



UNIVERSIDAD CENTRAL DE  
VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Identificación bioquímica y molecular de bacterias patógenas aisladas  
de plantas de papa (*Solanum tuberosum*) cultivadas en Chirgua,  
Edo. Carabobo, Venezuela**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Genesis Gabriela Apolinario Carmona, como requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Biología.

Tutora: Dra. Maira Oropeza

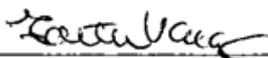
Caracas, Venezuela

Octubre, 2018

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL  
DE GRADO DEL (LA) Br. GENESIS GABRIELA APOLINARIO  
CARMONA**

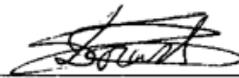
Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del (la) Br. Genesis Gabriela Apolinario Carmona, C.I: 20.615.083, titulado "**Identificación bioquímica y molecular de bacterias patógenas aisladas de plantas de papa (*Solanum tuberosum*) cultivadas en Chirgua, Edo. Carabobo, Venezuela**", para optar al título de Licenciado(a) en Biología, considerando que el trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en la ciudad de Caracas, a los diecisiete días del mes de Octubre del año dos mil dieciocho, dejando constar que la profesora Maira Oropeza actuó como Coordinadora del jurado examinador.



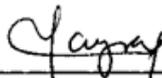
---

Prof. Teresa Edith Vargas  
Jurado



---

Prof. Nora Malaver  
Jurado



---

Prof. Maira Oropeza  
Tutor

## Resumen

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es el cuarto cultivo alimenticio de importancia mundial, después del trigo, arroz y maíz. En Venezuela, ocupa el octavo lugar en producción y el primer lugar de las raíces y tubérculos. Una de las grandes limitantes en la producción de papa en nuestro país son los problemas fitosanitarios, donde las principales bacterias patógenas son *Ralstonia solanacearum* y *Pectobacterium* sp, causantes de grandes pérdidas, por ello, el objetivo de este trabajo es caracterizar a nivel bioquímico y molecular las bacterias aisladas de tubérculos de papa cultivados en Chirgua, Estado Carabobo. Para esto, se realizaron observaciones de la morfología de las bacterias, tinción gram, pruebas bioquímicas, moleculares y demostración de los postulados de Koch mediante inoculaciones de microtubérculos de papa variedad Granola, con el fin de caracterizar y lograr la identificación de los aislados. Se obtuvieron tres aislados patogénicos corroborados mediante un ensayo preliminar de patogenicidad, gram negativos. Según la caracterización bioquímica, los aislados en estudio conforman un grupo muy heterogéneo, correspondiendo a los géneros *Pseudomonas* sp., *Acidovorax* sp. y *Dickeya* sp., siendo las características metabólicas respiratorias fundamentales para su diferenciación, además de la producción de fluoresceína; los estudios moleculares mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con iniciadores universales comprobaron que los aislados son microorganismos procariotas, y que no pertenecen a las especies *Ralstonia solanacearum* y *Pectobacterium caratovorum*. Finalmente, se comprobaron los postulados de Koch, donde la cepa identificada como *Pseudomonas* sp., no causó síntomas en las rodajas de microtubérculos de papa.

Palabras clave: *Solanum tuberosum*, *Pseudomonas*, *Acidovorax*, *Dickeya*, *Pectobacterium*, *Ralstonia solanacearum*, bacterias patógenas, identificación bioquímica.

## **Financiamiento**

Este Trabajo Especial de Grado se llevó a cabo en el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal de la Universidad Central de Venezuela, donde se contó con todos los reactivos y materiales necesarios, gracias al financiamiento otorgado por la Corporación de Ciencia y Tecnología (CODECYT) con el Proyecto titulado:” Producción de semilla mejorada y certificada de ajo (*Allium sativum*); apio criollo (*Arracacia xanthorrhiza*); fresa (*Fragaria ananassa*); Cacao (*Theobroma cacao*); café (*Coffea arabica*) y zanahoria (*Daucus carota*)”.

## **Agradecimientos**

Agradezco a DIOS por TODO, pues cada obstáculo superado y cada sueño alcanzado, ha sido gracias a él y las fuerzas que me ha dado para continuar el camino de la vida, uno lleno de aciertos y de errores, de momentos felices y tragos amargos, pero en el que solo se aprende caminando. Por permitirme estar rodeada de gente tan hermosa y a la que espero cubrir en los siguientes párrafos, quizás no los mencione a todos y espero que me disculpen, de igual manera estoy agradecida por cada uno pues de alguna forma me han traído hasta aquí. Gracias.

A mis padres Ketty y Ramón, quienes me impulsaron a superarme y seguir adelante, a pesar de los momentos de confusión durante mi carrera, les agradezco inmensamente por su amor incondicional, siempre me apoyaron e impulsaron a continuar, los amo y espero que siempre estén orgullosos de mí.

A mi hermanito Victor, a quien amo mucho y de quien estoy muy orgullosa, le agradezco por toda su ayuda pues estuvo presente y me prestó su apoyo en momentos donde lo necesite.

A mi hermosa Lulú, mi ángel de la guarda, con ella Dios me ha bendecido y me ha brindado la mejor compañía que alguna vez llegue a desear, desearía que fuera eterna.

A mi tutora Maira Oropeza, con quien estoy muy agradecida, pues sin saberlo, me acogió bajo su tutela cuando me encontraba perdida, sin estar segura ni cómo ni donde culminar esta última etapa de mi carrera, me brindó sus conocimientos tanto académicos como de vida, además de múltiples oportunidades, por las que siempre estaré agradecida.

A mis compañeros del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal Yayfré, Yurani y Antonio, por cada día y cada conversación, con quienes conviví diariamente durante todo este tiempo. Yay, muchas gracias por tus consejos. Al Instituto de Biología Experimental, a los profesores, a los estudiantes y al personal administrativo, por cada consejo que recibí en sus pasillos, y que entre todos le damos vida a tan hermosas instalaciones.

Al Sr. Rafael Yépez, quien fue muy atento durante tantos meses, mientras realizaba este trabajo, le agradezco por cada ayuda y favor recibido, espero que Dios pague su nobleza.

Al cafetín de Danny, todos los profesores y personal de la facultad que hace vida allí, por cada chiste, favor o aprendizaje recibido, sin duda alguna fue una escuela de vida que me alegra haber vivido.

A mi amiga Oriana, por todo el apoyo y amistad que me brindó durante la carrera, definitivamente es muy especial y la quiero mucho.

A mi amiga Edith, por su alegría y ser tan hermoso ser humano, sencillamente un tesoro en el IBE, que no todos tienen la fortuna de encontrar.

A Jose Alberto, por tan linda amistad, todo el cariño y las palabras de aliento que tanto necesite en los últimos momentos de mi trabajo.

A Samuel, quien cada día me sorprende haciéndose más espacio en mi sistema límbico y por todo su apoyo en este trabajo, fue muy significativo.

Por último, quiero agradecerles a mis dos personas entrañables, quienes siempre estarán conmigo a donde decida ir, pues viven en mi corazón. A mi abuelita Conchita, tu amor y devoción creó un espacio en mi corazón que jamás podre llenar y a mi Diego, mi amigo y mi cómplice, siempre le agradeceré a Dios por haberme permitido conocer la verdadera amistad a través de ti, aquella que es desinteresada y honesta, tú me

apoyaste y me cuidaste desde nuestra infancia y cuando partiste tuve que aprender a cuidarme sola, después de todo este tiempo... todavía lo hago.

## Índice de Contenido

|  |    |
|--|----|
| <b>1. Introducción</b> .....   | 14 |
| <b>2. Objetivos</b> .....  | 16 |
| 2.1. Objetivo general .....  | 16 |
| 2.2. Objetivos específicos.....  | 16 |
| <b>3. Antecedentes</b> .....   | 17 |
| 3.1. La papa ( <i>Solanum tuberosum</i> ).....                                 | 17 |
| 3.2. Origen de la papa .....   | 17 |
| 3.3. Importancia de la papa en Venezuela.....                                  | 18 |
| 3.5.1. <i>Ralstonia solanacearum</i> .....                                     | 22 |
| 3.5.2. <i>Pseudomonas</i> sp.....  | 24 |
| 3.5.3. <i>Burkholderia</i> sp.....   | 26 |
| 3.5.4 <i>Acidovorax</i> sp. ....   | 27 |
| 3.5.5. Erwinias .....  | 29 |
| 3.6. Identificación de Bacterias Patógenas.....                                | 32 |
| 3.6.1. Principales pruebas bioquímicas para la identificación bacteriana ..... | 33 |
| 3.7. Métodos moleculares de identificación.....                                | 35 |
| 3.7.1. Análisis del ARNr 16S.....  | 35 |
| 3.7.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....                         | 36 |
| 3.7.3. Genotipificación.....   | 37 |
| 3.8. Postulados de Koch.....   | 38 |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.8.1. Importancia del cultivo <i>in vitro</i> para la demostración de los postulados de Koch ..... | 39        |
| 3.9. Micropropagación.....  | 40        |
| 3.9.1. Etapas de la micropropagación .....  | 40        |
| 3.9.2. Cultivo <i>in vitro</i> de la papa .....   | 40        |
| 3.9.3. Microtuberización de la papa .....   | 41        |
| <b>4. Materiales y Métodos .....</b>  | <b>43</b> |
| 4.1. Obtención y mantenimiento de aislados bacterianos .....  | 43        |
| 4.2. Caracterización morfológica .....  | 44        |
| 4.3. Ensayo de patogenicidad en tubérculos comerciales .....  | 45        |
| 4.4. Caracterización bioquímica .....   | 46        |
| 4.5. Identificación molecular de las bacterias patógenas .....                                      | 49        |
| 4.5.1. Extracción del ADN bacteriano .....  | 49        |
| 4.5.2. Cuantificación y calificación del ADN extraído .....   | 50        |
| 4.5.3. Amplificación con iniciadores universales del gen 16S del ADNr.....                          | 50        |
| 4.5.4. PCR con iniciadores específicos.....   | 51        |
| 4.6. Postulados de Koch.....  | 54        |
| 4.6.1. Obtención de las suspensiones bacterianas .....  | 54        |
| 4.6.2. Preparación de las placas de cámara húmeda .....   | 54        |
| 4.6.3. Preparación de las cámaras húmedas con los microtubérculos de papas .....                    | 54        |
| 4.6.4. Inoculación .....  | 54        |
| 4.6.5. Incidencia y severidad en rodajas de microtubérculos .....                                   | 54        |

|   |            |
|---|------------|
| 4.6.6. Identificación del reaislado.....                                      | 55         |
| <b>5. Resultados y Discusión .....</b>  | <b>57</b>  |
| 5.1. Obtención y mantenimiento de aislados bacterianos .....                  | 57         |
| 5.2. Caracterización morfológica .....  | 57         |
| 5.3. Ensayo de patogenicidad.....   | 58         |
| 5.3.4. Caracterización Bioquímica .....                                       | 63         |
| 5.3.5. Identificación molecular .....   | 75         |
| 5.3.5.1. Extracción de ADN bacteriano.....                                    | 75         |
| 5.3.5.2. Cuantificación y calificación del ADN extraído .....                 | 77         |
| 5.3.5.3. Amplificación con iniciadores universales del gen 16S del ADNr ..... | 78         |
| 5.3.5.4. PCR con iniciadores específicos .....                                | 80         |
| 5.3.6. Micropropagación y obtención de microtubérculos.....                   | 85         |
| 5.3.7. Postulados de Koch .....   | 86         |
| <b>6. Conclusiones.....</b>   | <b>91</b>  |
| <b>7. Bibliografía.....</b>   | <b>93</b>  |
| <b>8. Anexos.....</b>   | <b>106</b> |

## Índice de Figuras

|  |             |
|--|-------------|
| <b>Figura 1.</b> Partes de la planta de papa .....   | 17          |
| <b>Figura 2.</b> Etapas de desarrollo y crecimiento de la planta de papa .....   | 20          |
| <b>Figura 3.</b> Marchitez bacteriana de la papa ( <i>Ralstonia solanacearum</i> ). Plantas en campo mostrando síntomas de la enfermedad.....        | 23          |
| <b>Figura 4.</b> Marchitez bacteriana de la papa ( <i>Ralstonia solanacearum</i> ). Decoloración y tejidos necróticos por pudrición secundaria. .... | 23          |
| <b>Figura 5.</b> <i>Pectobacterium</i> spp. pudrición blanda en tubérculos de papa.....  | 30          |
| <b>Figura 6.</b> Tallo de planta de papa infectado por <i>Pectobacterium</i> spp. ....   | 31          |
| <b>Figura 7.</b> Tubérculos con síntomas de enfermedad procedentes de la localidad de Chirgua, Edo. Carabobo, Venezuela .....                        | 43          |
| <b>Figura 8.</b> Crecimiento en agar LB .....  | 57          |
| <b>Figura 9.</b> Tinción Gram .....  | 58          |
| <b>Figuras 10, 11 y 12.</b> Evidencia fotográfica del ensayo de patogenicidad en tubérculos comerciales .....  | 59, 59 y 60 |
| <b>Figura 13.</b> Pruebas de lectura rápida .....  | 64          |
| <b>Figura 14.</b> Resultados de la prueba de Oxido-Fermentación .....  | 64          |
| <b>Figura 15.</b> Prueba de agar hierro de Kligler .....   | 66          |
| <b>Figura 16.</b> Crecimiento en agar MacConkey.....   | 66          |
| <b>Figura 17.1.</b> Prueba de reducción de nitratos. <b>Figura 17.2.</b> Prueba de arginina dehidrolasa.....   | 68          |
| <b>Figura 18.</b> Agar Kelman's TZC.....   | 69          |
| <b>Figura 19.</b> Agar Pseudomonas.....  | 71          |
| <b>Figura 20.</b> Agar King B.....   | 71          |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 21.</b> Prueba indol .....   | 74 |
| <b>Figura 22.</b> Electroforesis en gel de agarosa 0,8% de los extractos de ADN obtenidos por el método de Gomes y col. (2000). .....                                | 76 |
| <b>Figura 23.</b> Electroforesis en gel de agarosa 0,8% de los extractos de ADN obtenidos por el método de Gomes y col. (2000) modificado con CTAB 2X.....           | 78 |
| <b>Figura 24.</b> Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR para la amplificación de la subunidad menor del gen 16S del ADNr de procariotas..... | 79 |
| <b>Figura 25.</b> Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR para la detección de <i>R. solanacearum</i> .....                                    | 80 |
| <b>Figura 26.</b> Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR para la detección de <i>B. gladioli</i> .....  | 81 |
| <b>Figura 27.</b> Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR para la detección de <i>P. caratovorum</i> .....                                     | 82 |
| <b>Figura 28.</b> Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR para la amplificación de la región espaciadora ITS .....                             | 83 |
| <b>Figura 29.</b> Registro fotográfico reportado por Toth y col. (2001) ITS-PCR amplification patterns. ....   | 84 |
| <b>Figura 30.</b> Vitroplantas de papa variedad Granola.....   | 85 |
| <b>Figura 31.</b> Microtubérculos de papa de la variedad Granola.....  | 86 |
| <b>Figura 32.</b> Evidencia fotográfica de los postulados de Koch en rodajas de microtubérculos de papa variedad Granola .....                                       | 88 |

## Índice de Tablas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Estadísticas de Fedegro: cultivo de la papa .....  | 19 |
| <b>Tabla 2.</b> Características microbiológicas y bioquímicas de <i>R. solanacearum</i> . .....  | 24 |
| <b>Tabla 3.</b> Características bioquímicas y físicas de distintas especies de <i>Pseudomonas</i> . 25   |    |
| <b>Tabla 4.</b> Características que diferencian a las especies del género <i>Acidovorax</i> . .....  | 28 |
| <b>Tabla 5.</b> Características fisiológicas y bioquímicas usadas para discriminar las Enterobacteriaceae más comunes de pudrición blanda .....              | 32 |
| <b>Tabla 6.</b> Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias .....  | 33 |
| <b>Tabla 7.</b> Iniciadores universales propuestos por Lu y col. .....   | 51 |
| <b>Tabla 8.</b> Iniciadores y condiciones de PCR, para la detección molecular de <i>R. solanacearum</i> , <i>B. gladioli</i> y <i>P. carotovorum</i> . ..... | 51 |
| <b>Tabla 9.</b> Características morfológicas de los aislados .....   | 57 |
| <b>Tabla 10.</b> Resultados a pruebas bioquímicas de lectura rápida .....  | 63 |
| <b>Tabla 11.</b> Resultados de las principales pruebas bioquímicas .....   | 67 |
| <b>Tabla 12.</b> Valores de densidad óptica y concentración de ADN .....   | 77 |
| <b>Tabla 13.</b> Tamaño de bandas para las distintas <i>E. chrysanthemi</i> , por amplificación de PCR 16S-23S ITS (ITS-PCR).....                            | 84 |
| <b>Tabla 14.</b> Resultados de las principales pruebas bioquímicas realizadas a los reaislados de Koch.....  | 89 |

## Índice de Anexos

|  |     |
|--|-----|
| <b>Anexo 1.</b> Caldo LB.....  | 106 |
| <b>Anexo 2.</b> Agar LB. ....  | 106 |
| <b>Anexo 3.</b> Medio para punción. ....                             | 106 |
| <b>Anexo 4.</b> Medio Murashige y Skoog (1962) sólido. ....          | 107 |
| <b>Anexo 5.</b> Medio Murashige y Skoog líquido. ....                | 107 |
| <b>Anexo 6.</b> Medio de tuberización. ....                          | 107 |
| <b>Anexo 7.</b> Agar Simons Citrato. ....                            | 108 |
| <b>Anexo 8.</b> Agar hierro de Kligler.....                          | 108 |
| <b>Anexo 9.</b> Medio Hugh y Leifson (1953) para prueba OF. ....     | 108 |
| <b>Anexo 10.</b> Agar MacConkey.....                                 | 109 |
| <b>Anexo 11.</b> Licuefacción de la gelatina. ....                   | 109 |
| <b>Anexo 12.</b> Motilidad. ....                                     | 109 |
| <b>Anexo 13.</b> Indol.....  | 109 |
| <b>Anexo 14.</b> Caldo de reducción de nitratos. ....                | 109 |
| <b>Anexo 15.</b> Arginina dehidrolasa.....                           | 110 |
| <b>Anexo 16.</b> Agar Kelman's TZC. ....                             | 110 |
| <b>Anexo 17.</b> Agar Pseudomonas. ....                              | 110 |
| <b>Anexo 18.</b> Agar Cetrimida. ....                                | 111 |
| <b>Anexo 19.</b> Agar King B.....                                    | 111 |
| <b>Anexo 20.</b> Clave de identificación de bacterias patógenas .... | 112 |
| <b>Anexo 21.</b> Estructura secundaria del ARNr 16S.....             | 113 |

## 1. Introducción

La papa es una planta perteneciente a la familia Solanaceae, especie tetraploide *Solanum tuberosum* L., dividida en las subespecies *tuberosum*, cultivada ampliamente en las regiones templadas de América y Europa; y *andigenum*, propia de los cultivares de los Andes. El cultivo de papa posee una gran importancia a nivel mundial y nacional, tanto económica como nutricionalmente. Se consume el tubérculo, el cual es el lugar de reserva de los nutrientes, con un alto contenido de carbohidratos, lo que la posiciona como un alimento de alto valor energético.

Una de las grandes limitantes en la producción de papa son los problemas fitosanitarios o de enfermedades, que afectan plantas y tubérculos, generando pérdidas en los rendimientos y en la calidad del producto final. Los daños ocasionados pueden ser totales o parciales, comprometiendo la rentabilidad final del cultivo (Méndez e Inostroza, 2009). Dentro de las enfermedades que puede portar un tubérculo semilla se encuentran aquellas producidas por hongos, bacterias y virus (Inostroza, 2009).

Entre las enfermedades causadas por bacterias, las más importantes son la marchitez bacteriana ocasionada por *Ralstonia solanacearum*, pierna negra y pudrición blanda, ambas enfermedades pueden ser causadas por algunas especies bacterianas que conforman a los generos *Pectobacterium* sp. y *Dickeya* sp., tales como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Dickeya chrysanthemi*.

Para poder comprender la epidemiología y así encontrar un tratamiento eficaz de la enfermedad, son necesarias la identificación y caracterización de los principales patógenos que pueden afectar los cultivos, permitiendo así la erradicación de los mismos (Inostroza, 2009).

La identificación de bacterias patógenas de plantas se puede realizar mediante el uso de métodos morfológicos, bioquímicos y moleculares. Los métodos morfológicos permiten observar la morfología de la bacteria y de las colonias que forma; los métodos bioquímicos se basan en las particularidades dentro de los distintos tipos bacterianos, que dan lugar a diferentes respuestas en los patrones de comportamiento metabólico, fisiológico y morfológico de los miembros de cada grupo. Los métodos moleculares se han erigido como los procedimientos más confiables para la identificación de bacterias patógenas, dentro de los cuales el análisis de la secuencia génica del ARNr 16S es la herramienta más ampliamente utilizada. Este marcador está presente en todas las bacterias. Se presenta como una familia de multigenes u operones cuya función no se modifica con el tiempo y actúa como un marcador eficiente de evolución (Fernández y col., 2010). Igualmente las técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) han sido aplicadas tanto para el diagnóstico como para la genotipificación de las bacterias patógenas de plantas.

Considerando esto, en el presente trabajo se plantea identificar y caracterizar bacterias patógenas aisladas de tubérculos de papa colectados en Chirgua, Estado Carabobo, Venezuela.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo general**

Identificar aislados patogénicos obtenidos de tubérculos de papa colectados en Chirgua, Estado Carabobo, Venezuela.

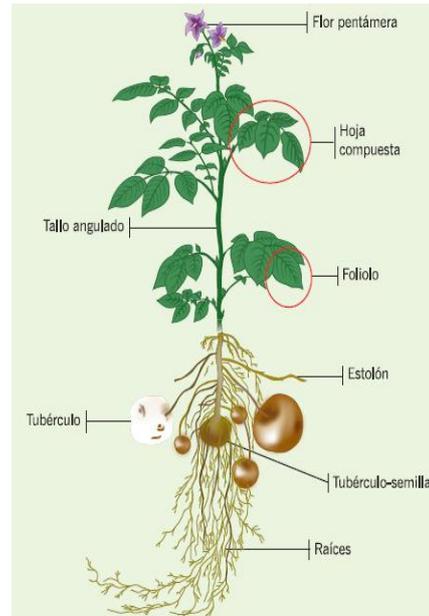
### **2.2. Objetivos específicos**

1. Aislar y purificar las bacterias patógenas a partir de los tubérculos de papa colectados en Chirgua, Estado Carabobo.
2. Caracterizar morfológicamente los aislados patogénicos.
3. Identificar bioquímica y molecularmente los aislados patogénicos.
4. Comprobar los postulados de Koch, observando la sintomatología en rodajas de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) de la variedad 'Granola' cultivadas *in vitro*.

### 3. Antecedentes

#### 3.1. La papa (*Solanum tuberosum*)

La papa es una planta dicotiledónea herbácea anual, autógama, con flores pentámeras de diversos colores. Los frutos son bayas de forma redonda como un pequeño tomate con 200 a 300 semillas. Los tallos son herbáceos, angulares, generalmente de color verde o rojo púrpura. Las hojas adultas son compuestas, pero las primeras hojas provenientes del tubérculo pueden ser simples. Los estomas son más numerosos en la superficie inferior de las hojas. Las raíces y estolones se desarrollan a partir del tallo subterráneo, entre el tubérculo-semilla y la superficie del suelo (Gandarillas y Ortuño, 2009).



**Figura 1.** Partes de la planta de papa (Tomada de Gandarillas y Ortuño, 2009).

#### 3.2. Origen de la papa

La papa se cultiva desde hace ocho mil años y su lugar de origen ha sido muy discutido. En este momento hay certeza que proviene de la región andina, probablemente de Perú, y, también, de la isla Chiloé, ubicada al sur de Chile. En el siglo XVI, los colonizadores españoles introducen la papa en Europa. A partir de ese momento el cultivo de papa se expande por el hemisferio norte durante la Revolución Industrial, hasta llegar a convertirse en un alimento fundamental para los mineros y obreros, cuyas largas jornadas laborales requerían gran aporte de energía (Borba, 2008). Las especies afines silvestres y cultivadas a la papa *Solanum tuberosum* ssp *tuberosum* se distribuyen desde

el sureste de Norteamérica, pasando por toda América Central y Suramérica, marcadamente la zona occidental, hasta llegar a latitudes mas allá de los 50° Sur. A lo largo de toda la cordillera andina, encontramos una gran variabilidad de especies y entre ellas 226 son silvestres y sólo ocho cultivadas (Contreras, 2008).

La papa es un cultivo originalmente adaptado a temperaturas relativamente bajas, con una producción máxima cuando la temperatura media diaria está entre los 15 y 21 °C (Rubio y Kirk, 2008).

### **3.3. Importancia de la papa en Venezuela**

La papa es el cuarto cultivo alimenticio de importancia mundial, después del trigo, arroz y maíz. En Venezuela, ocupa el octavo lugar en producción y el primer lugar de las raíces y tubérculos, contribuyendo con 50% de la producción total. La producción de papa en Venezuela se destina tanto al consumo fresco como para la industria, en el primero predomina la variedad de papa Granola, la cual es de origen alemán, además, se cultivan otras variedades de origen colombiano, así como de otros países y en menor proporción, las variedades nacionales. También encontramos variedades que han entrado a la región sin cumplir con los permisos sanitarios y trámites correspondientes fijados por las normas de importación de semilla nacional, las cuales poseen un amplio rango de adaptación a las condiciones agroclimáticas venezolanas (Enlace 2).

