



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

IDENTIFICACION DE AISLADOS BACTERIANOS
PATOGENICOS OBTENIDOS DE HOJAS DE PAPA
(*Solanum tuberosum* L.) COLECTADAS EN EL VALLE DEL
RÍO MUCUJÚN, ESTADO MÉRIDA.

Trabajo Especial de Grado. Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Mary Carmen Fernandes Pita, como requisito parcial para optar por el título de Licenciada en Biología.

Tutora: Dra. Maira Oropeza

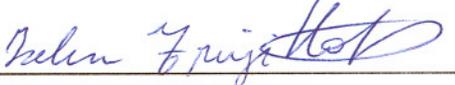
Caracas – Venezuela

Junio 2016

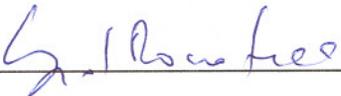
**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
DE LA Br. MARY CARMEN FERNANDES PITA**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. Mary Carmen Fernandes Pita, C.I.: 21.134.360, titulado **“Identificación de aislados bacterianos patogénicos obtenidos de hojas de papa (*Solanum tuberosum* L.) colectadas en el valle del Rio Mucujún, Estado Mérida”**, para optar al título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, al primer día del mes de Junio del año 2016, dejando constar que la Prof. Maira Oropeza actuó como coordinadora del jurado examinador.



Prof. Iselen Trujillo



Prof. Ingrid Fonseca



Prof. Maira Oropeza
(Tutora- Coordinadora)

RESUMEN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una planta herbácea que ocupa el quinto lugar dentro de los alimentos de mayor producción en el mundo. En Venezuela se cultivan principalmente las variedades 'Granola', altamente preferida en el mercado puesto que sus tubérculos pueden ser cosechados luego de 3 o 4 meses después su siembra, pero es muy susceptible a patógenos; y la variedad 'Arbolona negra' perteneciente a la subespecie *andigena*, y es resistente a ciertos patógenos; sin embargo, el tiempo de cosecha de los tubérculos puede llegar a los 9 meses después de la siembra. Dentro de los principales patógenos que afectan a los cultivos de papa en nuestro país, se encuentran el oomiceto *Phytophthora infestans* y las bacterias *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum* y *Dickeya chrysanthemi*. Adicionalmente, *Burkholderia gladioli* fue reportada recientemente en Venezuela como patógena de papa. El manejo adecuado de un cultivo comienza con el diagnóstico y caracterización de los patógenos que lo afectan, es por eso que en el presente trabajo se aislaron bacterias presentes en hojas de papa colectadas en el valle del Río Mucujún, Estado Mérida, para su posterior caracterización e identificación por pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares. De un total de 14 aislados se obtuvieron 2 patogénicos, ambos identificados por pruebas morfológicas y bioquímicas como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* o *Dickeya chrysanthemi*; y por estudios moleculares como *Dickeya chrysanthemi* al no amplificarse uno de los genes que codifican para la enzima pectato liasa característica de las Erwinias causantes de pudrición blanda. La

caracterización bioquímica y morfológica así como la sintomatología asociada a los aislados patogénicos permitieron simplificar el trabajo y evitar el gasto innecesario de reactivos, restringiendo los controles necesarios para las pruebas moleculares a *Pectobacterium carotovorum* como control positivo y *Escherichia coli* como control negativo. Finalmente se estudió la incidencia y severidad producida por los aislados en microtubérculos y hojas de vitroplantas de las variedades 'Granola' y 'Arbolona negra', mediante pruebas de patogenicidad, resultando tolerante la variedad 'Arbolona negra' a dicho patógeno. Las pruebas de patogenicidad permitieron además cumplir con los postulados de Koch. En este trabajo se identificó y caracterizó por primera vez en Venezuela a la bacteria patógena *Dickeya chrysanthemi* infectando cultivos de papa del estado Mérida. Este hallazgo repercutirá en la toma de medidas de control más efectivas de la enfermedad causada por esta bacteria (pudrición blanda) y por ende en mejoras en la producción de papa en el país.

Palabras claves: *Solanum tuberosum*, patógenos, *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium carotovorum*, *Burkholderia gladioli*, caracterización bioquímica, identificación molecular.

FINANCIAMIENTO

El desarrollo de este Trabajo Especial de Grado fue posible gracias al financiamiento obtenido por el Programa de Estímulo a la Innovación e Investigación (PEII), Proyecto N° 2012001357, así como a la infraestructura y suministros proporcionados por el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios por bendecirme con todas las bellas personas que me han apoyado y brindado su ayuda en todo momento para poder llegar a este día tan esperado.

A mis padres María Pita y Américo Fernandes, a quienes debo mi carrera, por enseñarme a luchar para alcanzar todas las metas que me proponga y jamás rendirme ante las dificultades. Por mostrarme que ante todo la sencillez y humildad siempre estarán por encima de todo.

A mis hermanos Faty y Migue, por ser unos ejemplos a seguir admirables y mostrarme que con esfuerzo y dedicación todo podemos lograrlo. Gracias por apoyarme siempre en enseñarme a soñar cada vez más alto.

A mi tutora Maira Oropeza por guiarme en todo este recorrido para lograr hacer realidad esta meta y más que una meta un sueño. Gracias por apoyarme y ayudarme en todo momento, por todo su esfuerzo y dedicación. No dudo en haber escogido la mejor persona para guiarme en este camino.

A mi amiga Francesca Coppola por compartir todos esos años de amistad en la universidad y fuera de ella, por apoyarme en todo momento y ser más que una amiga una hermana. Gracias a Anto, Tomás y Mate por acogerme en su casa incontables veces y ayudarme en todo momento.

A mi novio Daniel Moros por estar siempre allí apoyándome y motivándome a ser cada vez mejor. Gracias por hacerme olvidar esos días llenos de estrés y preocuparte siempre por mí.

A Yetsenia, Verónica, Estefanie, Carlos, Manaure, Douglas, Alí, en fin, a todas esas bellas personas que tuve la dicha de conocer en la carrera e hicieron inolvidables estos 5 años.

Gracias a toda la familia del LMV, donde conocí gente extraordinaria, Maye, Ana, Yay, Raiza, Maybe, Sandra, Bea, Ingrid, Rudy, Erick. Gracias por estar siempre allí cuando lo necesité, por ayudarme en todo momento y ser un claro ejemplo de trabajo en equipo. Gracias por todos los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, por todos los conocimientos y experiencias compartidas.

Gracias a Indira por todo tu apoyo durante todo el desarrollo de este trabajo, por siempre ayudarme incondicionalmente y estar allí cada vez que necesité tu ayuda, por ser una amiga más que dios me puso en el camino.

Finalmente quiero agradecer a una de las personas más importantes de mi vida, que a pesar que partiste al cielo, sé que de allá me cuidas junto a Dios y la Virgen. Gracias abuelita por ser la persona de más bellos sentimientos que he conocido, por mostrarme la satisfacción de ser humilde, caritativo y de siempre ayudar a los demás de manera incondicional. Gracias por mostrarme que confiando en Dios todo se puede. Gracias por permitirme cumplir otro sueño, otra meta en la que me viste iniciar y por la que me has visto luchar. Te amo, gracias por ser tan especial.

INDICE GENERAL

	Página
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. La papa	3
2.1.1. Descripción morfológica de la planta	3
2.1.2. Descripción taxonómica de la planta	4
2.1.3. Origen de la papa	5
2.1.4. Importancia de la papa a nivel mundial	5
2.2. Características e importancia del cultivo de papa en Venezuela	6
2.3. Variedades cultivadas en Venezuela	9
2.4. Bacterias patógenas que afectan a los cultivos nacionales de papa	10
2.4.1. <i>Ralstonia solanacearum</i>	12
2.4.2. <i>Pectobacterium</i> sp.	13
2.4.3. <i>Burkholderia gladioli</i>	15
2.5. Principales métodos de diagnóstico de bacterias patógenas	16
2.5.1. Caracterización morfológica	17
2.5.2. Caracterización bioquímica	19
2.5.3. Pruebas moleculares	25
2.5.3.1. Extracción de ADN bacteriano	25
2.5.3.2. PCR con iniciadores universales	27
2.5.3.3. PCR específica	29
2.5.3.4. Amplificación de la región espaciadora transcrita intergénica (ITS)	31
2.5.3.5. Caracterización de la variabilidad genética	33
2.6. <i>Micropropagación</i>	35
2.6.1. Pruebas de patogenicidad	40

2.7. Postulados de Koch	42
3. Objetivos	44
4. Metodología	45
4.1. Obtención y mantenimiento de aislados bacterianos	45
4.2. Cepas bacterianas usadas como control	46
4.3. Prueba de patogenicidad preliminar	47
4.4. Caracterización e identificación de los aislados patogénicos	48
4.4.1. Caracterización morfológica	48
4.4.2. Caracterización bioquímica	49
4.4.3. Identificación molecular	51
4.4.3.1. Extracción del ADN bacteriano	51
4.4.3.2. Cuantificación y evaluación de la calidad del ADN extraído	52
4.4.3.3. Electroforesis en gel de agarosa 0,8%	53
4.4.3.4. Amplificación con iniciadores universales del gen 16S del ADNr.	53
4.4.3.5. Amplificación con iniciadores específicos	54
4.4.3.6. Amplificación de la región espaciadora transcrita intergénica (ITS)	56
4.4.3.7. Caracterización de la variabilidad genética de los aislados LMV33 y LMV34	57
4.4.3.7.1. BOX-PCR	57
4.5. Micropropagación	58
4.5.1. Obtención de hojas de mayor tamaño	58

