Granola' y R12 colectados en la población de Sanare, Edo. Lara, las cuales presentaban síntomas de pudrición blanda y negra. Para corroborar la identidad bacteriana mediante los postulados de Koch, se utilizaron vitroplantas de papa de las variedades 'Granola' y 'Arbolona Negra', micropropagadas a partir de vitroplantas de dos meses de edad mantenidas en el banco de germoplasma del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal, IBE, UCV, variedades que son de gran importancia puesto que la variedad 'Granola' es ampliamente comercializada pero susceptible a enfermedades bacterianas, mientras que la variedad 'Arbolona Negra' es nativa y aparentemente resistente a enfermedades bacterianas.

### **4.2. Cepas bacterianas**

Se emplearon 11 aislados bacterianos de tubérculos de papa variedad 'Granola', los cuales presentaban síntomas de bacteriosis, colectados por personal del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal (LMV) en la población de Sanare, Edo. Lara. Estos 11 aislados fueron sometidos a pruebas previas de patogenicidad (con la finalidad de seleccionar aquellos aislados patogénicos) en tubérculos comerciales. Para ello, tubérculos de la variedad 'Granola' adquiridos en el mercado fueron desinfectados con una solución de etanol al

70% y posteriormente fueron sumergidos en agua destilada estéril. Una vez que se cortaron las rodajas para el ensayo (aproximadamente de 1cm de ancho) se flamearon y se colocaron en cámaras húmedas que contenían 10mL de agua destilada estéril. Finalmente las rodajas se inocularon con 10  $\mu$ L de una suspensión bacteriana de 6 horas de crecimiento.

Además se utilizó una cepa control de *Ralstonia solanacearum* caracterizada por Fonseca, 2014 en el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal, IBE, (UCV) y una cepa de *Escherichia coli* que sirvió de control negativo para las pruebas moleculares.

#### **4.3. Caracterización morfológica y microbiológica**

Se aplicó la técnica descrita en 1844 por el bacteriólogo Danés Christian Gram. La tinción se realizó siguiendo el procedimiento que se indica a continuación (tomado del “Manual de Prácticas del Laboratorio de Microbiología General”, de la Universidad Autónoma Metropolitana de México, 2004):

- 1.) Se prepararon frotis bacterianos colocando sobre un portaobjetos una muestra de bacterias bien extendidas.
- 2.) Se cubrió el frotis con 2 gotas de cristal violeta 1% durante 30 segundos a 1 minuto.
- 3.) Se lavó cuidadosamente el frotis con agua de la llave o destilada para eliminar el exceso de colorante.

- 4.) Se sacudió un poco y sin dejar secar cubrir el frotis con 2 gotas de lugol (yodo 1%) por 30 segundos.
- 5.) Se lavó cuidadosamente y con abundante agua para eliminar el resto de lugol.
- 6.) Se inclinó el portaobjetos y se aplicó gota a gota el decolorante (alcohol:acetona 70:30) dejando que escurra hasta que no fluya más tintura.
- 7.) Se lavó inmediatamente con agua.
- 8.) Al secar se le añadieron 2 gotas de safranina 2% durante 30 segundos.
- 9.) Se lavó nuevamente con agua y se dejó secar.
- 10) Se observó al microscopio óptico con el objetivo de 100X.

Para observar el color y la forma de las colonias así como la presencia o no de mucosidad de las mismas (lo cual se puede deber a la presencia o no de exopolisacáridos) se utilizó el medio sólido YDC cuya composición por litro es extracto de levadura 10g, dextrosa 20g, carbonato de calcio 20g, agar 15g.

#### **4.4. Caracterización Bioquímica**

Se llevarán a cabo las pruebas bioquímicas y el cultivo en los medios que se mencionan a continuación, puesto que son considerados importantes en la

caracterización de *Erwinia carotovorum* (*Pectobacterium carotovorum*) (Schaad y col., 2001) y (Garrity y col., 2005).

- Ácidos a partir de:
  - Rafinosa
  - Sorbitol
  - D-ribosa
  - Fructosa
- Catalasa
- CPG
- Gelatina
- Hidrólisis de almidón
- Indol
- McConkey
- Nitrato
- OF Glucosa
- OF Lactosa
- Oxidasa
- Prueba de KOH
- Simmons citrato
- Urea
- Motilidad
- Kliger

#### **4.5. Caracterización molecular**

##### **4.5.1. Extracción del ADN de los aislados bacterianos.**

Se llevaron a cabo los siguientes protocolos para determinar cuál es más eficiente para la extracción de ADN genómico de los aislados:

- Método de Gomes y col. (2000). Las bacterias se cultivaron en 5 mL de caldo nutritivo con 10% v/v de glicerol por 72 horas a 27°C. Se trasvasaron a un tubo eppendorf de 1.5 µl y se centrifugaron las

células a 13000xg por 5min. El sedimento se resuspendió en 200µL de solución de lisis (NaOH 0.2 N y SDS 1%) y 200µL de Tris 0.1 M. La mezcla se desproteinizó con 700µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v/v) y se centrifugó durante 10min a 13000xg. Posteriormente la fase acuosa se separó y se lavó con 700µL de etanol frío al 95% y se homogeneizó en vortex, y se centrifugó nuevamente, luego se decantó el sobrenadante y se lavó con 700µL de etanol frío al 70% y se centrifugó. Se decantó nuevamente el sobrenadante y el ADN se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µL de agua estéril.

- Método de Levesqué y col. (1995). Se aisló una colonia de cada cepa bacteriana sembradas en agar nutritivo y se colocó en crecimiento en 2mL de caldo LB durante 24 horas. Luego se tomaron 200µL del cultivo y se transfirieron a un tubo eppendorf añadiéndole posteriormente 800µL de agua destilada estéril. Se llevó a ebullición por 10min en baño de maría. Se centrifugó a 12000xg durante 2min y el sobrenadante se transfirió a otro tubo eppendorf y se almacenó a 20°C.
- Método de Wang y colaboradores (1999). Los cultivos se crecieron en caldo LB durante 72 horas a 25 °C, se centrifugaron a 3000 g durante 30 minutos y el sedimento se lavó dos veces en solución TES (Tris 10 mM, EDTA 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8), se resuspendió en 2 ml de

solución TES conteniendo 0.1 ml de SDS al 20%, se incubó a 55 °C durante 1 hora, se añadió 5 M de NaCl conteniendo 50 µl de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) al 10% y se incubó a 65 °C durante 30 minutos. Se añadió un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, se mezcló durante 5 minutos por inversión seguido de una centrifugación a 3000 g durante 30 minutos. A la fase acuosa resultante se le repitió el tratamiento de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, luego se le añadieron 2 volúmenes de etanol al 95% frío y 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M. Por último se centrifugó a 14000 g durante 5 minutos, se lavó con etanol frío al 70% y el sedimento se resuspendió en 50 µl de solución TE (Tris-HCl 1 mM, EDTA 1mM).

- Evaluación de la cantidad y calidad del ADN extraído.

Al extraer ADN es necesario realizar una evaluación tanto cuantitativa como cualitativa, para ello se utilizó en este caso el método de espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa, con la finalidad de evaluar, la concentración, pureza e integridad del ADN extraído.

Al comparar los resultados de concentración y pureza de los tres métodos de extracción de ADN, se tomó el ADN extraído mediante el método más eficiente para realizar los ensayos de PCR.

➤ Espectrofotometría.

Para estimar la concentración y pureza, se diluyeron 2.5µL de las muestras de ADN extraído, por cada uno de los métodos antes mencionados, en 497.5µL de agua destilada y se midió la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm. El equipo se blanqueado previamente, se tomaron nota de los valores de cada densidad óptica y de la relación 260/280, la cual indicó la pureza de la muestra en cuanto al contenido de material genético libre de proteínas y otros compuestos.

La concentración de ácidos nucleicos se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN}] (\mu\text{g/mL}) = \text{Abs} (260\text{nm}) \times \text{F.D.} \times 50 \mu\text{g/mL}$$

➤ Electroforesis en gel de agarosa.

Se observó la integridad del ADN extraído, tomando 8µL de la muestra y se mezcló con 2µL de tampón de carga (azul de bromofenol 0.25%, xilene cianol 0.25% y glicerol 30% en H<sub>2</sub>O) y se colocó en un bolsillo del gel de agarosa al 0,8%. Se aplicó corriente (80V) hasta que el primer colorante alcanzó el final del gel. Se trató el gel en una solución al 5% de bromuro de etidio durante 10 min y luego se lavó en agua por 20min. El gel se analizó, en un transiluminador (BioRad) (Luque y Herraéz, 2000).

#### **4.5.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

Se utilizó la PCR para evaluar la calidad del ADN extraído, comprobar la naturaleza procariota de los microorganismos y para la identificación de los aislados con iniciadores específicos. Además se utilizó la variante ERIC-PCR. En todos los casos, la PCR se realizó en un termociclador automatizado (GeneAmp PCR System) y los fragmentos se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y fueron tratados con una solución de bromuro de etidio al 5%. En todos los casos, se emplearon como controles una cepa de *E. coli*, una cepa de *B. gladioli* y una cepa de *Ralstonia solanacearum*. Como control de reactivos se utilizó un tubo conteniendo todos los componentes de la reacción en el cual se sustituyó el ADN por agua destilada estéril.

##### **4.5.2.1. PCR universal ADN ribosomal 16S**

La calidad del ADN extraído mediante los diferentes protocolos, se evaluó mediante la amplificación por PCR del fragmento 16S del gen ribosomal, fragmento que ha sido considerado una región altamente conservada en los organismos procariotas. La amplificación de este segmento se llevó a cabo mediante el protocolo de Lu y col., (2000) como se muestra en la tabla 7, mediante el uso de iniciadores universales U1:5-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3' y U2: 5-ATCGG(C/T)TACCTTGT TACGACTTC-3.

Tabla 6. Mezcla de reacción PCR 16S.

Reactivo	Stock	[deseada]	Volumen por muestra
Buffer	5X	1X	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25mM	2.5mM	2.5 µl
dNTP's	15mM	0.2mM	0.3µl
U1	25µM	0.2 µM	0.2 µl
U2	25 µM	0.22 µM	0.2 µl
Go Taq	5 U/µl	1 U	0.2 µl
ADN	25ng/µl	25 ng	1 µl
H <sub>2</sub> O	-	-	15.6 µl
<b>Total</b>			<b>25 µl</b>

Vf= 25 µl

Las condiciones de amplificación que se llevaron a cabo son las establecidas por Lu y col., (2000) y se detallan a continuación:

Ciclo 1: Desnaturalización durante 5 min a 94°C (una repetición).

Ciclo 2: Desnaturalización durante 1 min a 94°C, hibridación de iniciadores durante 1 min a 55°C, elongación durante 2 min a 72°C (35 repeticiones).

Ciclo 3: Extensión final durante 10 min a 72°C (una repetición).

Esperando un fragmento de 996pb y uno de aproximadamente 100pb como lo reportan los autores.

#### 4.5.2.2. PCR iniciadores específicos

Se dio inicio a la identificación molecular de los aislados LMV10, LMV11 y LMV12 realizando PCRs específicas para la identificación de *Ralstonia solanacearum* con los iniciadores OLI1(5'GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC3') y Y2 (5'CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT3') y de *Burkholderia gladioli* con los iniciadores GLA-f (5'-CGAGCTAATACCGCGAAA-3') y GLA-r (5'-

AGACTCGAGTCAACTGA-3') con el fin de verificar si estos pertenecen o no a alguna de estas especies, las cuales causan también pudrición en tubérculos de papa.

Tabla 7. Mezcla de reacción PCR específica para *R. solanacearum*.

<b>Reactivo</b>	<b>Stock</b>	<b>[deseada]</b>	<b>Volumen por muestra</b>
<b>Buffer</b>	5X	1X	5 µl
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25mM	1.5mM	1.5 µl
<b>dNTP's</b>	10mM	0.2mM	0.5µl
<b>Oli1</b>	10 µM	1 µM	2.5 µl
<b>Y2</b>	10 µM	1 µM	2.5 µl
<b>Go Taq</b>	5 U/µl	1 U	0.2 µl
<b>ADN</b>	25ng/µl	50 ng	1 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	-	-	10.8 µl
<b>Total</b>			25 µl

Vf= 25 µl

Condiciones de ciclado según lo reportado por Seal y colaboradores (1992):

Ciclo 1: Desnaturalización durante 2 minutos a 92°C (una repetición).

Ciclo 2: Desnaturalización durante 20 segundos a 94°C, hibridación de iniciadores durante 25 segundos a 67°C, elongación durante 30 segundos a 72°C (35 repeticiones).

Ciclo 3: Extensión final durante 10 minutos a 72°C (una repetición).

Esperando un fragmento de 292pb como lo reportan los autores.

Tabla 8. Mezcla de reacción PCR específica para *B. gladioli*.

Reactivo	Stock	[deseada]	Volumen por muestra
<b>Buffer</b>	5X	1X	5 µl
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25mM	1.5mM	1.5 µl
<b>dNTP's</b>	10mM	0.2mM	0.5µl
<b>GLA-f</b>	10 µM	0.4 µM	1 µl
<b>GLA-r</b>	10 µM	0.4 µM	1 µl
<b>Go Taq</b>	5 U/µl	1 U	0.2 µl
<b>ADN</b>	25ng/µl	50 ng	2 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	-	-	13.8 µl
<b>Total</b>			25 µl

Vf= 25 µl

Condiciones de ciclado según Furuya y colaboradores (2002):

Ciclo 1: Desnaturalización durante 2 min a 94°C (una repetición).

Ciclo 2: Desnaturalización durante 1 min a 94°C, hibridación de iniciadores durante 75 min a 55°C, elongación durante 1 min a 72°C (30 repeticiones).

Ciclo 3: Extensión final durante 7 min a 72°C (una repetición).

Esperando un fragmento de aproximadamente 300pb como lo reportan los autores.

Seguidamente con el propósito de detectar la presencia de ADN de *P. carotovorum* se realizó la amplificación por PCR del gen *pel* utilizando los oligonucleótidos Y1 (5'-TTACCGGACG CCGAGCTGTGGCGT – 3') y Y2 (5'CAGGAAGATGTCGTTATCGCGAGT3') esperando obtener un fragmento amplificado de 434 pb, para las especies *Pectobacterium carotovorum* (Tabla 9).

Tabla 9. Mezcla de reacción amplificación por PCR del gen *pel*.

Reactivo	Stock	[deseada]	Volumen por muestra
Buffer	5X	1X	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1.5 mM	1.5 $\mu$ l
dNTP's	10mM	0.2 mM	0.5 $\mu$ l
Y1PEL	10 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2.5 $\mu$ l
Y2PEL	10 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2.5 $\mu$ l
Go Taq	5 U/ $\mu$ l	1 U	0.2 $\mu$ l
ADN	25ng/ $\mu$ l	50 ng	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	-	-	10.8 $\mu$ l
<b>Total</b>			<b>25 <math>\mu</math>l</b>

Vf= 25  $\mu$ l

Condiciones de ciclado:

Ciclo 1: Desnaturalización durante 5 min a 94°C (una repetición).