La papa es un alimento versátil y tiene un gran contenido de carbohidratos, recién cosechada, contiene un 80% de agua y un 20% de materia seca. Entre el 60% y el 80% de esta materia seca es almidón. Además, la papa tiene poca grasa, abundantes micronutrientes, sobre todo vitamina C y contiene una cantidad moderada de hierro, pero el gran contenido de vitamina C fomenta la absorción de este mineral. Además,

este tubérculo tiene vitaminas B1, B3 y B6, y otros minerales como potasio, fósforo y magnesio, así como folato, ácido pantoténico y riboflavina (Enlace 4).

**Tabla 1.** Estadísticas de Fedeaagro: cultivo de la papa desde el año 2010 al año 2015 para Venezuela.

| <b>Años</b>                   | <b>2010</b> | <b>2011</b> | <b>2012</b> | <b>2013</b> | <b>2014</b> | <b>2015</b> |
|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Volumen de producción</b>  | 512,544     | 554,852     | 578,080     | 419,580     | 636,367     | 602,522     |
| <b>Valor de la producción</b> | 95,403      | 103,278     | 107,602     | 78,099      | 118,451     | 112,152     |
| <b>Superficie cosechada</b>   | 28,985      | 34,351      | 33,183      | 21,205      | 33,150      | 33,478      |
| <b>Rendimientos kg/ha</b>     | 17,683      | 16,152      | 17,421      | 19,787      | 19,197      | 17,998      |

El año con mayor volumen y valor de producción fue el 2014. Aunque se mantiene la misma superficie cosechada en comparación con el año 2015, en el año 2014 hubo un buen rendimiento Kg/HA, continuando con el 2013. Según FEDEAGRO (Enlace 7) (Tabla 1) el volumen de producción de este cultivo ha tenido un aumento desde el año 2010 al 2014. En el año 2015 se registró un decrecimiento con respecto al año anterior. También, hubo una caída del volumen y valor de producción en el año 2013, teniendo este año la menor superficie cosechada, aunque se observa un buen rendimiento de 19,787 Kg/HA. En general, hay un aumento en el volumen y valor de la producción y un rendimiento que oscila aproximadamente entre los 17,000 y los 19,000 Kg/HA.

### **3.4. Desarrollo y crecimiento de la planta de papa**

El crecimiento de la papa se divide en 5 etapas (Figura 2):

#### Etapa de Crecimiento I: Desarrollo de brotes:

- Los brotes se desarrollan del tubérculo semilla y crecen hacia arriba para emerger del suelo.
- Las raíces se desarrollan de la base de los brotes en emergencia.

#### Etapa de Crecimiento II: Crecimiento Vegetativo:

- Las hojas y los tallos se desarrollan a partir de los nódulos de los brotes que han emergido.
- Las raíces y estolones se desarrollan de los nódulos que se encuentran en crecimiento en el suelo.

Etapa de Crecimiento III: Inicio de Formación de los Tubérculos:

- Los tubérculos se forman en las puntas de los estolones, pero no presentan un crecimiento apreciable.
- En varios cultivares el final de este estado coincide con la primera floración.

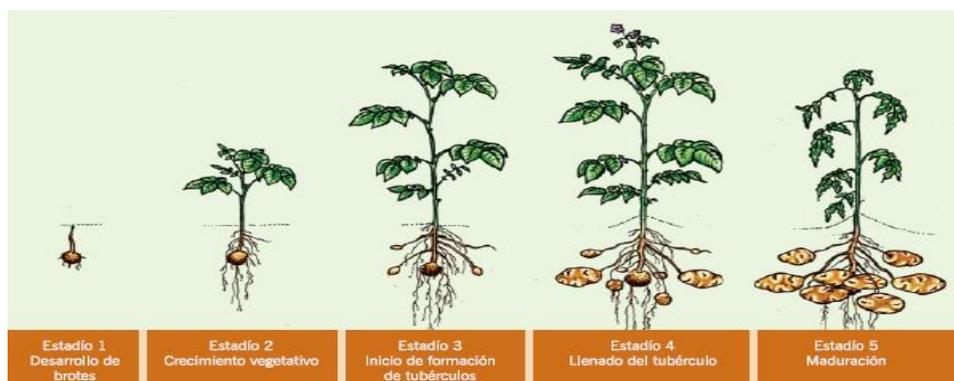
Etapa de Crecimiento IV: Llenado del Tubérculo:

- Las células del tubérculo se expanden con la acumulación de agua, nutrientes y carbohidratos.
- Los tubérculos se constituyen en el mayor almacén de carbohidratos y nutrientes.

Etapa de Crecimiento V: Maduración:

- El follaje amarillea y se caen las hojas, la fotosíntesis se reduce, el crecimiento de los tubérculos se detiene y el follaje muere.

El contenido de materia seca alcanza su punto máximo y la piel del tubérculo se fija (Gandarillas y Ortuño, 2009).



**Figura 2.** Etapas de desarrollo y crecimiento de la planta de papa (Tomada de Gandarillas y Ortuño, 2009).

En condiciones ambientales ideales, una planta de papa sana crecería llevando a cabo todas sus funciones fisiológicas en las cinco etapas de desarrollo; sin embargo, en condiciones reales nunca se logra una planta perfectamente sana, por la interferencia de varios factores, como los ambientales, las enfermedades, los insectos-plaga y los nemátodos (Gandarillas y Ortuño, 2009).

### **3.5. Bacterias patógenas de la papa**

Las bacterias asociadas a las plantas pueden ser benéficas o dañinas. Todas las superficies vegetales tienen microbios sobre ellas (epífitos), y algunos microbios viven dentro de las plantas (endófitos). Algunos son residentes y otros transitorios. Las bacterias se encuentran entre los microorganismos que colonizan a las plantas en forma sucesiva a medida que éstas maduran. Las células bacterianas individuales no se pueden observar sin un microscopio, sin embargo, poblaciones grandes de bacterias se vuelven visibles en forma de agregados en medio líquido, como biofilms en plantas, suspensiones viscosas taponando los vasos de las plantas, o como colonias en placas de Petri en el laboratorio. Generalmente se requieren poblaciones de  $10^6$  UFC (Unidades Formadoras de Colonia/mililitro) o mayores para que las bacterias funcionen como agentes de control biológico, con fines beneficiosos, o como patógenos, causando enfermedades infecciosas (Enlace 3).

El cultivo de papa es afectado por numerosos microorganismos que, en determinadas condiciones, causan daño económico. Las bacterias patógenas de la papa afectan el rendimiento y la calidad de las cosechas, estas dañan hojas, tallos o tubérculos; alteran el crecimiento de las plantas; causan pudriciones o malformación y afectan la apariencia comercial y calidad culinaria de los tubérculos. A continuación se detallarán características de las principales bacterias patógenas de papa (Bayona, 2013).

### 3.5.1. *Ralstonia solanacearum*

La marchitez bacteriana ocasionada por *Ralstonia solanacearum* (Sinónimo: *Pseudomonas solanacearum*) es una enfermedad vascular. Después de la infección, la bacteria coloniza la corteza y, posteriormente, los vasos xilemáticos propagándose por toda la planta. Las masas bacterianas interrumpen el flujo de agua desde las raíces a las hojas, resultando en la marchitez de la planta. La severidad de la enfermedad depende del tipo, temperatura y humedad del suelo (lo cual influye en el desarrollo del microorganismo), los hospedantes susceptibles y la virulencia de las cepas. Las altas temperaturas (30-35°C) y humedad son los principales factores asociados con la alta incidencia y severidad de la marchitez bacteriana (González y col., 2009).

Los síntomas de la marchitez bacteriana de la papa son similares a aquellos causados por la falta de agua o a otros tipos de marchitez patológica, pero comúnmente la marchitez bacteriana es unilateral, afectando los folíolos de un lado de una hoja, las hojas de un tallo, o un tallo en sí y otro no (Figura 3), (French, 1984). Al inicio de la infección se observa un marchitamiento de las hojas, que pueden aparecer marchitas en las horas más calurosas del día, aunque la planta parece recuperarse durante la noche. A medida que la infección progresa, se aprecia clorosis y posteriormente necrosis de las hojas. En el tallo, las lesiones suelen empezar en la base, pudiendo producir un oscurecimiento de los haces vasculares. Al cortar un tallo afectado se suele ver en el tejido vascular un exudado mucoso, constituido por una gran cantidad de bacterias (Cambra y Palacio-Bielsa, 2005).



**Figura 3.** Marchitez bacteriana de la papa (*Ralstonia solanacearum*). Plantas en campo mostrando síntomas de la enfermedad (Tomado del enlace 5).

Sin embargo, puede suceder que no se manifiesten ni la decoloración, ni la clorosis o necrosis del follaje. Los síntomas subterráneos más conspicuos se encuentran en los tubérculos. Los ojos del tubérculo exudan bacteria y a este exudado se adhiere el suelo. En algunos casos, la zona de los ojos o del estolón se decolora. Cuando se parten los tubérculos, en pocos minutos de los haces vasculares afectados sale un exudado formando "perlas" (Figura 4). Los tubérculos afectados retienen inicialmente su consistencia y adquieren un leve olor característico, luego se van descomponiendo como consecuencia de infecciones secundarias y pueden adquirir mayor coloración, además de pudrición blanda y fétida (French, 1984).



**Figura 4.** Marchitez bacteriana de la papa (*Ralstonia solanacearum*). Decoloración y tejidos necróticos por pudrición secundaria (Tomado del enlace 6).

*Ralstonia solanacearum* es una bacteria gramnegativa, bacilos de 0.5 a 0.7 por 1.5 a 2.5  $\mu\text{m}$ , oxidasa y catalasa positiva, capaz de acumular poli- $\beta$ -hidroxiburato (PHB) y reducir nitratos. Las bacterias de esta especie son incapaces de crecer a 40°C, crecen poco o nada en NaCl 2%. Los cultivos son negativos para la prueba de arginina dehidrolasa, licuefacción de gelatina e hidrólisis de esculina o almidón. Las colonias son no fluorescentes. Al contrario de las especies de *Burkholderia*, a los ácidos grasos celulares de las especies de *Ralstonia* les faltan los lípidos ornitina OL-1 y OL-2, y menos del 1 % del ácido graso total es C19:0 ácido ciclopropanoico (Schaad y col.,

2001), sus características más importantes las resume Chavarro y col. (2004) en la tabla 2.

**Tabla 2.** Características microbiológicas y bioquímicas de *R. solanacearum* (Chavarro y col., 2004).

| <b>Prueba</b>                                  | <b>Reacción</b> |
|--|-----------------|
| <b>Coloración Gram</b>                         | Gramnegativa    |
| <b>Gránulos de Poly-β-hidroxiburato</b>        | +               |
| <b>Prueba de KOH 3%</b>                        | Gramnegativa    |
| <b>Oxidación de Glucosa</b>                    | +               |
| <b>Oxidasa</b>                                 | +               |
| <b>Catalasa</b>                                | +               |
| <b>Tolerancia a soluciones de NaCl al 0.5%</b> | -               |
| <b>Tolerancia a soluciones de NaCl al 2%</b>   | -               |
| <b>Tolerancia a soluciones de NaCl al 4%</b>   | -               |
| <b>Citrato</b>                                 | +               |
| <b>Hidrólisis del Almidón</b>                  | -               |
| <b>Reducción de Nitratos</b>                   | +               |
| <b>Arginina dehidrolasa</b>                    | ±               |

### 3.5.2. *Pseudomonas* sp.

El género *Pseudomonas* fue descrito por Migula (1894) y ha sido utilizado para nombrar un amplio grupo de cepas bacterianas gramnegativas no entéricas, en general aeróbicas, no fermentativas, móviles (por uno o varios flagelos) y el contenido en el ADN de G+C se encuentra en el rango de 58-71%. Las especies pertenecientes a este género son organismos oportunistas conocidos por estar presentes en el suelo y agua, algunos de estos son patógenos nosocomiales aunque también existen especies patógenas de plantas. Una de las principales características que presenta este género es la facilidad para colonizar las raíces de las plantas. Los exudados que las plantas liberan por las raíces son ricos en carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos, los cuales son utilizados por las bacterias como fuente de alimento (Zuno-Floriano y col., 2009; Lloria y col., 2009; Schaad y col., 2001).

Una vez que las bacterias colonizan las raíces, pueden penetrar el tejido vegetal; en algunos casos, debido a la producción de enzimas celulíticas y pectolíticas, mismas que contribuyen a la degradación de las paredes celulares. La penetración también puede realizarse a través de las fisuras que se forman durante la emisión de las raíces secundarias, o a través de las heridas que se producen cuando la raíz se va desarrollando (Lodewyckx y col., 2002; Germaine y col., 2004). De acuerdo con Schaad y col. (2001), algunas *Pseudomonas* fitopatógenas pueden causar una variedad de reacciones en el hospedero como clorosis, decoloración y erupción del tejido, pudrición, necrosis, entre otras; las especies de dicho género asociadas a estas enfermedades en plantas suelen ser los patovares de *Pseudomonas syringae*, *P. marginalis* y *P. viridiflava*.

Las *Pseudomonas* se caracterizan por una gran diversidad metabólica y son capaces de utilizar una amplia gama de fuentes de carbono (véase las diferencias de algunas especies de *Pseudomonas* en la tabla 3). Por consiguiente, son importantes como organismos de bioremediación, donde desempeñan un papel importante en la descomposición, la biodegradación, y los ciclos del carbono y del nitrógeno (Carrasco, 2007).

La taxonomía del género ha sido controversial por años, debido que varias bacterias que inicialmente estaban incluidas en el género de *Pseudomonas* han sido reclasificadas en otros géneros o especies de una clase distinta de Proteobacteria a lo largo de los años, a medida que las técnicas de caracterización y clasificación de microorganismos han mejorado (Peix y col., 2009).

**Tabla 3.** Características bioquímicas y físicas de distintas especies de *Pseudomonas* (Forbes y col., 2009).

| Organismos            | Crecimiento a 42°C | Reducción de Nitrato | Licuefacción de la gelatina | Arginina dehidrolasa | Lisina descarboxilasa |
|-----------------------|--------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------|
| <i>P. aeruginosa</i>  | +                  | +                    | V                           | +                    | +                     |
| <i>P. fluorescens</i> | -                  | -                    | +                           | +                    | +                     |

|                     |   |   |   |   |   |
|---------------------|---|---|---|---|---|
| <i>P. mendocina</i> | + | + | - | + | + |
| <i>P. monteilii</i> | - | - | - | + | + |
| <i>P. putida</i>    | - | - | - | - | + |
| <i>P. stutzeri</i>  | V | + | - | - | - |
| <i>P. veronii</i>   | - | + | V | + | + |

V, resultado variable.

### 3.5.3. *Burkholderia* sp.

El género *Burkholderia* fue creado por Yabuuchi y col. (1992) para adaptar el antiguo grupo ARNr II *Pseudomonas*, excluyendo *Pseudomonas pickettii* y *Pseudomonas solanacearum*, que se transfirieron al género *Ralstonia* (Yabuuchi y col. 1995). Tradicionalmente, las especies de *Burkholderia* se conocen como patógenos de plantas y bacterias del suelo con dos excepciones importantes, *B. mallei* y *B. pseudomallei*, que son patógenos primarios para humanos y animales (Coenye y Vandamme, 2003).

Como se señaló anteriormente, varias especies del género *Burkholderia* pueden inducir enfermedades en las plantas. Por ejemplo, *B. cepacia* puede causar la podredumbre de la cebolla (Burkholder, 1950), pero se conoce que es capaz de infectar otras plantas. Otra especie fitopatógena, *Burkholderia caryophylli*, induce la marchitez bacteriana en varias especies de plantas. *Burkholderia gladioli* induce la pudrición blanda bacteriana en cebollas, el pardeamiento de la cubierta foliar y la pudrición del grano en el arroz, y enfermedades en las hojas y el corno en especies de gladiolo e iris, también puede infectar otras plantas, de la cual el patovar *B. gladioli* pv. *gladioli*, aislado en la rizósfera de papa, está listado como especie cuarentenaria para la exportación e importación de material vegetal hacia Venezuela, lo que sugiere que los patovares de *B. gladioli* tienen diferentes rangos de hospederos. Otras dos especies de *Burkholderia* fitopatógenas conocidas son *Burkholderia glumae* y *Burkholderia androponis*. *Burkholderia glumae* produce pudrición de plántulas y síntomas de marchitez en tomate, ajonjolí (*Sesamum indicum* L.), perilla (*Perilla frutescens*), berenjena y ají

picante, así como en otras 20 especies de plantas (Compant y col., 2008; Fonseca, 2014).

Según Schaad y col. (2001), los síntomas de enfermedades en plantas producidos por *Burkholderia* incluyen pudrición, marchitamiento, y necrosis severa dependiendo de la planta hospedera. Muchas especies pueden encontrarse asociadas con pudriciones de plantas. Son bacilos de 0.5 a 1 por 1.5 a 4  $\mu\text{m}$ , gramnegativos, catalasa positivos y capaces de acumular poli- $\beta$ -hidroxiburato (PHB). La mayoría son aerobios estrictos y no producen pigmentos fluorescentes. Los miembros de este grupo muestran un alto grado de diversidad de actividades catabólicas y propiedades biológicas.

#### **3.5.4. *Acidovorax* sp.**

Bacterias gramnegativas de forma bacilo 0.2–1.2  $\times$  0.8–5.0  $\mu\text{m}$ , se encuentran individuales, en parejas o cadenas cortas. Motiles por uno o raramente dos o tres flagelos. Aeróbicas, la mayoría de las cepas no produce pigmentos en agar nutritivo, pero algunas fitopatógenas pueden producir un pigmento difusible de amarillo a marrón claro. Oxidasa positivas, quimioorganotróficas, aunque cepas de dos especies (*A. facilis* y *A. delafieldii*) pueden crecer usando la oxidación de  $\text{H}_2$  como fuente de energía. Las bacterias de este género presentan un buen crecimiento en ácidos orgánicos, aminoácidos y peptona, pero los organismos muestran un crecimiento menos versátil en los carbohidratos.

En particular, las colonias de *Acidovorax facilis* presenta morfología redonda con márgenes lisos o ligeramente ondulados en agar nutritivo, pudiendo estar presente una zona marginal translúcida. Las colonias son convexas, lisas a ligeramente granulares y beige a ligeramente amarillas. A 30°C, las colonias pueden alcanzar diámetros de 0.5-3 mm en 3 días y 4 mm en 7 días. La mayoría de las especies no producen pigmentos en

agar nutritivo, pero algunas cepas fitopatógenas pueden producir un pigmento difusible con coloración de amarillo a marrón (Willems y col., 1992; Gardan y col., 2000).

*A. delafieldii* y *A. facilis* constituyen los microorganismos dominantes en suelos, compost viejo y fuentes de agua dulce que pueden degradar poli-3-hidroxi-butirato (PHB) y poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato (PHBV). Tres especies de *Acidovorax* son los agentes causales de enfermedades en varias plantas. *A. avenae* subsp. *avenae* causa síntomas de tizón foliar en muchos miembros de la familia Poaceae, incluidos el maíz (*Zea mays*), la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y el arroz (*Oryza sativa*) (Clafin y col., 1989).

Se observan pequeñas manchas blancas grisáceas, redondas u ovaladas, con un margen rojo, que pueden fusionarse para formar franjas longitudinales rojas. A veces, se producen lesiones empapadas de agua, que pueden convertirse en grandes zonas necróticas. La pudrición del tallo y la pudrición del cogollo también se han reportado.

Sin embargo, las pruebas de patogenicidad con *A. avenae* subsp. *avenae* en sandía, melón, calabaza, pepino, tomate y caupí son negativas. Las pruebas similares con *A. avenae* subsp. *citrulli* en tomate, caupí, maíz y Konjac también son negativas. Las pruebas con *A. konjaci* en melón, calabaza y pepino son negativas y en sandía resulta en una reacción de hipersensibilidad. La fitopatogenicidad de las otras especies de *Acidovorax* no ha sido reportada (Schaad y col., 1978; Goto, 1983).

**Tabla 4.** Características que diferencian a las especies del género *Acidovorax* (Willems y col., 1992).

| Características           | <i>A. facilis</i> | <i>A. avenae</i> subsp. <i>avenae</i> | <i>A. delafieldii</i> |
|---------------------------|-------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| Hidrólisis de la gelatina | +                 | -                                     | -                     |
| Reducción de nitratos     | -                 | d                                     | d                     |
| Citrato                   | -                 | d                                     | d                     |
| Catalasa                  | +                 |                                       | d                     |

|   |   |   |   |
|---|---|---|---|
| <b>Arginina dehidrolasa</b>                 | - | - | - |
| <b>Fluorescencia</b>                        | - |   | - |
| <b>Crecimiento en cetrimida</b>             | - |   | - |
| <b>Indol</b>                                | - |   | - |
| <b>Lisina y ornitina<br/>descarboxilasa</b> | - |   | - |
| <b>Acidez por D-Glucosa</b>                 | - | + | - |

d, resultado ambiguo.

### 3.5.5. Erwinias

Los síntomas de pierna negra y podredumbre blanda, pueden ser causados por las bacterias *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (Sinónimo: *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Sinónimo: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) y *Dickeya chrysanthemi* (Sinónimo: *Erwinia carotovora* subsp. *chrysanthemi*). Mientras que *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* es un patógeno exclusivo de papa, los dos restantes pueden afectar a un amplio rango de plantas huéspedes (Cambra y Palacio-Bielsa, 2005). Las bacterias pertenecientes al género *Dickeya* y *Pectobacterium* son patógenas de cultivos muy importantes. Estas especies han sido incluidas entre las 10 bacterias patógenas de plantas más importantes, basándose en su impacto económico y científico. Actualmente el género *Dickeya* está conformado por siete especies genómicas, incluyendo *Dickeya chrysanthemi* y *D. solani*; esta última también patógena de papa (Potrykus y col., 2016). *Dickeya* spp. se reportó por primera vez en plantas de papa en los Países Bajos en la década de 1970 y desde entonces se ha detectado en muchos otros países europeos. Sin embargo, desde 2004-2005 un nuevo patógeno, con el nombre propuesto *D. solani*, se ha extendido por toda Europa a través del comercio de tubérculos-semillas y está causando pérdidas económicas cada vez mayores. Aunque los síntomas de la enfermedad a menudo son indistinguibles de los que produce *Pectobacterium* spp. (Figura 5); *Dickeya* spp. Puede iniciar la enfermedad a partir de niveles de inoculación más bajos, pues tienen una mayor capacidad de diseminación a través del tejido vascular

de la planta, son considerablemente más agresivas y tienen temperaturas óptimas más altas para el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, también parecen ser menos resistentes que *Pectobacterium* spp. en el suelo y otros ambientes fuera de la planta (Toth y col., 2011).

### **Patogénesis de la pudrición blanda del tubérculo causada por Erwinias.**

Las bacterias se localizan intercelularmente, en lenticelas y en heridas, usualmente más allá de la capa de felodermis, y posiblemente, en menor medida, en el sistema vascular (xilema). Para la multiplicación de las Erwinias en el tejido del tubérculo, el principal factor ambiental que determina la descomposición es la presencia de agua en los tubérculos, lo que desencadena una cascada de eventos. Una película de agua sobre los tubérculos conduce rápidamente, según la temperatura, a la anaerobiosis dentro de los tubérculos. El oxígeno dentro de los tubérculos, una vez agotado por la respiración del tejido, 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, fenólicos, radicales libres, entre otros). También inhibe la lignificación y suberización de la pared celular, que ofrecen protección contra la degradación por enzimas pectolíticas (Pérombelon, 2002).



**Figura 5.** *Pectobacterium* spp. provoca una pudrición blanda en los tubérculos de papa (Tomada del enlace 1).

### **Patogénesis de la pierna negra**

A diferencia de la pudrición blanda de los tubérculos, las enfermedades del tallo generalmente se desarrollan bajo condiciones aeróbicas. La pierna negra se desarrolla

cuando un gran número de bacterias invade los tallos después de la multiplicación en los tubérculos madre podridos. La enfermedad no se desarrolla en plantas cultivadas sin tubérculos o en plantas cultivadas a partir de semillas libres del patógeno *Erwinia*, aunque el suelo se encuentre muy contaminado. El factor más importante para el desarrollo de la pierna negra es el nivel de agua del suelo (lluvia / riego), pues si se prolonga, induce el desarrollo de las condiciones anaeróbicas en los tubérculos de la madre, favoreciendo la multiplicación bacteriana y el inicio de la descomposición.

Los primeros estudios histopatológicos de pierna negra realizados por Artschwager (1920), muestran una lignificación extensa de los tejidos vasculares y el desarrollo de esclerótidos en la corteza del tallo y la médula y la formación de cristales proteicos en las células foliares como resultado de la infección. Sin embargo, estos cambios tienden a aumentar la resistencia de las plantas a la infección, ya que la lignificación es un mecanismo de resistencia efectivo al restringir la degradación de la pared celular por las enzimas pectolíticas. Además, se desarrolla más rápido y más extensamente en cultivares resistentes que en cultivares susceptibles. Los síntomas de pierna negra generalmente se desarrollan en brotes jóvenes antes de la lignificación o más arriba en tallos más viejos por encima de la base de madera (Figura 6), (Pérombelon, 2002).



**Figura 6.** Tallo de planta de papa infectado por *Pectobacterium* spp. (pierna negra), (Tomada del enlace 1).

Las bacterias de los géneros *Pectobacterium* y *Dickeya* corresponden a bacilos gramnegativos flagelados, 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. Los miembros del género *Dickeya* son positivos a la producción de indol, fosfatasa y sensibles a eritromicina y trehalosa negativas, a diferencia de *Pectobacterium* como indica la tabla 5; siendo estas pruebas importantes para la diferenciación de estos dos géneros (Czajkowski y col., 2015; Dado o lu y Kotan, 2017).