4.5.2. Obtención de microtubérculos	58
4.6. Pruebas de patogenicidad	59
4.6.1. Prueba de patogenicidad en microtubérculos	59
4.6.2. Prueba de patogenicidad en hojas de vitroplantas	60
4.6.3. Incidencia y severidad de la enfermedad	61
4.7. Postulados de Koch	62
5. Resultados y discusión	63
5.1. Obtención y mantenimiento de aislados bacterianos	63
5.2. Prueba de patogenicidad preliminar	63
5.3. Caracterización e identificación de los aislados patogénicos	66
5.3.1. Caracterización morfológica	66
5.3.2. Caracterización bioquímica	69
5.3.3. Identificación molecular	73
5.3.3.1. Extracción del ADN bacteriano.	74
5.3.3.2. Cuantificación y evaluación de la calidad del ADN extraído	74
5.3.3.3. Electroforesis en gel de agarosa 0,8%	76
5.3.3.4. Amplificación con iniciadores universales del gen 16S del ADNr.	77
5.3.3.5. Amplificación con iniciadores específicos	78
5.3.3.6. Amplificación de la región espaciadora transcrita intergénica (ITS)	81
5.3.3.7. Caracterización de la variabilidad genética de los aislados LMV33 y LMV34	85
5.3.3.7.1. BOX-PCR	86
5.4. Micropropagación	88

5.4.1. Pruebas de patogenicidad	90
5.4.1.1. Prueba de patogenicidad en microtubérculos	91
5.4.1.2. Prueba de patogenicidad en hojas de vitroplantas	94
5.5. Postulados de Koch	97
6. Conclusiones	99
7. Recomendaciones	101
8. Bibliografía	102
9. Anexos	117

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Solanum tuberosum</i> L.	4
Tabla 2. Resultados esperados en las pruebas bioquímicas para <i>Ralstonia solanacearum</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> y <i>Burkholderia gladioli</i> .	22
Tabla 3. Pruebas bioquímicas reportadas por Golkhandan y col. (2001) para la diferenciación de subespecies de <i>Pectobacterium carotovorum</i> y para <i>Dickeya chrysanthemi</i> .	23
Tabla 4. Pruebas bioquímicas reportadas por Baghaee-Ravari y col. (2011) para la diferenciación de subespecies de <i>Pectobacterium carotovorum</i> y para <i>Dickeya chrysanthemi</i> .	24
Tabla 5. Descripción morfológica de las colonias de los aislados patogénicos.	68
Tabla 6. Valores de densidad óptica y concentración de ADN obtenidos para los aislados patogénicos y las cepas controles.	76
Tabla 7. Valores de incidencia, severidad e índice de la enfermedad en microtubérculos para cada cepa control y aislado en las variedades 'Granola' y 'Arbolona negra'.	94
Tabla 8. Valores de incidencia, severidad e índice de la enfermedad en hojas de vitroplantas para cada cepa control y aislado en las variedades 'Granola' y 'Arbolona negra'.	96

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Características morfológicas de la planta de papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.).	4
Figura 2. Clave para identificar los géneros comunes de bacterias fitopatógenas (Schaad y col., 2001).	20
Figura 3. Morfología bacteriana.	48
Figura 4. Prueba de patogenicidad preliminar en tubérculos comerciales a las 72hpi.	65
Figura 5. Morfología bacteriana de los aislados patogénicos crecidos en medio LB sólido y YDC.	68
Figura 6. Prueba de tinción Gram para los aislados patogénicos.	70
Figura 7. Prueba de Oxido-Fermentación 48hpi para los aislados patogénicos y las cepas controles, en medio Hugh y Leifson suplementado con glucosa 10%.	71
Figura 8. Crecimiento de los aislados patogénicos y las cepas controles en medio Kliger.	72
Figura 9. Crecimiento de los aislados patogénicos a 37°C.	73
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa 0,8% de los extractos de ADN obtenidos.	77
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa 1,6% de los productos de PCR para la amplificación de la subunidad menor del gen 16S del ADNr de procariontas.	78
Figura 12a. Electroforesis en gel de agarosa 1,2% de los productos de PCR para la amplificación del gen de la pectoliasa. Iniciadores: Y1 y Y2.	79
Figura 12b. Electroforesis en gel de agarosa 1,2% de los productos de PCR para la amplificación del gen de la pectoliasa. Iniciadores: Y1 y Y2.	80
Figura 13a. Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos de PCR para la amplificación de la región espaciadora ITS. Iniciadores: G1	83

y L1.	
Figura 13b. Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos de PCR para la amplificación de la región espaciadora ITS. Iniciadores: G1 y L1.	84
Figura 14. Producto de amplificación de la región ITS obtenida por Toth y col. (2001).	85
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa 1,8% de los productos de PCR con el iniciador BOXA1R.	88
Figura 16. Microtubérculos de papa de las variedades 'Granola' (A) y 'Arbolona negra' (B).	89
Figura 17. Cultivo <i>in vitro</i> de papa de las variedades 'Granola' (A) y 'Arbolona negra' (B) en medio MS líquido y semi-sólido.	90
Figura 18. Vitroplantas de papa de las variedades 'Granola' (A) y 'Arbolona negra' (B), en medio MS semi-sólido suplementado con nitrato de plata.	91
Figura 19. Prueba de patogenicidad en microtubérculos de la variedad 'Granola'.	92
Figura 20. Prueba de patogenicidad en microtubérculos de la variedad 'Arbolona negra'.	93
Figura 21. Prueba de patogenicidad en hojas de vitroplantas de papa de las variedades 'Granola' y 'Arbolona negra'.	95

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Caldo LB (Luria-Bertaini)	116
Anexo 2. Agar LB	116
Anexo 3. Medio para punción	116
Anexo 4. Agar extracto-dextrosa-CaCO ₃ (YDC)	116
Anexo 5. Medio Murashige y Skoog (1962) semi-sólido	117
Anexo 6. Medio Murashige y Skoog líquido	117
Anexo 7. Medio Hugh y Leifson (1953)	118
Anexo 8. Agar Kliger	118
Anexo 9. Matriz de datos de la severidad en microtubérculos.	119
Anexo 10. Matriz de datos de la severidad en hojas	119

1. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una planta herbácea originaria de Sudamérica, consumida en casi todo el mundo (González, 2013), ocupando el quinto lugar en producción mundial después de la caña de azúcar, el maíz, el arroz y el trigo (FAOSTAT, 2015). Pertenece a la familia de las solanáceas, género *Solanum*. Se divide en dos subespecies: la *andigena*, silvestre que tuberiza preferiblemente bajo condiciones de días cortos y que crece principalmente en los Andes, y *tuberosum*, la variedad que hoy se cultiva en todo el mundo y adaptada a días más prolongados.

Los cultivos de papa pueden verse afectados por una serie de patógenos, destacando en Venezuela el oomiceto *Phytophthora infestans* que causa el tizón tardío de la papa, y las bacterias *Ralstonia solanacearum* causante de la pudrición parda; *Pectobacterium carotovorum* y *Dickeya chrysanthemi* que causan la pierna negra y pudrición blanda en tubérculos (Kerr y col., 2009). Fonseca en el 2014 reportó otra especie bacteriana patógena de papa, aislada de una planta de pimentón en Venezuela, *Burkholderia gladioli*, siendo de gran importancia por ser patógena también de humanos.

La diseminación de estas enfermedades se da principalmente por la introducción de tubérculos infectados, incrementando el riesgo por la habilidad de los patógenos de infectar los tubérculos de forma latente, lo cual impide su detección hasta que se haya esparcido por todo el sistema de producción (Kerr y col., 2009).

En Venezuela se siembran principalmente las variedades 'Granola' y 'Arbolona negra'. La variedad 'Granola' (*S. tuberosum* subsp. *tuberosum*), es de alta preferencia en el mercado, con la limitante de su alta susceptibilidad al oomiceto *Phytophthora infestans* y otros patógenos de importancia. Por su parte, 'Arbolona negra' (*S. tuberosum* subsp. *andigena*); es resistente a las heladas y a la mayoría de las enfermedades que atacan este cultivo, sin embargo, el tiempo para su cosecha es muy largo comparado con 'Granola', por lo cual ha sido desplazada en el mercado (Moreno, 2012).

Una estrategia para evitar la infección de plantas por patógenos que pueden causar la pérdida total o parcial de los cultivos, es el cultivo de variedades resistentes o el mejoramiento de variedades, para lo cual es necesaria la identificación y caracterización de los principales patógenos que pueden afectar los cultivos, así como el estudio de la patogenicidad en las principales variedades cultivadas.

En vista de esto, en el presente trabajo se planteó identificar y caracterizar bacterias patógenas aisladas de hojas de plantas de papa colectadas en el Valle del Rio Mucujún, Estado Mérida, así como evaluar la patogenicidad, incidencia y severidad de los aislados en las variedades de papa 'Granola' y 'Arbolona negra'.

2. ANTECEDENTES

2.1. La papa

La papa es un cultivo de gran importancia tanto a nivel nacional como internacional, ocupando los primeros puestos en producción y siendo cultivado en casi todo el mundo.

2.1.1. Descripción morfológica de la planta

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una planta herbácea y perenne, que puede medir hasta 1 metro de altura. Las hojas en su madurez son compuestas imparipinadas y se disponen de forma helicoidal a lo largo del tallo. Su parte floral consta de inflorescencias cimosas, con flores púrpuras o blancuzcas de 3 a 4 cm de diámetro, con 5 sépalos y 5 pétalos unidos, y ovario súpero. El sistema radical es fibroso, ramificado y extendido superficialmente, pudiendo penetrar hasta 0,8 m de profundidad. El fruto es una baya redonda de color verde, que al madurar se torna amarilla (Moreno, 2012).

A medida que crece la planta, las hojas producen almidón, que es transferido hacia los estolones. Estos se engrosan en sus extremos terminales producto de la acumulación de almidón, formándose así los tubérculos cercanos a la superficie del suelo, que constituyen las papas propiamente dichas. Al final de la temporada de crecimiento, las hojas y tallos mueren, y los tubérculos se desprenden de los estolones, pudiendo formarse entre 5 y 20 tubérculos por planta, dependiendo de la disponibilidad de humedad y nutrientes en el suelo (CIP, 2015). Así, los tubérculos, capaces de sobrevivir al frío, pueden reproducirse cuando las

condiciones son favorables, formándose brotes a partir de los “ojos” presentes en la superficie de los tubérculos, multiplicándose vegetativamente en campo, aunque en la práctica puede también hacerse mediante semillas o esquejes.