Ciclo 2: Desnaturalización durante 30 segundos a 94°C, hibridación de iniciadores durante 30 segundos a 60°C, elongación durante 1 minuto a 72°C (35 repeticiones).

Ciclo 3: Extensión final durante 7 minutos a 72°C (una repetición).

Esperando un fragmento de 434pb como lo reportan los autores.

#### 4.5.3. Amplificación de regiones repetitivas

Además se realizará la amplificación de la región intergénica espaciadora transcripta (ITS-PCR) según lo descrito por Toth y colaboradores (2001), utilizando los iniciadores universales G1 (5'-GAAGTCG TAACAAGG – 3') y L1 (5' - CAAGG CATC CACCGT -3') (Tabla 10).

Tabla 10. Mezcla de reacción amplificación por PCR de la región ITS.

<b>Reactivo</b>	<b>Stock</b>	<b>[deseada]</b>	<b>Volumen por muestra</b>
<b>Buffer</b>	5X	1X	5 $\mu$ l
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25mM	1.5mM	1.5 $\mu$ l
<b>dNTP's</b>	10mM	2mM	5 $\mu$ l
<b>G1</b>	10 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2.5 $\mu$ l
<b>L1</b>	10 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2.5 $\mu$ l
<b>Go Taq</b>	5 U/ $\mu$ l	1 U	0.2 $\mu$ l
<b>ADN</b>	25ng/ $\mu$ l	50 ng	2 $\mu$ l
<b>H<sub>2</sub>O</b>	-	-	6.3 $\mu$ l
<b>Total</b>			25 $\mu$ l

Vf= 25  $\mu$ l

Ciclo 1: Desnaturalización durante 5 min a 94°C (una repetición).

Ciclo 2: Desnaturalización durante 1 min a 94°C, hibridación de iniciadores durante 2 min a 55°C, elongación durante 2 min a 72°C (28 repeticiones).

Ciclo 3: Extensión final durante 2 min a 72°C (una repetición).

Esperando un fragmentos de diferentes pesos moleculares.

Finalmente se realizó la amplificación con iniciadores que hibridan con regiones repetidas dispersas en el genoma bacteriano, ERIC1: 5'- ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C -3' y ERIC2: 5'- AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G -3', siguiendo las condiciones de amplificación reportadas por Lopes y col., (2001) (Tabla 11).

Tabla 11. Mezcla de reacción amplificación ERIC-PCR.

Reactivo	Stock	[deseada]	Volumen por muestra
Buffer	5X	1X	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25mM	3 mM	3 µl
dNTP's	10mM	0.2mM	0.5µl
ERIC 1	10 µM	2 µM	2 µl
ERIC 2	10 µM	2 µM	2 µl
Go Taq	5 U/µl	1 U	0.2 µl
ADN	25ng/µl	25 ng	1 µl
H <sub>2</sub> O	-	-	11.3 µl
<b>Total</b>			<b>25 µl</b>

Vf= 25 µl

Condiciones de ciclado:

Ciclo 1: Desnaturalización durante 3 min a 95°C (una repetición).

Ciclo 2: Desnaturalización durante 1 min a 94°C, hibridación de iniciadores durante 1 min a 50°C, elongación durante 4 min a 65°C (30 repeticiones).

Ciclo 3: Extensión final durante 10 min a 65°C (una repetición).

Esperando fragmentos de distintos pesos moleculares.

#### **4.6. Cultivo *in vitro* de *Solanum tuberosum* variedad 'Granola' y 'Arbolona Negra' como sistema para pruebas de patogenicidad y postulados de Koch**

Las pruebas de patogenicidad se realizaron con microtubérculos y a continuación se detalla la metodología para la obtención de los mismos a partir de vitroplantas de papa variedades 'Arbolona Negra' y 'Granola'.

#### **4.6.1. Micropropagación de las variedades 'Arbolona Negra' y 'Granola'.**

En fiolas previamente esterilizadas y etiquetadas se agregaron 40mL de medio MS (1962), y en cada una de ellas se inocularon 4 microesquejes con 2 a 3 nudos cada uno (se utilizaron 8 fiolas para la variedad 'Arbolona Negra' y 6 fiolas para la variedad 'Granola'). Las fiolas se sellaron con tapones de gasa y algodón estériles y se colocaron en agitación orbital continua bajo luz blanca, por tres semanas (Moreno, 2012).

#### **4.6.2. Microtuberización de las variedades 'Arbolona Negra' y 'Granola'**

Siguiendo la metodología anterior, se indujo el crecimiento de plantas *in vitro* en medio líquido. Una vez transcurridas las tres semanas, el medio MS fue sustituido por un medio MS de microtuberización, cuya diferencia es que contiene 50 g de sacarosa por litro y 5mg/l de BA. Las fiolas se incubaron en agitación orbital continua con fotoperiodo 8h luz por dos meses.

#### **4.6.3. Pruebas de patogenicidad.**

Las pruebas de patogenicidad se realizaron en microtubérculos. Se tomaron 10µl de caldo con 6 horas de crecimiento y se agregaron directamente sobre una rodaja de microtubérculo colocada previamente en una placa de petri con 8 mL de agua destilada estéril (cámara húmeda) con la finalidad de proporcionar un ambiente con una humedad adecuada para el mantenimiento óptimo del microtubérculo. Como control negativo se realizó la

inoculación con medio sin bacteria. Se observó la aparición de síntomas (pudrición negruzca y olor fétido) durante 120 horas a una temperatura óptima de crecimiento de la bacteria previamente determinada pero que no afecte la supervivencia y mantenimiento de la papa.

Se evaluó el porcentaje de tubérculos enfermos con cada una de las cepas bacterianas y además se realizó un registro fotográfico del desarrollo de la enfermedad.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1. Material vegetal.**

De las muestras colectadas en Sanare, Estado Lara, finca Palo Verde, se seleccionaron tubérculos de papa mostrando la sintomatología típica de pudrición por bacterias. Se utilizaron microtubérculos obtenidos a partir de vitroplantas de papa de las variedades 'Granola' y 'Arbolona Negra', micropropagadas a partir de vitroplantas de dos meses de edad mantenidas en el banco de germoplasma del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal, IBE, UCV.

### **5.2. Cepas bacterianas**

Se emplearon 11 aislados bacterianos de tubérculos de papa con síntomas de bacteriosis colectados en la población de Sanare, Edo. Lara, perteneciendo cada aislado a un tubérculo de papa. Los aislados que fueron seleccionados presentaban colonias de borde irregular de blancas a crema en medio LB y Agar YDC, además todos eran bacilo Gram negativo. Se realizaron pruebas de patogenicidad en tubérculos comerciales con los 11 aislados (Figura 1) seleccionando así para el estudio las tres cepas que causaron la sintomatología de podredumbre en los tubérculos, las cuales fueron denominadas LMV10, LMV11 y LMV12 por ser aislados del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal. Tanto el control como las rodajas que no presentaron síntomas de la enfermedad, se observan con una coloración

negra debido a la oxidación típica de los tubérculos al estar en presencia de oxígeno.

Además se utilizaron una cepa control de *Ralstonia solanacearum* caracterizada por Fonseca (2014) en el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal, IBE, UCV y una cepa de *Escherichia coli*, donada por el Centro Médico Docente La Trinidad que sirvió de control negativo para las pruebas moleculares. Para estas pruebas se utilizó también un aislado de *B. gladioli* como control positivo.



Figura 1. Prueba de patogenicidad en tubérculos comerciales. Derecha: rodajas inoculadas y Control (sin inóculo) que no presentaron características de la enfermedad. A la izquierda muestras identificadas como 3, 4b y 1b con síntomas de pudrición y 4a sin síntoma de la enfermedad.

### 5.3 Caracterización morfológica y microbiológica

Las tres cepas seleccionadas fueron sometidas a la prueba de la Tinción Gram, resultando todas Bacilos Gram negativos como se muestra en la Figura 2.

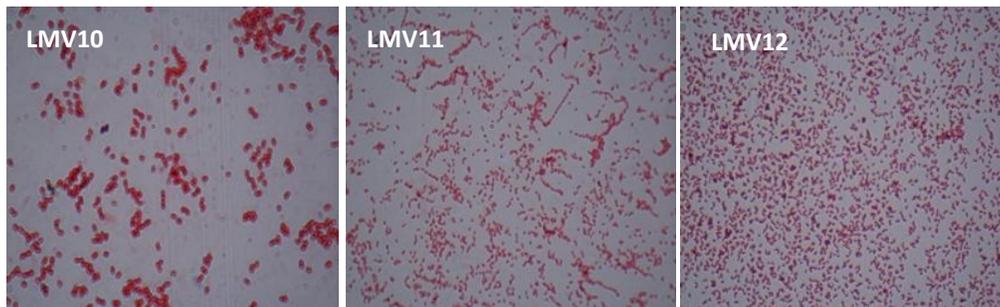


Figura 2. Tinción Gram.

Las tres cepas en estudio presentaron una coloración de blanca a crema en agar nutritivo mientras que la cepa control *R. solanacearum* presentó colonias mas pequeñas de borde regular y blancas en este medio. Al establecer el crecimiento de todas las cepas en Agar YDC se observaron distintas características, tales como coloración crema, secas, de superficie lisa y de bordes irregulares para las tres cepas en estudio, mientras que las colonias de *R. solanacearum* resultaron ser blancas, redondas y secas en el mismo medio (Figura 3).

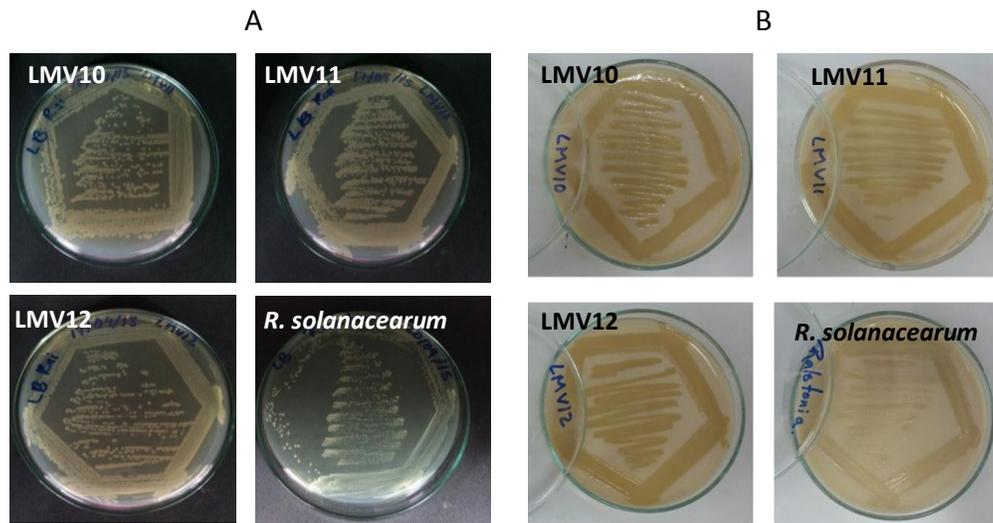


Figura 3. A: Colonias de 24 horas de crecimiento en AN. B: Colonias de 24 horas de crecimiento en Agar YDC.

#### 5.4 Caracterización bioquímica.

Existen diversas pruebas bioquímicas que se deben emplear para identificar un microorganismo, pudiendo encontrar con ellas el género y la especie bacteriana al cual pertenece. Debido a los síntomas de pudrición que presentaban los tubérculos de papa colectados en Sanare, para la identificación de los aislados obtenidos se estudió el grupo de bacterias que podría causar esta pudrición, encontrando que las bacterias *R. solanacearum* y *P. carotovorum* podrían ser buenos candidatos como los causantes de la enfermedad. Las pruebas preliminares de patogenicidad, las diferencias morfológicas y de cultivo diferencial nos permitieron en primera instancia centrar nuestra investigación en el género *Pectobacterium*, siendo las pruebas fundamentales para su identificación una vez realizada la tinción Gram las siguientes: Oxido-fermentación de carbohidratos, coloración en medio YDC, crecimiento a 37°C, catalasa, oxidasa, entre otras.

Los aislados LMV10, LMV11 y LMV12 resultaron ser positivos en la prueba de KOH al igual que *R. solanacearum* confirmando de esta manera que las bacterias son Gram negativas. Al crecer las bacterias en el medio MacConkey se logró determinar que los tres aislados en estudio, a diferencia de la cepa de *R. solanacearum*, responden al crecimiento en este medio selectivo, además sólo el aislado LMV10 es capaz de fermentar la lactosa en este medio (Figura 4), observándose las colonias con coloración rosada.

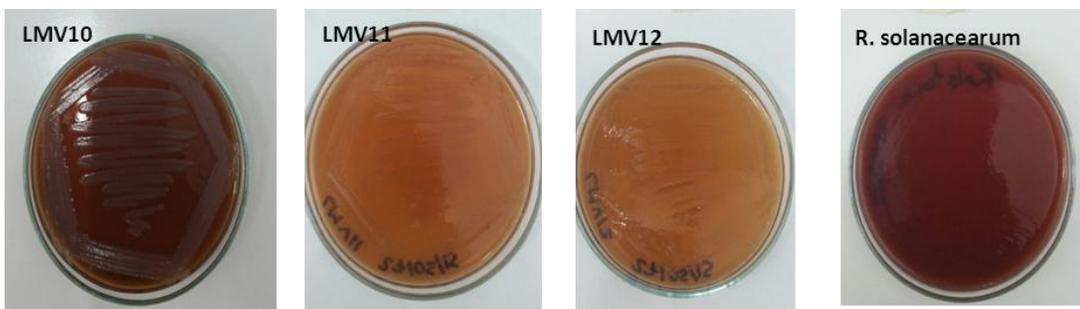


Figura 4. Crecimiento de las colonias en medio selectivo Agar MacConkey.

Los tres aislados además arrojaron resultados negativos para la reducción del nitrato, la hidrólisis del almidón, la fermentación de lactosa en agar Kligler (Figura 5), la producción de indol y para la acción de las enzimas oxidasa y ureasa.