**Tabla 5.** Características fisiológicas y bioquímicas usadas para discriminar las Enterobacteriaceae más comunes de pudrición blanda (Pérombelon y van der Wolf, 2002; Baghaee-Ravari y col., 2011).

| Prueba                                      | Pba | Pcc | Pwa | Pcb | <i>Dickeya</i> spp. |
|---|-----|-----|-----|-----|---------------------|
| <b>Crecimiento en agar nutritivo a 37°C</b> | -   | +   | ±   | +   | +                   |
| <b>Sensibilidad a eritromicina</b>          | -   | -   | -   | -   | +                   |
| <b>Indol</b>                                | -   | -   | -   | -   | +                   |
| <b>Fosfatasa</b>                            | -   | -   | -   | -   | +                   |
| <b>Producción de ácido por lactosa</b>      | +   | +   | -   | +   | +                   |
| <b>Producción de ácido por trehalosa</b>    | +   | +   | +   | +   | -                   |

Pba: *Pectobacterium atrosepticum*, Pcc: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, Pwa: *Pectobacterium wasabiae* , Pcb: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*.

### 3.6. Identificación de Bacterias Patógenas

Dentro de los distintos tipos bacterianos existen particularidades que dan lugar a respuestas diferentes en los patrones de comportamiento metabólico, fisiológico y morfológico de los miembros de cada grupo. Tales diferencias nos permiten agrupar a los microorganismos en familias, géneros y especies.

La tinción Gram es uno de los procedimientos más útiles en los laboratorios de bacteriología. Para iniciar la identificación de una bacteria, se determina si es grampositiva o gramnegativa. Las grampositivas aparecen de color morado y las gramnegativas de color rosa. Esta diferencia en la respuesta a la tinción Gram se debe a

diferencias en la estructura de la pared celular de las células grampositivas y gramnegativas (Madigan y col., 2009).

Las grampositivas presentan una gruesa capa de peptidoglicano que las hace resistentes a la acción de solventes orgánicos, cerrándose los poros de la pared celular e impidiendo que se escape el complejo cristal violeta/yodo por lo cual se mantiene la coloración azul-violeta; las gramnegativas en cambio presentan una fina capa de peptidoglicano, siendo demasiado delgada como para contener el complejo cristal violeta/yodo, el cual se escapa y pierde la coloración, permitiendo que entre la safranina y se colorean las células de rojo.

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias. Algunas de estas pruebas evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre segundos y pocas horas. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48 horas; este tipo de pruebas detectan componentes metabólicos o determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras su cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar. Los productos terminales de la acción enzimática son detectados a través de indicadores de pH o por la aparición de pigmentos que hacen virar el color del medio.

Hay distintos tipos de medios de cultivo y en cada uno de estos una serie de componentes básicos como sustrato, indicadores de pH, nutrientes e inhibidores.

### **3.6.1. Principales pruebas bioquímicas para la identificación bacteriana**

Las principales pruebas bioquímicas que se emplean para la identificación de bacterias, se resumen en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias (MacFaddin, 2003).

| <b>Prueba</b>                      | <b>Fundamento</b>  |
|------------------------------------|--|
| <b>KOH</b>                         | Identificación de bacterias gramnegativas.   |
| <b>Catalasa</b>                    | Comprobar la presencia de la enzima catalasa.  |
| <b>Crecimiento a 41°C</b>          | Crecimiento en placas con agar nutritivo a 41°C. El agar nutritivo es un medio rico que contiene todos los requerimientos nutricionales para el crecimiento de cualquier bacteria.   |
| <b>Citrato</b>                     | Determinar si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo, provocando alcalinidad.  |
| <b>Agar hierro de Kliger</b>       | Determinar la capacidad de un organismo de usar 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.                             |
| <b>Motilidad</b>                   | Determinar si un organismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen motilidad por medio de sus flagelos, que se encuentran principalmente entre los bacilos; sin embargo, algunas formas de cocos son móviles.   |
| <b>Oxidasa</b>                     | Determinar la presencia de las enzimas oxidasa.  |
| <b>Oxidación-Fermentación</b>      | Determinar el metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono.   |
| <b>MacConkey</b>                   | Fermentación de la lactosa.  |
| <b>Licuefacción de la gelatina</b> | Determinar la capacidad de un organismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) que licuan la gelatina.   |
| <b>Indol</b>                       | Determinar la capacidad de un microorganismo para separar indol a partir de triptófano.  |
| <b>Reducción de nitratos</b>       | Determinar la capacidad de un microorganismo de reducir los nitratos a nitritos o gas nitrógeno libre, lo cual se produce en condiciones de anaerobiosis.  |
| <b>Arginina dehidrolasa</b>        | Eliminación hidrolítica del NH <sub>2</sub> de la arginina por acción de una arginina dehidrolasa o arginina desiminasa, donde la degradación de la L-arginina a L-citrulina es una reacción productora de energía que proporciona una fuente importante de ATP. |
| <b>Agar TZC</b>                    | Medio de cultivo específico para identificar la virulencia o avirulencia de cepas de <i>Ralstonia solanacearum</i> .   |
| <b>Agar Pseudomonas</b>            | Aislamiento y detección de <i>Pseudomonas</i> por la producción de piocianina, debido a la presencia de glicerina.   |
| <b>Agar Cetrimida</b>              | Permite el crecimiento selectivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y de otras especies del género. La cetrimida es el agente selectivo y la glicerina estimula la formación del pigmento.   |
| <b>Agar King B</b>                 | Permite la producción de fluoresceína (o pioverdina), un   |

|  |  |
|--|--|
|  | pigmento amarillo-verdoso que es fluorescente bajo luz ultravioleta en algunas cepas de <i>Pseudomonas</i> . |
|--|--|

### **3.7. Métodos moleculares de identificación**

Las técnicas de identificación molecular en bacterias se basan en la amplificación genómica y en la secuenciación de unos genes (empleados como genes diana) o sus fragmentos. El medio de cultivo o las condiciones de incubación no serán factores determinantes, pero si serán factores críticos la técnica de extracción del ADN cromosómico y su amplificación. El ADN genómico se extrae a partir de las células totales mediante diferentes métodos estándar o sistemas comerciales con versatilidad sobre el tipo de muestra clínica o de matrices, en el caso de tratarse de una muestra alimentaria o ambiental. Dependiendo del tipo de bacteria se pueden aplicar modificaciones que simplifiquen u optimicen la extracción de ADN cromosómico

#### **3.7.1. Análisis del ARNr 16S**

En la taxonomía bacteriana, el análisis de la secuencia génica del ARNr 16S es la herramienta más ampliamente utilizada. El análisis de los ARNr 16S se ha utilizado para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota, causando un profundo impacto en la clasificación e identificación bacteriana. El ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 nucleótidos, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica.

Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el ARNr 16S se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla. Se encuentran altamente conservados, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contienen además variaciones que se concentran en zonas específicas. El análisis de la secuencia de los

ARNr 16S de distintos grupos filogenéticos reveló un hecho adicional de gran importancia práctica: la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma. Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos (o en la mayor parte) de los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca (o raramente) están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, los oligonucleótidos firma pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo. De distribución universal y componente crítico en la función celular, el ARNr 16S actúa como un cronómetro molecular al presentar un alto grado de conservación:

1. Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para su identificación.
2. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
3. El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S (1.500 nt) minimiza las fluctuaciones estadísticas.
4. La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
5. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ARNr 16S existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento (Rodicio y Mendoza, 2004).

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

En el caso del ARN 16S, se extrae el ADN de la bacteria y se utiliza como molde para la amplificación por PCR de un fragmento de su secuencia, con un rango de tamaño entre 500-1.500 pb (o de otro tamaño si se analizan otros genes). Con iniciadores universales o de amplio espectro complementarios a las regiones conservadas, se

amplificaría teóricamente un fragmento del gen del ARNr 16S en todas las bacterias. Ninguno de los iniciadores utilizados en la actualidad se considera totalmente universal, por lo que no se puede realizar una recomendación específica de iniciadores que garantice la amplificación de todos los procariotas.

En estudios taxonómicos de determinados géneros o especies, con frecuencia se prefiere realizar un diseño de iniciadores para los diferentes genes diana que presentan una mayor especificidad en el género o especie en cuestión. El diseño de nuevos iniciadores se realiza en regiones conservadas para un género o una especie determinado. Para confirmar una amplificación óptima, es imprescindible la electroforesis del producto de PCR en un gel de agarosa. Debe observarse una sola banda (perteneciente a un único amplicón) con el tamaño adecuado. En el caso de amplificarse un amplicón con el tamaño deseado y otro con diferente tamaño, pueden utilizarse diferentes opciones: extracción del amplicón deseado del gel de agarosa, modificación de las condiciones de PCR o utilización de nuevos iniciadores. Los amplicones suelen purificarse con sistemas comerciales, ya sea el producto de PCR o la banda de electroforesis incluida en el gel. Aunque estos sistemas eliminan el exceso de iniciadores y nucleótidos, debe someterse a una nueva electroforesis de confirmación.

### **3.7.3. Genotipificación**

La introducción de técnicas como la genotipificación a través de las secuencias repetidas, basadas en la amplificación por PCR, ha facilitado la identificación de diversos microorganismos, ya que reducen los costos y el tiempo de análisis. La familia de las secuencias cortas repetidas intergénicas se ha encontrado en bacterias entéricas como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Estas secuencias se encuentran dispersas en todo el genoma, y hoy en día se sabe que están en diversas especies bacterianas (Rincones, 2009).

Se han estudiado tres familias no relacionadas a nivel de secuencia de ADN con más detalle, la primera, llamada secuencia palindrómica extragénica repetitiva de 35 a 40 pb (REP), la secuencia de 124 a 127 pb, llamada consenso repetitivo intergénico enterobacterial (ERIC) y la última, de 154 pb llamada elemento BOX.

Mediante el uso de iniciadores oligonucleotídicos complementarios, se amplifican segmentos de ADN que se encuentran entre elementos repetitivos. Los productos amplificados varían en tamaño, dependiendo del espaciado de la secuencia rep, y dan como resultado patrones de bandas únicos después de la electroforesis en gel de agarosa (Lopes y col., 2001).

### **3.8. Postulados de Koch**

Uno de los grandes aportes científicos de Heinrich Hermann Robert Koch (1843-1910) fue la elaboración de la metodología usada para determinar al agente causal de una enfermedad. Esta metodología es conocida como los Postulados de Koch. Estos fueron establecidos como sigue:

1. El organismo sospechoso de causar la enfermedad debe encontrarse asociado de forma consistente, a especímenes con la sintomatología de la posible enfermedad.
2. El organismo debe aislarse en un medio de cultivo nutritivo y obtenerse como cultivo puro, para registrar sus características morfológicas, bioquímicas o moleculares.
3. El organismo debe inocularse en plantas sanas de la misma especie o variedad donde se observó originalmente el problema y deben producirse los mismos síntomas observados al iniciar el proceso.

4. El organismo debe ser re-aislado a partir de la planta inoculada en cultivo puro y sus características deben corresponder a las observadas en el segundo postulado.

Este procedimiento tiene cuatro pasos bien definidos que llevan a la comprobación de la capacidad patogénica en la mayoría de los microorganismos. Los síntomas observados en el postulado 1 deben corresponder al postulado 3, y las características observadas en el cultivo puro del organismo (postulado 2), deben corresponder a las del 4. En el proceso de diagnóstico, los postulados de Koch son de gran utilidad cuando se investiga una enfermedad desconocida (Rivera, 2007).

### **3.8.1. Importancia del cultivo *in vitro* para la demostración de los postulados de Koch**

En la identificación de bacterias fitopatógenas, es necesario demostrar estos postulados para corroborar que el organismo causante de la enfermedad es efectivamente el que se aisló e identificó inicialmente. Para esto, se recomienda el uso de material vegetal cultivado *in vitro*, garantizando así que el material utilizado se encuentre inicialmente libre de patógenos, siendo entonces el organismo inoculado el único posible agente causante de la enfermedad. En el caso de las plantas de papas, se pueden utilizar hojas de vitroplantas y rodajas de microtubérculos para la observación de la sintomatología y la interacción planta-patógeno.

Barrios en el año 2015, determinó que el uso del cultivo *in vitro* es apropiado para el cumplimiento de los postulados de Koch, inoculando el aislado identificado como *Pectobacterium* sp. en rodajas de microtubérculos. Posteriormente, Fernandes (2016) revalida estos sistemas para el estudio de la patogenicidad de una bacteria sobre órganos vegetales (hojas y microtubérculos), estudiando, la resistencia y susceptibilidad de especies vegetales a fitopatógenos como *Dickeya chrysanthemi*.

### **3.9. Micropropagación**

La micropropagación es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, ya que a través de esta, un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones, y la propagación de las plantas se da en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado. El cultivo *in vitro* es una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales; esto es, la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados (Castillo, 2004; Levitus y col., 2010).

#### **3.9.1. Etapas de la micropropagación**

La micropropagación presenta cuatro etapas principales: 1) establecimiento del cultivo, 2) desarrollo y multiplicación de vástagos o embriones, 3) enraizamiento y 4) aclimatación de las plántulas. Incluye además una etapa 0, de preparación del material vegetal, donde la elección y preparación del explante inciden directamente en su respuesta. Generalmente, las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden combinarse en condiciones *ex vitro* (Levitus y col., 2010).

#### **3.9.2. Cultivo *in vitro* de la papa**

La papa se propaga de manera convencional mediante la siembra de los tubérculos; sin embargo, este tipo de propagación perpetúa la presencia de patógenos causantes de enfermedades que reducen la productividad de los cultivos. Por ello, la producción sostenible de papa depende de la renovación constante del material de siembra libre de enfermedades. Para lograr esto, desde hace algunas décadas se han implementado técnicas de cultivo *in vitro*, entre ellas la micropropagación, como una alternativa que

permite la producción masiva de plantas libres de enfermedades, en poco tiempo, en espacios reducidos, y que puedan ser usadas por los agricultores para producir tubérculos semilla (Moreno y Oropeza, 2017).

Gallardo y col. (1997) utilizaron la micropropagación de papa para la multiplicación rápida de clones libres de enfermedades y la obtención de microtubérculos sanos para ser usados como semillas. La propagación *in vitro* de papa es mediante el subcultivo de yemas axilares. Se pueden obtener tanto plantas *in vitro* como microtubérculos (Igarza Castro y col. 2012).

Aragón y col. en el año 2010 estudiaron distintas concentraciones de sacarosa, intensidad de luz y niveles de dióxido de carbono en vitroplantas de papa, obteniendo que la concentración óptima de sacarosa es 30g/L y que una baja intensidad de luz y un alto nivel de dióxido de carbono, mejoraron la formación de hojas y raíces, reduciendo la respiración en el cultivo *in vitro*.

Alva y Oropeza (2013) evaluaron el efecto de la consistencia del medio de cultivo y del nitrato de plata en la micropropagación de dos cultivares de papa, Arbolona Negra y Granola, recomendando el uso microesquejes en medio semisólido MS (1962) suplementado con AgNO<sub>3</sub>.

### **3.9.3. Microtuberización de la papa**

Las técnicas de cultivo *in vitro* también permiten inducir la formación de microtubérculos, en un proceso conocido como microtuberización. Estos órganos pueden ser utilizados como semillas certificadas y constituyen una fuente de almacenamiento e intercambio seguro de germoplasma. La micropropagación y la microtuberización proporcionan un modelo experimental uniforme y conveniente para el mejoramiento del cultivo de la papa (Moreno y Oropeza, 2017). Las plantas de papa propagadas *in vitro* pueden producir microtubérculos cuando se colocan en condiciones

adecuadas (Wang y Hu, 1982). Estos generalmente se originan en estructuras aéreas de la planta aunque algunos pueden formarse en el medio de cultivo (Hussey y Stacey, 1984).

Sin embargo, el éxito de la micropropagación y la microtuberización depende de factores tales como: la temperatura, la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de sacarosa, el balance hormonal y el fotoperiodo (Moreno y Oropeza, 2017).

El primer informe sobre tuberización *in vitro* fue publicado por Barker (1953), quien utilizó brotes etiolados para inducir tuberización en un medio de cultivo con 8.0 g/L de sacarosa. A partir de ahí comenzó la utilización de reguladores del crecimiento a favor de la tuberización, lo que ha sido objeto de intensas investigaciones.

Hussey y Stacey en el año 1984 obtuvieron microtubérculos de papa después de 4 o 5 meses en medios sin hormonas, en fotoperiodo de días cortos y bajas temperaturas. Gopal y col. en 1998 indujeron la microtuberización de 22 genotipos de papa bajo seis condiciones distintas *in vitro*, obteniendo una buena producción de microtubérculos bajo fotoperiodo de días cortos y bajas temperaturas, pero mejorando estos números añadiendo benciladenina al medio y concluyendo que la interacción entre el genotipo y las condiciones de crecimiento eran significativas, indicando la importancia de desarrollar protocolos específicos para los genotipos con el fin de maximizar el proceso de microtuberización.

Moreno y Oropeza (2017) trabajaron con las variedades de papa Arbolona negra y Granola, obteniendo que las condiciones más favorables para la producción de microtubérculos es la incubación de las vitroplantas en medio líquido con 50g/L de sacarosa y bajo condiciones de fotoperiodo de días cortos.

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1. Obtención y mantenimiento de aislados bacterianos

Se obtuvieron 4 tubérculos con síntomas de enfermedad; dos tubérculos denominados 2.7 y dos tubérculos denominados 2.8 como se muestra en la figura 7, procedentes de la localidad de Chirgua. Monasterio Santa María Reina de los Angeles, Municipio Bejuma, Sector Cariatrima, Edo. Carabobo.

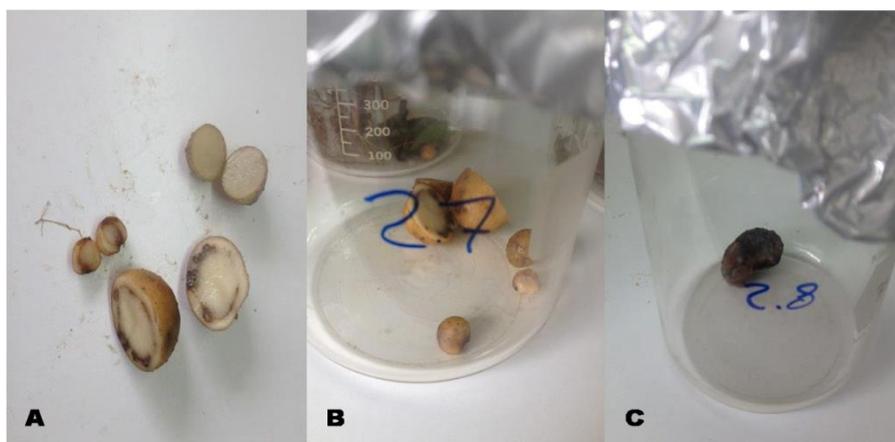
Coordenadas UTM: 1134291

N: 0587225

E: 1133049

N: 0588363

E: 1134228



**Figura 7.** Tubérculos con síntomas de enfermedad procedentes de la localidad de Chirgua, Edo. Carabobo, Venezuela. **A y B.** Tubérculos 2.7 **C.** Tubérculos 2.8.

Estos tubérculos se lavaron con agua y jabón. Posteriormente se esterilizaron mediante un lavado con hipoclorito de sodio por 15 min, agua destilada estéril por 10 min, alcohol 70% por 15 min y nuevamente agua destilada estéril por 10 min.

Las muestras de papas esterilizadas se maceraron con 5 ml de caldo LB (Anexo 1), un medio rico con las condiciones nutricionales necesarias para el crecimiento de cualquier microorganismo presente en el material vegetal macerado. Se diluyó un poco del

macerado en otros 5 ml de caldo LB. Para permitir el crecimiento bacteriano se mantuvo el tubo con el diluido del macerado en una cámara de agitación a 27°C por 24 h.

Luego de las 24 h de incubación de los macerados diluidos, se sembró por agotamiento en una placa con agar LB (Anexo 2). Las placas se incubaron por 24 h en una cámara de agitación a 27°C.

Las colonias morfológicamente distintas a simple vista que crecieron en las placas luego de las 24 h de haber sido sembradas, fueron separadas sembrando por agotamiento una colonia de cada morfología en distintas placas con medio de cultivo agar LB, hasta lograr la pureza de las colonias morfológicamente distintas. Una vez logrado esto, se inocularon en tubos pequeños de punciones (Anexo 3) debidamente identificadas.

#### **4.2. Caracterización morfológica**

Para caracterizar morfológicamente los aislados se observó la forma y color de las colonias en placas de agar LB. Además, se desarrolló la prueba de Tinción Gram a cada uno para identificar la forma de cada aislado bacteriano a nivel celular y también para determinar si son grampositivas o gramnegativas.

Para la Tinción Gram se aplicó la siguiente metodología:

- Se tomó una muestra del aislado con un palillo a partir de una placa con agar LB.
- Se realizó el extendido con un palillo de madera en un portaobjetos con una gota de agua destilada.
- Se fijó la muestra utilizando un mechero.
- Se agregó Cristal violeta y se esperó 1 min.
- Se enjuago con abundante agua destilada.
- Se agregó lugol y se esperó 1 min.

- Se enjuago con abundante agua destilada.
- Se enjuago con una solución de alcohol/acetona 70:30.
- Se enjuago con abundante agua destilada.
- Se agregó Safranina y se esperó 1 min.
- Se enjuagó con abundante agua destilada y se dejó secar el portaobjetos sobreponiendo un toallín sobre este último.

Finalmente se observó al microscopio óptico NIKON LABOPHOT-2 con el objetivo 100x, colocando aceite de inmersión sobre el sitio donde se depositó la muestra de cada aislado.

#### **4.3. Ensayo de patogenicidad en tubérculos comerciales**

Se realizó una prueba de patogenicidad inicial utilizando rodajas de papas obtenidas de tubérculos comerciales, con la finalidad de seleccionar las cepas bacterianas con capacidad de provocar síntomas de enfermedad. Para ello se llevó a cabo lo siguiente:

Se seleccionaron tubérculos sanos, los cuales fueron lavados con agua corriente y jabón, luego fueron pelados y lavados con agua destilada. Se desinfectaron por 15 min en agua destilada estéril, 10 min en hipoclorito de sodio 0,5 %, 15 min en agua destilada estéril y luego se colocaron en un plato de aluminio previamente rociado con alcohol al 70 % y se flameó, se cortaron las rodajas de aproximadamente 5 mm de grosor, las cuales se dejaron en una solución de ácido ascórbico estéril 0,05 % por 1 min para evitar posible oxidación del tejido durante los días del ensayo. Se colocaron 3 rodajas por cámara húmeda (Golkhandan y col., 2013). Para preparar las cámaras húmedas se emplearon placas de Petri con 3 círculos de papel absorbente, 1 rejilla de plástico y 10 ml de agua destilada estéril. Cabe destacar que se prepararon 2 cámaras húmedas por cepa y por control. En el centro de la rodaja del tubérculo se realizó una incisión circular con un

saca-bocados con la finalidad de conocer el sitio de inoculación de la cepa bacteriana y permitir su mayor penetración (Golkhandan y col; 2013).

Simultáneamente se prepararon suspensiones celulares tomando una colonia de 24 h de crecimiento bacteriano en agar nutritivo LB y se inoculó en 2+ ml de caldo nutritivo LB; se procedió a incubarlos por 24 h a temperatura ambiente con agitación continua. Para la inoculación de las rodajas, se tomaron con pipetas estériles 0,20 ml de cada una de las suspensiones bacterianas de 24 h de crecimiento en caldo nutritivo LB y se colocaron sobre la incisión realizada con el saca bocado en el centro de la rodaja. Así mismo, se inocularon rodajas de papa con caldo nutritivo estéril sin crecimiento bacteriano como control negativo y cepas bacterianas conocidas e identificadas previamente causantes de pudriciones en papa como control positivo, tales como *Ralstonia solanacearum* donada por el Laboratorio de Bacteriología Vegetal del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), *Pectobacterium carotovorum* (LMV 29 y LMV 31) identificadas por Coppola (2015) y *Dickeya chrysanthemi* identificada por Fernandes (2016).

Todas las rodajas inoculadas se incubaron en cámaras húmedas durante una semana a temperatura ambiente. Se evaluaron y se realizó un registro fotográfico de la sintomatología durante todo el ensayo.

#### **4.4. Caracterización bioquímica**

Para la identificación bioquímica se realizaron las siguientes pruebas:

Catalasa: Se colocó una gota de agua oxigenada en un portaobjetos estéril y se tomó con un palillo de madera una colonia, disolviéndola en el agua oxigenada, observando la aparición de burbujas, en caso de ser positiva la prueba.

Oxidasa: Sobre un papel de filtro, se colocaron dos gotas de solución acuosa del reactivo Kovacs, y se froto una colonia sobre éste, esperando unos 10 a 15 segundos para observar el viraje de color, tomando nota si la reacción es rápida o lenta.

Citrato: Se sembró la bacteria en medio Simons Citrato (Anexo 7) en taco y bisel con un asa recta, y se observó el viraje de color.

Agar hierro de Kliger: Los aislados se inocularon en medio Kliger (Anexo 8) observándose viraje de color y/o producción de gas y SH<sub>2</sub> a las 24 y 48h. El uso de un carbohidrato se observa como acidez en el medio, coloreándose el medio de amarillo.

Oxidación-Fermentación (Anexo 9): Se sembró cada bacteria en dos tubos distintos, uno en condiciones de aerobiosis (sin parafina) y uno en anaerobiosis (con parafina). Si ambos tubos se encontraron acidificados luego de 24-48 h, la bacteria posee un metabolismo fermentativo para el carbohidrato utilizado; si solo el tubo aeróbico esta acidificado, la bacteria solo oxida el carbohidrato utilizado.