Las papas son entonces tallos modificados que constituyen la semilla y los principales órganos de almacenamiento de la planta. Pueden presentar una forma alargada, redondeada y oblonga, y su color puede ser blanco, amarillo, violeta, rojizo, entre otros (Poehlman y Allen, 2003).

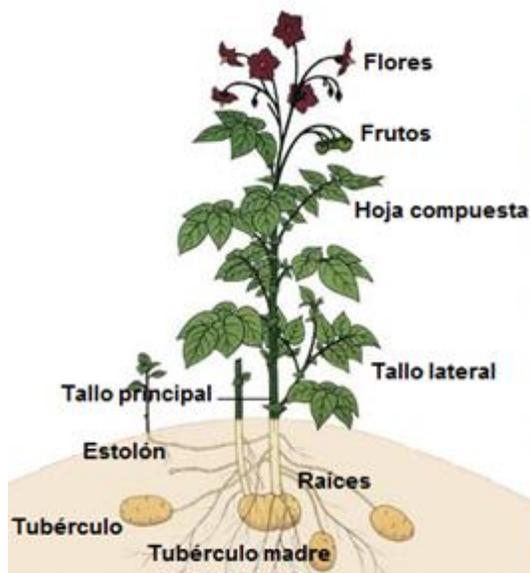


Figura 1. Características morfológicas de la planta de papa (*Solanum tuberosum* L.).
Tomado de: <http://cipotato.org/es/author/admin/>

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Solanum tuberosum* L.

Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase:	<i>Asteridae</i>
Orden:	<i>Solanales</i>
Familia:	<i>Solanaceae</i>
Género:	<i>Solanum</i>
Especie:	<i>Solanum tuberosum</i>

2.1.2. Descripción taxonómica de la planta

A nivel taxonómico esta planta se ubica dentro de la familia de las Solanáceas y el género *Solanum* (Tabla 1). Se divide en dos subespecies: subsp. *andigena*, adaptada a condiciones de días cortos y cultivada principalmente en los Andes, y

subsp. *tuberosum*, cultivada actualmente en todo el mundo y adaptada a días más prolongados (FAO, 2008; citado por Alvez, 2014).

En el mundo existen 226 especies silvestres distribuidas desde el suroeste de Estados Unidos hasta el sur de Chile, centrándose la mayoría de las especies en Perú y Bolivia. A su vez se cuentan con más de 4000 variedades, en su mayoría encontradas en los Andes Sudamericanos (CIP, 2015).

2.1.3. Origen de la papa

Según investigaciones confirmadas recientemente, el origen de la papa, especie *Solanum tuberosum*, se centra en la parte norte del lago Titicaca, sur del Perú (Spooner y col., 2005). El uso de la papa en la alimentación se inició hace aproximadamente 8.000 años (González y col., 2013), cultivándose desde el nivel del mar hasta los 4.700 m.s.n.m. (CIP, 2015). Su mayor producción se concentra en latitudes de 25 a 55 grados nortesur, es decir, en las regiones templadas del mundo (Romero, 2007).

2.1.4. Importancia de la papa a nivel mundial

Representa un cultivo de gran importancia a nivel mundial, por la cantidad de nutrientes que presentan sus tubérculos, ocupando en el año 2013, el quinto lugar en producción después de la caña de azúcar, maíz, arroz, y el trigo, con un total de 368.096 miles de toneladas (FAOSTAT, 2015), cultivándose en más de 130 países (Estrada, 2000). Entre los principales productores mundiales de papa se encuentran China, Rusia, India, Estados Unidos y Ucrania (FAOSTAT, 2013). En Sudamérica el mayor productor de este producto es Perú con el 26,6% de la

producción del total de dicha región, seguidos por Brasil, Colombia y Argentina (FAOSTAT, 2013).

2.2. Características e importancia del cultivo de papa en Venezuela

En Venezuela, la papa constituye el decimosexto producto de importancia en el país y el primero dentro de los tubérculos, centrándose su producción en la región andina, donde las condiciones son favorables para su desarrollo (Moreno, 2012).

Se cuenta con un total de 12.000 ha para el cultivo del tubérculo (Rivera, 2014), distribuido en los estados Aragua, Carabobo, Lara, Mérida, Táchira y Trujillo, concentrándose la producción en las zonas altas, a altitudes entre 2.000 y 3.899m.s.n.m., en los estados Mérida, Táchira y Trujillo (Fonseca, 2014).

La siembra de papa en el país no se inicia toda en la misma época del año, en los Estados Centrales, Aragua y Carabobo se inicia en los meses de noviembre y diciembre; en Lara y Trujillo, entre febrero a abril; y en los Estados Andinos de Mérida y Táchira, se siembra durante todo el año (Barrios, 2015), para poder asegurar la producción durante todo el año y no de manera estacional.

La producción de papa en el año 2012 aumentó en un 21% respecto al 2011, alcanzándose 169.775 toneladas (MAT, 2012), siendo el estado Mérida el que posee el mayor rendimiento, seguido por el estado Táchira. Sin embargo, según datos reportados por la Confederación de Asociaciones de Productores (FEDEAGRO), la producción en el año 2014 disminuyó 31% respecto a la obtenida en el año 2013 debido principalmente al déficit de la semilla, desabastecimiento de agroquímicos y fertilizantes, y la presencia de sequías

prolongadas en el ciclo de invierno de las zonas productoras. Todo esto ha causado la disminución de la producción nacional y la necesidad de aumentar las importaciones de semillas de papa. Sumado a esta problemática, en el año 2015 el presidente de la Federación de Productores de Papa y Hortalizas, Julio César Paredes, y el presidente de la Asociación de Productores de Papa de Carabobo, Aldemaro Ortega, indicaron que debido a unas semillas importadas que llegaron a sus manos en mal estado y además a que se le quitó el subsidio de los fertilizantes, la producción nacional disminuyó (Graffe, 2015).

La disminución de la producción nacional de papa en los últimos años ha ocasionado que la necesidad de semilla de papa certificada en el país aumente de 16 a 32 mil toneladas/año, siendo en la actualidad importada principalmente de Canadá, Alemania, Holanda, Argentina, y en menor proporción de Colombia (Fonseca, 2014).

Estas semillas importadas son sometidas a condiciones inestables de temperatura, humedad, entre otras, desde su adquisición hasta su siembra, presentándose la posibilidad que estas se infecten por patógenos y así se infecten los campos de cultivo. Además, el costo de estas semillas importadas han venido incrementando, lo cual ha afectado seriamente la producción de papa, reflejándose en el elevado costo del producto, baja rentabilidad y también en una disminución importante del área sembrada anualmente en ciertas regiones del país (Barrios, 2015).

Considerando esta y otras desventajas de la importación de semillas, así como para garantizar la calidad y cantidad de la producción nacional, se ha buscado producir en el país nuestra propia semilla certificada de papa, para lo cual en el año 2015 se publicó la Ley de Semillas en Venezuela, el cual tiene como objetivo promover la producción y certificación de semillas a nivel nacional así como su distribución y comercialización, a fin de consolidar la soberanía alimentaria. Para esto se propone en dicha ley la creación del Instituto Nacional de Semillas (INASEM) que se encargará de la certificación de semillas e incentivación de espacios de producción, prohibiendo la modificación genética de semillas (semillas transgénicas).

En el año 2014 se inauguró en el Estado Mérida el Laboratorio de Centro Biotecnológico para la Producción de semillas agámicas, en el cual se producen semillas de papa nativa sanas, para así rescatar nuestra papa nativa y disminuir los costos de producción (AVN, 2014).

Las papas nativas aparecen y se incrementan por acción de la recombinación genética espontánea, selección natural, mutaciones, migraciones y flujos de tubérculos (Ortega y col., 2005). En Venezuela las variedades nativas de papa se encuentran principalmente en los estados Mérida y Trujillo, entre los 2500 y 4000 m.s.n.m., y se caracterizan por presentar excelentes propiedades organolépticas y contenidos importantes de antioxidantes naturales, además de tolerar condiciones climáticas adversas (González y col., 2013) como la sequía, siendo entonces una opción de cultivo en zonas donde este factor es limitante, por lo que el cultivo de

variedades nativas pasa a ser beneficioso respecto al cultivo de variedades extranjeras.

2.3. Variedades cultivadas en Venezuela

En zonas con una gran diversidad, el intercambio de polen y el flujo genético es constante y continuamente surgen nuevas variedades (González y col., 2013), dando lugar a variedades resistentes a parásitos, enfermedades y condiciones climáticas, como es el caso de la variedad de papa 'Arbolona negra', resistente a *P. infestans* y a las heladas.

Romero en el 2007 indica que en Venezuela los productores de papa siembran principalmente la variedad 'Granola', procedente de Alemania. También es sembrada de manera artesanal la variedad 'Arbolona negra' (Romero, 2007), procedente del estado Mérida, y en menor proporción, se cultivan otras variedades tales como Caribay, Diacol capiro, Monserrate, Atlantic, Kennebec, Alpha, entre otras (Romero, 2007).

La variedad 'Granola', perteneciente al grupo *S. tuberosum* subsp. *tuberosum*, es de alta preferencia en el mercado, pero es altamente susceptible al oomiceto *P. infestans*, causante de la enfermedad del tizón tardío, y a otras plagas y factores abióticos. La planta presenta hojas medianas de color verde pálido. En los primeros 15 a 20 días presenta una formación lenta del follaje, que luego acelera su tasa de crecimiento (Moreno, 2012). Posee inflorescencias pequeñas y flores de color rojo-violeta intenso. Los tubérculos se adaptan a zonas medias y altas de cultivo de nuestro país, y pueden demorar de 3 a 4 meses para poder ser

cosechados, son de tamaño mediano a grande, forma ovalada, piel de color amarilla, pulpa amarilla clara (Salas y col., 2000). Alva (2014) y Marín (2015), demostraron la susceptibilidad de esta variedad al oomiceto *P. infestans*. Fonseca (2014), demuestra que esta variedad es susceptible a las bacterias *Burkholderia gladioli*, *Ralstonia solanacearum* y *Pectobacterium carotovorum*, causantes de pudrición en tubérculos (Coppola, 2015).