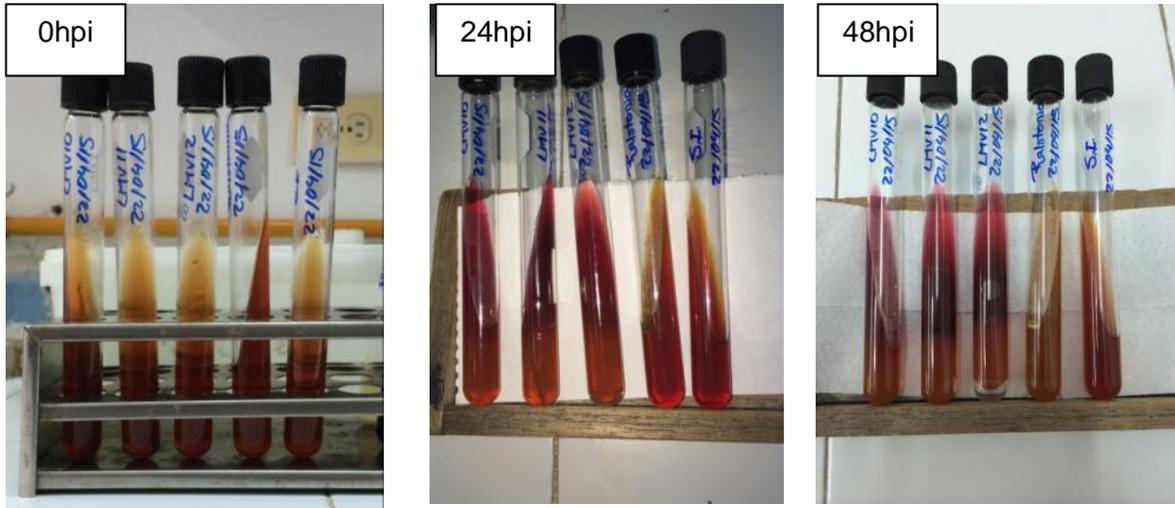


Figura 5. Agar Kligler A: 0hpi, B: 24hpi y C: 48hpi.

Entre las características más importante destaca la actividad anaeróbica facultativa de estos microorganismos, la cual se logró determinar con la prueba de oxido-fermentación tanto para glucosa como para lactosa.

Los resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a los tres aislados reportados en la Tabla 12, coinciden con lo reportado para el género *Pectobacterium* por Schaad y colaboradores en el 2001 y por Garrity y colaboradores en el 2005.

Se pudo observar la diferencia entre estos tres aislados con la cepa control *R. solanacearum* tanto en características morfológicas como en algunas características bioquímicas, descartandose la posibilidad de que uno de los aislados corresponda a este género; entre las diferencias más importantes destaca el hecho de que los tres aislados son fermentadores, mientras que *R. solanacearum* no tiene la capacidad de fermentar azúcares.

Tabla 12. Características bioquímicas de los aislados LMV10, LMV11, LMV12, y de la cepa control *R. solanacearum*.

Pruebas Bioquímicas	LMV10		LMV11		LMV12		<i>R. solanacearum</i>	
<b><u>Ácidos a partir de:</u></b>								
Rafinosa	+		+		+		+	
Sorbitol	+		+		+		+	
D-ribosa	+		+		+		+	
Fructosa	+		+		+		+	
<b>Catalasa</b>	+		+		+		+	
<b>CPG</b>	+		+		+		-	
<b>Gelatina</b>	+		+		+		+	
<b>Hidrólisis de almidón</b>	-		-		-		+	
<b>Indol</b>	-		-		-			
<b>McConkey</b>	Lac <sup>+</sup>		Lac <sup>-</sup>		Lac <sup>-</sup>		No hubo crecimiento	
<b>Nitrato</b>	-		-		-		-	
<b>OF:</b>	<b>*Aer</b>	<b>**An aer.</b>	<b>Aer</b>	<b>Anae r.</b>	<b>Aer</b>	<b>Ana er.</b>	<b>Aer</b>	<b>Anaer.</b>
<b>Glucosa</b>	+	+	+	+	+	+	-	-
<b>Lactosa</b>	+	+	+	+	+	+	-	-
<b>Oxidasa</b>	-		-		-		+	
<b>Prueba de KOH</b>	+		+		+		+	
<b>Simmons citrato</b>	+		+		+		-	
<b>Urea</b>	-		-		-		-	
<b>Motilidad</b>	+		+		+		+	
<b>Fermentación de Glucosa en Kliger</b>	+		+		+		+	
<b>Fermentación de Lactosa en Kliger</b>	-		-		-		+	
<b>Producción de ácido sulfhídrico en Kliger</b>	-		+		+		-	
<b>Producción de gas en Kliger</b>	-		+		+		-	

\*Aerobio \*\*Anaerobio

## 5.5 Caracterización molecular

La técnica más empleada para la caracterización, identificación y diagnóstico de patógenos de animales y de plantas es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para llevar a cabo esta técnica con éxito debemos obtener un material genético libre de contaminantes proteicos y mantenerlo estable para evitar que se degrade (Alvez, 2014).

### 5.5.3. Extracción del ADN

En este trabajo se probó la eficiencia de tres métodos de extracción de ADN para escoger entre ellos el más apropiado para luego realizar el diagnóstico molecular. La Tabla 13 muestra las concentraciones y pureza de los ADNs extraídos por estos tres métodos.

Tabla 13. Concentración y pureza de los ADNs extraídos

Método de extracción.	Muestras	260nm	280nm	260/280	DNA (µg/µl)	Proteínas (µg/µl)
Gomes y col. (2000)	LMV10	0.021	0.015	1.400	0.781	7.377
	LMV11	0.023	0.014	1.643	0.943	4.310
	LMV12	0.030	0.018	1.667	1.239	5.217
	<i>R. solanacearum</i>	0.021	0.015	1.400	0.781	7.377
Levesque y col. (1995)	LMV10	0.043	0.037	1.162	1.373	24.86
	LMV11	0.037	0.032	1.156	1.175	21.64
	LMV12	0.086	0.076	1.132	2.673	52.82
	<i>R. solanacearum</i>	0.092	0.076	1.211	3.051	48.28
Wang y col. (1999)	LMV10	0.058	0.051	1.137	1.812	35.23
	LMV11	0.013	0.010	1.300	0.458	5.675
	LMV12	0.011	0.008	1.375	0.404	4.086
	<i>R. solanacearum</i>	0.002	0.002	1.000	0.054	1.589

En la tabla expuesta anteriormente se puede observar que la máxima concentración de ADN según la lectura espectrofotométrica se obtuvo mediante el método de Levesqué y colaboradores (1999), sin embargo como este es un método en el cual no hay un paso de purificación, los restos celulares, producto de la lisis pudo haber interferido en la medición de la absorbancia arrojando valores mayores de concentración de ADN, esto puede corroborarse al observar las bandas amplificadas para cada uno de los aislados mediante este método, en el gel de electroforesis que se muestra en la Figura 6, siendo éstas de baja intensidad. Sin embargo, al observar las bandas amplificadas para cada uno de los aislados por el método de Gomes y colaboradores (2000), se observan bandas más intensas indicando así la eficiencia del método.

En la Figura 6 podemos observar la electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los ADNs extraídos por estos métodos, observándose bandas de alto peso molecular.

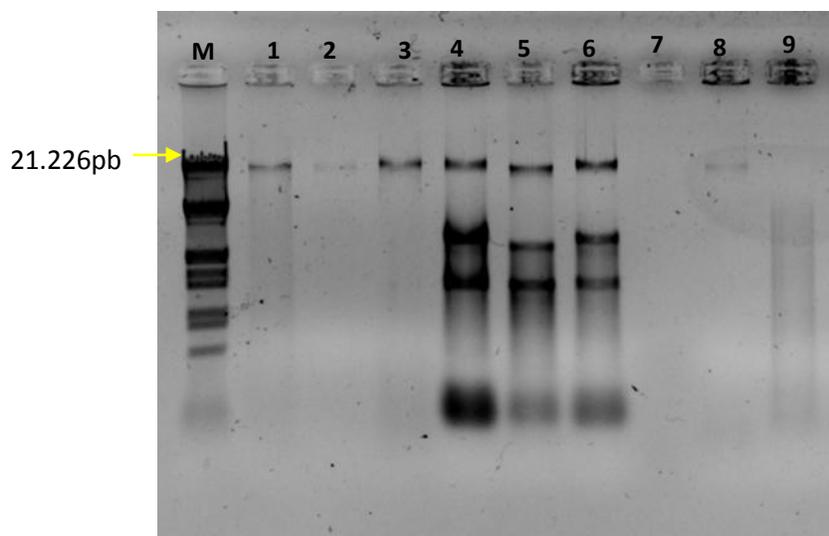


Figura 6. Registro fotográfico de la electroforesis de los extractos de ADN total de los aislados LMV10, LMV11 y LMV12 con los tres métodos de extracción. M marcador de peso molecular  $\lambda$  Hind III Promega. Carriles 1, 2 y 3 método de Levesqué y col. (1995). Carriles 4,5 y 6 método de Gomes y col. (2000). Carriles 7,8 y 9 método de Wang y col. (1999).

Como puede observarse en la Tabla 13, con el método de Gomes y col. (2000) se obtuvo suficiente cantidad de ADN con los valores de pureza más cercanos a 1.8. Además estas muestras presentaban menor cantidad de proteínas. Este resultado se corrobora en el gel mostrado en la figura 6, donde los ADNs extraídos con el método de Gomes y col. (2000) se observan con alta integridad.

#### **5.5.4. Amplificación de la región del RNA ribosomal 16S**

Para comprobar la calidad de los ADNs extraídos y verificar su naturaleza procariota se realizó la amplificación de una región del gen ribosomal 16S, altamente conservado en bacterias. Para esto se utilizaron los iniciadores universales U1 y U2. En la figura 7 se detalla el registro fotográfico de la electroforesis de las amplificaciones por PCR, observándose una banda de 996 pb de la misma intensidad en todas las muestras, la cual corresponde a un fragmento del gen de la subunidad ribosomal menor 16S corroborando así que se trata de organismos procariotas.

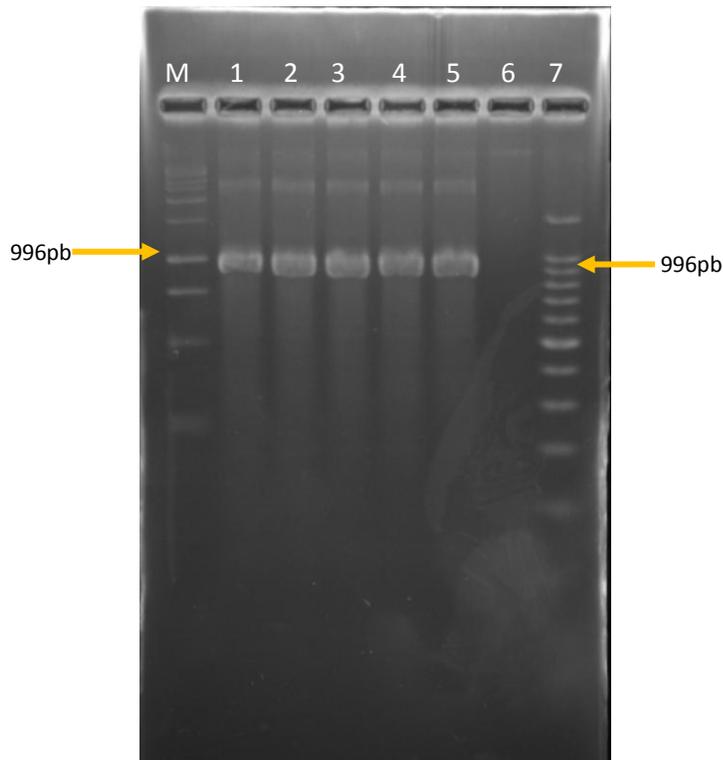


Figura 7. Registro electroforético en gel de agarosa con los iniciadores U1 y U2. M1: marcador 1kb promega. Carril 1,2,3,4,5 cepas: LMV10, LMV11, LMV12, *R. solanacearum* y *E. coli* respectivamente, 6 control de reactivos. M2. marcador 100pb promega.

Se observa además una banda inespecífica de alto peso molecular, lo cual puede deberse a la posibilidad de los iniciadores de hibridar en las regiones inespecíficas, durante los eventos de amplificación. Esta PCR nos permitió además asegurar que los extractos de ADNs están libres de inhibidores que puedan impedir el anillamiento de los iniciadores en las siguientes PCRs que se utilizarán para la identificación y genotipificación de los aislados. Tanto los autores que diseñaron estos iniciadores (Lu y col., 2000) como diversos

autores trabajando con ADN de procariotas, observaron resultados similares (Oropeza y col., 2008; Alvez, 2014; Fonseca, 2014).

### **5.5.3. Amplificación con iniciadores específicos**

Fonseca (2014) estableció un procedimiento para la identificación diferencial de *R. solanacearum* y *B. gladioli* bacterias patógenas que causan síntomas similares de pudrición blanda en tubérculos de papa. El diagnóstico diferencial se basó en pruebas microbiológicas, bioquímicas y moleculares, estableciendo el uso de iniciadores específicos para diagnosticar estas bacterias usando PCR.

En este sentido, como primer paso hacia la identificación molecular de los aislados LMV10, LMV11 y LMV12 se realizaron PCRs específicas que permitieran asegurar que estos aislados no corresponden a *R. solanacearum* ni a *B. gladioli*. En la Figura 8 se detallan los registros fotográficos de las amplificaciones por PCR de los aislados con los iniciadores GLA-f y GLA-r específicos para *Burkholderia gladioli* (Figura 8a) y Oli1 y Y2 específicos para *R. solanacearum* (Figura 8b). En ambos geles se puede observar una sola banda correspondiente al control positivo en cada uno de los casos (de 292 pb para *R. solanacearum* y de 300 pb para *B. gladioli*), lo que nos asegura que los iniciadores son específicos para cada especie en cuestión y que entre los aislados problema ninguno corresponde a estas especies bacterianas.