Crecimiento y fermentación de lactosa en agar MacConkey: Se sembró el aislado en placas con agar MacConkey (Anexo 10), incubando por 48h a 30°C. Si el crecimiento es positivo, son bacterias gramnegativas baciliformes y si hay un cambio de color a rojo neutro alrededor de las colonias de las bacterias, entonces hay una disminución del pH siendo positiva la utilización de lactosa.

Licuefacción de la gelatina: Los aislados se inocularon en tubos con medio de gelatina (Anexo 11) y se incubaron entre 24h y 14 días, observando el medio licuado en caso de ser positivo o el medio solido si es negativo.

Motilidad: Se sembró una colonia de cada aislado por punción en un tubo con medio de motilidad (Anexo 12), en línea recta y se observó a las 24 y 48 h si el microorganismo es móvil o inmóvil, pues migran desde la línea de siembra y difunden en el medio.

Indol: Se tomó una colonia y se inoculó en un caldo rico en triptofano (Anexo 13) y se incubó por 24 h. La producción de indol se reveló mediante el uso del reactivo de Kovacs, donde un resultado positivo se observa con la formación de color rojo fucsia en la interfase del reactivo y el caldo.

Caldo de reducción de nitratos: Se tomó una colonia y se inoculó en un caldo de nitratos (Anexo 14); se incubó por 24-48 h. La reducción de nitratos a nitritos se evidenció con la utilización de los compuestos  $\alpha$ -naftol al 0,5% y ácido sulfanílico al 0,8%.

Arginina dehidrolasa: Los aislados se inocularon por punción en un medio que contenía el aminoácido (Anexo 15), y luego se colocó una capa de parafina estéril sobre este, creando condiciones de anaerobiosis, se incubó de 24 h a 4 días. Se puede observar si la arginina fue desiminada mediante la alcalinización del medio.

Estas pruebas se realizaron según los protocolos sugeridos por Schaad y col. (2001) para la identificación de bacterias patógenas de plantas (Anexo 20).

Otras pruebas realizadas:

Agar Korman's TZC: El aislado se inoculó por agotamiento en el medio específico TZC, para determinar si la cepa es o no virulenta (Anexo 16). Debido a la interacción con un polisacárido extracelular se diferencian las colonias de *R. solanacearum* entre cepas virulentas (colonias blancas al centro rojas, presencia de estrías color rojo) y no virulentas o silvestres (colonias completamente rojas); (Xu y col., 2009). Una vez realizada la siembra las placas se incubaron a 30°C, observando el crecimiento y cambio de color de las colonias durante 24, 48 y 72 h.

Agar Pseudomonas (Anexo 17): Los aislados se sembraron por agotamiento, y se incubaron las placas a 30°C por 24-48 h, observando sí había formación de pigmentos, y exponiendo la placa a luz UV.

Agar Cetrimida (Anexo 18): Los aislados se sembraron por agotamiento, y se incubaron las placas a 37°C por 24-48 h, observando si había crecimiento, formación de pigmentos y exponiendo la placa a luz UV.

Agar King B (Anexo 19): Los aislados se sembraron por agotamiento, y se incubaron las placas a 37°C por 24-48 h, observando si había formación de pigmentos y exponiendo la placa a luz UV, para exponer la fluoresceína.

#### **4.5. Identificación molecular de las bacterias patógenas**

##### **4.5.1. Extracción del ADN bacteriano**

Se desarrolló el método propuesto por Gomes y col. (2000), el cual fue reportado en el estudio de Alvez y col. (2011) como un método eficiente, y en el cual se obtiene un material genético de calidad y con una pureza que permitió llevar a cabo los análisis por PCR. Para esto se procedió con la siguiente metodología:

1. Las bacterias crecieron en 5 ml de caldo nutritivo con 10% de glicerol durante 72 h a 27 °C, para obtener una densidad de células alta.
2. Se centrifugó 1,5ml del cultivo a 13000 rpm por 5 min y se resuspendió el sedimento en 200 µl de solución Tris 0,1mol/L.
3. Se añadió 200µl de solución de lisis (NaOH 0,2N y SDS 1%) y 100µl de Proteinasa K 1mg/ml.
4. Se incubó durante 1 h a 55°C.
5. Se añadió 1000 µl de Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1 v/v), se homogenizó y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min.
6. Se tomó la fase acuosa y se añadió al sobrenadante 700µl de EtOH frío al 100%, se dejó por 20 min a -20°C para que precipitara el ADN y se centrifugó a 13000 rpm por 5 min.

7. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con EtOH 80%, verificando que se despegue el pellet del fondo del tubo. Se centrifugó a 13000 rpm por 5 min.

8. Se descartó nuevamente el sobrenadante y se secó el precipitado de ADN por 30 min.

El mismo, se resuspendió en 50µl de agua destilada estéril.

Luego, el método de Gomes y col., (2000) se repitió con la siguiente modificación, con el fin de mejorar la calidad del ADN extraído, entre los pasos 4 y 5, expresados anteriormente:

a. Se añadió 700µl de CTAB 2X (añadiendo 2 µl de β-Mercaptoetanol)

b. Se incubó a 65°C durante 30 min.

#### **4.5.2. Cuantificación y calificación del ADN extraído**

Para determinar la concentración y pureza del ADN extraído se midió la absorbancia de la muestra diluida 200 veces (2,5µl de ADN en 497,5µl de agua destilada) a 260nm y a 280nm, en un espectrofotómetro Genesys 10 Bio (Sambrook y Russell, 2001) en cubetas de cuarzo. La relación de absorbancia 260nm/280nm permite detectar la contaminación de las muestras de ADN o ARN con proteínas, siendo el valor óptimo de un extracto puro comprendido entre 1.8 y 2.

La cuantificación se basa en que 1 DO (unidad de densidad óptica) a 260nm equivale a 50 µg/ml de ADN doble cadena, 40 µg.ml<sup>-1</sup> de ADN y ARN cadena sencilla, y 33 µg.ml<sup>-1</sup> de oligonucleótidos cadena sencilla. Así, la concentración de ADN extraído se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$[\text{DNA}] (\text{ng}/\mu\text{l}) = \text{Abs} (260 \text{ nm}) \times \text{F.D.} \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

#### **4.5.3. Amplificación con iniciadores universales del gen 16S del ADNr**

Para corroborar que los aislados corresponden a organismos procarióticos y además que no presentan inhibidores para la PCR, se amplificó la banda de 996 pb del gen 16S del

ADNr, mediante una PCR empleando los iniciadores universales diseñados por Lu y col. (2000), U1 (nucleótidos 518 a 537) y U2 (nucleótidos 1513 a 1491) del gen 16S del ADNr de *E. coli* (Tabla 7).

**Tabla 7.** Iniciadores universales propuestos por Lu y col. (2000) para la identificación de procariontes.

| Iniciadores | Secuencia                                |
|-------------|--|
| U1          | 5' CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG 3'         |
| U2          | 5' ATC GG(C/T) TAC CTT GTT ACG ACT TC 3' |

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25µl que contenía: 1X Amortiguador de reacción, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP's, 2 µM Iniciadores, 50 ng DNA de la muestra bacteriana y 0.06 U de Taq Polimerasa.

Las condiciones de amplificación se fijaron según el protocolo planteado por Lu y col. (2000), con los siguientes ciclos:

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 48°C, elongación durante 2 min a 72°C (35 repeticiones).

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

Los fragmentos amplificados se observaron mediante una electroforesis en gel de agarosa 1,8% de 13µl del amplificado en 2µl de buffer de carga.

#### 4.5.4. PCR con iniciadores específicos

Se desarrollará una PCR con iniciadores específicos para la identificación de *R. solanacearum*, *P. carotovorum* y *B. gladioli* (Tabla 8), con el fin de determinar si los aislados patogénicos encontrados corresponden a alguna de estas especies bacterianas y según los resultados de las pruebas bioquímicas.

**Tabla 8.** Iniciadores y condiciones de PCR, para la detección molecular de *R. solanacearum*, *B. gladioli* y *P. carotovorum*.

| <b>Especie<br/>Iniciadores/<br/>Región</b>    | <b>Secuencia</b>   | <b>Autor</b>              |
|---|--|---------------------------|
| <b><i>R. solanacearum</i><br/>Oli1<br/>Y2</b> | 5`GGGGGTAGCTTGCTACCTCC3`<br>5`ACTCCTACGGGAGGCAGTGGG3`          | Seal y col.<br>(1992)     |
| <b><i>B. gladioli</i><br/>GLA-f<br/>GLA-r</b> | 5`CGAGCTAATACCGCGAAA3`<br>5`AGACTCGAGTCAACTGA3`                | Furuya y col.<br>(2002)   |
| <b><i>P. carotovorum</i><br/>Y1<br/>Y2</b>    | 5`TTACCGGACGCCGAGCTGTGGCGT 3`<br>5`CAGGAAGATGTTCGTTATCGCGAGT3` | Nazerian y col.<br>(2011) |

Para *Ralstonia solanacearum* las condiciones de ciclado fueron las reportadas por Seal y col. (1992):

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

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

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

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

En el caso de *Burkholderia gladioli* las condiciones de ciclado fueron las reportadas por Furuya y col. (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 1,15 min a 55°C, elongación durante 2 min a 72°C (30 repeticiones).

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

Para la PCR con iniciadores específicos, se usó como control positivo ADN de *Burkholderia gladioli* (Fonseca, 2014), esperando un fragmento de 290 pb como lo reportan los autores.

Por último, entre los iniciadores específicos, para *Pectobacterium caratovorum* las condiciones de ciclado fueron las siguientes:

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

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

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

Esperando un fragmento de 434 pb como lo reportan Nazerian y col. (2011).

Además, se realizó la amplificación de la región intergénica espaciadora transcrita (ITS-PCR) según lo descrito por Jensen y col. (1993), utilizando los iniciadores universales G1 (5' GAAGTCG TAACAAGG 3') y L1 (5' CAAGG CATC CACCGT 3'). En este caso se esperó obtener distintos patrones de bandas, dependiendo de la sub especie de *Pectobacterium* presente en la amplificación de los productos ITS - PCR en gel de agarosa al 1,5 % (Toth y col., 2001).

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL que contiene: 1X

Amortiguador de reacción, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP's, 1 µM Iniciadores, 50 ng DNA de la muestra bacteriana y 1 U de Taq Polimerasa. Con las siguientes condiciones de ciclado:

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).

Los fragmentos amplificados se observaron mediante una electroforesis en geles de agarosa 1,5%. Para observar los geles, se tiñeron con 0.5µg/ml de bromuro de etidio y se tomaron fotografías bajo luz ultravioleta en un transiluminador GelDoc (BioRad).

## **4.6. Postulados de Koch**

### **4.6.1. Obtención de las suspensiones bacterianas**

Se reactivó cada bacteria aislada en 2 ml de caldo LB y se incubaron en una cámara de agitación a 27°C por 24 h. Luego del tiempo de incubación, se sembró cada bacteria en placas con agar LB. Se tomó una colonia crecida en la placa luego de 24h y se inoculó en 2 ml de caldo LB, incubando por 6h.

### **4.6.2. Preparación de las placas de cámara húmeda**

Para las placas de cámara húmeda, en una cámara de flujo laminar, se colocaron 3 láminas de toallín estéril en el fondo de cada placa de Petri y luego una malla de plástico estéril para soporte. Se añadió 10 ml de agua destilada estéril a cada placa para mantener la humedad durante la prueba.

### **4.6.3. Preparación de las cámaras húmedas con los microtubérculos de papas**

Se colocaron 5 rodajas de microtubérculos en cada placa de cámara húmeda.

### **4.6.4. Inoculación**

Luego de 6 h de incubadas las colonias bacterianas, se inocularon 10 µl de cada suspensión en el centro de cada rodaja de los microtubérculos de la placa correspondiente.

Como control negativo se preparó una cámara con rodajas inoculadas con 10 µl de caldo LB. Por su parte, como controles positivos, se inocularon rodajas de microtubérculos con aislados de *Ralstonia solanacearum*, *Dickeya chrysanthemi* y *Pectobacterium carotovorum*.

### **4.6.5. Incidencia y severidad en rodajas de microtubérculos**

Se realizó la observación de la aparición de los síntomas (pudrición, exudado lechoso y viscoso en la superficie del tubérculo y olor fétido) y se llevo a cabo un registro

fotográfico cada 24 h de la evolución de la enfermedad, así como la descripción de los síntomas y conteo de microtubérculos afectados para determinar la incidencia de la enfermedad.

La severidad fue calculada asignando valores de severidad empleando la escala modificada por Fonseca (2014), propuesta por Montanelli y col. (1995), de acuerdo a la sintomatología presente en los microtubérculos, de la siguiente manera: 1 cuando sólo el borde del tubérculo se encuentra afectado, 2 cuando menos del 25% del tubérculo se encuentra afectado, 3 cuando del 26% al 50% del tubérculo se encuentra afectado, 4 cuando del 51% al 75% del tubérculo se encuentra afectado y 5 cuando del 76% al 100% del tubérculo se encontró afectado.

Una vez establecidos estos valores se calculó el índice de enfermedad empleando la escala de gradiente de síntomas adaptada por Fonseca (2014), de Rott y Chagvardieff (1987) para la siguiente fórmula:

$$ID = \frac{(X1 \times 1) + (X2 \times 2) + (X3 \times 3) + (X4 \times 4) + (X5 \times 5)}{XT \times 5} \times 100$$

Donde: **X1** es el número de microtubérculos con una escala de severidad igual a 1, **X2** es el número de microtubérculos con una escala de severidad igual a 2, **X3** es el número de microtubérculos con una escala de severidad igual a 3, **X4** es el número de microtubérculos con una escala de severidad igual a 4, **X5** es el número de microtubérculos con una escala de severidad igual a 5 y **XT** el número total de microtubérculos evaluados.

#### **4.6.6. Identificación del reaislado**

Para cumplir con los postulados de Koch, se obtuvieron los aislados bacterianos a partir de las rodajas de microtubérculos, mediante un macerado en 5ml de caldo LB y este

reaislado se reidentificó mediante el uso de pruebas bioquímicas y moleculares que permitieron la identificación de la muestra problema original

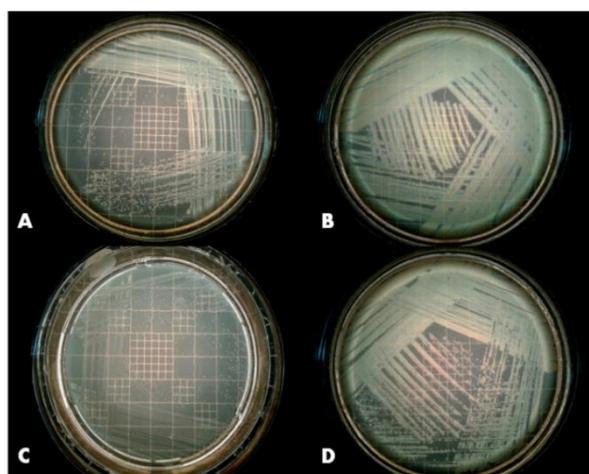
## 5. Resultados y Discusión

### 5.1. Obtención y mantenimiento de aislados bacterianos

Se obtuvieron un total de 4 aislados purificados, los cuales provienen de los tubérculos de papa que se muestran en la figura 7, dos aislados del tubérculo 2.7 denominados 2.7.1 y 2.7.2, y dos aislados del tubérculo 2.8 denominados 2.8.1 y 2.8.2, ambos tubérculos mostraban síntomas de enfermedad y fueron colectados en Chirgua, Edo. Carabobo, Venezuela. Una vez purificadas las distintas morfologías se almacenaron en punciones para su análisis.

### 5.2. Caracterización morfológica

Se realizó una observación de las colonias en placas con agar LB (Figura 8) y además, se llevó a cabo la tinción Gram (Figura 9) para conocer el grupo al cual pertenece cada aislado bacteriano, ya que ésta divide a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias grampositivas y bacterias gramnegativas (Tabla 9), lo cual que indica diferencias fundamentales en la estructura y composición de la pared celular (Alvez, 2014).

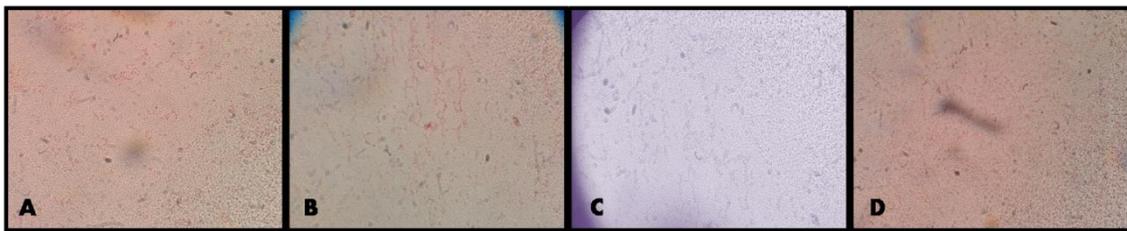


**Figura 8.** Crecimiento en agar LB. **A.** Aislado 2.7.1. **B.** Aislado 2.7.2. **C.** Aislado 2.8.1 y **D.** Aislado 2.8.2.

**Tabla 9.** Características morfológicas de los aislados obtenidos de los tubérculos de papa con síntomas de enfermedad.

| <b>Aislado</b> | <b>Morfología de la colonia</b>   | <b>Tinción Gram</b> |
|----------------|---|---------------------|
| <b>2.7.1</b>   | Forma circular, elevación convexa y borde entero.                           | Bacilo gramnegativa |
| <b>2.7.2</b>   | Forma circular, elevación convexa y borde lobulado translucido.             | Bacilo gramnegativa |
| <b>2.8.1</b>   | Forma circular, tamaño muy pequeño (aproximadamente 0.1 mm) y borde entero. | Coco grampositiva   |
| <b>2.8.2</b>   | Forma circular, elevación plana y borde ondulado.                           | Bacilo gramnegativa |

En la tabla 9, se establecen las características de las distintas morfologías de las colonias observadas para cada aislado, según Vargas-Flores y Kuno-Vargas (2014), debido a que las bacterias pueden observarse a simple vista cuando estas se encuentran en colonias. También, es importante resaltar que el aislado 2.7.2 posee un olor dulce o afrutado, el cual suele estar relacionado con especies de *Pseudomonas*, tal como lo reportan los autores Cox y Parker, (1979) y El-Fouly y col. (2015) en el caso de *Pseudomonas aeruginosa*.

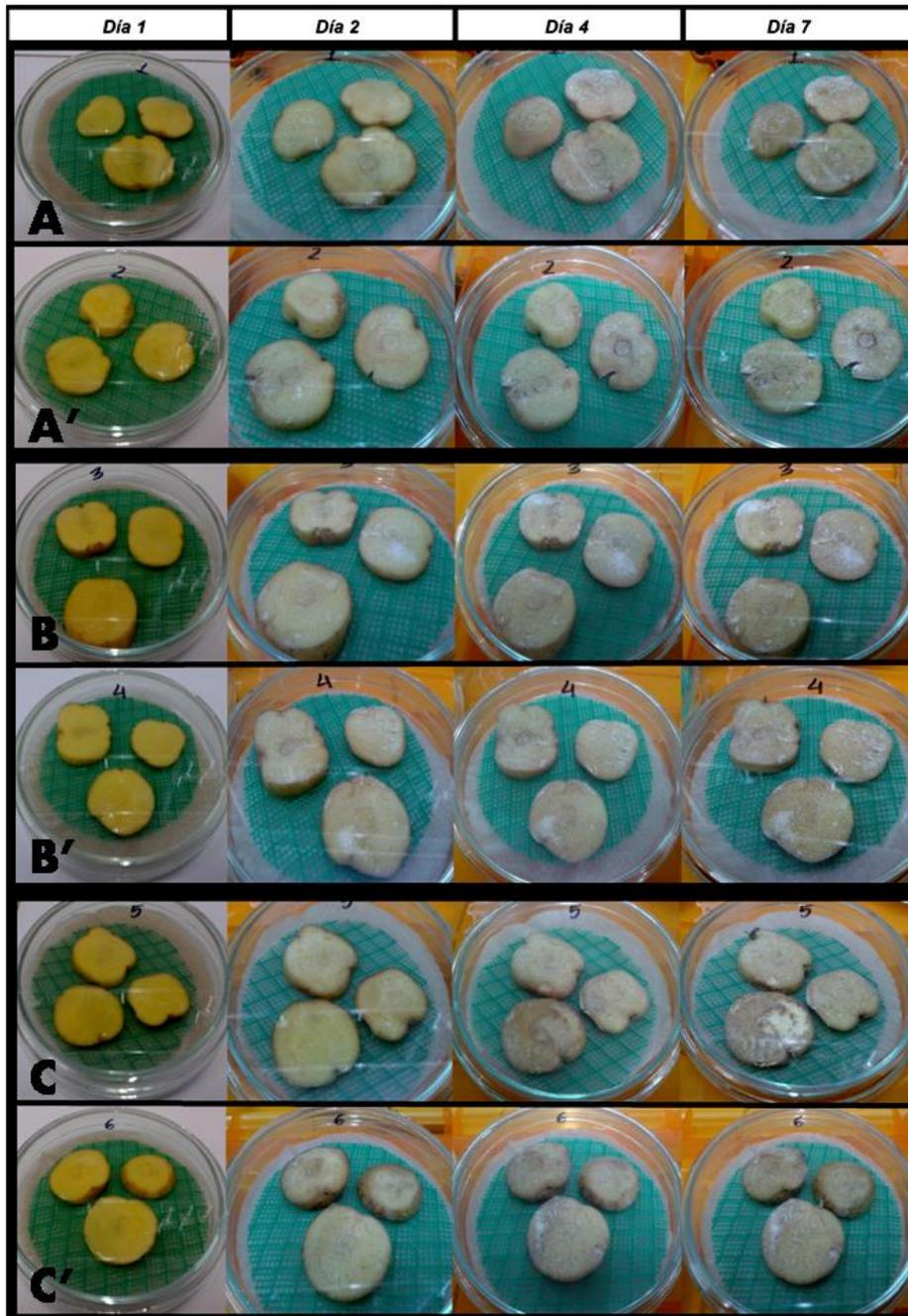


**Figura 9.** Tinción Gram. **A.** Aislado 2.7.1. **B.** Aislado 2.7.2. **C.** Aislado 2.8.1 y **D.** Aislado 2.8.2.

También, pueden ser vistas a través de un microscopio óptico o electrónico; a través de métodos de tinción puesto que son incoloras y una correcta tinción mejora la visibilidad (Vargas-Flores y Kuno-Vargas, 2014). Se pudo apreciar que la mayoría de los aislados son células en forma bacilo y gramnegativas, a excepción del aislado 2.8.1 que es grampositiva y forma coco.

### **5.3. Ensayo de patogenicidad**

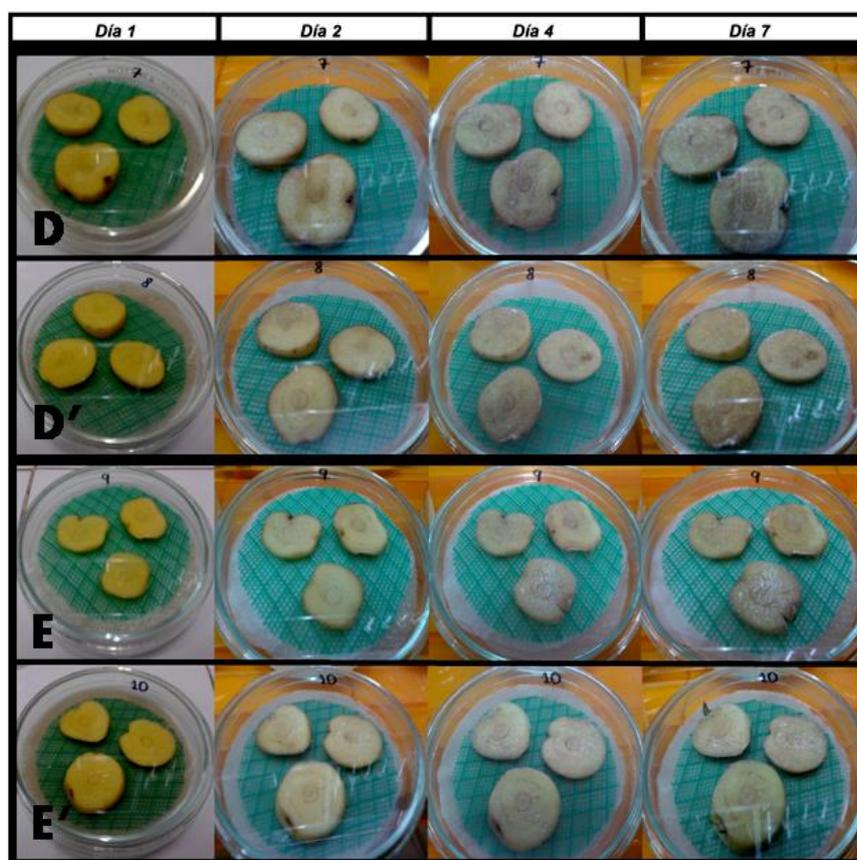
Se llevó a cabo una prueba preliminar de patogenicidad, obteniendo los siguientes resultados:



**Figura 10.** Evidencia fotográfica del ensayo de patogenicidad en tubérculos comerciales a los días 1, 2, 4 y 7. **Placas A y A'**. Control negativo, Caldo LB. **Placas B y B'**. Aislado 2.7.1. **Placas C y C'**. Aislado 2.7.2.