Por su parte, 'Arbolona negra' pertenece al grupo *S. tuberosum* subsp. *andigena*. La flor es de color morado intenso y la planta es muy resistente a las heladas. Los tubérculos tienen una corteza de color oscuro y son resistentes a la mayoría de las enfermedades que atacan este cultivo, principalmente al ataque de *P. infestans*. Alva (2014), reportó un gen de resistencia en esta variedad para dicho patógeno, y Fonseca (2014) observó una menor susceptibilidad a especies bacterianas como *Ralstonia solanacearum*. Los tubérculos de esta variedad son de alta calidad y pueden permanecer en almacenamiento por varios periodos de tiempo sin dañarse (Romero y Monasterio, 2008); sin embargo, por su maduración tardía (7 o 9 meses), esta variedad ha sido reemplazada en el campo (Moreno, 2012).

2.4. Bacterias patógenas que afectan a los cultivos nacionales de papa

Los cultivos de papa a nivel mundial pueden verse afectados por factores abióticos dentro de los cuales se consideran las condiciones climáticas básicamente, y también por factores bióticos dentro de los cuales se encuentran patógenos virales, hongos y bacterias, y también las plagas dentro de las cuales se mencionan los insectos que causan daños al cultivo.

Cada uno de estos patógenos y plagas causan síntomas distintos en las plantas. Los virus se caracterizan por causar una reducción en el tamaño de los tejidos, disminución del número de tubérculos, y deformaciones y rajaduras en los tubérculos. Los hongos pueden ocasionar manchas húmedas marrones en hojas y tallo, manchas secas marrones en la superficie de los tubérculos, manchas oscuras en hojas con apariencia de anillos internos, deformaciones sobre los tubérculos, entre otras. Las bacterias pueden causar secreciones dentro y en los ojos de los tubérculos, pudrición, marchitez y muerte de la planta, entre otras. Por su parte, los insectos pueden producir túneles en los tubérculos, agujeros en las hojas, plegamiento de los bordes de las hojas, entre otros.

El patógeno que ha causado mayores pérdidas de los cultivos de papa a nivel mundial es el oomiceto *Phytophthora infestans* causante del tizón tardío de la papa. Este patógeno destruye hojas, tallos y tubérculos en todas las áreas paperas del mundo (Torres, 2002). Seguido a este tenemos también dos patógenos bacterianos de gran importancia: *Ralstonia solanacearum*, causante de la marchitez bacteriana que produce pérdidas graves en regiones tropicales, subtropicales y templadas del mundo; y *Pectobacterium carotovorum*, que causa la pierna negra y/o la pudrición blanda de los tubérculos (CIP, 1995). En nuestro trabajo, dado los síntomas que presentaban las muestras de hojas colectadas, además consideraremos a una bacteria fitopatógena de gran importancia en la familia de las solanáceas, *Burkholderia gladioli*, reportada como patógena de papa en Venezuela por Fonseca (2014).

2.4.1. *Ralstonia solanacearum*

Causa la marchitez parda de la papa, una de las enfermedades más importantes del mundo para este cultivo, especialmente en regiones tropicales y subtropicales (Stead, 1999). Es un patógeno vascular que afecta el transporte de agua de las raíces a las hojas, resultando en la obstrucción de los vasos xilemáticos (Lopes y Boiteux, 2012). Esta bacteria tiene la particularidad de sobrevivir por mucho tiempo en el suelo (García y col., 1999).

En el campo, se produce el marchitamiento de toda o de partes de la planta, enanismo y amarillamiento del follaje, en la parte aérea. En tallos jóvenes pueden observarse rayas a través de la epidermis correspondiente a los haces vasculares infectados. En los tubérculos infectados, al hacerle un corte transversal, presentan una coloración parduzca en el anillo vascular, del cual sale un mucílago al hacerle presión (Hooker, 1980; Martín y French, 1985, citado por García y col., 1999).

Cuenta con un genoma bipartita de 5.8 Mb organizado en dos replicones, un cromosoma de 3.7Mb y un megaplásmido de 2.1Mb (Salanoubat y col., 2002. Citado por Fonseca, 2014).

Son bacilos gram negativos, oxidasa y catalasa positivos, presentan reducción de nitrato, usan el citrato como única fuente de carbono, no crecen a 40°C y son negativos para la arginina dihidrolasa, para la fermentación de glucosa y lactosa, para la licuefacción de gelatina e hidrólisis de almidón. Forman colonias aeróbicas, mucoides, color beige (Schaad y col., 2001), convexas, de superficie lisa y borde irregular en medio YDC, (García y col., 1999; Chavarro y col., 2004).

2.4.2. *Pectobacterium* sp.

El género *Pectobacterium* se ha dividido en numerosas especies y subespecies incluyendo *P. carotovorum* subsp *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp *oderiferum*, *P. brasiliensis*, *P. carotovorum* subsp. *betavasculatorum*, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, y *P. wasabiae*, con base en las diferencias bioquímicas y moleculares y de rango de hospedero (Golkhandan y col., 2013).

Solo tres especies de *Erwinia* han sido reportadas para papa en Venezuela: *Pectobacterium atrosepticum* (anteriormente *E. carotovora* subsp. *atroseptica*) restringida a climas fríos; *Dickeya chrysanthemi* (anteriormente *E. chrysanthemi*), patógena de numerosos cultivos tropicales y sub-tropicales; y *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (anteriormente *E. carotovora* subsp. *carotovora*), distribuida en zonas tropicales y templadas (García, 2000; Charkowski, 2015). Estos tres patógenos pueden causar pudrición blanda en los tubérculos infectados, pero solo *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y *D. chrysanthemi* causan pierna negra. *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* causa pierna negra a temperaturas menores a 25°C; mientras que *D. chrysanthemi* lo hace a temperaturas mayores (Pérombelon, 2002).

P. carotovorum es un patógeno que ingresa por la raíz de la planta o mediante insectos, coloniza el xilema y produce grandes cantidades de enzimas degradadoras de la pared celular de las hojas, tallo, raíces y tubérculos (Charkowski, 2015). En los tubérculos infectados aparecen manchas húmedas de color café crema y de mal olor, pudiendo llegar a la descomposición completa del tubérculo. A este síntoma se le llama pudrición blanda (Montesdeoca y col., 2013).

Contrario a *R. solanacearum*, las bacterias del género *Pectobacterium* sobreviven poco en el suelo pero pueden hacerlo en el agua. Puede dispersarse por varios mecanismos como agua, semilla, instrumentos de trabajo e insectos (Harrison y col., 1987; McCarter-Zoner y col., 1984; citados por Charkowski, 2015).

Generalmente, *P. carotovorum* está en estado de latencia en las lenticelas de los tubérculos. El principal factor que desvía de latencia a desarrollo de la enfermedad, es la presencia del agua en los tubérculos, lo cual dispara una cascada de eventos que conducen a la llegada de la pudrición. La formación de una película de agua conduce, dependiendo de la temperatura, a anaerobiosis dentro del tubérculo, lo cual disminuye el oxígeno dentro de los tubérculos. Las condiciones anaeróbicas generadas afectan los sistemas de resistencia del huésped dependientes de oxígeno (fitoalexinas, fenoles, radicales libres, etc.) e inhiben la lignificación y suberización de la pared celular que ofrecen protección a la degradación por las enzimas pécticas producidas por la bacteria y que degradan los componentes de la pared celular de las plantas (Pérombelon, 2002; citado por Barrios, 2015).

A nivel genómico, el género *Pectobacterium*, consta de un solo cromosoma circular de unos 5 Mb que codifica para unos 4800 genes (Bell y col. 2004; Glasner y col. 2008; Nykyri y col. 2012, citado por Charkowski, 2015). Algunas cepas presentan plásmidos, pero éstos no parece jugar un papel importante en la patogenicidad (Charkowski, 2015).

Respecto a la morfología y bioquímica de *P. carotovorum*, son bacilos Gram negativos, anaeróbicos facultativos, positivos para catalasa, producen licuefacción de gelatina, fermentación de glucosa y lactosa, reducción de nitrato y uso del citrato como única fuente de carbono, y son negativos para oxidasa y producción de indol (Baghaee-Ravari y col., 2011; Schaad y col., 2001). García (2000) reporta como otras pruebas diferenciales entre *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* respecto a *P. carotovorum* subsp. *atroseptica* y *Dickeya chrysanthemi*, la producción de ácido a partir de lactosa y la ausencia de gas a partir de glucosa.

2.4.3. *Burkholderia gladioli*

Este patógeno no había sido reportado para Venezuela, hasta que Fonseca (2014) caracterizó un aislado de una planta de pimentón en el Estado Mérida (donado por el Laboratorio de Fitopatología de la ULA) y evaluó la patogenicidad de éste sobre microtubérculos y vitroplantas de papa. Observó síntomas de patogenicidad como manchas negruzcas o amarillas en la superficie de las hojas y marchitez; manchas en la superficie de los tubérculos y manchas hundidas de color amarillo o naranja en los tallos (Fonseca, 2014).

Este hallazgo se considera de gran importancia por ser además patógena de humanos, ocasionando fibrosis quística (Fonseca, 2014), que consiste en la acumulación de un moco espeso y pegajoso en los pulmones y tubo digestivo, dando origen a infecciones pulmonares potencialmente mortales (MedlinePlus, 2016). Puesto que hay numerosas bacterias fitopatógenas asociadas a enfermedades en humanos se considera aún más importante la identificación de

los principales patógenos de los cultivos nacionales y su control efectivo, así como evitar el consumo de vegetales con sintomatología de patogenicidad.

Su genoma es de 9.05 Mb y está constituido por dos cromosomas y cuatro plásmidos. El cromosoma 1 tiene un tamaño de 4.413.616 pb y el cromosoma 2 de 3.700.833 pb.

Son bacilos Gram negativos, de color blanco cremoso, con borde irregular, aeróbicos, positivos para catalasa, fermentación de glucosa, arginina y citrato, móviles, no fermentan la lactosa, y son negativos para las pruebas de oxidasa y almidón (Schaad y col., 2001; Fonseca, 2014).