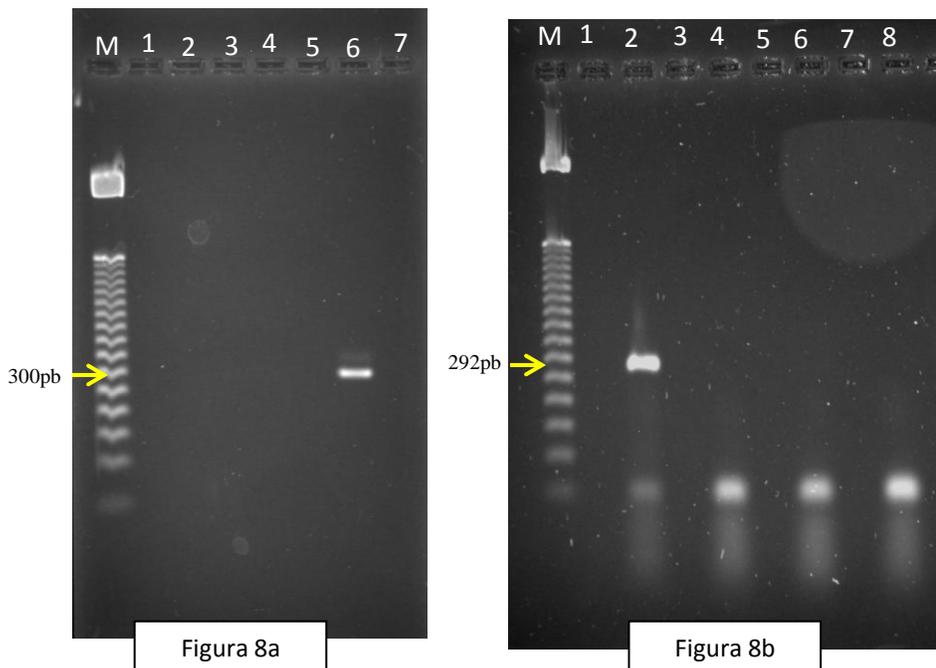


Figura 8. 8a) PCR con iniciadores específicos GLA-f y GLA-r. Carril 1, 2 y 3 cepas LMV10, LMV11 y LMV12 respectivamente, carril 4 y 5 *R. solanacearum* y *E. coli* respectivamente. Carril 6 *B. gladioli*. Carril 7 control de reactivos. 8b) PCR con iniciadores específicos Oli1 y Y2 Carril 2 *R. solanacearum* 4, 6 y 8 cepas LMV10, LMV11 y LMV12 respectivamente. En ambos casos el carril M contiene el marcador de peso molecular 50pb Promega.

Dado este resultado y lo obtenido en las pruebas bioquímicas, se enfocó la atención ahora con más énfasis en el diagnóstico de *P. carotovorum* que es otra bacteria patógena de papa que causa síntomas de pudrición.

Darrase y colaboradores (1994) usando el gen que codifica para una pectatoliasa (gen *pel*) desarrollaron una prueba de PCR con un par de iniciadores que amplifican un fragmento de 434 pb en cepas de *Erwinia carotovora*. De las 89 cepas de *E. carotovora* analizadas, solamente las cepas de *E. carotovora* subesp. *betavasculorum* no eran detectadas por esta

técnica. Basándonos en este resultado, utilizamos los iniciadores para amplificar esta banda en los aislados problema.

En la Figura 9a se muestran los resultados de la corrida electroforética de los productos de PCR con los iniciadores Y1PEL y Y2PEL para cada aislado y las cepas control, observándose en los aislados LMV10, LMV11 y LMV12 bandas inespecíficas y una banda cercana a 500 pb. Los iniciadores no amplificaron ninguna banda en los controles, lo cual corrobora la diferencia observada en las pruebas bioquímicas entre los aislados LMV10, LMV11 y LMV12 y *R. solanacearum* pero tampoco permite identificar los aislados como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Este protocolo se realizó en diferentes oportunidades modificando una variable a la vez, como ajuste en la temperatura de anillamiento, cambio en la concentración de los iniciadores, así como en la concentración del ADN y no se obtuvo de ninguna manera la banda esperada.

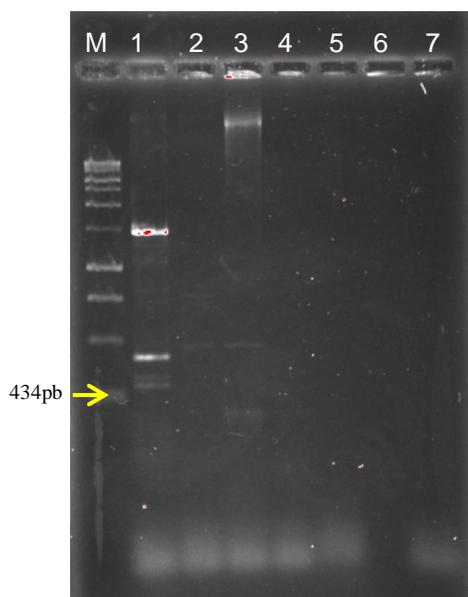


Figura 9. 9a) PCR con iniciadores específicos Y1PEL y Y2PEL. M: marcador de peso molecular 1kb Promega. Carril 1, 2 y 3 cepas LMV10, LMV11 y LMV12 respectivamente, carril 4 y 5 *R. solanacearum* y *E. coli* respectivamente. Carril 7 control de reactivos.

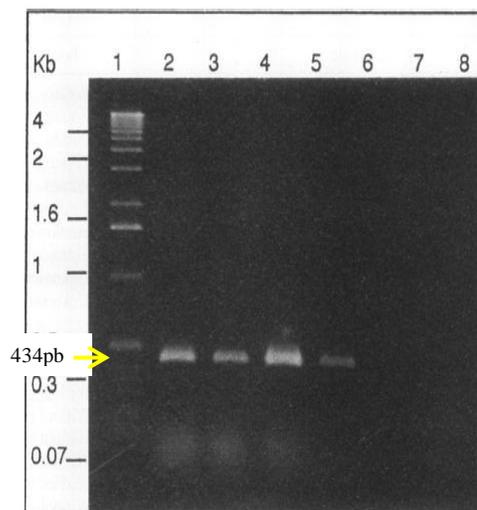


Figura 9. 9b) Agarose electrophoresis of PCR-amplified DNA from several strains. Lanes: 1, 1-kb DNA ladder; 2, *E. carotovora* subsp. *atroseptica* 86.20; 3, *E. carotovora* 1H; 4, *E. carotovora* subsp. *carotovora* SCRI193; 5, *E. carotovora* subsp. *odonifera* 2154; 6, *E. carotovora* subsp. *betavasculatorum* 2122; 7, *E. chrysanthemi* 3937 (19); 8, *Y pseudotuberculosis* ATCC 23208. The arrowhead indicates the 434-bp amplified fragment. (Tomado de Darrase y col. (1994).

Considerando que en el trabajo de Darrase y colaboradores (1994) la única cepa que no amplificó el gen *pel* fue *E. carotovora* subsp. *betavasculatorum* (Figura 9b), los aislados LMV10, LMV11 y LMV12 podrían ser identificados como *P. carotovorum* subsp. *betavasculatorum*. Darrase y colaboradores (1994) explican que la ausencia de la banda de 434pb en *E. carotovora* subsp. *betavasculatorum* podría estar correlacionada con la gama de huéspedes de estas bacterias y por la concentración de las pectinas en las

distintas plantas y la hipótesis que plantean es que en estas bacterias la enzima y en consecuencia, la secuencia de su gen son diferentes. Este resultado fue corroborado por Hélias y colaboradores 1998, en un trabajo donde caracterizaron subespecies de *Erwinia carotovora* en plantas de patata, suelo y agua con métodos basados en PCR, siguiendo el protocolo de Darrase y colaboradores (1994) obteniendo una amplificación exitosa del gen *pel* para distintas subespecies de *Erwinia* excepto para la subespecie *betavasculatorum*.

La bacteria *P. carotovorum* subsp. *betavasculatorum* es una bacteria patógena de papa que causa pierna negra y pudrición de tubérculos, al igual que *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y estos síntomas son similares a los observados en las pruebas de patogenicidad reportados en esta investigación.

#### **5.5.4. Amplificación de regiones repetitivas**

Posteriormente, los extractos de ADN de los aislados LMV10, LMV11 y LMV12 fueron sometidos a una amplificación por PCR haciendo uso de los iniciadores G1 y L1 diseñados en 1993 por Jensen y colaboradores, los cuales amplifican la región intergénica espaciadora entre el 16S y 23S. Estos iniciadores fueron además utilizados por Toth y colaboradores en 2001 para amplificar esta región en distintas cepas de *Erwinia*, logrando clasificarlas en tres grandes grupos. Los resultados de esta amplificación se muestran en la Figura 10a, donde es posible observar la diferencia entre el patrón de bandas

que muestra el aislado LMV10 con respecto a los aislados LMV11 y LMV12 que poseen un patrón idéntico dando indicios de una alta similitud genética. Esta similitud genética ya se había observado en el comportamiento fisiológico de los aislados LMV11 y LMV12, los cuales coincidieron en el 100% de las pruebas bioquímicas realizadas; diferenciándose del aislado LMV10 en la producción de ácido sulfhídrico y producción de gas en agar Kliger, así como la utilización de la lactosa en el medio Macconkey.

Toth y colaboradores (2001) también reseñan como carácter diagnóstico de las especies de *Erwinia*, el tamaño de las bandas de la región ITS amplificadas. En la tabla 14 se detalla el tamaño de las bandas obtenidas, producto de la amplificación de la región ITS.

Tabla 14. Tamaño de las bandas obtenidas mediante la amplificación de la región ITS

	Muestra				
	LMV10	LMV11	LMV12	<i>R. solanacearum</i>	<i>E.coli</i>
Tamaño de las Bandas	2.172	1.874	1.856	204	1.181
	1.434	1.647	1.632		912
	1.107	1.447	1.447		637
	637	1.192	1.192		534
	559	929	938		436
	383	809	809		203
	340	643	643		
	251	581	581		
		520	520		
		428	428		
		280	280		
<b>N° de bandas</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>1</b>	<b>6</b>

La Figura 10b, muestra los patrones de amplificación del ADN de varias subespecies de *P. carotovorum* realizado por Toth y colaboradores (2001); tomando en cuenta este resultado y comparándolo con el obtenido en esta investigación se puede notar que para varias subespecies son comunes las bandas de aproximadamente 500 pb a 580 pb suponiendo así que el aislado LMV10 corresponde a la subespecie *atroseptica* o *betavascularum*, mientras que los aislados LMV11 y LMV12 corresponden probablemente a la especies *E. carotovora* subsp. *odorífera*, *E. carotovora* subsp. *wasabiae* *E. cacticida* (carril 6,7,y 8 figura 10b).

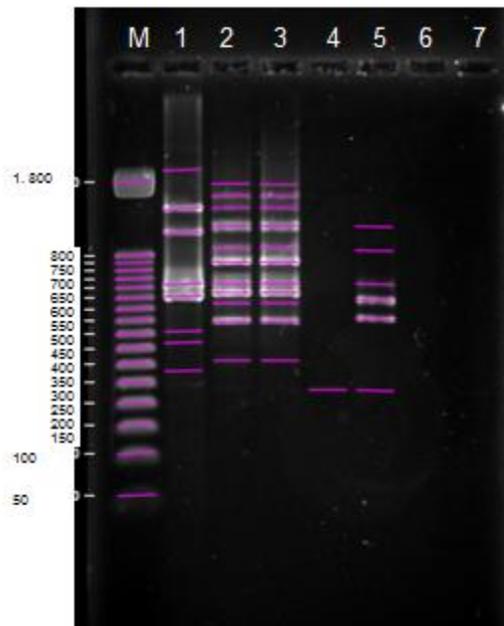


Figura 10a. Registro fotográfico de electroforesis de las amplificaciones de la región ITS, empleando los iniciadores G1 y L1. M: marcador de tamaño molecular 50pb. Carriles 1,2 y 3 aislados LMV10, LMV11 y LMV12; carriles 4 y 5 controles *R. solanacearum* y *E. coli*. Carril 7 control de reactivos.

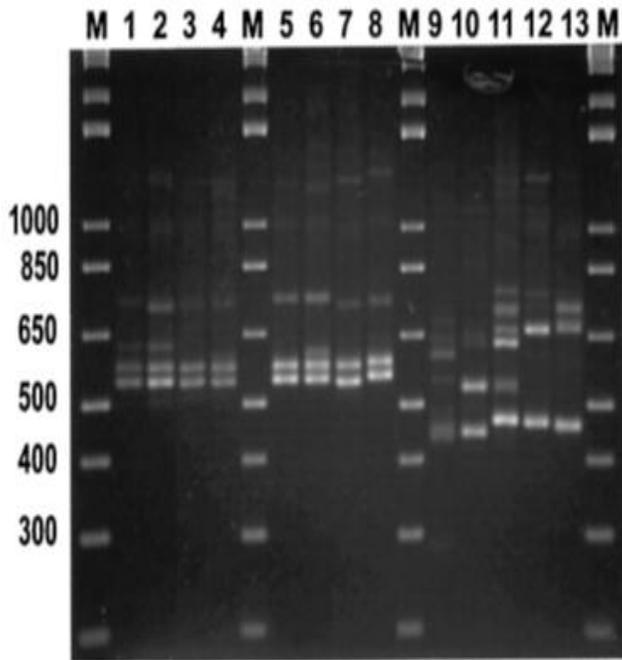


Figura 10b. Registro fotográfico reportado por Toth y colaboradores (2001) ITS-PCR amplification patterns of species belonging to *Erwinia*, *Pantoea*, *Enterobacter*, and other *Enterobacteriaceae* genera. Lane 1, *E. carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI 1039; 2, *E. carotovora* subsp. *betavasculorum* SCRI 479; 3, ECCa, *E. carotovora* subsp. *carotovora* SCRI 244; 4, ECCb, *E. carotovora* subsp. *carotovora* SCRI 167; 5, ECOa, *E. carotovora* subsp. *odorifera* SCRI 914; 6, ECOb, *E. carotovora* subsp. *odorifera* SCRI 915; 7, *E. carotovora* subsp. *wasabiae* SCRI 481; 8, *E. cacticida* SCRI 484; 9, *Enterobacter cancerogenus* SCRI 489; 10 and 11, *E. cypripedii* SCRI 478 and SCRI 440; 12 and 13, *E. rhapontici* SCRI 421 and SCRI 472.

La diferencia en el número de bandas obtenidas en los aislados LMV10, LMV11 y LMV12 con respecto a las obtenidas por Toth y colaboradores (2001), puede deberse a la variabilidad genética que pueden presentar individuos de una misma especie que viven en hábitats distintos.

Por otra parte, las secuencias repetidas ERIC también juegan un papel importante en la organización del genoma bacteriano. Louws y colaboradores (1994), plantearon la hipótesis de que a través de la evolución, cada línea especializada o patovar tiene una distribución única o reordenamiento de las secuencias repetitivas en el genoma, lo que pudiera generar patrones genómicos correlacionados con un patovar específico.