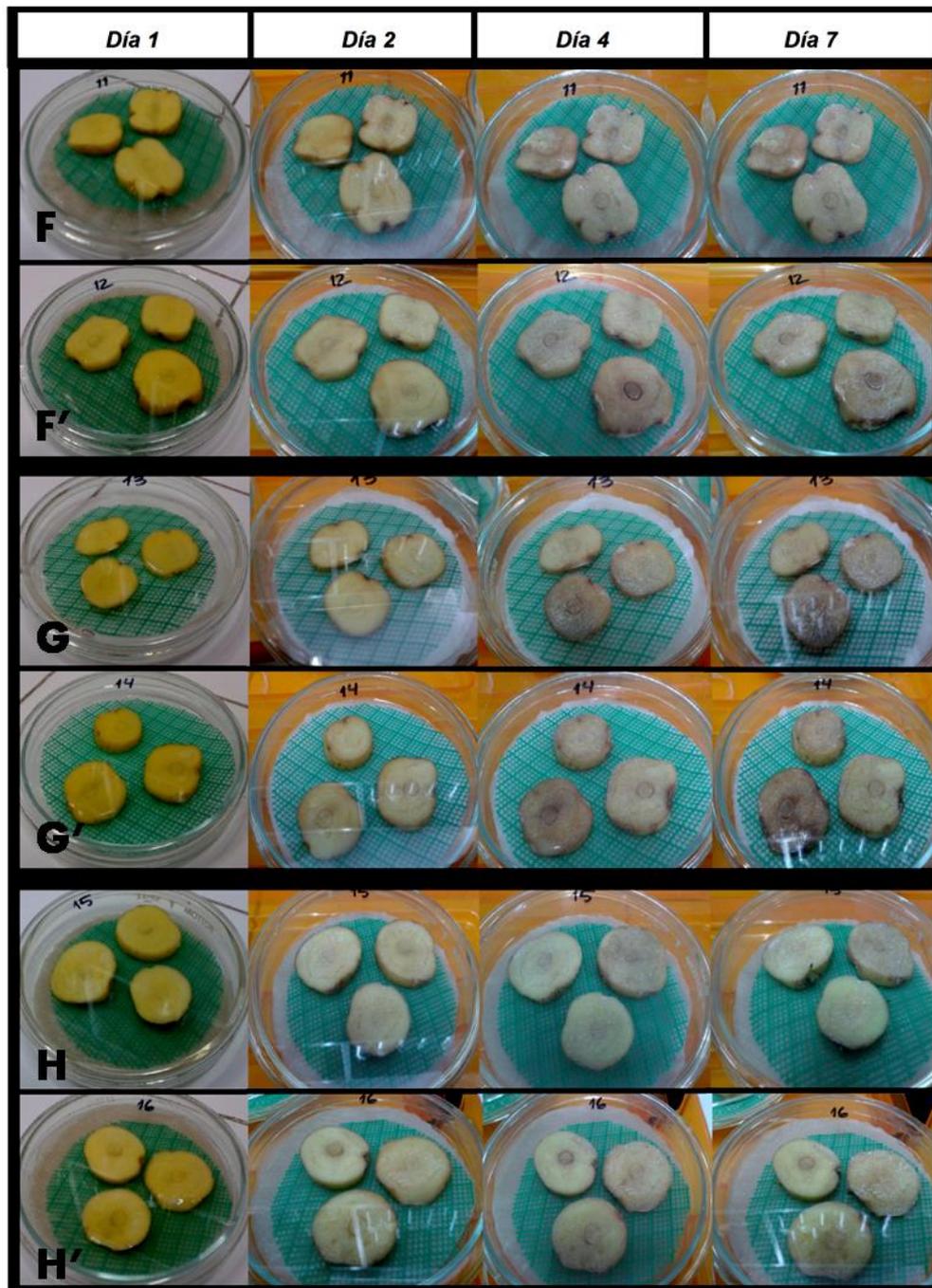
Inicialmente, se observa en la figura 10 que las placas inoculadas con caldo LB como control negativo, A y A' no poseen síntomas de pudrición, ni exudados, aunque se aprecia un oscurecimiento del tejido debido a que los compuestos fenólicos se pueden

oxidar por acción del oxígeno molecular a pH alcalino a quinonas, las cuales también pueden formarse por acción de la polifenoloxidasas que es una enzima muy común en los tejidos vegetales (Fennema y Tannenbaum, 2000). Las rodajas de papa que fueron inoculadas con el aislado 2.7.1 correspondientes a las placas B y B' no presentaron ningún síntoma, mientras las placas C y C' que corresponden a las rodajas de papa inoculadas con el aislado 2.7.2 presentaron signos de pudrición como se puede observar en la placa C al cuarto día post-inoculación.



**Figura 11.** Evidencia fotográfica del ensayo de patogenicidad en tubérculos comerciales a los días 1, 2, 4 y 7. **Placas D y D'.** Aislado 2.8.1. **Placas E y E'.** Aislado 2.8.2.

No se observaron síntomas de pudrición, ni presencia de exudados en las rodajas de papa inoculadas con el aislado 2.8.1, correspondientes a las placas D y D' de la figura 11, a diferencia de la placa E al cuarto día, donde una de las rodajas presento signos de pudrición, la cual fue inoculada con el aislado 2.8.2.



**Figura 12.** Evidencia fotográfica del ensayo de patogenicidad en tubérculos comerciales a los días 1, 2, 4 y 7. **Placas F y F'.** Control positivo, *R. solanacearum*. **Placas G y G'.** Control positivo, *P. caratovorum*. **Placas H y H'.** Control positivo, *D. chrysanthemi*.

En la figura 12, se pueden apreciar placas con las rodajas inoculadas con los aislados utilizados como controles positivos, la placa F, corresponde a la especie *Ralstonia solanacearum*, en esta se presentó una degradación del tejido vegetal en una de las

rodajas, abarcando aproximadamente un 25% de la rodaja. En la placa F' una rodaja presento síntomas de pudrición donde previamente se había observado un exudado cremoso a partir del cuarto día, esta placa fue inoculada con el control positivo *Pectobacterium caratovorum*, y esta pudrición puede deberse a la actividad pectolítica de la bacteria, aunque la especie *Dickeya chrysanthemi* también posee la capacidad de producir pectoliasas que degraden las pectinas del tejido vegetal, no se observaron síntomas en las placas H y H' correspondientes a esta cepa, esto pudo deberse a que la temperatura óptima para la producción de la enfermedad a partir de las especies de *Dickeya chrysanthemi* es mayor en comparación con las especies de *Pectobacterium* sp., la virulencia de *D. chrysanthemi* predomina en los climas tropicales y subtropicales, mientras que *Pectobacterium* sp. en los climas templados (Pitman y col., 2008). Además, fue posible que la presencia de una cepa saprófita presente en el material vegetal inhibiera el crecimiento del aislado, pues sabemos que en su gran mayoría las bacterias patógenas no suelen ser competitivas.

Los resultados obtenidos a través de estas pruebas preliminares de patogenicidad concuerdan con lo que exponen Vidaver y Lambrecht (2004), donde mencionan que la mayoría de las bacterias asociadas a plantas son bacilos gramnegativos. Por esta razón, se descarta el aislado 2.8.1, además de que no originó síntomas en las pruebas preliminares de patogenicidad. Aunque el aislado 2.7.1 tampoco ocasionó signos de enfermedad en estas pruebas, no será excluido debido a los síntomas que se observaron en el tubérculo de donde originalmente fue aislado y a su caracterización como bacteria gramnegativa.

Tomando en cuenta los síntomas observados en los tubérculos de papa (Figura 7) objeto de este estudio, el tubérculo 2.7 posee signos que corresponden a la marchitez bacteriana causadas por *Ralstonia solanacearum* como se muestra en la figura 4 y el

tubérculo 2.8 presenta signos de podredumbre, lo que indica la presencia de una bacteria capaz de pudrir el tubérculo. Schaad y col. (2001), en su clave para diferenciar los géneros bacterias patógenas, clasifica como gramnegativas a las bacterias pertenecientes a los géneros *Erwinia*, *Ralstonia*, *Acidovorax*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Xanthomonas* y *Xylophilus*, de los cuales, *Erwinia*, *Ralstonia* y *Burkholderia* han sido reportados en la bibliografía como causantes de la pudrición blanda en papa.

#### 5.3.4. Caracterización Bioquímica

La identificación bioquímica de las especies bacterianas corresponde a un conjunto de pruebas y no a una específica, ya que puede cambiar entre individuos de una misma especie dependiendo del metabolismo de la bacteria (Fonseca, 2014). Siguiendo las recomendaciones de Schaad y col. (2001), se realizó una serie de pruebas de lectura rápida (Tabla 10).

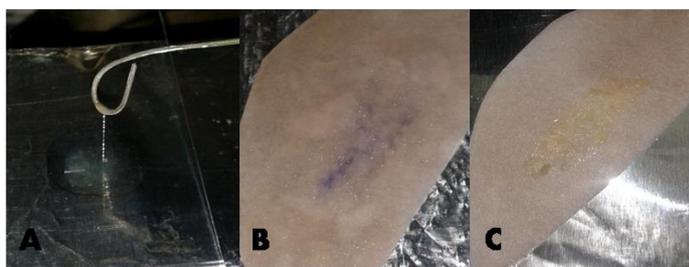
**Tabla 10.** Resultados a pruebas bioquímicas de lectura rápida para la identificación de bacterias patógenas.

| Prueba   | Aislado 2.7.1 | Aislado 2.7.2 | Aislado 2.8.2 |
|----------|---------------|---------------|---------------|
| KOH      | Gramnegativa  | Gramnegativa  | Gramnegativa  |
| Catalasa | +             | +             | +             |
| Oxidasa  | +             | +             | -             |

El aislado 2.8.1 resulto una bacteria grampositiva con la prueba KOH, confirmando el resultado obtenido previamente con la tinción Gram.

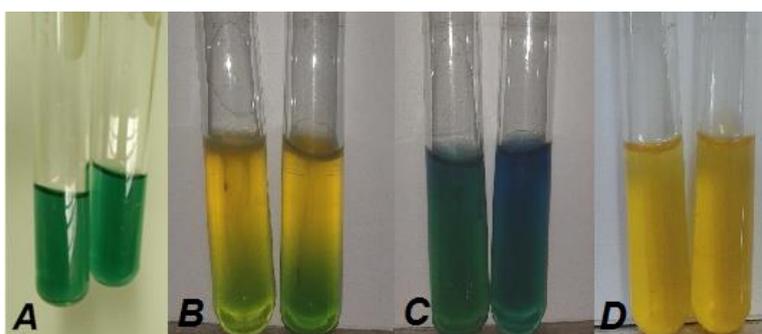
Con la prueba KOH las bacterias gramnegativas se convierten en una mezcla viscosa mientras que las grampositivas no. La prueba de la oxidasa (Figura 13) es usada en microbiología para determinar si una bacteria produce alguna de las citocromo C oxidasa; por lo tanto, no es determinativa para identificar el género, en el caso de los géneros *Pectobacterium* y *Dickeya* (Erwinias) todas las especies son oxidasa negativas, debido a que los individuos anaerobios carecen de la actividad oxidasa, no pueden vivir

en presencia de oxígeno atmosférico y no poseen sistema de citocromo oxidasa, por lo tanto los aislados 2.7.1 y 2.7.2 se descartan como posibles bacterias pertenecientes a estos géneros. Entre otros géneros gramnegativos-oxidasa positivos, se encuentran *Ralstonia*, *Acidovorax*, *Agrobacterium*. La prueba oxidasa no permite caracterizar otros géneros como *Pseudomonas* y *Burkholderia* ya que están integrados por distintas especies, algunas oxidasa positivas y otras negativas.



**Figura 13.** Pruebas de lectura rápida. **A.** Prueba KOH positiva (bacteria gramnegativa). **B.** Prueba oxidasa positiva. **C.** Prueba oxidasa negativa.

Continuando la clave de identificación de bacterias fitopatógenas de Schaad y col. (2001) (Anexo 20), los aislados bacterianos se separaron entre bacterias aeróbicas y anaeróbicas, utilizando la prueba de Oxido-Fermentación (Figura 14).

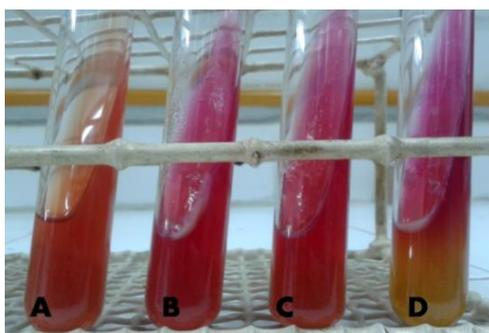


**Figura 14.** Resultados de la prueba de Oxido-Fermentación (5 días), donde el tubo izquierdo corresponde al tubo en condiciones de anaerobiosis (se le añadió parafina) y el tubo derecho corresponde a las condiciones de aerobiosis. **A.** Control (sin inocular). **B.** Aislado 2.7.1. **C.** Aislado 2.7.2 y **D.** Aislado 2.8.2.

En los resultados obtenidos en la prueba de Oxido-Fermentación con el medio Hugh y Leifson, suplementado con glucosa al 10%, se aprecia una coloración azul-verdoso en

los tubos correspondientes al control. En la sección D de la figura 14, los tubos se encuentran completamente de color amarillo, lo cual según MacFaddin (2003) se debe a que algunas bacterias son capaces de metabolizar un hidrato de carbono por vías fermentativas, en este caso, la glucosa, que es hidrolizada en dos moléculas de triosa, luego son convertidas a una cantidad de compuestos con 1, 2 3 o 4 carbonos; el principal intermediario es el ácido pirúvico. Los productos finales varían con cada especie bacteriana, lo que depende de su sistema enzimático y de las condiciones ambientales. Este proceso requiere un compuesto orgánico como aceptor de electrones terminal y una fosforilación inicial, evidenciándose por un cambio en la coloración del medio, el cual era inicialmente azul-verdoso y luego de color amarillo, causado por cambios de pH, ocasionado por la producción de ácido. En el caso del aislado 2.7.1 (Figura 14.B) es aeróbico, ya que utilizo la glucosa que se encontraba cercana a la superficie del medio y la utilización de glucosa que se observa en el tubo que tenía parafina, pudo deberse a la presencia de oxígeno en el medio antes de añadir la misma. Por último, el aislado 2.7.2, no oxidó ni fermentó la glucosa presente en el medio, ya que el mismo se tornó a un color azul más oscuro (en aerobiosis) por alcalinización del medio.

Con estos resultados se puede afirmar que el aislado 2.8.2 es anaeróbico facultativo y pertenece a los géneros de *Pectobacterium* o *Dickeya*. Y los aislados 2.7.1 y 2.7.2 son organismos aeróbicos, es decir no fermentadores, tales como *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Acidovorax*, entre otros. Mediante el uso de la prueba de agar hierro de Kliger se puede verificar la utilización de la glucosa por parte de los aislados, que para la cepa 2.7.2 resultó negativa en la prueba de Oxido-Fermentación, y además se determina si las mismas pueden metabolizar la lactosa, tal como se muestra en la figura 15.

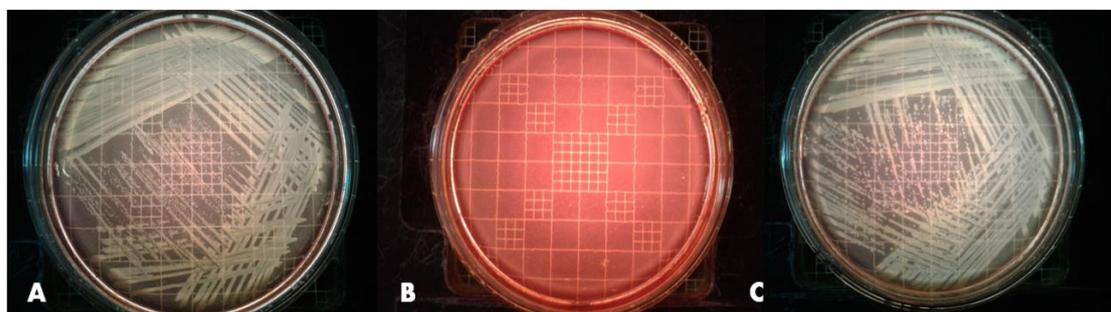


**Figura 15.** Prueba de agar hierro de Kligler. **A.** Control (sin inocular). **B.** Aislado 2.7.1. **C.** Aislado 2.7.2. **D.** Aislado 2.8.2.

En esta prueba el aislado 2.7.2 no metabolizó la glucosa, pues el tubo se mantuvo con una tonalidad rojiza, lo cual indica la utilización de las peptonas presentes en el medio de cultivo. El aislado 2.7.1 apenas acidificó el fondo del tubo, como el aislado 2.8.2, aunque el cambio de color fue más visible en este caso, ninguno de los microorganismos metabolizó la lactosa ni produjo H<sub>2</sub>S.

Como se mencionó anteriormente, los síntomas observados en el tubérculo 2.7 de la figura 7 y de donde se obtuvieron los aislados 2.7.1 y 2.7.2, son de marchitez bacteriana, por ende, el aislado 2.7.1 podría ser una cepa de *Ralstonia solanacearum*, agente causal de la marchitez bacteriana en papa.

Posteriormente, los aislados fueron sembrados en placas con medio de cultivo agar MacConkey (Figura 16).



**Figura 16.** Crecimiento en agar MacConkey. **A.** Aislado 2.7.1. **B.** Aislado 2.7.2. **C.** 2.8.1.2

Este medio de cultivo es selectivo para bacilos gramnegativos, debido a que la presencia de cristal violeta y sales biliares inhiben la flora grampositiva, aunque también se conoce que ciertas bacterias gramnegativas pueden no crecer en el mismo (Goldman y Green, 2009). Los aislados 2.7.1 y 2.8.2 crecieron en el medio de cultivo, aunque no utilizaron la lactosa, el cual es el carbohidrato suministrado en este medio; el aislado 2.7.2, no creció, descartando la posibilidad que pueda pertenecer al género de *Ralstonia*. Actualmente, se conoce que entre las bacterias fitopatógenas la especie *Acidovorax facilis*, previamente denominada *Pseudomonas facilis* no es capaz de crecer en agar MacConkey (Willems y col., 1992).

Es importante resaltar que, a lo largo de su estudio, el género *Pseudomonas* demostró ser polifilético, mediante la hibridación de ADN-ARNr y que consistía en cinco grupos distintos y remotamente relacionados que no podían mantenerse en un solo género (De Vos y De Ley, 1983). *Pseudomonas facilis* y *Pseudomonas delafieldii* pertenecen al complejo acidovorans rRNA en Betaproteobacteria. Luego, en una extensión de este estudio polifásico, varias especies de *Pseudomonas* fitopatógenas también se transfirieron al género *Acidovorax* (Willems y col., 1992).

**Tabla 11.** Resultados de las principales pruebas bioquímicas realizadas a los aislados patogénicos en estudio.

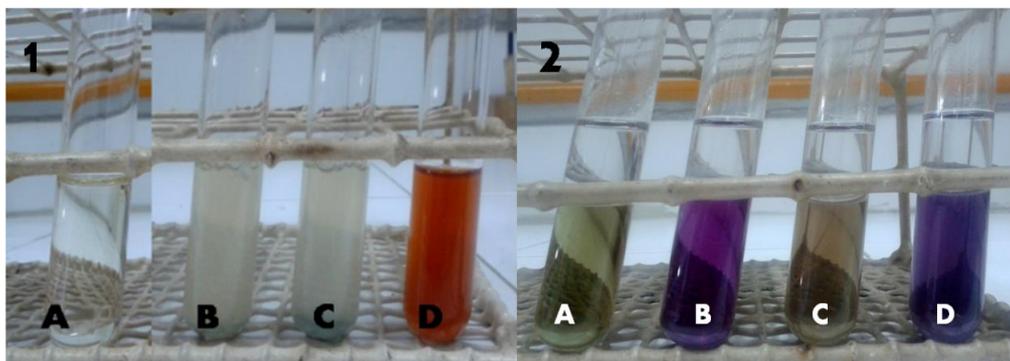
| Prueba                             | Aislado 2.7.1               | Aislado 2.7.2               | Aislado 2.8.2               |
|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>Crecimiento a 41°C</b>          | -                           | -                           | +                           |
| <b>Oxido-Fermentación</b>          | O+/F-                       | O-/F-                       | O+/F+                       |
| <b>Kliger</b>                      | Glu+/Lac-/H <sub>2</sub> S- | Glu-/Lac-/H <sub>2</sub> S- | Glu+/Lac-/H <sub>2</sub> S- |
| <b>Motilidad</b>                   | +                           | +                           | +                           |
| <b>Citrato</b>                     | +                           | -                           | +                           |
| <b>Licuefacción de la gelatina</b> | -                           | +                           | -                           |
| <b>Indol</b>                       | -                           | -                           | +                           |
| <b>Reducción de nitratos</b>       | -                           | -                           | +                           |

|                             |                              |                |                   |
|-----------------------------|------------------------------|----------------|-------------------|
| <b>Arginina dehidrolasa</b> | +                            | -              | +                 |
| <b>Agar MacConkey</b>       | Crecimiento+/Lac-            | Crecimiento-   | Crecimiento+/Lac- |
| <b>Agar Cetrimida</b>       | Crecimiento+<br>Sin pigmento | Crecimiento -  | *                 |
| <b>Agar King B</b>          | Fluoresceína +               | Fluoresceína - | Fluoresceína -    |

\* No se realizó.

En la tabla 11, podemos observar los distintos resultados obtenidos para cada aislado. Es importante destacar la gran variabilidad en el metabolismo, detectada mediante estas pruebas bioquímicas en los tres aislados bacterianos; sobre todo, porque proceden de dos tubérculos con signos de enfermedad pero provenientes de la misma zona geográfica.

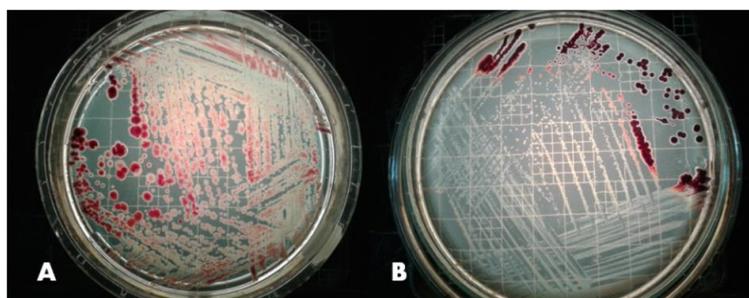
Mediante la realización de estas pruebas se puede descartar que el organismo **2.7.1**, pueda ser identificado como *Ralstonia solanacearum*, ya que haciendo una comparación de los resultados obtenidos con las características típicas de *R. solanacearum* según Chavarro y col. (2004) para algunas pruebas bioquímicas (Tabla 2), el aislado 2.7.1 resulto negativo en la reducción de nitratos (Figura 17.1), y positivo para la arginina dehidrolasa (Figura 17.2), lo cual fue discriminante ya que todas las razas de esta especie son positivas para la reducción de nitratos y negativos para la arginina dehidrolasa.



**Figura 17. 1.** Prueba de reducción de nitratos. **A.** Control (sin inocular). **B.** Aislado 2.7.1. Resultado negativo. **C.** Aislado 2.7.2. Resultado negativo. **D.** Aislado 2.8.2. Resultado positivo. **Figura 17. 2.** Prueba de arginina dehidrolasa. **A.** Control (sin

inocular). **B.** Aislado 2.7.1. Resultado positivo. **C.** Aislado 2.7.2. Resultado negativo. **D.** Aislado 2.8.2. Resultado positivo.

Conjuntamente se realizó una prueba de crecimiento en Agar Kelman's TZC, el cual permite determinar la virulencia de las cepas de *R. solanacearum*, que gracias a la interacción con un polisacárido extracelular (cuya ausencia en variantes silvestres reduce su virulencia considerablemente) permite diferenciar las colonias de *R. solanacearum* entre cepas virulentas (colonias blancas al centro rojas, presencia de estrías color rojo) y no virulentas o silvestres (colonias completamente rojas) (Xu y col., 2009). Después un periodo de incubación de 24-72 h como recomienda Fonseca (2014), se observó un crecimiento atípico, de esta manera se realizó una comparación resaltando las diferencias entre el crecimiento de una cepa de *R. solanacearum* (control positivo) y del aislado 2.7.1 (Figura 18)



**Figura 18.** Agar Kelman's TZC, a las 72 h de observación. **A.** *R. solanacearum*. **B.** Aislado 2.7.1.

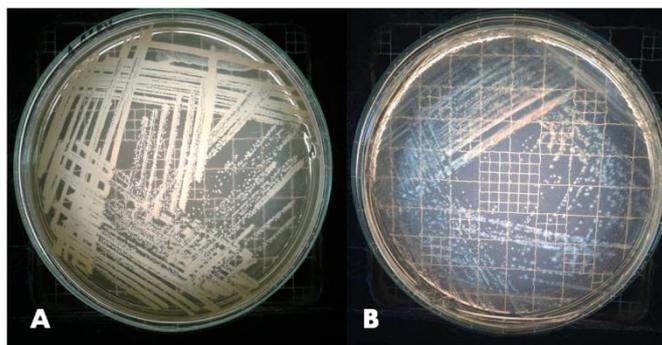
Como podemos apreciar en la figura 18, las colonias del aislado 2.7.1 crecieron mayormente de color crema, excepto en unas zonas de la placa donde se observaron las colonias de color rojizo, reafirmando que la cepa 2.7.1 no es *R. solanacearum*.

Entre otros géneros asociados a *Ralstonia*, tales como son los no fermentadores, se tiene a *Burkholderia* y *Pseudomonas*, donde las especies que integran el primero pueden tener respuestas muy variables a las pruebas bioquímicas, pues como se mencionó anteriormente en el caso de la oxidasa, hay especies negativas y especies positivas ante

esta prueba. Igual ocurre para la arginina dehidrolasa entre otras pruebas. Durante varios años, estas bacterias (*Burkholderia*) continuaron siendo reconocidas como miembros de las *Pseudomonas* no fluorescentes. Palleroni y col. (1973) reconocieron la heterogeneidad taxonómica entre las *Pseudomonas* y delinearon cinco grupos de homología de especies basados en experimentos de hibridación de ARN-ADN. Así se creó el género *Burkholderia* y se ordenaron algunas especies del grupo II de ARNr (*P. cepacia*, *P. caryophylli*, *Pseudomonas gladioli*, *Pseudomonas malle* y *Pseudomonas pseudomallei*).