2.5. Principales métodos de diagnóstico de bacterias patógenas

Una aproximación adecuada para aumentar la producción y disminuir las pérdidas de cultivos por patógenos es el uso de semillas certificadas y de buena calidad y el uso de variedades resistentes. Por esta razón en este trabajo nos centramos en el estudio de patógenos bacterianos aislados de las muestras y la verificación de la susceptibilidad de dos de las variedades cultivadas en nuestro país.

No solo basta con una posible identificación a nivel de la sintomatología producida sobre la planta, puesto que hay patógenos que pueden estar en la planta de forma latente y observarse los síntomas en el próximo cultivo. Además hay patógenos que pueden producir una sintomatología similar, lo que podía llevar a una identificación errónea del patógeno.

Los protocolos de identificación se basan a menudo en el aislamiento de bacterias de semillas o extractos de plantas de cultivo en un medio semiselectivo, seguido de la identificación por las características de la colonia y características morfológicas y bioquímicas. Tales pruebas requieren de una a varias semanas para la confirmación final del agente causante de la enfermedad. Por esta razón, existe la necesidad del uso de pruebas rápidas y fiables para reemplazar estos ensayos biológicos que requieren mucho tiempo (Alvarez, 2004). Por esta razón, en los últimos años se ha recomendado el uso de pruebas moleculares basadas en el aislamiento y amplificación del ADN (Schaad y col., 2001).

Así pues, una amplia gama de pruebas genóticas se han empleado para la detección de fitopatógenos conocidos y la mayoría de los trabajos reportan el uso de PCR para la detección de patógenos bacterianos. Desde una revisión en 1999 (65), numerosas publicaciones han informado de la evolución y/o la aplicación de iniciadores (primers) específicos para la detección de los patógenos (Alvarez, 2004).

2.5.1. Caracterización morfológica

La observación al microscopio óptico de los cultivos bacterianos, tienen un rol importante en la identificación de las bacterias y su ubicación taxonómica (Pírez y Mota, 2008).

Consiste en caracterizar tanto las colonias como las células bacterianas por separado, calificándolas según el color, borde y superficie de las colonias, forma de las células y estructura de su pared celular. La forma de las células bacterianas

está determinada por la rigidez de su pared celular, diferenciándose básicamente según su forma en cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (cilíndrica o bastones; rectos o curvos) y espirilos (espiral). Al dividirse, las células bacterianas pueden mantenerse separadas o unidas, con uno o más planos de división, pero siempre conservando su independencia celular (Pírez y Mota, 2008).

Las bacterias pueden observarse sin tinción (examen en fresco) si se las coloca en glicerol o soluciones no acuosas que aumenten el índice de refracción o con tinción usando distintas coloraciones que mejoran su visualización ya que son células incoloras. Dichas tinciones se basan en la afinidad que presentan los colorantes por las estructuras bacterianas (Pírez y Mota, 2008).

La coloración de Gram es la más usada en bacteriología; debe su nombre a Christian Gram, quién desarrollo dicha técnica en 1884. Se basa en la tinción diferencial, dado que las bacterias pueden clasificarse según su resistencia a la decoloración en gram positivas o gram negativas, según la composición de la pared celular. Las gram positivas presentan una gruesa capa de peptidoglicano que la hace resistente a la acción de solventes orgánicos, cerrando 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 gram negativas en cambio presentan una capa de peptidoglicano delgada que no permite contener el complejo cristal violeta/yodo, se escapa y se pierde la coloración, permitiendo que entre la safranina y se colorean las células de rojo (Narayanasamy, 2011).

2.5.2. Caracterización bioquímica

Las características metabólicas de las bacterias son rasgos de gran importancia para determinar a qué género o incluso especie pertenecen. Para caracterizarlas bioquímicamente se realizan una serie de pruebas con medios selectivos que permiten determinar la capacidad de las bacterias de utilizar sustratos específicos o tolerar ciertos antibióticos. Se emplean también diferentes colorantes que provocan un crecimiento característico y desarrollo de colonias cuyo aspecto permite distinguirlos fácilmente de otros organismos que no sean de interés (Stefanova y col., 1986).

Schaad y col. (2001) desarrollaron una clave donde muestran una serie de pruebas bioquímicas que permiten diferenciar algunos géneros de bacterias fitopatógenas. Dicha clave se muestra a continuación (figura 2).

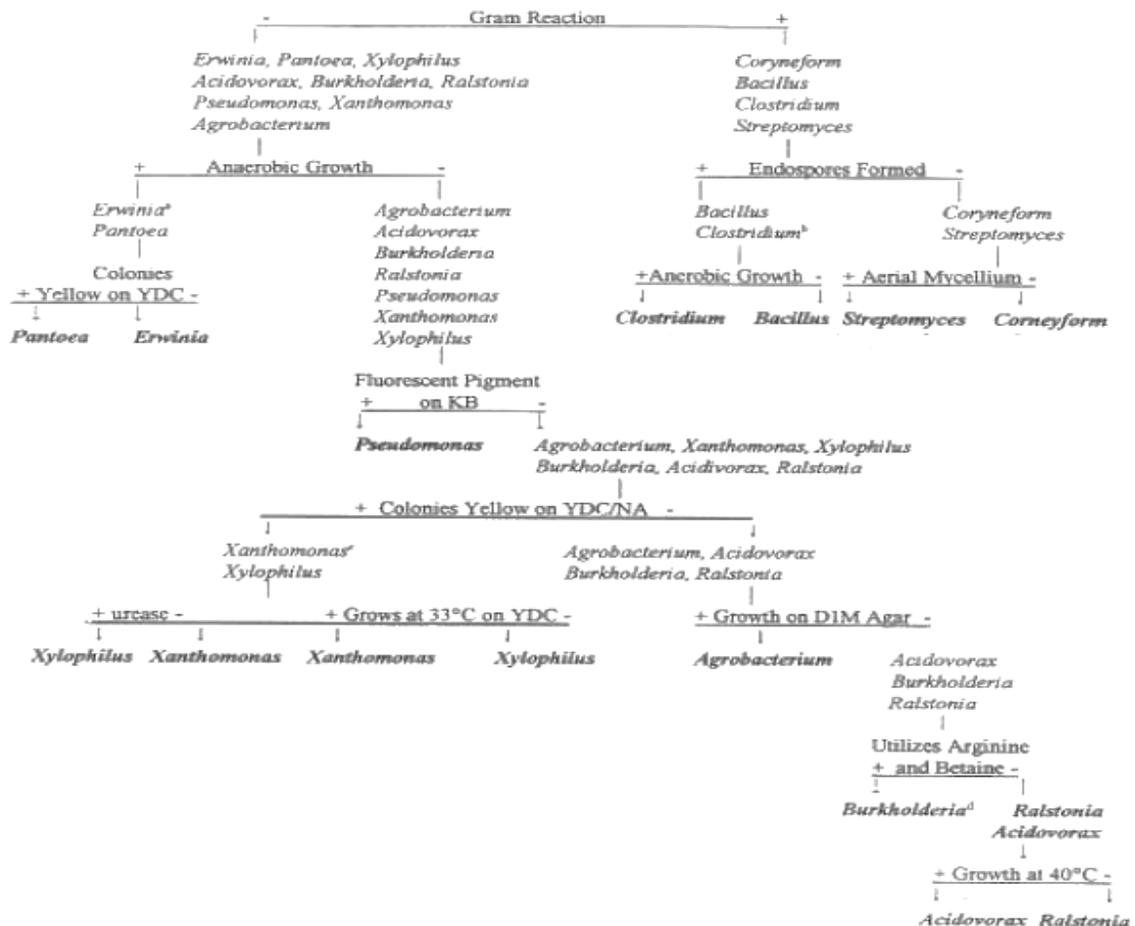


Figura 2. Clave para identificar los géneros comunes de bacterias fitopatógenas (Schaad y col., 2001).

Como mostraremos en los resultados, las bacterias patógenas del cultivo de papa caracterizadas en este trabajo son gram negativas, por lo que descartamos los géneros del lado derecho y seguimos la clave del lado izquierdo; por lo cual se escogieron las siguientes pruebas bioquímicas:

KOH: Esta prueba permite confirmar cuáles aislados son gram negativos.

Crecimiento anaeróbico: sembrando los aislados en medio Hugh y Leifson suplementado con glucosa, con y sin parafina, permite determinar si una bacteria es aeróbica o anaeróbica por cambio en la coloración del medio.

Con estas dos pruebas podemos determinar si los aislados pertenecen al género *Pectobacterium* (anteriormente *Erwinia*), dentro del cual se incluye *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum* y *Dickeya chrysanthemi*. De lo contrario y tomando en cuenta los tres principales géneros de bacterias reportadas en el país como patógenas de papa, podemos pasar directamente a la prueba de arginina para determinar si los aislados patogénicos pertenecen a los géneros *Burkholderia* o *Ralstonia*. Con estos resultados, luego se pueden desarrollar otras pruebas bioquímicas reportadas en investigaciones previas para corroborar la identificación anterior los aislados patogénicos, como:

Oxidasa: permite determinar la presencia de la enzima oxidasa en una bacteria.

Movilidad: permite determinar la capacidad de movilizarse de la bacteria.

Fermentación de lactosa: sembrando los aislados en medio McConkey se puede determinar la capacidad de fermentar la lactosa.

Kliger: permite la diferenciación de enterobacterias con base en la fermentación de glucosa y lactosa, y a la producción de ácido sulfhídrico.

Los resultados esperados para cada una de estas pruebas y para los controles que se utilizarán en esta investigación, se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados esperados en las pruebas bioquímicas para *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium carotovorum* y *Burkholderia gladioli*.