En este sentido, el ADN de los tres aislados problema se sometió a la amplificación por ERIC-PCR y el resultado se muestra en la Figura 11, donde claramente se observa la diferencia en los patrones obtenidos para el aislado LMV10 con respecto a los obtenidos para los aislados LMV11 LMV12 los

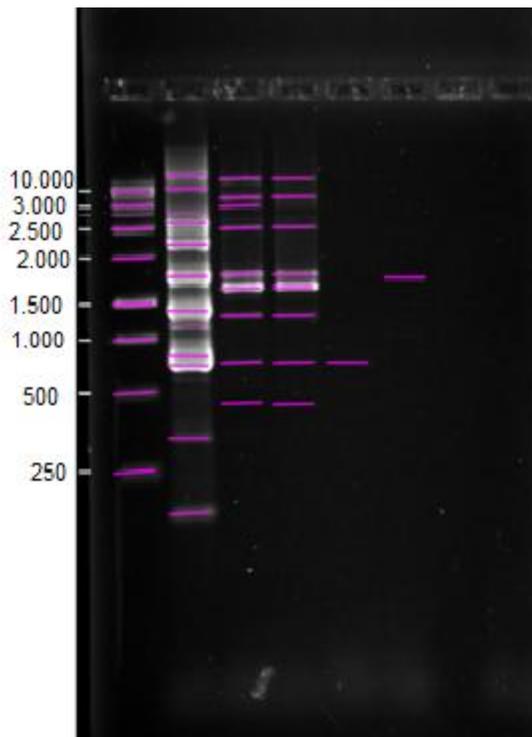


Figura 11. Registro fotográfico de electroforesis de las amplificaciones mediante ERIC-PCR, empleando los iniciadores ERIC1 y ERIC2. M: marcador de tamaño molecular 50pb. Carriles 1,2 y 3 aislados LMV10, LMV11 y LMV12; carriles 4 y 5 controles *R. solanacearum* y *E. coli*. Carril 7 control de reactivos.

cuales al igual que en la amplificación de la región ITS arrojaron el mismo patrón de banda corroborando así la similitud entre ellos y su diferencia con el aislado LMV10. Como mencionamos antes, esta similitud corrobora los resultados arrojados por las pruebas bioquímicas realizadas previamente, con el aislado LMV10 mostrando un comportamiento

fisiológico distinto con respecto a los otros dos aislados.

Los métodos genotípicos epidemiológicos están basados

en el estudio del ADN, cromosómico o extracromosómico. En la tipificación molecular se comparan las secuencias nucleotídicas de los microorganismos de manera directa e indirecta, permitiendo determinar la relación clonal entre

cepas de una misma especie bacteriana. Una alternativa para genotipificar son las técnicas basadas en la amplificación de secuencias de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Fonseca, 2014). Usando las secuencias ERIC, ha sido posible discriminar serotipos estrechamente relacionados de la misma especie y grupos de cepas no relacionadas clonalmente ya que poseen un gran poder discriminatorio (Jomar y col., 2006). En este sentido, la técnica ERIC-PCR permitió diferenciar al aislado LMV10 de los aislados LMV11 y LMV12, puesto que el patrón de banda es totalmente distinto. La similitud en la cantidad y el tamaño de los fragmentos amplificados en los aislados LMV11 y LMV12 permite deducir que son genéticamente idénticos.

#### **5.6 Cultivo *in vitro* de *Solanum tuberosum* variedad ‘Granola’ y ‘Arbolona Negra’ como sistema para estudios de la patogenicidad y de los postulados de Koch.**

La identificación de organismos patógenos puede complementarse con el empleo de pruebas donde se evalúe la patogenicidad del organismo en cuestión. Como los aislados LVM10, LMV11 y LMV12 son microorganismos patógenos del cultivo de papa, en este trabajo se estableció el cultivo *in vitro* de dos variedades de papa ‘Arbolona Negra’ y ‘Granola’ para llevar a cabo dichas pruebas, basándonos en el hecho de que estas son plántulas libres de patógenos y que crecen bajo condiciones ideales y homogéneas, por lo

que se podría obtener un resultado más confiable que al utilizar tubérculos comerciales.

### 5.6.1 Micropropagación de las variedades 'Arbolona Negra' y 'Granola'.

Ambas variedades fueron cultivadas a partir de microesquejes en fiolas siguiendo el protocolo establecido por Moreno (2012) obteniéndose resultados a las cuatro semanas de haber sido cultivadas. Ambas variedades mostraron tallos alargados, no se reportó contaminación de los mismos en esta etapa del establecimiento *in vitro* (Figura 12a). Una vez que transcurrieron 3 semanas un grupo de estas plántulas fue subcultivado en medio MS semisólido suplementado con Nitrato de Plata, obteniendo hojas con un mayor área foliar (figura 12b) tal como lo describen Alva y Oropeza (2013).



Figura 12) vitroplantas variedad 'Arbolona Negra'(AN) y variedad 'Granola' (G).

### 5.6.2 Microtuberización de las variedades 'Arbolona Negra' y 'Granola'

Siguiendo las indicaciones de Moreno (2012) se logró la obtención de microtubérculos de ambas variedades (Figura 13), un total de 112 microtubérculos de la variedad 'Arbolona Negra' y 60 para la variedad 'Granola' de tamaños variables oscilando desde 1cm hasta 4 cm de longitud y un diámetro que varió entre los 0,5cm y 1,5cm. Para el establecimiento de las pruebas se seleccionaron aquellos cuyo diámetro era mayor que 1cm, esto con el fin de ser objetivos al momento de observar los síntomas de la enfermedad, ya que en rodajas con diámetro menor a 1 cm podrían confundirse los síntomas de pudrición negra, con la oxidación del microtubérculo, al estar expuesto.



Figura 13. Microtubérculos variedad 'Arbolona Negra' y variedad

### 5.7 Pruebas de patogenicidad en microtubérculos de 'Arbolona Negra' y 'Granola'

Fonseca (2014) realizó pruebas de patogenicidad en microtubérculos de las variedades 'Arbolona Negra' y 'Granola' en un estudio donde logró comparar

y diferenciar la sintomatología causada por tres bacterias distintas patógenas de este cultivo, como lo son *Burkholderia gladioli*, *Ralstonia solanacearum* y *Pectobacterium carotovorum*. En la Tabla 15 se detalla la cantidad de microtubérculos de cada variedad que presentaron la sintomatología de la enfermedad una vez que fueron inoculados con suspensiones bacterianas de los aislados problema de esta investigación y la cepa control *R. solanacearum*.

Tabla 15. Resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad en microtubérculos de ambas variedades de papa inoculados con las cepas problema y el control positivo *R. solanacearum*.

<b>'Arbolona Negra'</b>					
<b>Horas</b>	<b>LMV10</b>	<b>LMV11</b>	<b>LMV12</b>	<b><i>R. solanacearum</i></b>	<b>Sin inóculo</b>
24	Sanos	Sanos	Sanos	Sanos	Sanos
48	1/8	Sanos	Sanos	1/8	Sanos
72	1/8	Sanos	Sanos	1/8	Sanos
96	1/8	1/8	Sanos	1/8	Sanos
120	1/8	1/8	Sanos	1/8	Sanos
<b>'Granola'</b>					
<b>Horas</b>	<b>LMV10</b>	<b>LMV11</b>	<b>LMV12</b>	<b><i>R. solanacearum</i></b>	<b>Sin inóculo</b>
24	Sanos	2/8	5/8	2/8	Sanos
48	2/8	4/8	7/8	4/8	Sanos
72	2/8	6/8	7/8	5/8	Sanos
96	2/8	6/8	7/8	5/8	Sanos
120	2/8	6/8	7/8	5/8	Sanos

\*Los resultados aquí expuestos se reportan como: Número de rodajas enfermas/ Número total rodajas

La inoculación con el aislado LMV10 (Figura 14) permitió corroborar la patogenicidad del mismo, presentando infección en tubérculos de ambas variedades. La sintomatología va desde un ennegrecimiento y ablandamiento

del mismo hasta un olor fétido. En ambas variedades la sintomatología pudo observarse a partir de las 48 horas post inóculo (hpi), tal como se muestra en la Tabla 15.

En el caso del aislado LMV11 (Figura 15), la sintomatología se observó a partir de las 24 horas en la variedad 'Granola', mientras que los primeros síntomas de la enfermedad en la variedad 'Arbolona Negra' aparecieron a las 96 horas después de la inoculación (Tabla 15). En este caso, el número de rodajas de microtubérculos con síntomas de la enfermedad fue mayor que en los inoculados con el aislados LMV10.

Los microtubérculos de la variedad 'Arbolona Negra' inoculados con el aislado LMV12 (Figura 16) no presentaron sintomatología de la enfermedad en ninguna de las etapas de la prueba. Mientras que en los microtubérculos de la variedad 'Granola' los síntomas pudieron observarse desde las 24 horas post inoculación, viéndose afectados 7 de 8 microtubérculos inoculados (Tabla 15).

Por otra parte, la patogenicidad estudiada con la cepa de *Ralstonia solanacearum* arrojó una contaminación para los microtubérculos de ambas variedades de papa (Figura 17). Esta infección se observó en menor cantidad para los microtubérculos de la variedad 'Arbolona Negra'.

En la Figura 18, se reporta la enfermedad de los microtubérculos inoculados con los tres aislados y *R. solanacearum* observándose claramente el daño en el tejido del microtubérculo.

La figura 19, reporta a su vez la enfermedad en microtubérculos de la variedad 'Arbolona Negra' a las 120hpi, observándose el tejido en este caso sin lesiones profundas.

En la figura 20, se detalla claramente como el control sin inóculo que estuvo bajo las mismas condiciones, no mostró ningún síntoma de la enfermedad, en ambas variedades, de hecho es posible notar como las condiciones de humedad y temperatura favorecieron el brote de yemas en los mismos.

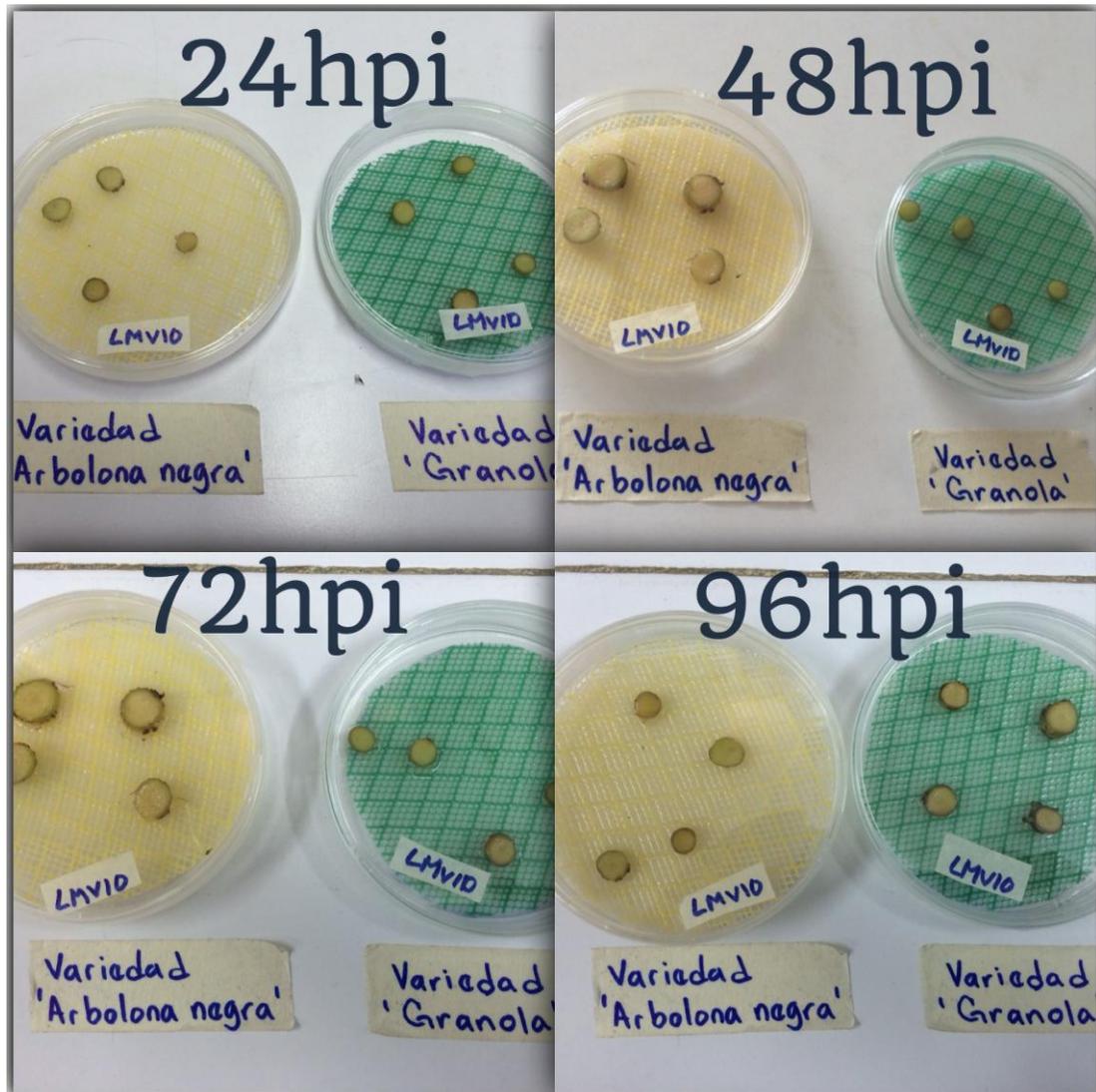


Figura 14. Progreso de la enfermedad en microtubérculos de las variedades 'Arbolona Negra' y 'Granola' inoculados con el aislado LMV10.

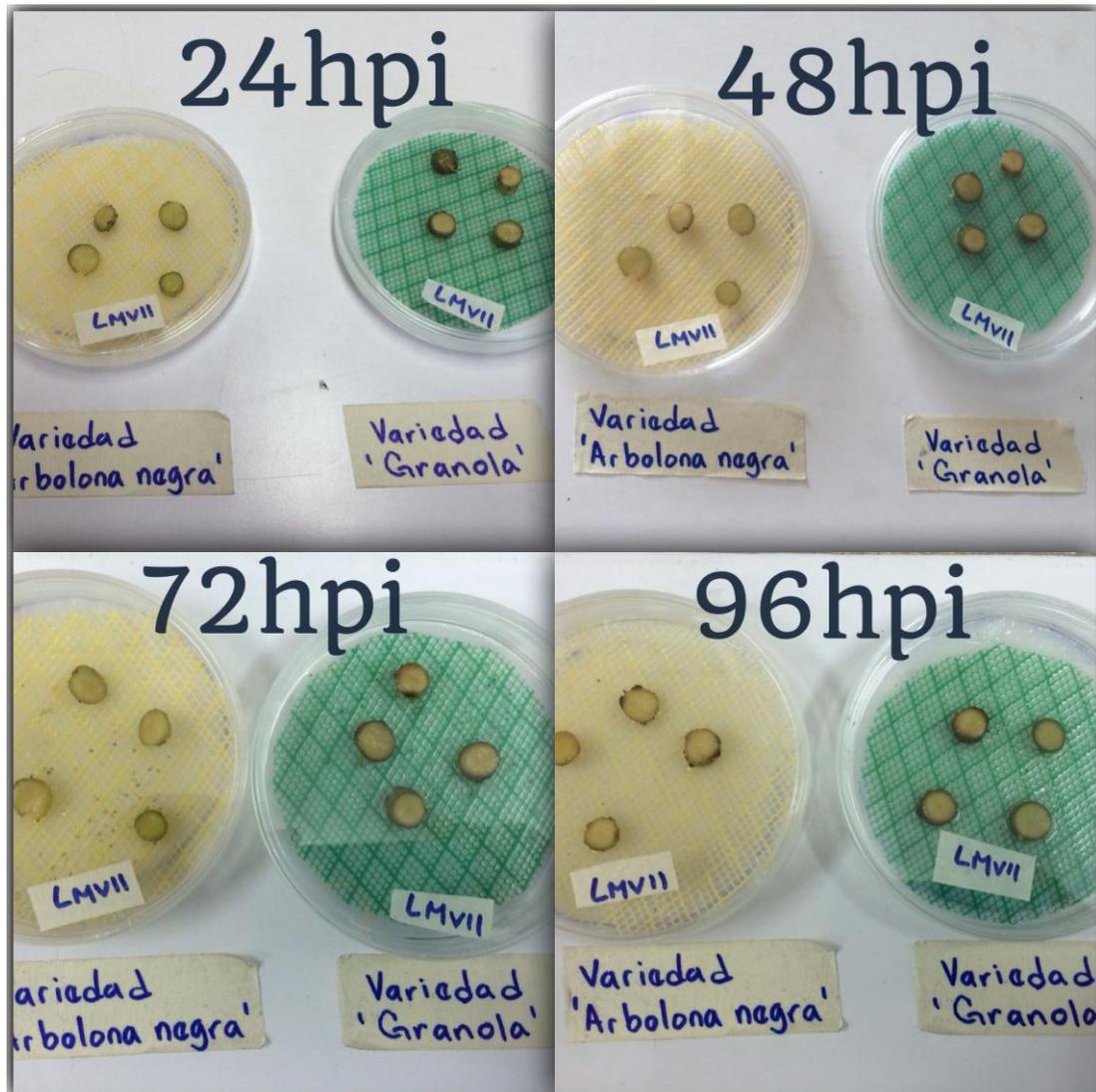


Figura 15. Progreso de la enfermedad en microtubérculos de las variedades 'Arbolona Negra' y 'Granola' inoculados con el aislado LMV11.