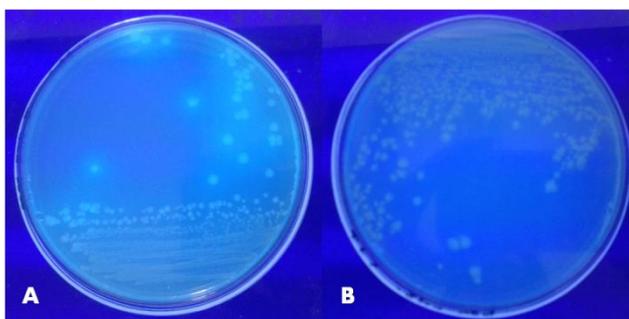
Los miembros del grupo de *Burkholderia* tienen un tipo de metabolismo estrictamente aeróbico con oxígeno como aceptor de electrones terminal. Entre otras características, la mayoría de las especies también pueden reducir el nitrato a nitrito a la excepción de *B. sartisoli* (Suárez-Moreno y col., 2012). Esta especie fue reasignada al género *Paraburkholderia* por Sawana y col. (2014), quienes delinearon dos grandes grupos de especies dentro del género *Burkholderia*: Clase I, que contiene todos los miembros patógenos del género, y Clase II, que contiene una gran variedad de especies ambientales.

Continuando el estudio, el aislado 2.7.1 se sembró el aislado en agar *Pseudomonas* donde creció sin la formación de pigmentos (Figura 19. A). Además, también se sembró en agar cetrimida, donde su crecimiento fue positivo, siendo este un medio de cultivo selectivo para *Pseudomonas aeruginosa* y otras especies del género. El cloruro de magnesio y el sulfato de potasio promueven la formación de piocianina, pioverdina, piomelanina y fluoresceína de *P. aeruginosa* y la cetrimida es un detergente catiónico que actúa como agente inhibidor, liberando el nitrógeno y el fósforo de las células de la flora acompañante y es capaz de inhibir algunas especies de *Pseudomonas* (Enlace 8). Estos resultados indican que el aislado puede pertenecer al género de *Pseudomonas*.



**Figura 19.** Agar *Pseudomonas*. **A.** Aislado 2.7.1. **B.** Aislado 2.7.2.

Para continuar con la caracterización bioquímica de estos aislados tan heterogéneos y de acuerdo con Schaad y col. (2001), el aislado 2.7.1 se cultivó en agar King B, el cual es útil para aislar todas las *pseudomonas* fluorescentes de las plantas. Las *pseudomonas* producen pigmentos fluorescentes difusibles de color amarillo, verde o azul en este medio deficiente en hierro después de 24 a 48 h de crecimiento. Las colonias fluorescentes pueden visualizarse mediante placas de observación bajo luz UV de 366 nm. Como se aprecia en la figura 20, el aislado 2.7.1 resultó positivo para fluoresceína.



**Figura 20.** Agar King B visto con luz ultravioleta (UV). **A.** Aislado 2.7.1. **B.** Aislado 2.7.2.

Actualmente, se conoce que algunas de las diferencias entre *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, y otras especies del género, se basan en la capacidad de hidrolizar la gelatina, donde las primeras dos son positivas y *P. putida* es negativa para esta prueba. Además, *P. fluorescens* y *P. putida* no reducen los nitratos mientras que otras especies de *Pseudomonas* si lo hacen, y todas son capaces de oxidar la glucosa (Blazevic y col. 1973; Forbes y col. 2009). Por todo esto, el aislado 2.7.1 podría

identificarse como una bacteria perteneciente al género *Pseudomonas*, y a la especie *Pseudomonas putida*. Las pseudomonas fluorescentes saprofitas asociadas con plantas, tales como *P. putida* y *P. fluorescens* han sido tema de estudio para lograr su diferenciación de *P. aeruginosa*, una patógena oportunista de plantas y animales, debido a esta diferencia en la patogenicidad (Schaad y col., 2001; Blazevic y col. 1973).

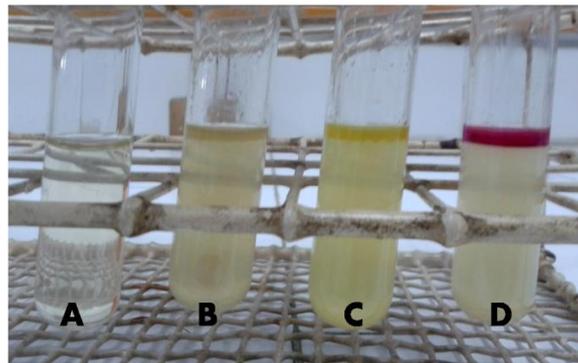
Tomando en cuenta los resultados obtenidos para el aislado **2.7.2** (negativo para citrato, crecimiento a 41°C, indol, reducción de nitrato, arginina dehidrolasa, crecimiento en MacConkey y agar cetrimida; pero positivo para la licuefacción de la gelatina y motilidad), se considera que puede incluirse en el género *Pseudomonas* o géneros asociados como *Acidovorax*. Gracias a su crecimiento negativo en agar cetrimida, se descarta que el mismo sea *Pseudomonas aeruginosa*, ya que este medio es selectivo para esta especie y capaz de inhibir el crecimiento de algunas especies de *Pseudomonas*. Al cultivar este aislado en medio de cultivo agar *Pseudomonas*, el cual está suplementado con glicerol para estimular la formación de pigmentos, se observaron colonias de color beige o crema, mostrando a su vez cierto tono azulado a contraluz como se aprecia en la figura 19. Sin embargo, la interpretación de este resultado es inconclusa, con respecto a la posibilidad de que el aislado 2.7.2 pertenezca al género de *Pseudomonas*, ya que sí el mismo es capaz de producir algún pigmento, este debería estar difundido por la placa, pues la producción de piocianina se debe observar como una zona color azul-verdoso que rodea la colonia, o que se extiende en todo el medio de cultivo debido a la difusión del pigmento, que no es el caso. De igual forma, la formación de colonias no pigmentadas no descarta por completo un aislado de *Pseudomonas*. Además, el aislado creció sin producción de pigmentos ni fluoresceína (Figura 20) en agar King B. Por tanto, las colonias no pigmentadas en este medio deben

someterse a una identificación bioquímica más exhaustiva (Enlace 9; Enlace 10) o confirmar su identificación por pruebas moleculares.

Sin embargo, las características bioquímicas de este aislado resumidas en la tabla 11, coinciden con las reportadas para el género *Acidovorax*, que debido a su metabolismo tan único, pueden distinguirse fácilmente de otros patógenos de plantas (Schaad y col., 2001). Las especies *A. delafieldii* y *A. facilis* constituyen los microorganismos dominantes de suelos, compost viejo y fuentes de agua dulce y tres especies de *Acidovorax* son agentes causales de enfermedades en varias plantas, incluyendo las dos anteriores y la especie *A. avenae* subsp. *avenae* (Claflin y col., 1989). *A. delafieldii* y *A. avenae* subsp. *avenae* son negativas para la licuefacción de la gelatina, mientras que la especie *A. facilis* es positiva (Willems y col., 1992), por tanto bioquímicamente se podría decir que el aislado 2.7.2 se acerca a la especie *Acidovorax facilis*.

Finalmente, el aislado **2.8.2** negativo para la licuefacción de la gelatina y utilización de lactosa, pero positivo para el crecimiento a 41°C, motilidad, citrato como única fuente de carbono, arginina dehidrolasa, reducción de nitratos e indol, podría pertenecer al grupo de las erwinias (Schaad y col. 2001). Es un bacilo gramnegativo y fermentador. Actualmente, las erwinias comprenden los géneros *Pectobacterium* y *Dickeya*, entre las cuales *Pectobacterium atrosepticum* (anteriormente *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* (*Erwinia carotovora* subsp. *brasiliense*), *Pectobacterium wasabiae* (*Erwinia carotovora* subsp. *wasabiae*) y varios *Dickeya* spp. (*Erwinia chrysanthemi*), que incluye a *D. dianthicola* (*Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola*), *Dickeya dadantii*, *Dickeya zae* (*Erwinia chrysanthemi* pv. *zae*) y la nueva especie *Dickeya solani* son responsables de causar pierna negra en el campo y pudrición blanda del tubérculo en el almacenamiento

(Czajkowski y col. 2014). Si se analiza detenidamente los resultados obtenidos mediante pruebas bioquímicas, podemos encontrar que el aislado problema es indol positivo (Figura 21). Mientras que ninguna de las especies de *Pectobacterium* es positiva para esta prueba, las especies del género *Dickeya* si lo son (Tabla 5); por lo tanto se podría identificar el aislado 2.8.2 como una especie perteneciente al género *Dickeya*.



**Figura 21.** Prueba indol. **A.** Control (sin inocular). **B.** Aislado 2.7.1. Resultado negativo. **C.** Aislado 2.7.2. Resultado negativo. **D.** Aislado 2.8.2

Un importante estudio de Starr y col. (1966) informó por primera vez que *Dickeya* produce un pigmento azul llamado indigoidina, que brinda protección a las bacterias de las especies reactivas del oxígeno durante la infección de la planta. Esta observación llevó a Lee y Yu (2005) a desarrollar el medio NGM (Medio de crecimiento de nematodos, en inglés Nematode Growth Media), que contiene glicerol y clorito de manganeso, en el que *Dickeya* puede formar colonias azules. Este sería un excelente método de diferenciación para corroborar la identificación de una cepa perteneciente al género de *Dickeya*, mediante el uso de pruebas bioquímicas. Lamentablemente, algunas veces los resultados obtenidos a través de estas técnicas pueden ser ambiguos, ya que los microorganismos están siendo sometidos constantemente a la presión del ambiente, genéticamente pueden sufrir mutaciones y dar resultados variables ante estas pruebas,

por ello se destaca la importancia de la identificación de bacterias a través de métodos moleculares.

### **5.3.5. Identificación molecular**

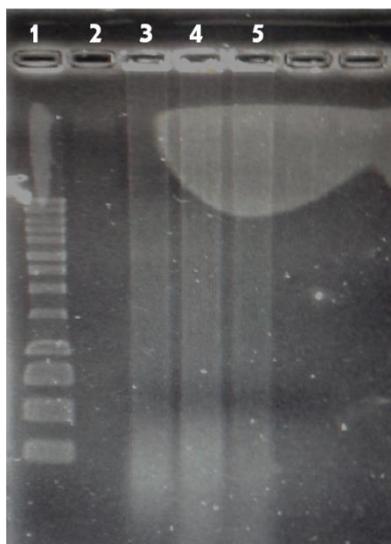
Teniendo en cuenta la previa caracterización de los aislados, se procedió a realizar un análisis molecular de los mismos, utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con iniciadores universales con el objetivo de corroborar la naturaleza procariota y con iniciadores específicos reportados para las especies *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium caratovorum* y *Burkholderia gladioli*, con el fin de descartar de forma definitiva que los microorganismos en estudio no pertenecen a dichas especies.

#### **5.3.5.1. Extracción de ADN bacteriano**

La extracción y purificación de ADN representa la etapa inicial de casi todas las técnicas moleculares pues nos proporciona un ADN libre de impurezas e inhibidores, características fundamentales para el éxito en la obtención de datos genéticos confiables (Cornejo y col., 2014). En el presente trabajo se empleó el método descrito por Gomes y col. (2000) para la extracción del ADN bacteriano, reportado previamente por Alvez y col. (2011), Coppola (2015) y Barrios (2015), como un método que resultó ser eficiente y efectivo, tanto por la integridad del ADN aislado como por su concentración. Sin embargo, en la extracción de ADN de los tres aislados bacterianos problema, no se obtuvo una buena calidad del ADN (Figura 22), además de una baja concentración (Tabla 12), lo cual pudo ser causado por una gran cantidad de polisacáridos presentes en el material de estudio, pues al modificar el método añadiendo CTAB 2X (Bromuro de Cetil trimetil amonio), sustancia adecuada para procesar tejidos con una alta concentración de polisacáridos y polifenoles, y añadiendo  $\beta$ -mercaptoetanol, un

inhibidor de DNAsas y RNAsas, si se obtuvo el ADN en una cantidad y calidad adecuadas.

Este protocolo fue desarrollado por Murray y Thompson en 1980 y publicado hasta 1987 por Wagner y col. (1987). Se ha utilizado de manera efectiva en diversas especies de plantas (Doyle y Doyle, 1987; Tel-Zuri y col., 1999; Aras y col., 2003), bacterias (Honore´-Bouakline y col., 2003), hongos, líquenes (Crespo y col., 1999) e insectos (Fraga y col. 2004). En la actualidad algunos laboratorios, que procesan un alto número de muestras, lo siguen utilizando ya que permite obtener ADN de alta calidad eliminando los inhibidores que afectan la PCR; además de ser un método económico y fácil de estandarizar (Cornejo y col., 2014).



**Figura 22.** Electroforesis en gel de agarosa 0,8% de los extractos de ADN obtenidos por el método de Gomes y col. (2000). **Carril 1.** Marcador de peso molecular (1 Kb, PROMEGA). **Carril 3.** Aislado 2.7.1. **Carril 4.** Aislado 2.7.2. **Carril 5.** Aislado 2.8.2.

Posteriormente con este método, se realizó la extracción del ADN de los tres aislados problema, además de los controles positivos *R. solanacearum*, *P. caratovorum* y *D. chrysanthemi*. En simultáneo también se extrajo el ADN de los dos reaislados obtenidos a partir de microtubérculos de la variedad Granola, para comprobar los postulados de

Koch. Como puede verse en la figura 23, la calidad del ADN mejoró notablemente, así como la cantidad.

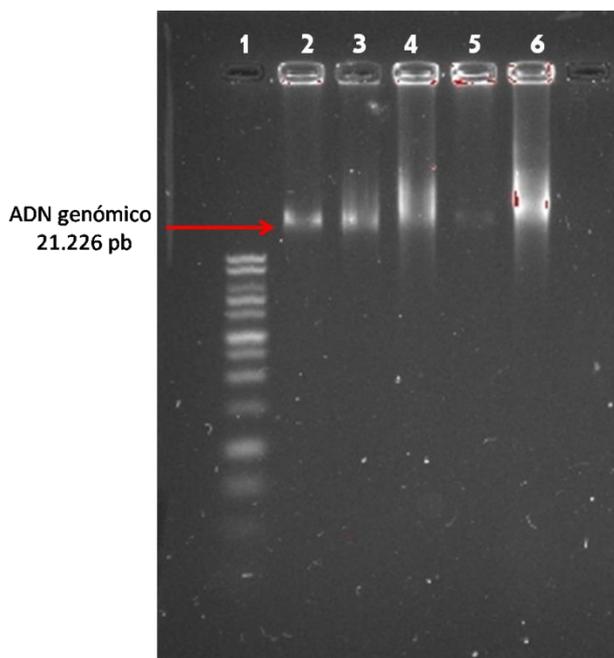
### 5.3.5.2. Cuantificación y calificación del ADN extraído

Una vez obtenido el ADN, es importante determinar el rendimiento mediante espectrofotometría. La ley de Lambert-Beer indica que la concentración de una molécula en solución depende de la cantidad de luz absorbida por las moléculas disueltas. Una característica del ADN es que absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm y permite estimar su concentración mediante espectrofotometría. Cuando la longitud de la celda en que se disuelve el ADN es de 1 cm, la absorbancia es igual a la densidad óptica (DO). En el caso de ADN genómico o de doble cadena, una OD equivale a 50 µg/ml (Lehninger, 1982). Se debe considerar el factor de dilución para obtener la concentración en nanogramos/microlitro (ng/µl), tal como se muestra en la tabla 12, para el aislamiento de ADN de las cepas problemas y los controles positivos.

**Tabla 12.** Valores de densidad óptica y concentración de ADN obtenidos para los aislados patogénicos, cepas controles y reaislados de los postulados de Koch utilizando el método de extracción de Gomes y col. (2000) y modificado.

| Método de extracción                       | Muestra                        | D.O. (260 nm) | D.O. (280 nm) | Relación 260/280 | [DNA] (ng/µl) |
|--|--------------------------------|---------------|---------------|------------------|---------------|
| Gomes y col. (2000)                        | Aislado 2.7.1                  | 0,029         | 0,025         | 1,160            | 29            |
|  | Aislado 2.7.2                  | 0,008         | 0,006         | 1,333            | 8             |
|  | Aislado 2.8.2                  | 0,010         | 0,008         | 1,250            | 10            |
| Gomes y col. (2000) modificado con CTAB 2X | Aislado 2.7.1                  | 0,167         | 0,088         | 1,898            | 167           |
|  | Aislado 2.7.2                  | 0,336         | 0,256         | 1,313            | 336           |
|  | Aislado 2.8.2                  | 0,108         | 0,057         | 1,895            | 108           |
|  | 2.7.1 Koch                     | 0,074         | 0,038         | 1,974            | 74            |
|  | 2.7.2 Koch                     | 0,204         | 0,100         | 1,889            | 204           |
|  | <i>R. solanacearum</i>         | 0,051         | 0,029         | 1,759            | 51            |
|  | <i>P. caratovorum</i> (LMV 29) | 0,148         | 0,088         | 1,682            | 148           |
|  | <i>P. caratovorum</i> (LMV 31) | 0,123         | 0,070         | 1,757            | 123           |
| <i>D. chrysanthemi</i>                     | 0,123                          | 0,073         | 1,685         | 123              |               |

Además de conocer la cantidad y calidad del ADN por espectrofotometría, es importante conocer si el ADN obtenido está íntegro. La integridad del ADN se puede observar mediante electroforesis en gel de agarosa. Si el ADN está íntegro, se debe observar una banda estrecha cercana al pozo en que se colocó el extracto (Figura 23).



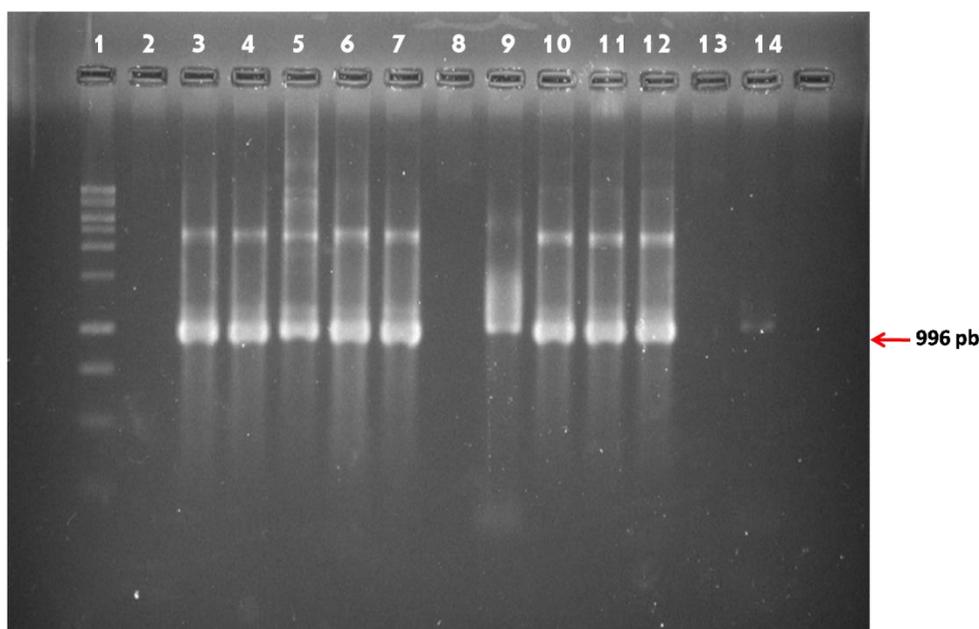
**Figura 23.** Electroforesis en gel de agarosa 0,8% de los extractos de ADN obtenidos por el método de Gomes y col. (2000) modificado con CTAB 2X. **Carril 1.** Marcador de peso molecular (1 Kb, PROMEGA). **Carril 2.** Aislado 2.7.1. **Carril 3.** Aislado 2.7.2. **Carril 4.** Aislado 2.8.2. **Carril 5.** Aislado 2.7.1 Koch. **Carril 6.** Aislado 2.7.2 Koch.

En la figura 23, se observó una banda de alto peso molecular, de buena calidad e integridad del ADN, en el gel de Agarosa al 0,8%, además de esto no se apreció una alta contaminación de ARN como en la figura 21, gracias a la modificación realizada al método propuesto por Gomes y col. (2000).

### 5.3.5.3. Amplificación con iniciadores universales del gen 16S del ADN<sub>r</sub>

Para comprobar la calidad de los ADN<sub>s</sub> extraídos y verificar su naturaleza procariota se realizó la amplificación de una región del gen ribosomal 16S, altamente conservado en bacterias. En la figura 24, encontramos la amplificación de la banda de 996 pb

correspondiente al ADN procariota, empleando los iniciadores universales U1 y U2 (Lu y col., 2000).



**Figura 24.** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR para la amplificación de la subunidad menor del gen 16S del ADNr de procariotas utilizando los iniciadores U1 y U2. **Carril 1.** Marcador de peso molecular (1 Kb, PROMEGA). **Carril 3.** Aislado 2.7.1. **Carril 4.** Aislado 2.7.2. **Carril 5.** Aislado 2.8.2. **Carril 6.** Aislado 2.7.1 Koch. **Carril 7.** Aislado 2.7.2 Koch. **Carril 9.** *R. solanacearum*. **Carril 10.** *P. caratovorum* (LMV 29). **Carril 11.** *P. caratovorum* (LMV 31). **Carril 12.** *D. chrysanthemi*. **Carril 14.** Control de reactivos.

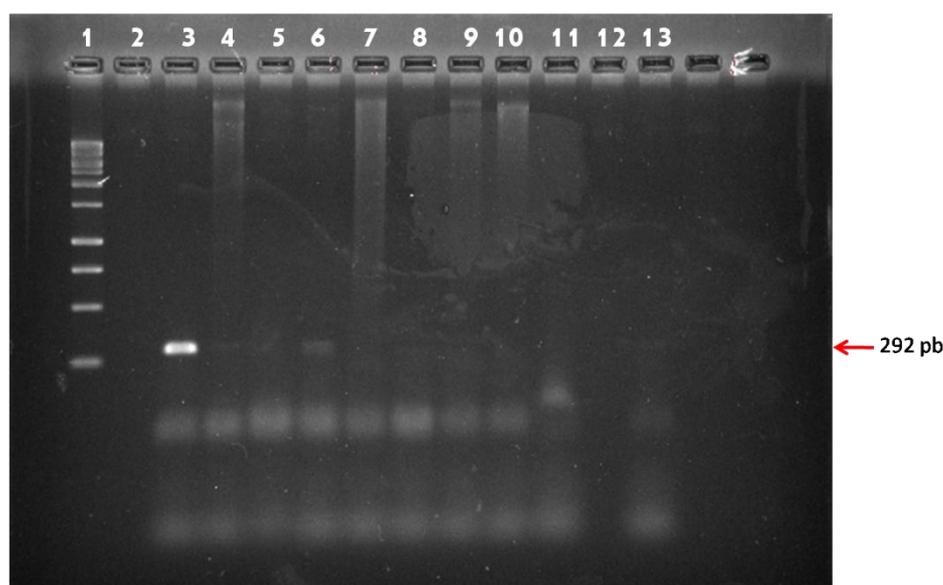
En la figura 24, podemos apreciar una banda de 996 pb de la misma intensidad en todas las muestras, la cual corresponde a un fragmento del gen de la subunidad ribosomal menor 16S corroborando así que se trata de organismos procariotas y de que el ADN tiene la calidad necesaria para ser amplificado por PCR.

El ARNr 16S actúa como un cronómetro molecular al presentar un alto grado de conservación y se caracteriza por la presencia de regiones variables especie-específicas. La secuencia del gen ARNr 16S presenta de forma aproximada 1.500 pb, y se compone de 9 zonas variables V1-V9 y zonas conservadas (Anexo 21), donde este tamaño

proporciona suficiente polimorfismo interespecífico para diferenciar y establecer medidas estadísticas válidas.

#### 5.3.5.4. PCR con iniciadores específicos

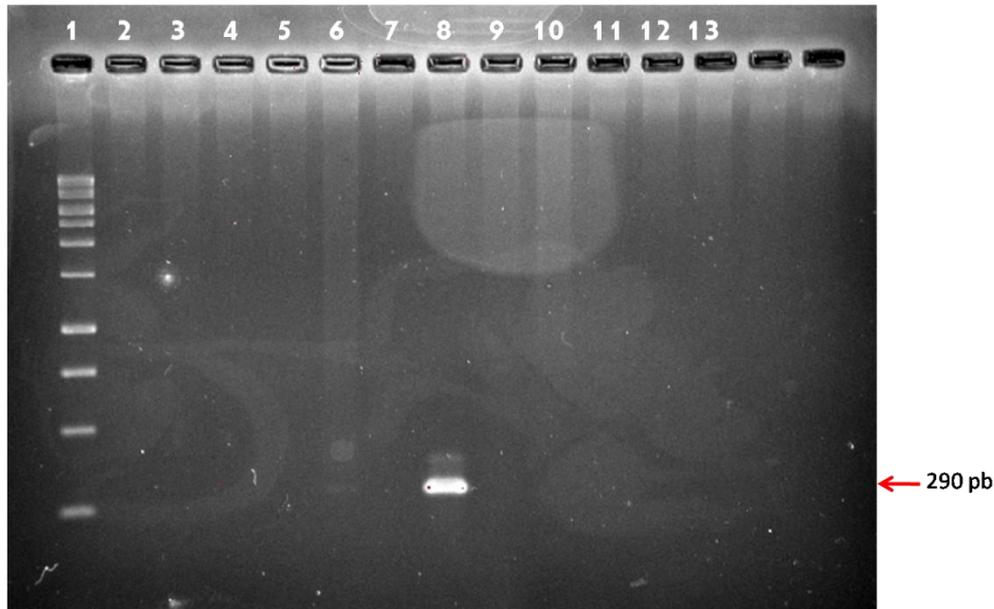
Como próximo paso hacia la identificación molecular de los aislados 2.7.1, 2.7.2 y 2.8.2 se realizaron PCRs específicas que permitieran descartar de forma definitiva que estos aislados no corresponden a *R. solanacearum*, *P. caratovorum* ni a *B. gladioli*.