PRUEBA	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	<i>Burkholderia gladioli</i>
KOH	+ (Schaad y col. 2001)	+ (Schaad y col., 2001)	+ (Schaad y col., 2001)
OF	Aeróbica (García y col., 1999)	Anaeróbica facultativa (Baghaee-Ravari y col., 2011)	Aeróbica (Schaad y col., 2001)
Oxidasa	+ (Schaad y col., 2001)	- (Baghaee-Ravari y col., 2011)	- (Schaad y col., 2001)
Movilidad	+ (Schaad y col., 2001)	+ (Baghaee-Ravari y col., 2011)	+ (Schaad y col., 2001)
McConkey	No crece (Fonseca, 2014)	+ (Schaad y col., 2001)	- (Fonseca, 2014)
Kliger	Glu+; Lac+ (Fonseca, 2014)	Glu+; Lac- (Schaad y col., 2001)	Glu+; Lac- (Schaad y col., 2001)

En caso de dar la prueba de Oxidación-Fermentación positiva para *Pectobacterium carotovorum*, las pruebas Kliger y crecimiento a 37°C permiten

diferenciar entre las subespecies patógenas de papa, según indican Golkhandan y col. (2013) y Baghaee-Ravari y col. (2011).

Tabla 3. Pruebas bioquímicas reportadas por Golkhandan y col. (2013) para la diferenciación de subespecies de *Pectobacterium carotovorum* y para *Dickeya chrysanthemi*. *Pcc*: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; *Pco*: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *oderiferum*; *Pw*: *Pectobacterium wasabiae*; *Pa*: *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*; *Pb*: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *betavasculorum*; *Dc*: *Dickeya chrysanthemi*.

	Reference strains					
	<i>Pcc</i>	<i>Pco</i>	<i>Pw</i>	<i>Pa</i>	<i>Pb</i>	<i>Dc</i>
Pectolytic ability	+	+	+	+	+	+
Grow at 37 °C	+	+	—	—	+	+
Utilization of						
Raffinose	+	+	—	+	+	+
Lactose	+	+	—	+	+	+
α -Methylglucoside	—	+	—	+	+	+
HR on tobacco leaves	+	+	—	—	+	NT
PCR with:						
Y1/Y2	+	+	+	+	—	—
G1/L1	+	+	+	+	+	—
EcalF/Eca2R	—	—	—	+	—	—
EXPCCR/EXPCCF	+	—	+	—	—	—
ITS-RFLP (<i>RsaI</i>)						—

Tabla 4. Pruebas bioquímicas reportadas por Baghaee-Ravari y col. (2011) para la diferenciación de subespecies de *Pectobacterium carotovorum* y para *Dickeya chrysanthemi*. *Pcc*: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; *Pco*: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *oderiferum*; *Pa*: *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*; *Pb*: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *betavasculorum*; *Pw*: *Pectobacterium wasabiae*; *Dc*: *Dickeya chrysanthemi*.

	Pcc	Pco	Pa	Pb	Pw	Dch
Pectolytic activity	+	+	+	+	+	+
OF	FA ^a	FA	FA	FA	FA	FA
Oxidase	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+
Indole Production	-	-	-	-	-	+
Phosphatase	-	-	-	-	-	+
Gelatinase	+	+	-	-	+	+
Cascinase	+	+	-	-	+	+
Lecithinase	-	-	-	-	-	+
Rss ^c	-	+	+	+	-	+
Growth at 37°C	+	+	-	+	-	+
Sensitivity to Erythromycine	-	-	-	-	-	+
Utilization of: Lactose	+	+	+	+	-	+
Trehalose	+	+	+	+	+	-
Maltose	-	+	+	+	-	-
Palatinose	-	+	+	+	-	-
α -Methylglucoside	-	+	+	+	-	-
Raffinose	+	+	+	+	-	+
Sorbitol	-	+	-	-	-	-
α-D(+)-Melibiose	+	+	+	-	-	+
D-(+)-Cellobiose	+	+	+	-	+	+
D-(+)-Arabitol	-	+	-	-	-	-
D(-)-Tartrate	-	+	-	-	-	-
Citrate (simmons)	+	-	+	-	+	+
Malonate	-	-	-	-	-	+
D-Glucuronate	+	-	+	+	+	+
L-Glutamate	+	+	-	+	-	+

^a Facultatively anaerobic

^b Percentage of isolates that tested positive

^c Reducing substance from sucrose

Con las pruebas bioquímicas mencionadas en la tabla 2 se pueden identificar los aislados objeto de esta investigación hasta género, y por la prueba de crecimiento a 37°C, dentro de las pruebas mostradas en las tablas 3 y 4 podemos saber si estamos en presencia de *P. atrosepticum* o *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Dickeya chrysanthemi*; sin embargo, para tener resultados precisos y concluyentes se utilizarán también pruebas moleculares, razón por la cual a continuación mencionaremos las bases teóricas y principios de las pruebas moleculares más

usadas para la identificación y caracterización de bacterias patógenas de papa así como los antecedentes del uso de estas pruebas con este propósito.

2.5.3. Pruebas moleculares

Considerando que las bacterias, a nivel morfológico y bioquímico, pueden tener características muy similares siendo especies distintas, y que por lo tanto puede tenderse a una identificación errónea si nos basamos únicamente en estos caracteres, se han desarrollado técnicas de biología molecular, basadas en el grado de relación entre las secuencias de los ácidos nucleicos, mediante análisis bien sea del ADN o ARN de los microorganismos (Rivera, 2014). Puesto que la secuencia del ADN es única para cada organismo, estas técnicas moleculares son capaces de proporcionar resultados precisos, fiables y reproducibles rápidamente para facilitar la toma de decisiones y así combatir una enfermedad (Narayanasamy, 2008).

El rápido desarrollo de las técnicas moleculares para la caracterización de bacterias en la última década se ha simplificado mucho y se ha mejorado la detección e identificación de patógenos (Alvarez, 2004).

2.5.3.1. Extracción de ADN bacteriano

Para el estudio del ADN de un organismo es necesario obtener dicha molécula apartada y purificada de los demás componentes celulares. Algunos investigadores han desarrollado metodologías que permiten extraer, aislar y purificar el ADN de un conjunto de células, destacando 3 metodologías para

células bacterianas: método de Lévesque y col. (1995), método de Wang y col. (1999) y el método de Gomes y col. (2000); entre otros métodos.

Lévesque y col. (1995) estudiaron genes de resistencia a antibióticos presentes en integrones de bacterias clínicas resistentes pertenecientes a la familia de las enterobacterias y pseudomonas. Para el aislamiento del ADN bacteriano sometieron las células bacterianas a ebullición durante 10 minutos para lisar las células y liberar el material genético.

Posteriormente Wang y col. (1999) evaluando cuatro metodologías para la detección de *Xanthomonas albilineans*, causante de la escaldadura foliar de la caña de azúcar, aislaron el material genético sometiendo las células bacterianas ante distintos solventes y centrifugaciones que permiten aislar y purificar el ADN para su posterior identificación.

Al año siguiente, Gomes y col. (2000) propusieron un método de aislamiento del ADN de *Xanthomonas* ssp. y probaron además el método de Ausubel y col. (1992), obteniendo mejores resultados con la metodología propuesta.

Por su parte, Barrios (2015) probó estas tres metodologías de extracción de ADN para 2 aislados identificados presuntamente como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, para *E. cyripedii* y para *R. solanacearum*. Obtuvo con la metodología de Lévesque y col. (1995) la mayor concentración de ADN pero también una alta contaminación con proteínas, pues este método carece de algún paso de purificación del ADN. Con la metodología de Wang y col. (1999) se obtuvo una baja concentración de ADN. Finalmente el método de Gomes y col. (2000)

resultó ser el más adecuado para extracción de ADN bacteriano obteniendo suficiente cantidad de ADN y en un porcentaje de pureza adecuado para el estudio del ADN bacteriano.

Una vez que tenemos el ADN purificado, se debe comprobar la eficiencia del método de manera cuantitativa, por espectrofotometría, y cualitativa por una electroforesis del extracto en gel de agarosa al 0,8%, a fin de evaluar la concentración, pureza e integridad del ADN extraído (Gomes y col., 2000).

2.5.3.2. **PCR con iniciadores universales**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es uno de los métodos moleculares de mayor eficiencia en el diagnóstico de enfermedades vegetales. Esta técnica permite obtener millones de copias de un fragmento de ADN en pocas horas y se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas (Mas y col., 2001):

1ª Desnaturalización del ADN doble cadena.

2ª Hibridación de los iniciadores al extremo 3' específica en cada una de las hebras.

3ª Extensión de la cadena por acción de la ADN polimerasa.

El gen 16S del ADNr de procariontes es altamente utilizado para detección molecular y estudios filogenéticos de bacterias. Es un polinucleótido de aproximadamente 1500 nucleótidos que posee un gran número de copias de regiones variables y conservadas en organismos procariontes (Solano, 2010), lo cual permite identificar organismos procariontes mediante la amplificación y

secuenciación del genoma con iniciadores universales basados en dichas regiones conservadas. Estas regiones fueron observadas por Dubnau y col. (1965) al estudiar la secuencia de los genes ribosomales en *Bacillus*.

Pocos son los genes altamente conservados como el 16S del ADNr de procariotas (Clarridge, 2004; Solano, 2010). En los años 80's Woese consideró el gen 16S del ADNr como un cronómetro molecular, ya que permite establecer alineamientos y comparaciones entre su secuencia y relacionarlos a diferentes niveles taxonómicos. El gen es bastante largo por presentar suficiente polimorfismo inter-específico, lo que proporciona diferenciación y mediciones estadísticamente válidas (Clarridge, 2004; Solano, 2010).

Considerando la importancia del gen 16S de ADNr, Lu y col. (2000) diseñaron un par de iniciadores específicos para identificar bacterias patógenas presentes en el líquido cefalorraquídeo, mediante una PCR. El iniciador U1 (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3'), correspondiente a los nucleótidos 518 al 537 del gen 16S del rARN de *E. coli*; y el iniciador U2 (5'-ATCGG(C/T)TACCTTGTTACGACTTC-3'), correspondiente a los nucleótidos 1513 al 1491 del mismo gen. La PCR realizada en este trabajo se designó con el nombre de PCR universal. Todas las bacterias identificadas dieron el mismo patrón de bandas, por estar presente dicha región en todos los organismos procarióticos. Por esta razón la PCR universal permite detectar organismos procarióticos para su posterior identificación.