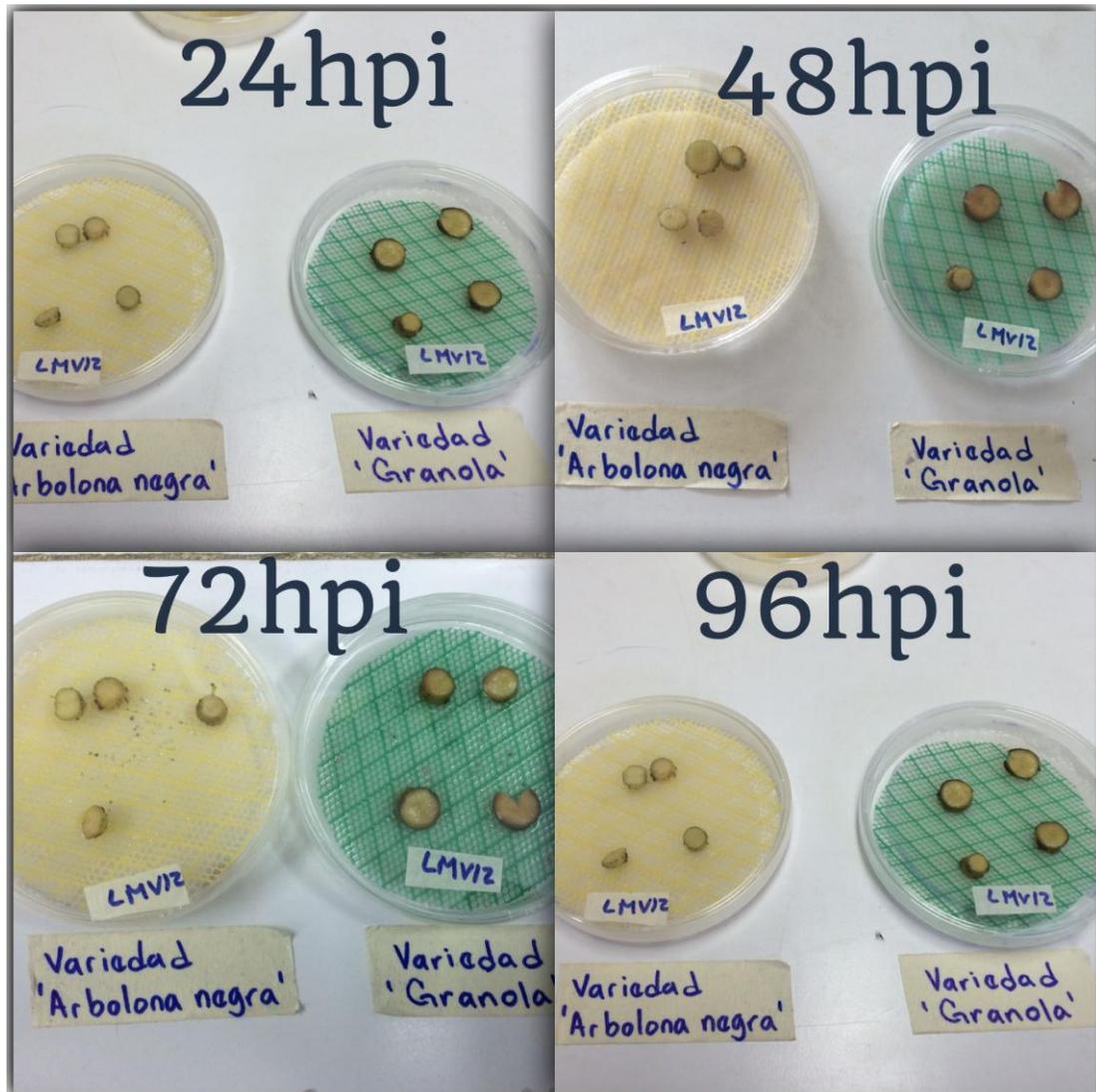


Figura 16. Progreso de la enfermedad en microtubérculos de las variedades 'Arbolona Negra' y 'Granola' inoculados con el aislado LMV12.

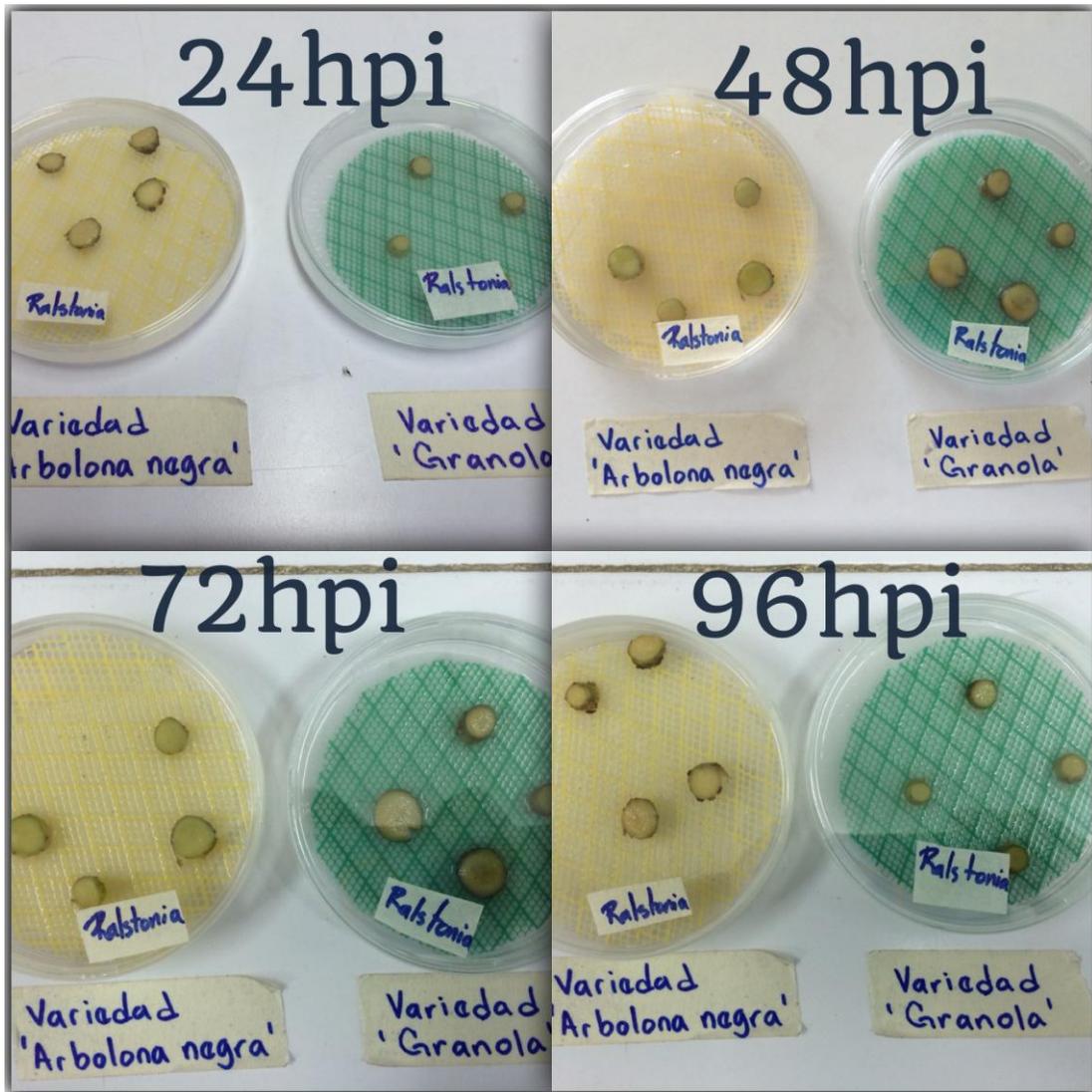


Figura 17. Progreso de la enfermedad en microtubérculos de las variedades 'Arbolona Negra' y 'Granola' inoculados con *R. solanacearum*.

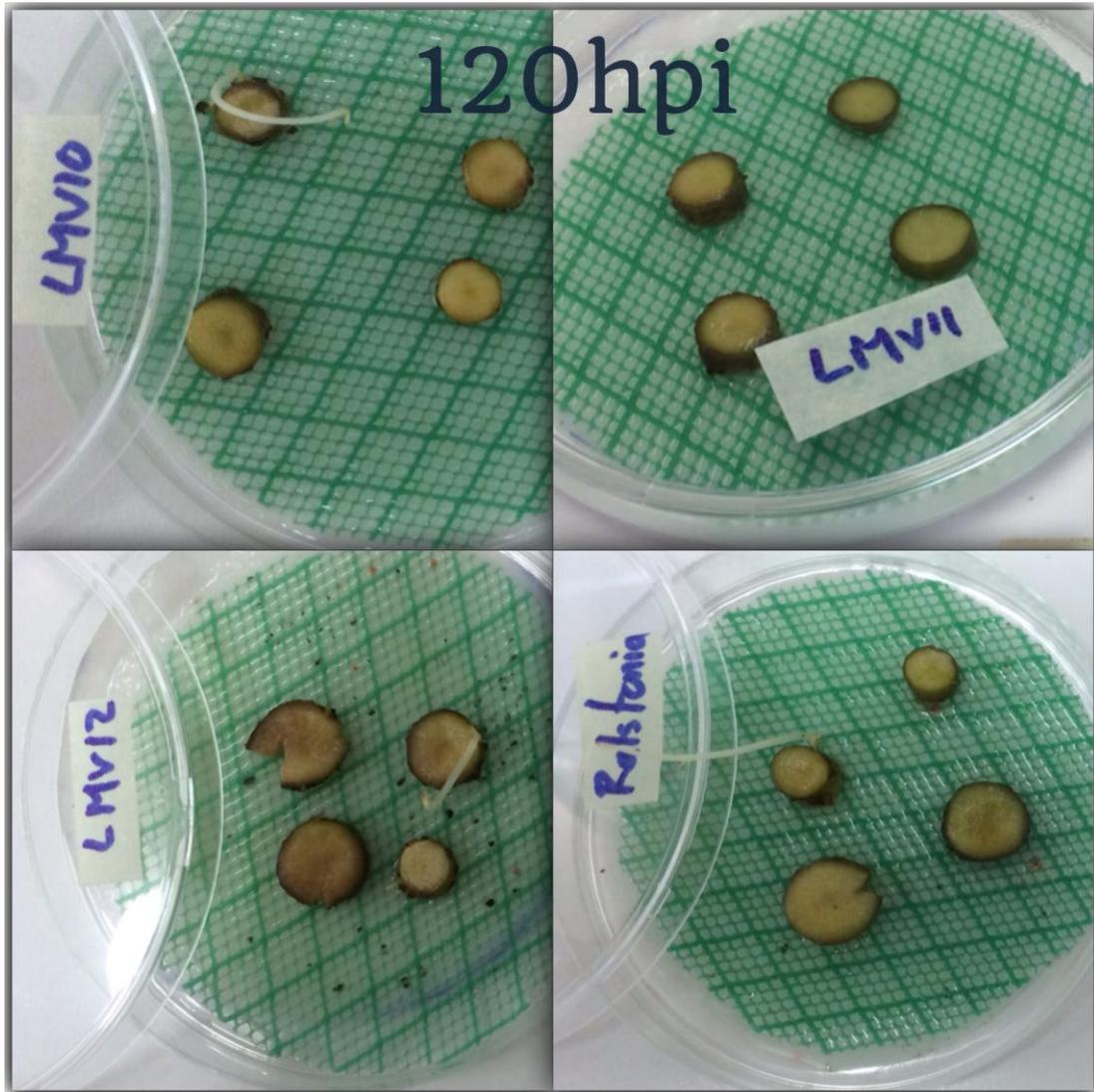


Figura 18. Reporte de la enfermedad a las 120 horas en microtubérculos de la variedad 'Granola' inoculados con los aislados LMV10, LMV11, LMV12 y *R. solanacearum*.