**Figura 25.** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR para la detección de *R. solanacearum* utilizando los iniciadores específicos OLI1 y Y2. **Carril 1.** Marcador de peso molecular (1 Kb, PROMEGA). **Carril 3.** *R. solanacearum*. **Carril 4.** Aislado 2.7.1. **Carril 5.** Aislado 2.7.2. **Carril 6.** Aislado 2.8.2. **Carril 7.** Aislado 2.7.1 Koch. **Carril 8.** Aislado 2.7.2 Koch. **Carril 9.** *P. caratovorum* (LMV 29). **Carril 10.** *P. caratovorum* (LMV 31). **Carril 11.** *D. chrysanthemi*. **Carril 13.** Control de reactivos.

Con el propósito de detectar la presencia de ADN correspondiente a *R. solanacearum* como control positivo, se realizó la amplificación empleando los iniciadores OLI1 y Y2, según las condiciones de ciclado reportadas por Seal y col. (1992). En la figura 25, se puede observar una sola banda correspondiente al control positivo de 292 pb, lo que nos

asegura que los iniciadores son específicos para esta especie en cuestión y que entre los aislados problema ninguno corresponde a esta especie bacteriana.



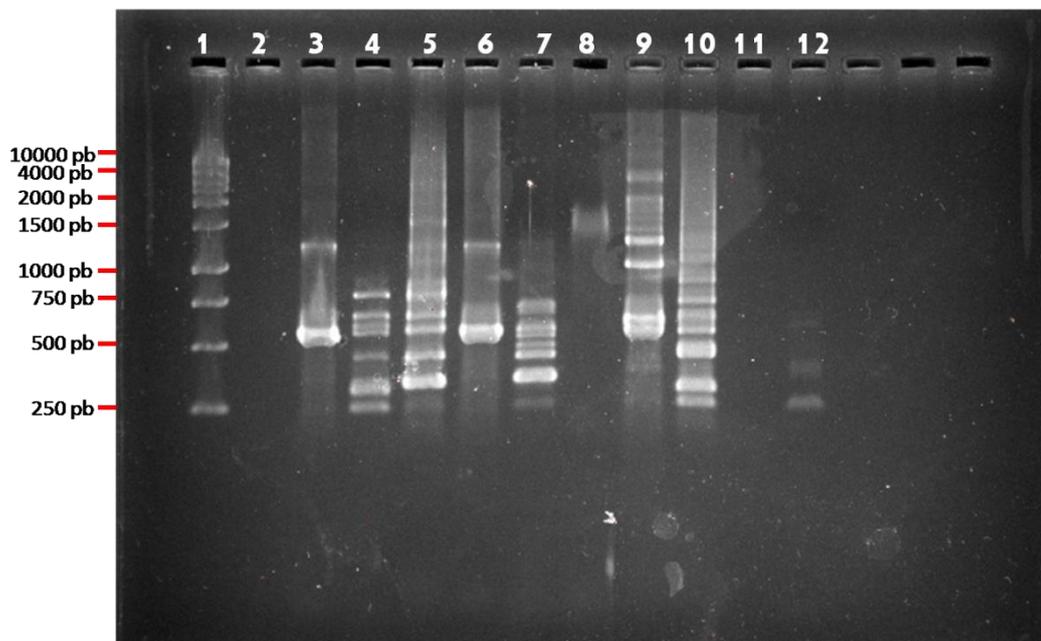
**Figura 26.** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR para la detección de *B. gladioli* utilizando los iniciadores específicos GLAf y GLAr. **Carril 1.** Marcador de peso molecular (1 Kb, PROMEGA). **Carril 3.** Aislado 2.7.1. **Carril 4.** Aislado 2.7.2. **Carril 5.** Aislado 2.8.2. **Carril 6.** Aislado 2.7.1 Koch. **Carril 7.** Aislado 2.7.2 Koch. **Carril 8.** *Burkholderia gladioli*. **Carril 9.** *R. solanacearum*. **Carril 10.** *P. caratovorum* (LMV 29). **Carril 11.** *D. chrysanthemi*. **Carril 13.** Control de reactivos.

De igual forma se procedió con los iniciadores específicos GLAf y GLAr para la detección de *B. gladioli*, donde solo se amplificó la banda de 290 pb en el control positivo de *B. gladioli* (Figura 26) confirmando que ninguno de los aislados problema corresponde a esta especie bacteriana.



**Figura 27.** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR para la detección de *P. caratovorum* utilizando los iniciadores específicos Y1pel y Y2pel. **Carril 1.** Marcador de peso molecular (1 Kb, PROMEGA). **Carril 3.** Aislado 2.7.1. **Carril 4.** Aislado 2.7.2. **Carril 5.** Aislado 2.8.2. **Carril 6.** Aislado 2.7.1 Koch. **Carril 7.** Aislado 2.7.2 Koch. **Carril 8.** *P. caratovorum* (LMV 29). **Carril 9.** *P. caratovorum* (LMV 31). **Carril 10.** *D. chrysanthemi*. **Carril 11.** *R. solanacearum*. **Carril 13.** Control de reactivos.

En la figura 27, podemos observar la amplificación del gen *pel* para pectoliasas, característico de la especie *Pectobacterium caratovorum*, el cual amplificó para el ADN de las muestras LMV 29 y LMV 31 (controles positivos) una banda de 434 pb, con las condiciones que reportaron los autores Nazerian y col. (2011), tal como lo reportó Coppola (2015). El ADN de *D. chrysanthemi* amplificó una banda de peso molecular aproximado, más cercano a 500 pb, lo cual pudo deberse a la capacidad de producir pectoliasas de esta especie bacteriana, aunque esto no se había reportado previamente. Además, se pudo confirmar que ninguna de las cepas problema corresponde a la especie bacteriana *P. caratovorum*.



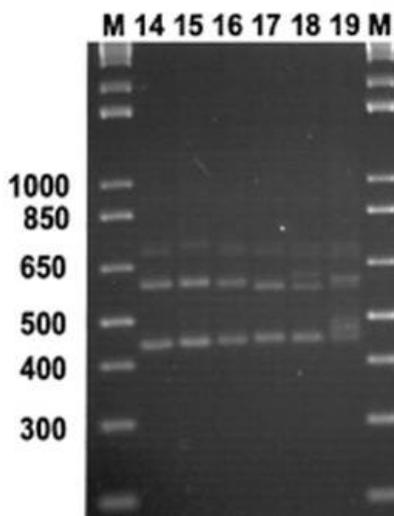
**Figura 28.** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR para la amplificación de la región espaciadora ITS utilizando los iniciadores G1 y L1. **Carril 1.** Marcador de peso molecular (1 Kb, PROMEGA). **Carril 3.** Aislado 2.7.1. **Carril 4.** Aislado 2.7.2. **Carril 5.** Aislado 2.8.2. **Carril 6.** Aislado 2.7.1 Koch. **Carril 7.** Aislado 2.7.2 Koch. **Carril 8.** *R. solanacearum*. **Carril 9.** *P. caratovorum* (LMV 29). **Carril 10.** *D. chrysanthemi*. **Carril 12.** Control de reactivos.

Finalmente, para la identificación molecular de los aislados problemas, los ADNs se amplificaron con los iniciadores G1 y L1, bajo las condiciones descritas por Toth y col. (2001), procedimiento capaz de discriminar entre las subespecies de *P. caratovorum* obteniendo un patrón de bandas para cada una de ellas.

El patrón de bandas observado en el carril 9 que corresponde a *Pectobacterium caratovorum* presenta un patrón similar al reportados en trabajos previos (Toth y col., 2001; Baghaee-Ravari y col., 2011; Nazerian y col., 2011; Golkhandan y col., 2013) (Figura 28, carril 9).

Toth y col. (2001) reportaron una banda de aproximadamente 450pb para *Dickeya chrysanthemi*, lo que corresponde al carril 10, como también podemos apreciar esa banda en el carril 5, correspondiente al aislado 2.8.2, identificado previamente por

pruebas bioquímicas, como especie perteneciente al género *Dickeya* sp. aunque el patrón de bandas es diferente al control positivo utilizado en el laboratorio, que sí coincide con los estudios de estos autores (Figura 29, Tabla 13).



**Figura 29.** Registro fotográfico reportado por Toth y col. (2001) ITS-PCR amplification patterns. **14.** ECHa , *E. chrysanthemi* SCRI 418; **15.** ECHb , *E. chrysanthemi* SCRI 4071; **16.** ECHc , *E. chrysanthemi* SCRI 4004; **17.** ECHd , *E. chrysanthemi* SCRI 4037; **18.** ECHe , *E. chrysanthemi* SCRI 4044; **19.** ECHf , *E. chrysanthemi* SCRI 409.

**Tabla 13.** Tamaño de bandas para las distintas *E. chrysanthemi*, causantes de pudrición blanda, por amplificación de PCR 16S-23S ITS (ITS-PCR) (Toth y col., 2001).

| <i>Erwinia chrysanthemi</i> | Bandas pb                         |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| ECHa                        | 440, 590, 690                     |
| ECHb                        | 445, 590, 720, 1170               |
| ECHc                        | 450, 590, 695                     |
| ECHd                        | 450, 580, 690                     |
| ECHe                        | 450, 575, 605, 670, 700           |
| ECHf                        | 450, 470, 490, 580, 595, 685, 710 |

El resultado de la región ITS nos permitió corroborar la identidad de los controles positivos, comprobar que los ADN reaislados con el propósito de comprobar los postulados Koch eran genómicamente idénticos a los aislados originales y descartar

definitivamente que los aislados problema pudiesen pertenecer a las especies *R. solanacearum*, *P. carotovorum* o *B. gladioli*; dando así mayor fortaleza a la identificación lograda por métodos morfológicos y bioquímicos.

### 5.3.6. Micropropagación y obtención de microtubérculos

Se inició el establecimiento con 5 microesquejes (2 yemas) de vitroplantas de la variedad Granola de papa, en medio Murashige y Skoog (1962) (MS) líquido, por cada fiola (100ml), teniendo un total de 7 fiolas, es decir 35 microesquejes. Siguiendo el protocolo establecido por Moreno y Oropeza (2017) se obtuvo el desarrollo y elongación de las 35 vitroplantas, estas se mantuvieron durante dos meses en continua agitación y fotoperiodo. Se observó contaminación en dos fiolas (10 micropesquejes).



**Figura 30.** Vitroplantas de papa variedad Granola, dos meses después de su establecimiento.

En la figura 30, se puede observar un buen crecimiento de las plantas en medio líquido con tallos alargados y hojas numerosas, coincidiendo con lo reportado por Alva y Oropeza (2013), ya que estas presentaron vigorosidad y el desarrollo de raíces, tallos y hojas. Posteriormente, se cambió el medio de cultivo MS líquido a medio de microtuberización, y de esta forma las vitroplantas regeneradas, se mantuvieron durante un mes más, continuando con el protocolo de Moreno y Oropeza (2017). Se reportó nuevamente una contaminación de dos fiolas (57, 14%). Por último, se realizó la recolección de los microtubérculos (Figura 31), obteniendo un total de 209 por quince

vitroplantas, es decir un promedio de 13,93 microtubérculos por vitroplanta de la variedad Granola.



**Figura 31.** . Microtubérculos de papa de la variedad Granola. **A.** Fiolas con microtubérculos. **B.** Recolección de microtubérculos.

Moreno y Oropeza (2017) reportaron que el fotoperiodo fue el factor determinante en la producción de microtubérculos, ya que las condiciones de días cortos inducen la formación de los microtubérculos debido a que esta condición lumínica anula los efectos inhibitorios de las giberilinas sobre la tuberización en papa. Además, que el cultivo *in vitro* de microesquejes en medios suplementados con hormonas vegetales y la incubación bajo condiciones fotoperiódicas de días cortos permite obtener microtubérculos de papa en un corto periodo de tiempo, lo cual se confirmó con la producción de microtubérculos para la posterior realización de los postulados de Koch.

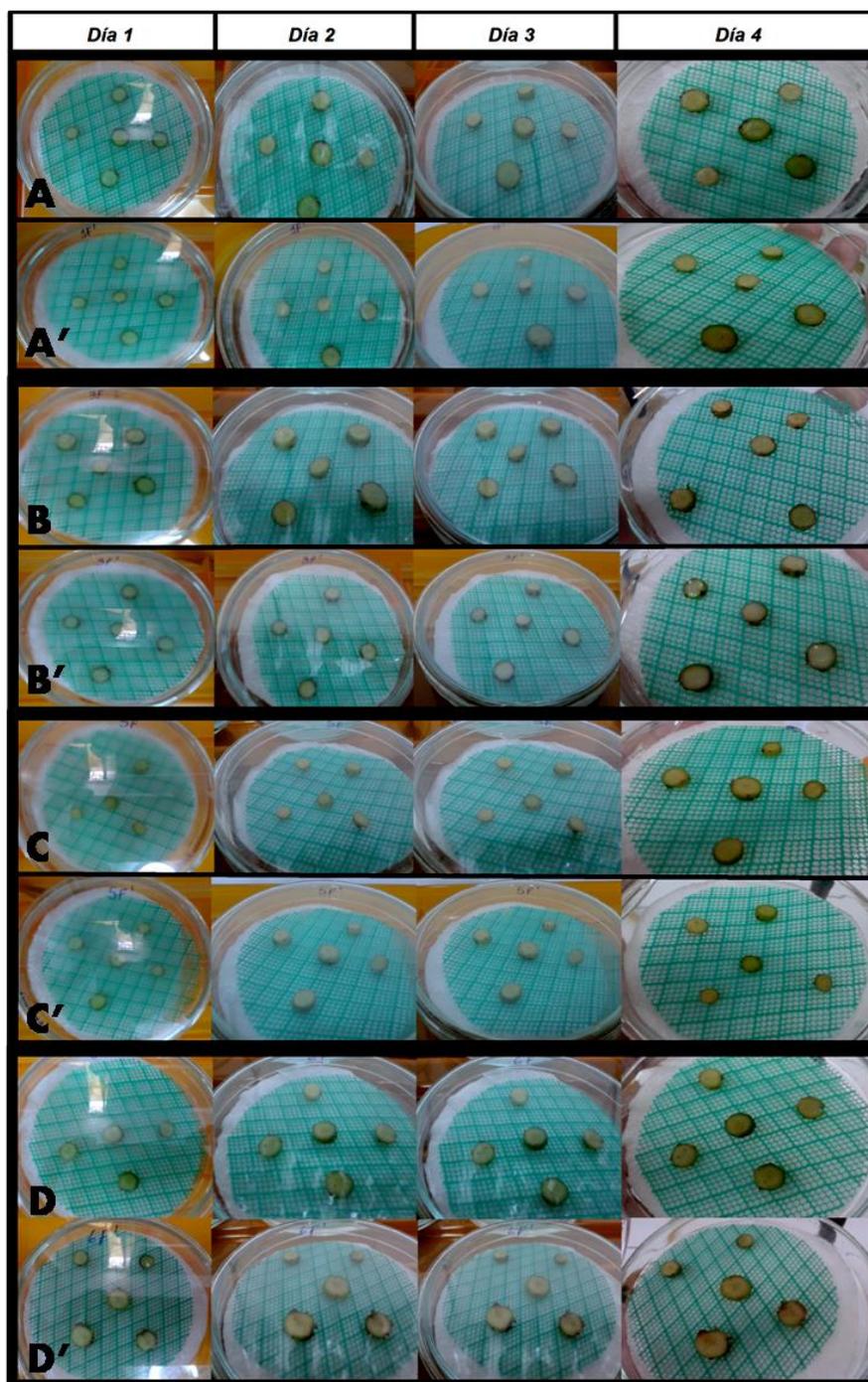
### 5.3.7. Postulados de Koch

Los postulados se diseñaron para determinar el agente causal de las enfermedades, en caso de que estas fueron causadas por microorganismos. En este trabajo, además de confirmar los postulados de Koch, de evaluará la susceptibilidad y/o resistencia de la variedad Granola de *Solanum tuberosum in vitro* y se estudiará la virulencia de los aislados bacterianos a temperatura ambiente.

Tomando en cuenta que las cepas bacterianas más importantes del cultivo de papa que están presentes en el país, son ocasionadas por las especies *R. solanacearum* y

*Pectobacterium* sp., se continuaron utilizando las cepas *R. solanacearum*, *P. caratovorum* y *D. chrysanthemi* como controles positivos con el fin de comparar la sintomatología.

El presente ensayo solo pudo cumplirse con los aislados problemas 2.7.1 y 2.7.2, además del control positivo *P. caratovorum* (Figura 32), debido a que en el reaislamiento con el resto de las muestras se obtuvieron dos cepas bacterianas en cada caso, para el aislado 2.8.2 y los controles *R. solanacearum* y *D. chrysanthemi*, tal problema pudo deberse a una contaminación previa de los caldos y por ende, la inoculación no se realizó de la forma adecuada, evitando cumplir los postulados para estas últimas muestras, pues no se podrían referir los síntomas observados a los inoculos mencionados, por lo mismo no se tomó como resultados. Sin embargo, las cepas obtenidas a través del ensayo fueron denominadas 2.7.1 Koch y 2.7.2 Koch, para los aislados 2.7.1 y 2.7.2, respectivamente.



**Figura 32.** Evidencia fotográfica de los postulados de Koch en rodajas de microtubérculos de papa variedad Granola. **Placas A y A'**. Control negativo, Caldo LB. **Placas B y B'**. Control positivo, *Pectobacterium carotovorum*. **Placas C y C'**. Aislado 2.7.1. **Placas D y D'**. Aislado 2.7.2.

Las cepas 2.7.1 Koch y 2.7.2 Koch fueron identificadas bioquímica y molecularmente de la misma forma los aislados iniciales, comprobando que se trata de las mismas cepas bacterianas, como se observan sus resultados a continuación en la tabla 14.

**Tabla 14.** Resultados de las principales pruebas bioquímicas realizadas a los reaislados de Koch.

| Prueba                             | Aislado 2.7.1 Koch          | Aislado 2.7.2 Koch          |
|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>Crecimiento a 41°C</b>          | -                           | -                           |
| <b>Oxido-Fermentación</b>          | O+/F-                       | O-/F-                       |
| <b>Kliger</b>                      | Glu+/Lac-/H <sub>2</sub> S- | Glu-/Lac-/H <sub>2</sub> S- |
| <b>Motilidad</b>                   | +                           | +                           |
| <b>Citrato</b>                     | +                           | -                           |
| <b>Licuefacción de la gelatina</b> | -                           | +                           |
| <b>Indol</b>                       | -                           | -                           |
| <b>Reducción de nitratos</b>       | -                           | -                           |
| <b>Arginina dehidrolasa</b>        | +                           | -                           |
| <b>Agar MacConkey</b>              | Crecimiento+/Lac-           | Crecimiento-                |
| <b>Agar King B</b>                 | Fluoresceína +              | Fluoresceína -              |

### 5.3.7.1. Incidencia y severidad

La incidencia para la cepa control *Pectobacterium caratovorum* fue de un 50%, debido a que la mitad de las rodajas presentaron pudrición con un exudado lechoso y viscoso, la aparición de los mismos fue a las 24 h de inoculación, es decir el segundo día, tal como lo reporto Coppola (2015), con una severidad igual a 5, según la escala propuesta por Montanelli y col. (1995), modificada por Fonseca (2014), siendo 5 el mayor grado de severidad, y por último, un índice de enfermedad del 50%.

El aislado 2.7.1 no presentó síntomas de enfermedad en las rodajas de los microtubérculos, es decir que la incidencia fue de un 0%, y esto concuerda con los estudios preliminares de patogenicidad donde no desarrolló síntomas en los tubérculos comerciales. Por lo tanto, no es una cepa patógena, sino, como se mencionó anteriormente, *Pseudomonas putida* es una bacteria saprofita. Aunado a esto, según estudios previos y comparativos como el de Coppola (2015) la variedad Granola suele ser muy susceptible ante el ataque de patógenos.

Existe una diversidad de estudios sobre *Pseudomonas putida* debido a su importancia en biotecnología. Esto se debe, en parte, a su gran versatilidad metabólica, que le permite crecer en ambientes muy diversos y utilizar muchos compuestos diferentes como fuente de carbono y energía. Sin embargo, la asimilación de muchos de ellos está sujeta a represión catabólica, es decir, la expresión de los genes implicados en el transporte y metabolismo de estos sustratos está reprimida cuando en el medio hay otro compuesto que permite a la bacteria un crecimiento más eficiente (Hernández, 2014).

Con respecto al aislado 2.7.2 identificado inicialmente como *Acidovorax*, presentó una incidencia del 20%, ya que infectó dos rodajas de los microtubérculos, como se puede observar en la figura 32 placa D' y se reportó una severidad de 1, ya que los síntomas no abarcaban ni un 25% de la rodaja y se encontraban en los bordes, apenas con un índice de enfermedad del 4%. Son notables las grandes diferencias en comparación con *Pectobacterium caratovorum*, una cepa patógena de papa de gran importancia a nivel comercial.

Por último, los aislados cumplen los cuatro postulados de Koch donde el cuarto dice que “el organismo debe ser reaislado a partir de la planta inoculada en cultivo puro y sus características deben corresponder a las observadas en el segundo postulado”, es decir que poseen las mismas características morfológicas, bioquímicas y moleculares.

## 6. Conclusiones

- De los tubérculos de papa con síntomas de marchitez bacteriana se lograron aislar dos aislados bacterianos denominados 2.7.1 y 2.7.2 siendo bacilos gramnegativos; mientras que del tubérculo de papa con síntomas de pudrición se lograron aislar dos bacterias, de las cuales una fue grampositiva (2.8.1) y la otra gramnegativa (2.8.2).
- El aislado 2.7.1 fue identificado como una especie del género *Pseudomonas* sp. El aislado 2.7.2 fue caracterizado como *Acidovorax* sp. y el aislado 2.8.2 pertenece al género *Dickeya* sp.
- La modificación del método propuesto por Gomes y col. (2000), tal como fue la adición de CTAB 2X y  $\beta$ -Mercaptoetanol en el proceso de la extracción de ADN, rindió ADN de mejor calidad y mayor concentración. La amplificación del gen 16s *ARNr* permitió comprobar la naturaleza procariota del ADN de los aislados bacterianos en estudio.
- El uso de iniciadores específicos para las especies *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium caratovorum* y *Burkholderia gladioli* permitió confirmar que los aislados problema no pertenecían a estos géneros bacterianos.
- El uso de microtubérculos resultó ventajoso para la comprobación de los postulados de Koch pues garantizan que el material utilizado se encuentra inicialmente libre de patógenos, siendo entonces el organismo inoculado el único posible agente causal de la enfermedad.
- Los valores de incidencia y severidad de la enfermedad para el aislado 2.7.1 fueron nulos, lo cual concuerda con su identificación como bacteria no patógena,

mientras que el aislado 2.7.2 presento una incidencia del 20% y una severidad igual a 1.

## 7. Bibliografía

- ALVA S. y Oropeza M. 2013. Effect of culture medium consistence and silver nitrate on micropropagation of two potato (*Solanum tuberosum*) cultivars. *Revista Colombiana de Biotecnología*. **15**: 61-70.
- ALVEZ B. 2014. Análisis de la reacción de plantas de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) a la infección con *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. Tesis Doctoral. Caracas, Venezuela.
- ALVEZ B., Carballo J., Alonso G. y Oropeza M. 2011. Diagnóstico molecular de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson en Venezuela, agente causal de la escaldadura foliar de la caña de azúcar. *Agronomía Tropical*. **61**: 27-36.
- ARAGÓN C., Escalona M., Rodríguez R., Cañal M., Capote I., Pina D. y González-Olmedo J. 2010. Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. **46**: 89–94.
- ARAS S., Duran A. y Yenilmez G. 2003. Isolation of DNA for RAPD analysis from dry Leaf material of some *Hesperis L.* Specimens. *Plant Molecular Biology*. **21**: 461a–461f.
- ARTSCHWAGER E. 1920. Pathological anatomy of potato blackleg. *Journal of Agricultural Research*. **20**: 325-330.
- BAGHAEE-RAVARI S., Rahimian H., Shams-Bakhsh M., Lopez-Solanilla E., Antúnez-Lamas M. y Rodríguez-Palenzuela P. 2011. Characterization of *Pectobacterium* species from Iran using biochemical and molecular methods. *European Journal of Plant Pathology*. **129**: 413–425.
- BARKER WG. 1953. A method for the *in vitro* culturing of potato tubers. *Science*. **118**: 384–385.

- BARRIOS R. 2015. 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. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. 114 pp.
- BAYONA R. 2013. Manejo integrado de plagas y enfermedades en el cultivo de papa. Paucartambo, Cusco, Perú. 28 pp.
- BLAZEVIC D., Koepcke M., y Matsen J. 1973. Incidence and identification of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in the Clinical Laboratory. Applied Microbiology. **25**: 107-110.
- BORBA N. 2008. La papa un alimento básico. RAP-AL Uruguay. 11pp.
- BURKHOLDER WH. 1950. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. Phytopathology. **40**: 115–117.
- CAMBRA M. y Palacio-Bielsa A. 2005. Enfermedades bacterianas de la patata: Situación en Aragón. Surcos Aragón. **91**: 26-31.
- CARRASCO D. 2007. Aislamiento e identificación de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos, comprobando su actividad enzimática. Trabajo Especial de Grado. Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador. 39 pp.
- CASTILLO A. 2004. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Uruguay. 8 pp.
- CHAVARRO M., Angel D. y 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.