La PCR universal para la identificación bacteriana consta inicialmente de la amplificación del ADN de la muestra y posteriormente de la secuenciación del fragmento obtenido. Las regiones del genoma que se amplifican deben presentar las siguientes características: a) estar presentes en todas las especies bacterianas; b) contener secuencias altamente conservadas en las cuales actúan los iniciadores; y c) presentar secuencias polimórficas para poder diferenciar distintas especies. La secuencia obtenida en la PCR universal se compara con aquellas depositadas en bases de datos públicas como el banco de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Poggi y col., 2009), para la identificación específica de la bacteria.

El análisis de secuencias de los genes 16S del ADNr para el estudio de procariotas, reveló que existen una o más secuencias específicas cortas que nunca están presentes en grupos filogenéticamente distintos; dichas secuencias se denominan nucleótidos firma y muestran un mayor número de mutaciones (Tortoli, 2003; Solano, 2010), permitiendo así la identificación de especies bacterianas.

2.5.3.3. PCR específica

Entre otras aplicaciones de la PCR se encuentra: la amplificación de fragmentos de genes como rápida alternativa de la clonación, la modificación de fragmentos de ADN, la detección sensible de microorganismos seguido de una segura genotipificación, análisis de muestras arqueológicas y estudios antropológicos, la detección de mutaciones importantes en enfermedades hereditarias, transformación maligna o tipaje de tejidos, el análisis de marcadores genéticos

para aplicaciones forenses, pruebas de paternidad y para el mapeo de rasgos hereditarios, el estudio de expresión de genes, entre otras (Herrera y Gamba, 1996).

En vista de la facilidad y el alcance de la técnica de PCR, distintos investigadores han diseñado iniciadores específicos para la identificación de especies bacterianas. En este trabajo nos centraremos en los 2 principales patógenos de papa en Venezuela: *Ralstonia solanacearum* y *Pectobacterium carotovorum*. Para la identificación de *Ralstonia solanacearum*, se emplean comúnmente los iniciadores OLI1 y OLI2 propuestos por Seal y col. (1992), diseñados a partir de la región 16S del ADNr (Barrios, 2015).

En investigaciones previas se han secuenciado los genes que codifican para las enzimas pectato liasas (genes *pel*), principales responsables de la patogenicidad producida por *P. carotovorum*, identificándose 3 familias: la familia BC con genes *pel* comunes en *D. chrysanthemi* y *P. carotovorum*; la familia ADE con genes *pel* presentes únicamente en *D. chrysanthemi*; y la familia Y con genes *pel* de algunas cepas de *P. carotovorum* y *Yersinia pseudotuberculosis*. Partiendo de estos genes, Darrase y col., (1994) diseñaron los iniciadores Y1 y Y2 a partir de la familia Y de los genes *pel*. Estos iniciadores permiten la amplificación de un fragmento de 434 pb en todas las cepas de *P. carotovorum*, excepto *P. carotovorum* subsp. *betavasculatorum* y *D. chrysanthemi*.

Estos iniciadores fueron además probados por Nazerian y col. (2011) para la identificación de bacterias patógenas de plantas de okra colectadas en diferentes

campos de Malasia; por Baghaee-Ravari y col. (2011) para caracterizar especies de *Pectobacterium* de Iran; por Barrios (2015) para la identificación de bacterias patógenas de tubérculos de papa colectados en Sanare, Estado Lara, identificándolas como *P. carotovorum* subsp. *betavascularum*; y por Coppola (2015) para identificar bacterias patógenas de plantas de papas colectadas en el Río Chama, Estado Mérida, identificándolas como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* o subsp. *atroseptica*.

2.5.3.4. Amplificación de la región espaciadora transcripta intergénica (ITS)

Dentro de una misma especie bacteriana existe una alta variabilidad genética que origina diferentes subespecies, cepas, etc., dependiendo del rango de variabilidad. El polimorfismo detectado entre las especies bacterianas, resulta de la variabilidad en la repetición de las secuencias repetidas y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones del ADN. Estos polimorfismos presentan un gran poder discriminatorio y han resultado muy útiles para diferenciar serotipos estrechamente relacionados y grupos de cepas no relacionadas clonalmente (Rivas y col., 2006).

La región multicopia 16S-23S espaciadora intergénica transcrita (ITS) separa la subunidad grande y pequeña del ARNr y presenta una larga secuencia variable que puede ser estudiada por PCR-RFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción) permitiendo la diferenciación de especies.

Los métodos de identificación actuales basados en pruebas bioquímicas y morfológicas para *Erwinias* causantes de pudrición blanda son imprecisos y requieren de mucho tiempo (Toth y col., 2001). Se encontró que el análisis por ITS-PCR e ITS-restricción mediante iniciadores universales desarrollados por Jensen y col. (1993), son métodos simples, precisos y rápidos que permiten la identificación de este género. Por medio del método ITS-PCR se obtiene un patrón de bandas que permite diferenciar las *Erwinias* causantes de pudrición blanda de otras *Erwinias* así como de otras especies bacterianas. Permite además clasificarlas en 3 grupos: Grupo I, *Pectobacterium atrosepticum* (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) y *Pectobacterium betavasculorum*; Grupo II, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*E. carotovora* subsp. *carotovora*), subsp. *odorifera*, *Pectobacterium wasabiae* y *E. cacticida*; y Grupo III, *Dickeya chrysanthemi* (*E. chrysanthemi*) (Toth y col., 2001).

La amplificación de la región ITS ha sido reportada en numerosos trabajos para la identificación de especies de *Pectobacterium*. En este sentido, Toth y col. (2001), Baghaee-Ravari y col. (2011) y Golkhandan y col. (2013), reportan la amplificación de la región ITS en conjunto con la digestión de dicho producto de amplificación con enzimas de restricción para un mayor nivel de discriminación.

Barrios (2015) y Coppola (2015), con la finalidad de identificar aislados patogénicos, utilizaron pruebas bioquímicas y moleculares, incluyendo la amplificación de la región ITS mediante una PCR con los iniciadores G1 y L1 propuestos por Jensen y col. (1993) y mediante el protocolo de amplificación propuesto por Golkhandan y col. (2013). Barrios (2015) clasificó 3 aislados

obtenidos de tubérculos de papa infectados provenientes del Estado Lara, incluyendo uno en el grupo I y dos en el grupo II. Por su parte, Coppola (2015) clasificó 66 aislados bacterianos obtenidos de hojas de papa infectadas provenientes del Estado Mérida, incluyendo a todos dentro del grupo II. Siendo estos los grupos de clasificación propuestos por Toth y col. (2001) para la amplificación con los iniciadores G1 y L1.

2.5.3.5. Caracterización de la variabilidad genética

El análisis al azar de las secuencias cortas repetitivas intergénicas permite caracterizar a nivel genómico las bacterias y agruparlas según su cercanía filogenética. La familia de las secuencias cortas repetidas intergénicas ha sido encontrada en bacterias entéricas, dispersas en el genoma (Rincones, 2009). Se han estudiado 3 familias de secuencias cortas repetidas intergénicas no relacionadas a nivel de secuencia de ADN; la primera llamada secuencia palindrómica extragénica repetitiva (REP) de 35 a 40 pares de bases (Frank y col., 1994; citado por Junco, 2015); la secuencia de 124 a 127 pares de bases llamada consenso repetitivo intergénico enterobacterial (ERIC) (Hulton y col., 1991; citado por Junco, 2015); y el elemento BOX de 154 pares de bases (Martin y col., 1992; citado por Junco, 2015).

Se ha reportado que la amplificación de estas secuencias cortas repetitivas intergénicas han sido usadas ampliamente en tipificación, análisis genético y en la identificación de brotes infecciosos bacterianos (Rademarker y Brujin, 1997). Estos análisis están basados en la amplificación de las secuencias de ADN a través de la técnica de PCR, usando iniciadores específicos para cada tipo de secuencia.

Para cada muestra se obtiene un polimorfismo distinto por la variabilidad en la repetición de estas secuencias repetitivas y la distancia entre las mismas producto de inserciones o deleciones en el ADN. De esta manera es posible discriminar serotipos estrechamente relacionados de la misma especie y grupos de cepas relacionadas clonalmente (Versalovic y col., 1991).

La amplificación por PCR de secuencias repetidas ha facilitado la tipificación de diversos microorganismos ya que reduce los costos y el tiempo de análisis (Coenye y col., 2002; Malathum y col., 1998; Versalovic y col., 1991). Según sea la organización de estas secuencias repetitivas a lo largo del genoma, se pueden generar huellas del genoma que permitan identificar bacterias de interés mediante una amplificación de cualquiera de estas tres regiones mediante una PCR, siendo también una herramienta útil de carácter diagnóstico y para la genotipificación de aislados bacterianos (Rincones, 2009).

Alvez (2014) desarrolló ERIC-PCR y REP-PCR con el ADN proveniente de ocho muestras bacterianas aisladas de plantas de caña de azúcar con síntomas de escaldadura foliar, encontrando que no había similitud con una cepa control de *Xanthomonas albilineans*. Sin embargo 6 de los 8 aislados presentaron un patrón de bandas similar, indicando por lo tanto que puedan estar relacionadas clonalmente entre sí.

Barrios (2015), aplicando ERIC-PCR a 3 aislados bacterianos obtenidos de tubérculos de papa con síntomas de pudrición blanda, obtuvo dos aislados con el mismo patrón de bandas, concluyendo que son genéticamente idénticos y a su

vez son distintos del otro aislado, el cual presentó un patrón de bandas diferente. Sin embargo, obtuvo tanto por pruebas bioquímicas como por la amplificación de la región ITS con los iniciadores G1 y L1 diseñados por Jensen y col. (1993) que los 3 aislados pertenecen al género *Pectobacterium*.

Adicionalmente, Junco (2015), mediante el uso de pruebas bioquímicas y moleculares, incluyendo la amplificación de las regiones repetidas ERIC y BOX, a través de la técnica de PCR, identificó como *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* a una bacteria aislada de una planta de geranio con síntomas de marchitez.

De acuerdo con Castro-Alarcón y col. (2009), los aislados que presentan el mismo número de fragmentos con el mismo tamaño son denominados genéticamente idénticos, los aislados que difieren en dos a tres fragmentos son denominados estrechamente relacionados y los aislados que difieren en más de siete fragmentos son denominados sin relación alguna.