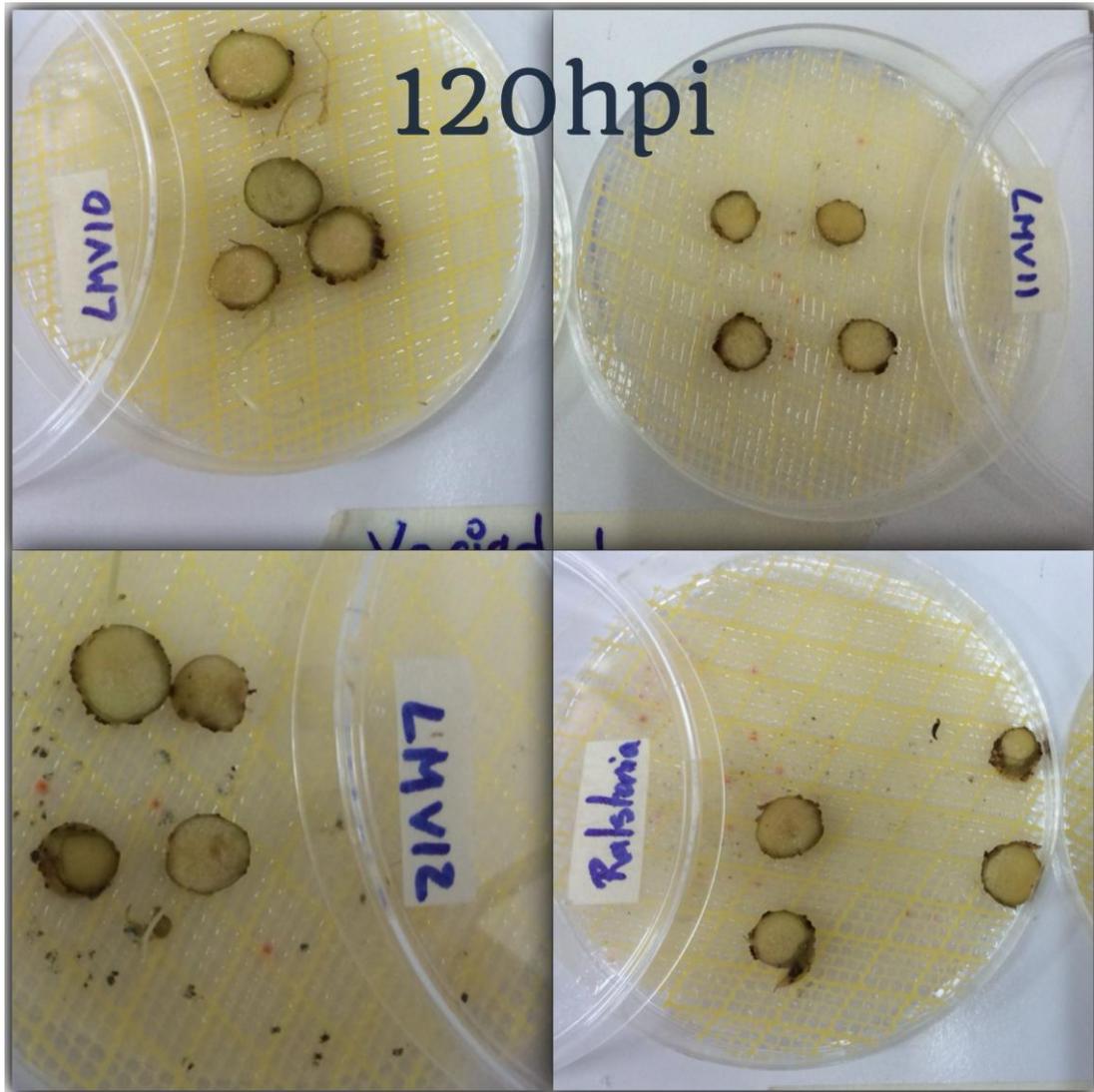


Figura 19. Reporte de la enfermedad a las 120 horas en microtubérculos de la variedad 'Arbolona Negra' inoculados con los aislados LMV10, LMV11, LMV12 y *R. solanacearum*.

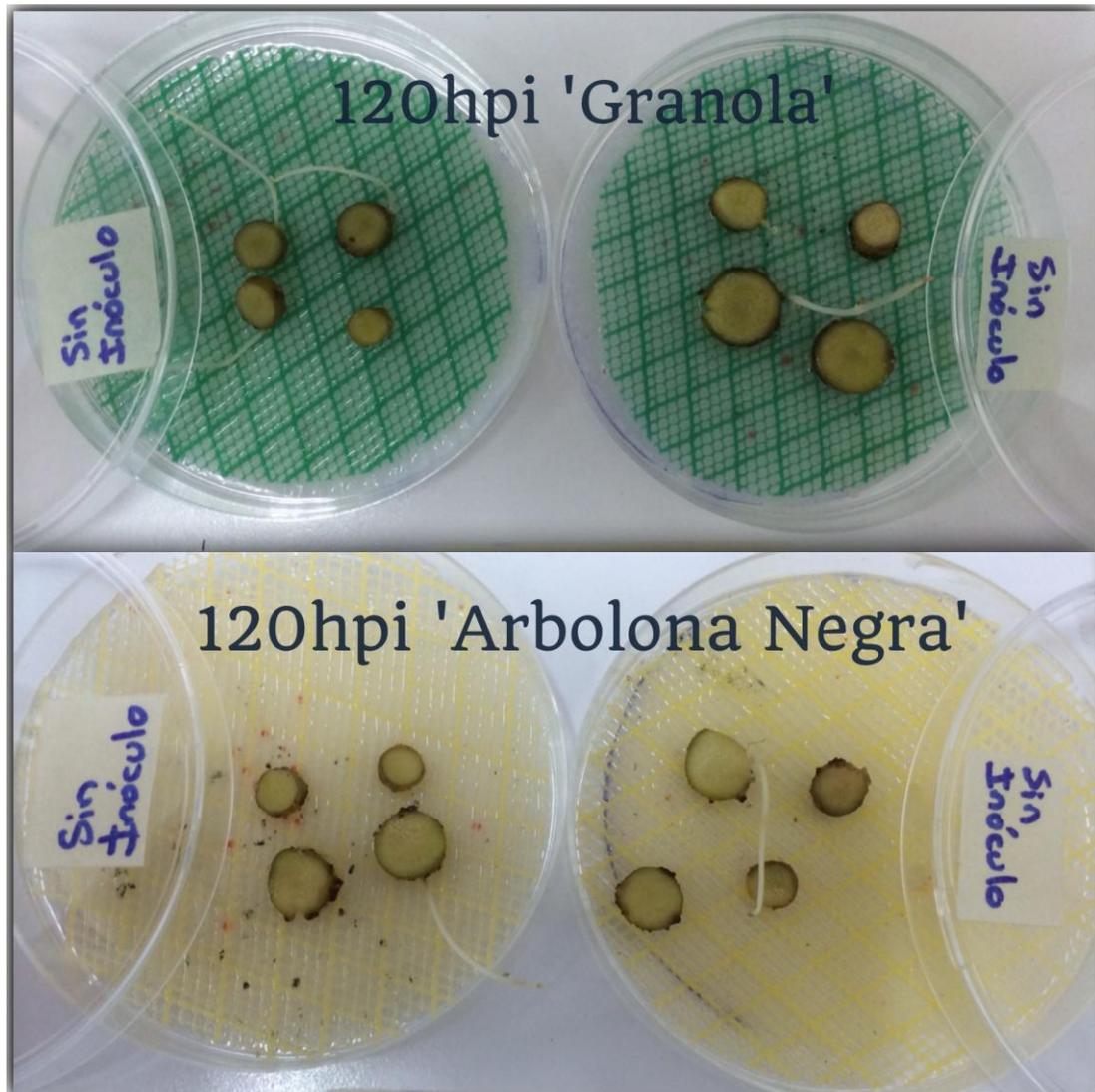
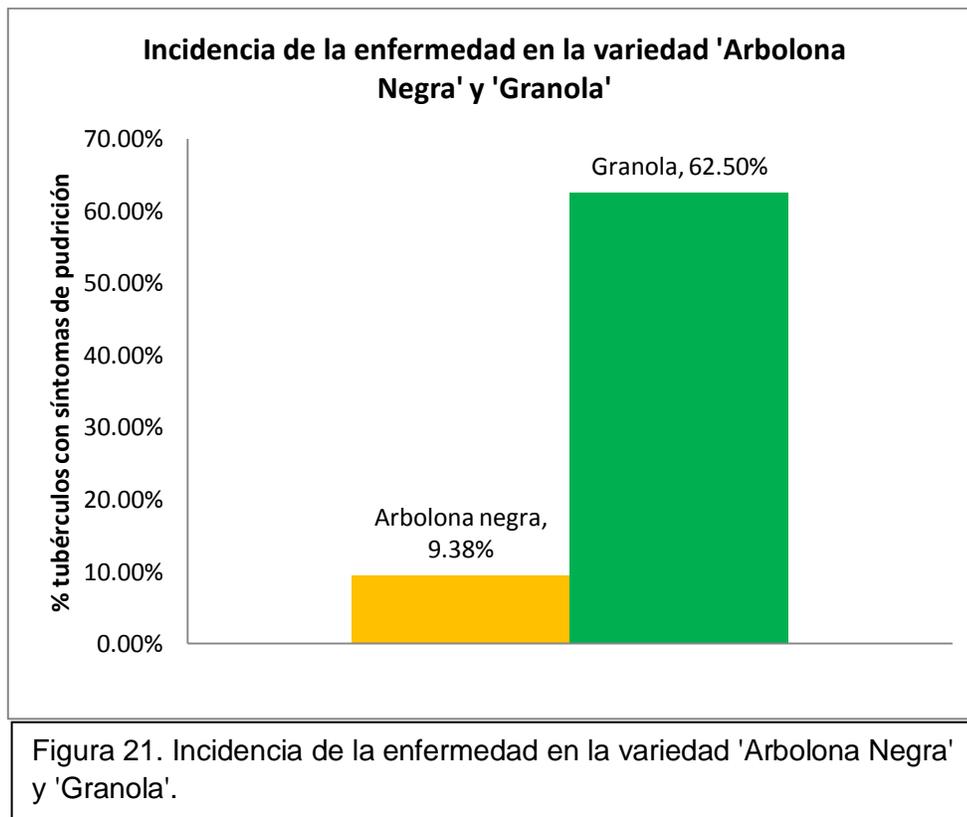


Figura 20. Microtubérculos sin inóculo de las variedades 'Granola' (mallas verdes) y 'Arbolona Negra' (mallas amarillas) a las 120h.

Con estas pruebas además de evaluar la patogenicidad de los aislados, se evaluó también la resistencia frente al ataque de fitopatógenos de la variedad 'Arbolona Negra'. Los resultados obtenidos pueden evidenciarse en la Figura 21 donde la incidencia de la enfermedad para la variedad 'Granola' fue de

62,5%, mientras que la incidencia en la variedad 'Arbolona Negra' fue 9,38%. Esto tomando en cuenta los resultados totales obtenidos al inocular con los tres aislados problemas de esta investigación y la cepa control *R. solanacearum*.



La interacción de distintos patógenos con estas dos variedades de papa han sido motivo de estudio en el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal (IBE). Entre ellos destaca el trabajo realizado por Fonseca en el 2014, donde mediante la inoculación de estas mismas variedades de papa, con tres aislados bacterianos, que fueron identificados como *Ralstonia solanacearum*,

*Burkholderia gladioli* y el aislado LMV11 que por pruebas bioquímicas en esa oportunidad fue diagnosticado como *Pectobacterium* sp; encontró diferencias en la sintomatología ocasionada por *Pectobacterium* sp., siendo ésta ablandamiento severo de los tubérculos, desde las 24h, los cuales se ennegrecen y cuartean al paso de las horas con la presencia de exudado y la formación de burbujas, a diferencia de la sintomatología causada por *R. solanacearum* y *B. gladioli* es menos severa y corresponde a pudrición y/o ennegrecimiento (siendo este síntoma más característico sobre la variedad 'Granola' infectada con *B. gladioli*). Fonseca (2014) además realizó la primera caracterización molecular de la respuesta de 'Arbolona Negra' ante la infección con un patógeno bacteriano, mediante ensayos de ADNc-AFLPs, encontrando secuencias relacionadas con el reconocimiento del patógeno y el reordenamiento del citoesqueleto, con respuesta hipersensible, reforzamiento de la pared celular, SAR, ubiquitinación, señalización celular mediada por kinasas, mecanismos de regulación celular e interferencia del ADN del patógeno.

Por otra parte Alva (2014), realizó el estudio de la interacción *Solanum tuberosum-Phytophthora infestans*, inoculando hojas de vitroplantas de ambas variedades, utilizando 4 concentraciones distintas del inóculo  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^5$ . Evaluó la incidencia de la enfermedad durante tres días, observando que el menor porcentaje fue obtenido para la variedad 'Arbolona

Negra' estando éste entre 17% y 63%, mientras que para la variedad 'Granola' obtuvo un porcentaje de 27% a 87%.

Estos resultados concuerdan con lo reportado en esta investigación, donde nuevamente la variedad 'Arbolona Negra' mostró una menor incidencia frente a los tres aislados patogénicos estudiados; validando la importancia de esta variedad nativa para los programas de mejoramiento de este cultivo.

### **Postulados de Koch**

Una vez finalizado el estudio de patogenicidad, se procedió a evaluar los postulados de Koch. Para ello, se tomó una muestra de la región afectada del microtubérculo y se colocó en un caldo LB se incubó durante 24 horas a 27°C. Transcurrido este tiempo, una alícuota del caldo fue sembrado en Agar Nutritivo donde se observaron colonias puras para los tres aislados (LMV10, LMV11 y LMV12). Se sometieron a pruebas sencillas como la tinción Gram, prueba de la oxidasa y la catalasa (Figura 22). Las tres pruebas coincidieron con las reportadas inicialmente para estos aislados. Además en la figura 23 observamos la diferencia que había sido reportada en cuanto al crecimiento en el agar MacConkey, entre el aislado LMV10 respecto a los aislados LMV11 y LMV12, siendo estos dos últimos Lac<sup>-</sup> y el aislado LMV10 Lac<sup>+</sup>.

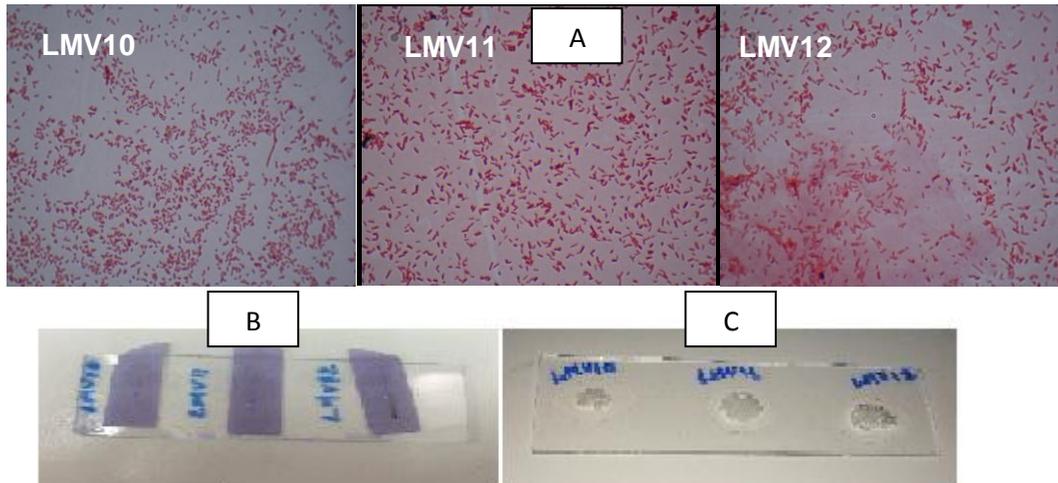


Figura 22. A: Tinción Gram; B: Prueba de la Oxidasa, C: Prueba de la Catalasa.