- CLAFLIN L.E., Ramundo B.A., Leach J.E. y Erinle I.D. 1989. *Pseudomonas avenae*, causal agent of bacterial leaf stripe on pearl millet. *Plant Disease*. **73**: 1010–1014.
- COENYE T. y Vandamme P. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology*. **5**: 719–729.
- CONTRERAS A. 2008. Historia y origen de la papa cultivada: Influencia de la papa americana en el mejoramiento de la especie a nivel mundial. Universidad Austral de Chile, Chile. *Revista ALAP'08 (Asociación Latinoamericana de Perfusión)*. 516pp.
- COMPANT S., Nowak J., Coenye T., Clément C. y Barka E. 2008. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *Federation of European Microbiological Societies*. **32**: 607–626.
- COPPOLA F. 2015. Caracterización bioquímica y molecular de bacterias aisladas de hojas de papa (*Solanum tuberosum* L.) colectadas en el valle del Río Chama, Estado Mérida, Venezuela. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- CORNEJO A., Serrato A., Rendón B. y Rocha M. 2014. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. SEMARNAT. Primera Edición. México. 257 pp.
- COX C. y Parker J. 1979. Use of 2-Aminoacetophenone Production in Identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Of Clinical Microbiology*. **9**: 479-484.
- CRESPO A., Blanco O., Cubero O., Molina M. y Cubas P. 1999. Técnicas y métodos para la iniciación en el estudio de la evolución molecular con aplicaciones especiales para el análisis de los hongos liquenizados. *Botánica Complutensis*. **23**: 13-51.
- CZAJKOWSKI R., Pérombelon M, Jafra S., Lojkowska E, Potrykus M., van der Wolf J. y Sledz W. 2015. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and

*Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. *Annals of Applied Biology*. **166**: 18-38.

- DADA O LU F. y Kotan R. 2017. Identification and characterization of *Pectobacterium carotovorum*. *The Journal of Animal and Plant Sciences*. **27**: 647-654
- DE VOS P. y De Ley J. 1983. Intra- and intergeneric similarities of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* ribosomal ribonucleic acid cistrons. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **33**: 487–509.
- DOYLE J. J. y Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*. **19**: 11-15.
- EL-FOULY M., Sharaf A., Shahin A., El-Bialy H. y Omara A. 2015. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. **8**: 36-48.
- FENNEMA O. y Tannenbaum S. 2000. Introducción a la química de los alimentos. Ed. Reverté SA. 1258 pp.
- FERNANDES M. 2016. Identificación de aislados bacterianos patogénicos obtenidos de hojas de papa (*Solanum tuberosum* L.) colectadas en el valle del Río Mucujún, Estado Mérida. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. 120 pp.
- FERNÁNDEZ A, García de la Fuente C., Sáez J. y Valdezate S. 2010. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Procedimientos en microbiología clínica*. **37**:9-14.
- FRENCH E. R. 1984. Marchitez bacteriana de la papa (*Pseudomonas solanacearum*) en América Latina. Centro Internacional de la papa (CIP). Seminario de Investigación y de Trabajo: "Avances en el control de la marchitez bacteriana (*P. Solanacearum*) de la

papa en América Latina: Reunión de planeamiento", realizado en Brasilia Agosto 31 Sept. 3, 1982. 121 pp.

- 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. 305 pp.
- FORBES B.A., Sahn D.F. y Weissfeld A.S. 2009. Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana, Doceava Edición, Buenos Aires, Argentina. 1160 pp.
- FRAGA J., Rodríguez J., Fuentes O., Castex M. y Fernández-Calienes A. 2004. Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar. Revista Cubana de Medicina Tropical. **56**: 208-13.
- FURUYA N., Ura H., Liyama K., Matsumoto M., Takeshita M. y Takanami, Y. 2002. Specific oligonucleotide primers based on sequences of the 16S-23s ADNr spacer region for the detection of *Burkholderia gladioli* by PCR. Journal of General Plant Pathology. **68**: 220-224.
- GALLARDO M., Mogollón N., Piñero Z. y Hernández N. 1997. Densidad de plantas en la producción de tubérculos semillas de papa (*Solanum tuberosum* L.) a partir de microtubérculos en invernáculos. Jornadas de Investigación del Decanato de Agronomía de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Barquisimeto, Venezuela. 10 pp.
- GANDARILLAS A. y Ortuño N. 2009. Compendio de enfermedades, insectos, nemátodos y factores abióticos que afectan el cultivo de papa en Bolivia. Fundación PROINPA. Cochamba-Bolivia. 182pp.
- GARDAN L., Dauga C., Prior P., Gillis M. y Saddler G.S. 2000. *Acidovorax anthurii* sp. nov., a new phytopathogenic bacterium which causes bacterial leaf-spot of

- anthurium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **50**: 235–246.
- GOLDMAN H. y Green L. 2009. *Practical handbook of microbiology*. Taylor and Francis Group. Boca Raton. 855pp.
  - GOLKHANDAN E., Kamaruzaman S., Sariah M., Zainal M. y Nasehi A. 2013. Characterization of Malaysian *Pectobacterium* spp. from vegetables using biochemical, molecular and phylogenetic methods. *European Journal of Plant Pathology*. **137**: 431-443.
  - GOMES L., Roncato K., Andrino F. y Almeida F. 2000. A simple method for DNA isolation from *Xanthomonas* spp. *Scientia Agricola*. **57**: 553-555.
  - GONZÁLEZ I., Arias Y. y Peteira B. 2009. Interacción planta-bacterias fitopatógenas: caso de estudio *Ralstonia Solanacearum*-plantas hospedantes. *Protección Vegetal*. **24**: 69-80.
  - GOPAL J., Minocha J.L. y Dhaliwal H.S. 1998. Microtuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Reports*. **17**: 794–798.
  - GOTO M. 1983. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci* subsp. nov., the causal agent of bacterial leaf blight of konjac (*Amorphophallus konjac* Koch). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **33**: 539–545.
  - HERNÁNDEZ S. 2014. Regulación del metabolismo del carbono en *Pseudomonas putida* Estrategia del sistema regulador formado por la proteína crc y los srnas crcz y crcy. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España. 240 pp.
  - HONORE´-BOUAKLINE S., Vincensini J., Giacuzzo V., Lagrange P. y Herrmann J. 2003. Rapid diagnosis of extrapulmonary Tuberculosis by PCR: Impact of sample preparation and DNA extraction. *Journal of Clinical Microbiology*. **41**: 2323–2329.

- HUSSEY G. y Stacey N.J. 1984. Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Annals of Botany*. **53**: 565-578.
- IGARZA CASTRO J., Agramonte D., Alvarado-Capó Y., de Feria M y Pugh T. 2012. Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. *Biotecnología Vegetal*. **12**: 3–24.
- INOSTROZA J. 2009. Manual de papa para La Araucanía: Manejo y plantación. INIA Carillanca. Temuco, Chile. Boletín N° 193.114 pp.
- JENSEN M., Webster J., Straus N. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction – amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *American Society for Microbiology*. **59**: 945 – 952.
- LEE Y.A. y Yu C.P. 2005. A differential medium for the isolation and rapid identification of a plant soft rot pathogen, *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Microbiological Methods*. **64**: 200–206.
- LEHNINGER A. 1982. *Biochemistry*. Worth Publishers. New York, EE.UU. 1011 pp.
- LEVITUS G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E. y Mroginski L. 2010. *Biología y Mejoramiento Vegetal II*. INTA. Argentina. 648 pp.
- LODWYCKX C., Megeay M., Vangronsveld J., Clijsters J. y van der Lelie D. 2002. Isolation, characterization and identification of bacteria associated to the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* subsp. *calaminaria*. *International Journal of Phytoremediation*. **4**: 101-115.
- LOPES S., Damann K. y Grelen L. 2001. *Xanthomonas albilineans* diversity and identification based on rep-PCR fingerprints. *Current Microbiology*. **42**: 155–159.
- LU J., Perng C., Lee S. y Wan C. 2000. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. **38**: 2076–2080.

- MAC FADDIN F. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Panamericana, Argentina. 850pp.
- MADIGAN M., Martinko J., Dunlap P. y Clark D. 2009. Biología de los Microorganismos. Pearson Educación, S.A. 1296 pp.
- MÉNDEZ P. e Inostroza J. 2009. Manual de papa para La Araucanía: Manejo de cultivo, enfermedades y almacenaje. INIA Carillanca. Temuco, Chile. Boletín N° 194. 116 pp.
- MIGULA N. 1894. Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe. **1**: 235–238.
- MONTANELLI C., Chiari A., Stefanini F. y Nascari G. 1995. Evaluation of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato under controlled conditions. *Euhytica*. **81**: 35-43.
- MORENO M. y Oropeza M. 2017. Efecto de las hormonas vegetales y el fotoperiodo en la producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Revista Colombiana de Biotecnología*. **19**: 29-38.
- MURASHIGUE T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology*. **15**: 173-197.
- MURRAY M. y Thompson W. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*. **8**: 4321-4326.
- NAZERIAN E. y Sijam K. 2011. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* causing a new soft rot disease on okra in Malaysia. *Journal of General Plant Pathology*. **77**: 292–294.
- PALLERONI N., Kunisawa R., Contopoulou R. y Doudoroff M. 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International journal of systematic bacteriology*. **23**: 333–339.

- PEIX A., Ramírez M. y Velázquez E. 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. Elsevier. **9**: 1132-1147.
- PÉROMBELON M. 2002. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: an overview of pathogenesis. Plant Pathology. **51**: 1–12
- PÉROMBELON M. y van der Wolf J. 2002. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual. Scottish Crop Research Institute Annual Report **10**.
- PITMAN A., Wright P., Galbraith M. Y Harrow S. 2008. Biochemical and genetic diversity of pectolytic enterobacteria causing soft rot disease of potatoes in New Zealand. Australasian Plant Pathology. **37**: 559–568.
- POTRYKUS M., Golanowska M., Sledz W., Zoledowska S. y Motyka A. 2016. Biodiversity of *Dickeya* spp. isolated from potato plants and water sources in temperate climate. Plant Disease. **100**: 408-417.
- RINCONES L. 2009. Detección y caracterización molecular de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* y *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* variedad Fuscans patógenos en frijol (*Phaseolus sp.* L.), mediante análisis de Secuencias Consenso Intergénicas Repetidas Enterobacteriales (ERIC) y Secuencias en Mosaico del Elemento Box (BOX). Tesis. Universidad Nacional. Colombia. 81 pp.
- RIVERA G. 2007. Conceptos Introductorios a la Fitopatología. Primera Edición. Euned. 346 pp.
- RODICIO M. y Mendoza M. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. **22**: 238-245.

- ROTT P. y Chagvardieff P. 1987. *In vitro* reactions of sugarcane (*Saccharum* sp.) plantlets inoculated with 2 strain of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. Plant cell, Tissue and Organ Culture. **9**: 9-18.
- RUBIO. A. y Kirk W. 2008. Efecto de la temperatura y fotoperiodo sobre la fisiología de la planta y susceptibilidad al tizón tardío de la papa. Revista ALAP'08 (Asociación Latinoamericana de Perfusión). 516pp.
- SAMBROOK J. y Russell D. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Second Edition. New York, USA. 1546 pp.
- SAWANA A., Adeolu M. y Gupta R. 2014. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. Front Genet. **5**: 429.
- SCHAAD N., Jones J. y Chun W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS PRESS. Third Edition. Minnesota, USA. 350 pp.
- SCHAAD N., Sowell G. Jr., Goth R., Colwell R. y Webb R. 1978. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *Citrulli* subsp. nov. International journal of systematic bacteriology. **28**: 117–125.
- SEAL L., Jackson J. y Young W. 1992. Use of tARN consensus primer to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by Polimerase Chain Reaction amplification. Applied and Environmental Microbiology. **58**: 3759-3761.
- STARR M.P., Cosens G. y Knackmuss H.J. 1966. Formation of the blue pigment indigoidine by phytopathogenic *Erwinia*. Applied Microbiology. **14**: 870–872.
- SUÁREZ-MORENO Z., Caballero-Mellado J., Coutinho B., Mendonça-Previato L., y James E. y Venturi V. 2012. Common Features of Environmental and Potentially Beneficial Plant-Associated *Burkholderia*. Microbial Ecology. **63**:249–266.

- TEL-ZURI N., Abbo S., Myslabodski D. y Mizrahi Y. 1999. Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). *Plant Molecular Biology*. **17**: 249–254.
- TOTH I., Avrova A. y Hyman L. 2001. Rapid identification and differentiation of the soft rot *Erwinias* by 16S-23S Intergenic Transcribed Spacer-PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism analyses. *American Society for Microbiology*. **67**: 4070–4076.
- TOTH I., van der Wolf J., Saddler G., Lojkowska E., Hélias V., Pirhonen M., Tsror L. y Elphinstone J. 2011. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology*. **60**: 385–399.
- VARGAS-FLORES T. y Kuno-Vargas A. 2014. Morfología bacteriana. *Revista de Actualización Clínica*. **49**: 2594-2598.
- VIDAVER A.K y Lambrecht P.A. 2004. Las bacterias como patógenos vegetales. *The Plant Health Instructor*.
- WAGNER D., Furnier G., Saghay-Marroof M., Williams S., Dancik B. y Allard R. 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. **84**: 2097-2100.
- WANG P. y Hu C. 1982. *In vitro* mass tuberization and virus free seed potato production in Taiwan. *American Journal of Potato Research*. **59**: 33–37.
- WILLEMS A., Goor M., Thielemans S., Gillis M., Kersters K. y De Ley J. 1992. Transfer of several phytopathogenic species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *Avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci* *International journal of systematic bacteriology*. **42**: 107–119.

- XU G., Ma H., Nei M. y Kong H. 2009. Evolution of F-box genes in plants: Different modes of sequence divergence and their relationships with functional diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **106**: 835-40.
- YABUUCHI E., Kosako Y., Oyaizu H., Yano I., Hotta H., Hashimoto Y. y col. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderiacepacia*. *Microbiology and Immunology*. **36**: 1251–1275.
- YABUUCHI E., Kosako Y., Yano I., Hotta H. y Nishiuchi Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen nov. proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiology and Immunology*. **39**: 897–904.
- ZUNO-FLORIANO F., Estrada-de los Santos P., Gallegos-Infante J., Rocha-Gúzman N., Aldana-Madrid M., Virgen-Calleros G., Miller M. y Muñoz-Ruiz C. 2009. Producción *in vitro* de plántula de papa inoculada con *Pseudomonas* sp. *Terra Latinoamericana*. **27**: 207-217.

#### **Consultas en línea:**

- Enlace 1: ACUÑA I. 2017. Sarna común y sarna ácida. INIA Remehue. Disponible en: <http://www.inia.cl/wp-content/uploads/FichasTecnicasSanidadVegetal/Ficha%2047%20Sarna%20comun%20y%20sarna%20acida.pdf> [consulta: 26 de Marzo del 2018].
- Enlace 2: GONZALEZ L., Araujo Y., Salas J., Lugo Z., Gómez D., Pichardo J., Osorio M., Gordones G., Montilla M., y Porrás E. 2016. Variedades de papa venezolana.

Disponible en:[http://www.sian.inia.gob.ve/inia\\_divulga/divulga\\_34/rid34\\_gonzalez\\_27-32.pdf](http://www.sian.inia.gob.ve/inia_divulga/divulga_34/rid34_gonzalez_27-32.pdf) [consulta: 04 de Abril del 2018].

- Enlace 3: VIDAVER A., Lambrecht P. 2004. Bacteria as Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*.  
<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/Bacteria.aspx>[consulta: 15 de Marzo del 2018].
- Enlace 4: <http://www.fao.org/potato-2008/es/lapapa/IYP-6es.pdf>[consulta: 04 de Abril del 2018].
- Enlace 5: <http://theorganicfarmer.org/Articles/bacterial-wilt-big-threat-potato-growing>[consulta 01 de Abril del 2018].
- Enlace 6:<https://www.invasive.org/collections/viewcollection.cfm?id=700> [consulta 01 de Abril del 2018].
- Enlace 7: <http://www.fedeagro.org/produccion/default.asp>[consulta: 26 de Marzo del 2018].
- Enlace 8:  
[http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a2ed5a58f4ee.pdf](http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2ed5a58f4ee.pdf)  
[consulta: 07 de Agosto del 2018].
- Enlace 9:  
[http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a296bd519987.pdf](http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a296bd519987.pdf)  
[consulta: 15 de Septiembre del 2018].
- Enlace 10: <http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/ES-PA-257018.pdf> [consulta: 15 de Septiembre del 2018].

## 8. Anexos

### Anexo 1. Caldo LB.

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Triptona             | 10g/L |
| Extracto de levadura | 5g/L  |
| Cloruro de sodio     | 5g/L  |

### Anexo 2. Agar LB.

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Triptona             | 10g/L |
| Extracto de levadura | 5g/L  |
| Cloruro de sodio     | 5g/L  |
| Agar                 | 16g/L |

### Anexo 3. Medio para punción.

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Triptona             | 10g/L |
| Extracto de levadura | 5g/L  |
| Cloruro de sodio     | 5g/L  |
| Agar                 | 6g/L  |

#### **Anexo 4. Medio Murashige y Skoog (1962) sólido.**

Al medio no se le añaden hormonas vegetales y se le ajusta el pH a 5.6. Posteriormente, el medio se esteriliza en autoclave a 120<sup>o</sup>c, 15 libras de presión, durante 20 minutos.

| <b>Nombre</b> | <b>Constituyente</b>                               | <b>Concentración del stock g/l</b> | <b>Vol. Del stock. Para 1 lt de medio</b> | <b>Concentración final en el medio mg/l</b> |
|---------------|--|------------------------------------|---|---|
| <b>A</b>      | NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                    | 82,5                               | 20  | 1650  |
| <b>B</b>      | KNO <sub>3</sub>                                   | 95,2                               | 20  | 1900  |
| <b>C</b>      | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                     | 1,24                               | 5   | 6,2   |
|               | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                    | 34,0                               |   | 170,0                                       |
|               | KI   | 0,166                              |   | 0,83  |
|               | Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,050                              |   | 0,25  |
|               | CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O              | 0,005                              |   | 0,025                                       |
| <b>D</b>      | CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O               | 88                                 | 5   | 440   |
| <b>E</b>      | MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O               | 74,0                               | 5   | 370,0                                       |
|               | MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O               | 4,46                               |   | 22,3  |
|               | ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O              | 1,72                               |   | 8,6   |
|               | CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O               | 0,005                              |   | 0,025                                       |
| <b>F</b>      | Na <sub>2</sub> EDTA                               | 3,72                               | 10  | 37,2 27,8                                   |
|               | FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O               | 2,76                               |   |   |
| <b>G</b>      | Tiamina  | 0,08                               | 5   | 0,4   |
|               | Mio-inositol                                       |                                    |   | 8 g/l                                       |
|               | Agar o GELRITE                                     |                                    |   | 8 o 2 g/l                                   |

#### **Anexo 5. Medio Murashige y Skoog líquido.**

Igual composición del medio Murashige Skoog sólido (Anexo 5), sin añadirle el agar.

#### **Anexo 6. Medio de tuberización.**

Igual composición que el medio Murashige y Skoog líquido, pero con 50g/L de sacarosa y 5mg/L de benciladenina.

**Anexo 7.** Agar Simons Citrato.

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Citrato de sodio    | 2g/L    |
| Cloruro de sodio    | 5g/L    |
| Fostato dipotásico  | 1g/L    |
| Fosfato moniamónico | 1g/L    |
| Sulfato de magnesio | 0,2g/L  |
| Azul de bromotimol  | 0,08g/L |
| Agar                | 15g/L   |

**Anexo 8.** Agar hierro de Kligler.

|                            |          |
|----------------------------|----------|
| Peptona de carne           | 13g/L    |
| Cloruro de sodio           | 5g/L     |
| Lactosa                    | 10g/L    |
| Tripteína                  | 10g/L    |
| Glucosa                    | 1g/L     |
| Citrato de hierro y amonio | 0,5g/L   |
| Tiosulfato de sodio        | 0,3g/L   |
| Rojo de fenol              | 0,025g/L |
| Agar                       | 15g/L    |
| pH                         | 7,3      |

**Anexo 9.** Medio Hugh y Leifson (1953) para prueba OF.

|                    |         |
|--------------------|---------|
| Tripteína          | 2g/L    |
| Cloruro de sodio   | 5g/L    |
| Fostato dipotásico | 0,3g/L  |
| Azul de bromotimol | 0,03g/L |
| Agar               | 2,5g/L  |
| pH                 | 7,1     |

Se preparan dos tubos por cada cepa, una con parafina (anaeróbico) y otro sin parafina (aeróbico).

**Anexo 10.** Agar MacConkey.

|                                   |          |
|-----------------------------------|----------|
| Digerido pancreático de gelatina  | 17g/L    |
| Sales biliares                    | 1,5g/L   |
| Digerido péptico de tejido animal | 1,5g/L   |
| Cloruro de sodio                  | 5g/L     |
| Digerido pancreático de caseína   | 1,5g/L   |
| Cristal violeta                   | 0,001g/L |
| Lactosa                           | 10g/L    |
| Agar                              | 13,5g/L  |
| Rojo neutro                       | 0,03g/L  |
| pH                                | 7.1      |

**Anexo 11.** Licuefacción de la gelatina.

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Extracto de carne | 5g/L   |
| Peptona           | 10g/L  |
| Gelatina          | 4,8g/L |
| Cloruro de sodio  | 5g/L   |
| Agar              | 15g/L  |
| pH                | 7,2    |

**Anexo 12.** Motilidad.

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Extracto de carne | 3g/L  |
| Peptona           | 10g/L |
| Cloruro de sodio  | 5g/L  |
| Agar              | 4g/L  |

**Anexo 13.** Indol.

|                  |       |
|------------------|-------|
| Triptona         | 20g/L |
| Cloruro de sodio | 5g/L  |

**Anexo 14.** Caldo de reducción de nitratos.

|                  |       |
|------------------|-------|
| Peptona          | 10g/L |
| Cloruro de sodio | 5g/L  |
| KNO <sub>3</sub> | 1g/L  |
| pH               | 7,2   |

La prueba se revela con los compuestos  $\alpha$ -naftol al 0,5% y ácido sulfanílico al 0,8%.

**Anexo 15.** Arginina dehidrolasa.

Después de inocular el aislado bacteriano en cada tubo, se le añade una capa de parafina estéril (2-3 ml).

|                        |          |
|------------------------|----------|
| Peptona                | 5g/L     |
| Extracto de carne      | 5g/L     |
| Purpura de bromocresol | 0,1g/L   |
| Rojo cresol            | 0,005g/L |
| Fosfato de piridoxal   | 0,005g/L |
| Glucosa (dextrosa)     | 0,5g/L   |
| pH                     | 6        |

Agregar 10 g de L-arginina (1% de concentración) y medir pH. Autoclavar a 121° C por 10 min.

**Anexo 16.** Agar Kelman's TZC.

|                |       |
|----------------|-------|
| Dextrosa       | 10g/L |
| Peptona        | 10g/L |
| Casaminoácidos | 1g/L  |
| Agar           | 18g/L |

Disolver 1g de 2,3,5-cloruro de trifenil tetrazolio (triphenyl tetrazolium chloride en ingles, TZC) en 100 ml de agua destilada. Añadir 5ml/L al medio base, antes de servir.

**Anexo 17.** Agar Pseudomonas.

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Peptona             | 20g/L  |
| Cloruro de magnesio | 1,4g/L |
| Sulfato de potasio  | 10g/L  |
| Agar                | 15g/L  |
| pH                  | 7,2    |

Añadir 10 ml de glicerina antes de calentar y disolver.

**Anexo 18.** Agar Cetrimida.

Añadir 48,4 g de medio base del Agar Pseudomonas (Anexo 18) a 1 L de agua destilada estéril, disolver completamente. Luego se le agrega el CTAB y por último se mezclan 10 ml de glicerina empleando calor hasta que esté completamente disuelto el medio.

|  |        |
|--|--------|
| Peptona                                  | 16g/L  |
| Cloruro de magnesio                      | 1,4g/L |
| Hidrolizado de caseína                   | 10g/L  |
| Sulfato de potasio                       | 10g/L  |
| Bromuro de<br>cetiltrimetilamonio (CTAB) | 0,3g/L |
| Agar                                     | 11g/L  |
| pH                                       | 7,2    |

**Anexo 19.** Agar King B.

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Peptona             | 20g/L  |
| Fosfato di potásico | 1,5g/L |
| Sulfato de magnesio | 1,5g/L |
| Agar                | 15g/L  |
| pH                  | 7,2    |

Añadir 10 ml de glicerina antes de calentar y disolver.

**Anexo 20.** Clave de identificación de bacterias patógenas (Schaad y col., 2001).



**Anexo 21.** Estructura secundaria del ARNr 16S. Las hélices, comunes a todos los seres vivos y denominadas hélices universales, se numeran de la 1 a la 48 en orden de aparición a partir del extremo 5. Las hélices específicas de procariontas se indican con Pa-b, donde a es el número de la hélice universal precedente y b el número de serie. Las regiones relativamente conservadas se presentan en negrilla. Las regiones variables, en líneas finas, se designan V1-V9, teniendo en cuenta que V4 es exclusiva de eucariotas. Las regiones que se muestran en líneas discontinuas sólo están presentes en un número limitado de estructuras (Fernández y col., 2010).