Figura 23. Colonias re-aisladas de los microtubérculos, arriba LMV11 y LMV12; abajo LMV10.

No se emplearon pruebas moleculares, puesto que no se obtuvo una identificación clara de los aislados en estudio, aunque se podían comparar los patrones de bandas arrojados por la amplificación de la región ITS, no se consideró una prueba relevante para comprobar que las cepas re-aisladas eran las mismas con las que se habían inoculado los microtubérculos ya que esto fue demostrado cuando fueron sembradas en el agar MacConkey.

## 6. DISCUSIÓN GENERAL

Al considerar los resultados obtenidos en esta investigación, destacan la importancia del uso y la integración de diferentes metodologías para la identificación bacteriana. Al estudiar la morfología, mediante tinción Gram y técnicas de cultivos como el crecimiento en medio YDC y agar nutritivo, así como al realizar las distintas pruebas bioquímicas fue posible identificar a los tres aislados como *Pectobacterium* incluso según lo reportado por Schaad y colaboradores 2001, podrían identificarse como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Sin embargo, al realizar el estudio molecular, pudimos percatarnos que ninguno de los tres aislados amplificaba la banda de 434 pb, perteneciente al gen *pel*, característico de estas bacterias pectolíticas. Esta aproximación para el diagnóstico de esta bacteria ha dado resultados muy precisos, amplificándose únicamente la banda de 434 pb en las especies de *P. carotovorum* (Coppola, comunicación personal); es por esta razón, que las amplificaciones inespecíficas observadas en la Figura 9 no permiten llegar al diagnóstico definitivo de estos aislados. Sin embargo, gracias a los resultados obtenidos con la amplificación de regiones repetitivas y ERIC-PCR, pudimos corroborar la diferencia fisiológica del aislado LMV10 en relación con los aislados LMV11 y LMV12, y los perfiles de las bandas de los aislados LMV11 y LMV12 concuerdan con el perfil de bandas presentado por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y el perfil de bandas del aislado LMV10 concuerda con el de la especie *Erwinia cypripedii*. La patogenicidad de los

aislados LMV10, LMV11 y LMV12 pudo ser corroborada mediante las pruebas realizadas en los microtubérculos de las variedades, 'Granola' y 'Arbolona Negra' observándose en éstos, una sintomatología similar a la que presentaban las papas colectadas en la población de Sanare. Además mediante estas pruebas se logró evaluar tanto la resistencia de la variedad 'Arbolona Negra' y la susceptibilidad de la variedad 'Granola' frente al ataque de estas bacterias patógenas, esto destaca la importancia de rescatar el cultivo de variedades nativas de papa que podrían contribuir con la seguridad y soberanía alimentaria del país.

## 7. CONCLUSIONES

- De las papas colectadas en Sanare Edo. Lara con síntomas de pudrición se lograron aislar las tres bacterias estudiadas en esta investigación, siendo estas Gram negativas. Los resultados de las pruebas morfológicas, microbiológicas y bioquímicas permitieron incluirlas en el género *Pectobacterium*.
- Se logró determinar que el método de extracción de ADN propuesto por Gomes y colaboradores (2000) es el de mayor eficiencia para la extracción de ADN de estas bacterias.
- La amplificación mediante PCR específica tanto para *R. solanacearum* como para *B. gladioli*, corroboró lo obtenido con las pruebas bioquímicas, descartando la posibilidad de que alguno de los aislados perteneciera a estas especies bacterianas.
- No se logró la amplificación del gen *pel* en ninguno de los aislados, por lo que se sospecha estar en presencia de *P. carotovorum* subsp. *betavascularum*, única subespecie de este género que no amplifica este gen.
- Las amplificaciones de regiones repetitivas tales como ITS y ERIC, permitieron separar al aislado LMV10 de los aislados LMV11 y LMV12 los cuales presentaron gran similitud entre ellos en el número y tamaño de bandas obtenidas; resultado que corrobora el parecido

fisiológico de los aislados LMV11 y LMV12, diferentes al aislado LMV10, según los resultados obtenidos con las pruebas bioquímicas.

- El uso del cultivo *in vitro* resultó ser un sistema apropiado para el establecimiento desarrollo de las pruebas de patogenicidad y cumplimiento de los postulados de Koch.
- Las pruebas de patogenicidad lograron demostrar la resistencia de la variedad 'Arbolona Negra' frente al ataque de estas bacterias fitopatógenas, con respecto a la variedad 'Granola' la cual es altamente susceptible.
- Se cumplieron a cabalidad los postulados de Koch, corroborando así que las bacterias estudiadas causan el síntoma que presentaban las papas de las que fueron aisladas, en microtubérculos sanos.

## **8. RECOMENDACIONES**

Tomando en cuenta que no se pudo identificar con exactitud la especie a la que pertenecen los aislados LMV10, LMV11 y LMV12, se recomienda realizar la secuenciación del gen 16S región altamente conservada y que permite relacionar filogenéticamente a los organismos procariotas.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Alarcón, J., León, E., Nuñez, P., Forigua, V. 2011. Manejo fitosanitario del cultivo de papa. Bogotá, Colombia. 32pág.
2. Alva S., 2014. Evaluación de la resistencia a *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary mediante el uso de marcadores AFLP en plantas de *Solanum tuberosum* (L.) cultivadas in vitro. Tesis doctoral. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
3. Alva, S., Oropeza, M. 2013. Effect of culture medium consistence and silver nitrate on micropropagation of two potato (*Solanum tuberosum*) cultivars. Rev. Colombian Biotechnoly. 15: 55-62.
4. Alves, B. 2014. Análisis de la reacción de plantas de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) a la infección con *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela. 278pág.
5. Aquiahuatl, M., Pérez, M. 2004. Manual de prácticas del Laboratorio de Microbiología General de la Universidad Autónoma Metropolitana de México. Consultado en la web 09/07/2013.  
[http://www.uamenlinea.uam.mx/materiales/licenciatura/diversos/AQUAHUATL RAMOS MARIA DE LOS ANGELES Manual de practicas de.pdf](http://www.uamenlinea.uam.mx/materiales/licenciatura/diversos/AQUAHUATL_RAMOS MARIA DE LOS ANGELES Manual de practicas de.pdf)

6. Censo Agrícola Nacional <http://censo.mat.gob.ve/> (consultado en la web 29/05/2014)
7. Chavarro, M., Angel, D., Martinez, H. 2004. Utilización de iniciadores específicos para el diagnóstico molecular de *Ralstonia solanacearum* a partir de aislamientos provenientes del departamento de Antioquia. Revista de La División de Ciencias De La Salud. 18: 67–68
8. Coraspe-León, H., Ortega, E., Montero, F., Alvarado, C. 2002. El ácido giberélico en la interrupción del reposo de tubérculos semillas de papa en las condiciones de páramo. *Agronomía Tropical* 4: 543-554.
9. Darrasse, A., Priou, S., Kotoujansky, A., Bertheau, Y. 1994. PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato disease. *Applied Environmental Microbiology* 60: 1437-1443.
10. Dimitri, M. 1987. Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería. Tomo I. Descripción de plantas cultivadas. ACME S.A.C.I, Buenos Aires. Pág.: 467-538.
11. Elphistone, J. 1987. La pudrición blanda y la pierna negra de la papa *Erwinia* ssp. Boletín de Información Técnica 21, Lima, Perú; 18 pág.

12. Fonseca, I. 2014. Identificación bioquímica y molecular De *Burkholderia gladioli* y análisis de su interacción con plantas de *Solanum tuberosum*. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.
13. Furuya N., Ura H., Liyama K., Matsumoto M., Takeshita M., Takanami Y. Specific oligonucleotide primers based on sequences of the 16S-23s rADN spacer region for the detection of *Burkholderia gladioli* by PCR. J. Gen. Plant Pathol. 2002. 68: 220-224.
14. Garrity, George M.; Brenner, Don J.; Krieg, Noel R.; Staley, James R. 2005. Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria, Parts A-C. Springer- Verlag. 408pág.
15. Gomes L., Roncato M., Andrino F., Almeida F. A simple method for DNA isolation from *Xanthomonas* spp. Scien. Agric. 2000. 57: 553-555.
16. Haynes, K., Potts, W., Goth, R. 1997. Evaluation of the reliability of determining soft rot resistance in potatoes by the tuber slice method. American Potato Journal. 74:265-277
17. Helias V., Le Roux AC., Bertheau Y., Andrivon D., Gauthier JP., Jouan B. 1998. Characterisation of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato

- plants, soil and water extracts with PCR-based methods. *European Journal of Plant Pathology* 104: 685–699.
18. Hernández Y., Mariño N., Trujillo G., Urbina C. 2005. Invasión de *Ralstonia solanacearum* en tejidos de tallos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 22: 181-190.
19. Jomar R., Redondo C., Alonso G. Genotipificación de cepas de enterobacterias procedentes de 4 centros de salud del área de Caracas. *Act. Cient. de la Soc. Venez. de Bioana. I Espec.* 2006. 9: 3-7.
20. Kang H. W., Kwon S. W., Go S. J. 2003. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant Pathology* 52: 127–133.
21. Kettani-Halabi, M., Terta, M., Amdan, M., El Fahime, E., Bouteau, F., Ennaji, M. 2013. An easy, simple inexpensive test for the specific detection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* based on sequence analysis of the pmrA gene. *BMC Microbiology* 13:176- 185.
22. Lu, J., Perng, C., Lee, S., Wan, C. 2000. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease for detection, and

- identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. J. Clin. Microbiol. 38: 2076-2080.
23. Hernández Y., Mariño N., Trujillo G., Urbina C. 2005. Invasión de *Ralstonia solanacearum* en tejidos de tallos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Rev. Fac. Agron. (LUZ). 22: 181-190.
- 24.. Jomar R., Redondo C., Alonso G. Genotipificación de cepas de enterobacterias procedentes de 4 centros de salud del área de Caracas. Act. Cient. de la Soc. Venez.de Bioana. I Espec. 2006. 9: 3-7.
- 25.. Kang H. W., Kwon S. W., Go S. J. 2003. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. Plant Pathology 52: 127–133.
- 26.. Kettani-Halabi, M., Terta, M., Amdan, M., El Fahime, E., Bouteau, F., Ennaji, M. 2013. An easy, simple inexpensive test for the specific detection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* based on sequence analysis of the *pmrA* gene. BMC Microbiology 13:176- 185.
- 27.. López SA., Damann K., Grelen L. *Xanthomonas albilineans* diversity and identification based on Re-PCR fingerprint. Current Microbiology. 2001. 42: 155-159.

- 28.6. Lu, J., Perng, C., Lee, S., Wan, C. 2000. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease for detection, and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. J. Clin. Microbiol. 38: 2076-2080.
29. Luque J., Herraéz A. 2000. Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética. Editorial Harcourt. 1ra edición. Madrid. 469pág.
30. Moreno, M. 2012. Efecto de la composición del medio de cultivo y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa (*Solanum Tuberosum L.*). Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.
31. Murashigue, T., Skoog, F. (1962). A revied medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. Plant Physiol., 15:173-197.
32. Narayanasamy, P. 2008, Molecular biology in plant pathogenesis and disease management: 7 Microbial Plant Pathogens. 1: 109.
33. Nazerian, E., Sijam, K., Meor, Z., Keshavarz, K. 2011. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* causing a new soft rot disease on okra in Malaysia. Japón.
34. Origen de la papa. Venezuela. [http://biblioteca.unet.edu.ve/db/alexandr/db/bcunet/edocs/TEUNET/2008/pregrado/Agronomia/FuentesA\\_RodnyA/Capitulo2.pdf](http://biblioteca.unet.edu.ve/db/alexandr/db/bcunet/edocs/TEUNET/2008/pregrado/Agronomia/FuentesA_RodnyA/Capitulo2.pdf)  
(30/01/2014)

35. Pérombelon, M. C. M. 2002. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology*. 51: 1–12.
36. Poggi M., Guzman D., García C., Lagos L. 2009. PCR universal o de amplio espectro: Un aporte a la detección e identificación de bacterias y hongos en la práctica clínica. *Rev. Méd. Chile*. 137: 1122-1125.
37. Poueymiro M., Genin S. 2009. Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Curr. Opin. Microbiol.* 12(1):44-52.
38. Rademaker, J., Hoste, B., Louws, F., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P., y col. (2000). Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50:665-677.
39. Remenant, B., Coupat-Goutaland, B., Guidot, A., Cellier, G., Wicker, E., Allen, C. 2010. Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics*. 11:379.
40. Romero, L., Monasterio, M. 2005. Papas negras, papas del páramo. Un pasivo socioambiental de la modernización agrícola en Los Andes de Venezuela. ¿Es posible recuperarlas? *Boletín Antropológico.*; 23(64): 107-138.

41. Santambrosio, E., Ortega, M., Garibaldi, P. 2009. Trabajo práctico n° 4 “Tinción y observación de microorganismos”. Facultad Regional Rosario Departamento de Ingeniería Química Cátedra de Biotecnología. Argentina. 9 pág.
42. Seal L., Jackson J., Young W. 1992 Use of tARN consensus primer to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by Polimerase Chain Reaction amplification. *Appl. Environment. Microbiol.* 58: 3759-3761.
43. Schaad N., Jones J., Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS PRESS. Third Edition. Minnesota.
44. Smith J., Offord L., Holderness M., Saddler G. Genetic Diversity of *Burkholderia solanacearum* (Synonym *Pseudomonas solanacearum*) Race 3 in Kenya International Mycological Institute. *Appl Environ Microbiol.* 1995. 61: 4263–4268.
45. Terta, M., Azelmat, S., Ait M’hand, R., El Hassan, A., Barakate, M., Bouteau, F., Ennaji, M. 2012. Molecular typing of *Pectobacterium carotovorum* isolated from potato tuber soft rot in Morocco. *Ann Microbiol.* 62:1411–1417.
46. Toth, K, Avrova, O, Hyman, J. (2001) Rapid Identification and Differentiation of the Soft Rot Erwinias by 16S-23S Intergenic

Transcribed Spacer-PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism Analyses

- 47.2. Versalovic, J Koeuth, T and Lupski, J Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes.
- 48.3. Wang, Z., Comstock, E.; Hatziloukas, P., Schaad, N. (1999). Comparison of PCR, Bio-PCR, DIA, ELISA and isolation on semi-selective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald. *Plant Pathol.*, 48:245-252.
49. Zhu, L., Xie, H., Chen, S., Ma, R. 2010. Rapid isolation, identification and phylogenetic analysis of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *Journal of Plant Pathology*. 92: 479-483.