2.6. Micropropagación

La identificación de un patógeno bacteriano no está completa sin la comprobación de los postulados de Koch (ver más adelante); además, y como mencionamos antes, el conocimiento de la susceptibilidad o resistencia de los cultivares de papa que se cultivan en el país, es también importante para un buen manejo del cultivo y para ir sustituyendo variedades susceptibles por variedades resistentes y así evitar el uso de compuestos químicos tóxicos para la salud humana y para el ambiente, en el control de enfermedades de plantas. En el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal del Instituto de Biología Experimental de la Universidad

Central de Venezuela, desde hace 7 años se ha implementado el cultivo *in vitro* para establecer los patosistemas que permiten estudios de resistencia y susceptibilidad así como el re-aislamiento de la bacteria patógena para comprobar los postulados de Koch.

El desarrollo de todas las técnicas *in vitro* se sustentan sobre el principio de la totipotencia celular, propuesta por Haberlandt en 1902 (Thorpe, 1995; citado por Portillo y Santacruz-Ruvalcaba, 2004). La totipotencia se refiere a la capacidad de las células vegetales para dar origen a todos los tipos de células diferenciadas de un organismo dado, así como la regeneración del mismo organismo (Lackie y Dow, 1989; citado por Portillo y Santacruz-Ruvalcaba, 2004), mediante el uso de hormonas vegetales (Alva, 2014).

Dentro de los diferentes sistemas de regeneración de plantas *in vitro*, la micropropagación es una excelente alternativa para conservar los cultivares nativos de papa, para la producción masiva de semillas y para la producción de vitroplantas con parámetros de crecimiento adecuados que permitan el estudio de la interacción planta-patógeno (Alva y Oropeza, 2013).

La micropropagación consiste en producir plantas completas a partir de inóculos con potencialidad, tales como segmentos de tallo con yemas o meristemas aislados, los cuales son cultivados asépticamente en un recipiente estéril bajo condiciones ambientales y nutrientes controlados, teniendo como resultado plantas genéticamente idénticas a la planta parental (Arellano y col., 2010).

El principio de cultivo de tejidos *in vitro* es simple; primero, es necesario aislar una parte de la planta (explante); segundo, proveer al explante de un medio ambiente apropiado (medio de cultivo adecuado y en condiciones físicas propias de la especie) en el cual pueda expresar su potencial intrínseco o inducido, partiendo de plantas de sanidad probada. Éstas son multiplicadas asépticamente bajo una cámara de flujo laminar, se seccionan segmentos de tallos provistos de una yema axilar, son transferidos a recipientes de vidrio con medio fresco de cultivo, los recipientes son sellados con tapas autoclavables y cintas de parafilm (Salas, 1995). Luego se realizan cambios de medio de cultivo por medio de cultivo fresco hasta que las plantitas tengan un tamaño y crecimiento radical apropiado para ser pasadas a condiciones de vivero.

La micropropagación se practica con éxito en especies hortícolas (Murashige, 1974), ornamentales (Constantine, 1981) e incluso en especies leñosas (Thorpe y Harry, 1991). En algunas especies, esta metodología ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación, como un incremento acelerado del número de plantas, reducción del tiempo de multiplicación y del espacio requerido, mayor control sobre la sanidad del material vegetal, facilidad para transportar y facilidad de multiplicar variedades de las cuales existen pocos individuos (Villalobos y Thorpe, 1993).

Así como existen ventajas asociadas a la técnica, también tiene sus desventajas, como el requerimiento de personal especializado, así como de equipos e infraestructura adecuada y los productos químicos pueden ser de elevado costo (Salas, 1995).

La producción de tubérculos *in vitro* (microtubérculos) también presenta ciertas ventajas, como la obtención de éstos en cualquier época del año, pueden ser almacenados en espacios pequeños y su transporte es aún más fácil que el de vitroplantas (Salas, 1995); y el uso de vitroplantas en pruebas de patogenicidad, permite al investigador estar seguro que los tejidos a utilizar están completamente libres de otros patógenos. En el próximo subtítulo ahondaremos más sobre estos beneficios.

Una vitroplanta de papa puede generar de 20 a 30 tubérculos en el invernadero, y luego cada tubérculo se multiplica en 20 o 30 en cada ciclo. Así, luego de 4 ciclos, una vitroplanta puede haber generado 3,2 millones de tubérculos como semilla certificada, lo cual disminuye los costos de producción, el tiempo de cosecha y el transporte de estos tubérculos libres de patógenos (Romero, 2007). En este sentido, Gallardo y col. en el año 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 certificadas (Moreno, 2012).

Murashige y Skoog (1962), propusieron un medio para cultivo *in vitro* de plantas de tabaco, compuesto por sales inorgánicas y compuestos orgánicos que permiten el desarrollo de plantas *in vitro*. Así mismo, actualmente, los medios de cultivo utilizados para la micropropagación están constituidos principalmente por las sales propuestas por Murashige y Skoog (1962), vitaminas, reguladores de crecimiento, sacarosa y agar en caso de medio semi-sólido (Salas, 1995).

Alva y Oropeza (2013) evaluaron la consistencia del medio de cultivo y del nitrato de plata en la micropropagación de las variedades de papa 'Granola' y 'Arbolona negra', obteniendo para medio semisólido, plantas más altas pero más frágiles que en medio líquido, donde obtuvieron plantas de menor altura y con menos hojas, pero con mayor área foliar. A su vez, obtuvieron ausencia de hiperhidricidad y epinastía causada por el etileno y una mayor área foliar al ser cultivadas en medio semisólido con 2mg/L de nitrato de plata. Al sellar los cultivos con las tapas de polipropileno y parafilm, se previene la contaminación y la desecación del medio (McClelland y Smith, 1990; citado por Alva, 2014), pero también inhibe el intercambio gaseoso, dando como resultado la acumulación de etileno, una oleofina en estado gaseoso existente bajo condiciones normales fisiológicas durante el cultivo de tejidos vegetales (Alva, 2014).

Por su parte, Moreno (2012) evaluó el efecto de la consistencia del medio de cultivo y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa de la variedad 'Granola' y 'Arbolona negra', obteniendo que como condición óptima para el desarrollo de los mismos, las vitroplantas deben ser incubadas bajo fotoperiodo de días cortos (6 horas de luz) y en medio líquido con 50g/L de sacarosa y 5mg/L de BA.

En el país se cuenta con el Laboratorio de Cultivo *in vitro* del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) y el laboratorio de Productores Independientes del Páramo (PROINPA) en el Estado Mérida, donde mediante el cultivo *in vitro* se producen microtubérculos que son entregados a los productores para su uso como semilla certificada. Además se cuenta con el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal

del Instituto de Biología Experimental (IBE) en Caracas, en el cual se realizan estudios de los patógenos que afectan a los cultivos nacionales de papa, caña de azúcar y geranio; así como también estudios de mejoramiento vegetal mediante el cultivo *in vitro* de estas variedades.

El Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) posee un banco de germoplasma *in vitro* de variedades de papa comerciales y una capacidad de 1500m² de área efectiva para producir semilla pre-básica, proyectando la producción de 200 microtubérculos/m² (Alva, 2014).

2.6.1. Pruebas de patogenicidad

Mediante el cultivo *in vitro* y la micropropagación se obtienen plantas idénticas a la madre así como vitroplantas y microtubérculos sanos y mejorados para el desarrollo de distintos estudios, asegurándonos que los tejidos u órganos utilizados para un mismo estudio son genéticamente idénticos a la planta de la cual se partió. La obtención de plantas sanas hace de las vitroplantas el material más apropiado para el estudio de la patogenicidad de fitopatógenos en distintas especies y variedades de plantas, pues la sintomatología observada se deberá únicamente al fitopatógeno estudiado y no a otro fitopatógeno del ambiente ni a condiciones ambientales adversas, pues se trabaja de manera aséptica y bajo condiciones externas controladas y óptimas para la planta en estudio.

A estas pruebas donde se inocula el órgano de una planta con un patógeno particular, con la finalidad de determinar o comprobar la sintomatología asociada de dicho patógeno en el órgano inoculado y la planta estudiada, se les denominan

pruebas de patogenicidad. Estas pruebas son un criterio de gran importancia para la identificación de bacterias que se sospeche sean los agentes causantes de la enfermedad en una planta (Mushin y col., 1959). Para evaluar la virulencia de un organismo en una planta, se utilizan dos términos en las pruebas de patogenicidad que describen el grado de afección del patógeno en la planta u órgano. Estos dos términos son la incidencia y la severidad.

La severidad se determina como el porcentaje del órgano inoculado que se observa afectado. Montanelli y col. (1995) propusieron un índice de la enfermedad para determinar la respuesta de resistencia o susceptibilidad de la papa al patógeno *R. solanacearum*, al ser inoculada bajo condiciones asépticas y controladas. La escala propuesta fue la siguiente: 0, solo el borde infectado; 1, menos del 25% afectado; 2, 26%-30% afectado; 3, 51%-75% afectado; y 4, 76%-100% afectado. Fonseca (2014) modificó dicha escala y probando distintos tamaños de inóculo, obtuvo un tamaño de inóculo apropiado de 10^8 UFC/inóculo y una incubación a 18°C y luz continua para patogenicidad en tubérculos y 25°C y luz continua para patogenicidad en hojas.

Rott y Chagvardieff (1987) proponen una fórmula para la determinación del índice de la enfermedad, ocasionada por *Xanthomonas albilineans* en caña de azúcar:

$$ID = \frac{(X1x1) + (X2x2) + (X3x3) + (X4x4) + (X5x5)}{Xt}$$

Fonseca (2014), propone una modificación de esta relación adaptándola a la patogenicidad de *B. gladioli* en papa, partiendo de los índices de severidad obtenidos en la patogenicidad en microtubérculos y para la patogenicidad en

hojas, tomando los siguientes índices de severidad: 0, hojas sin lesión; 1, hojas con necrosis únicamente en el lugar donde se colocó el inóculo; 2, hojas con puntos negros en el área foliar; 3, hojas con una lesión necrótica o clorótica de mayor tamaño que la gota del inóculo pero menor al 50% de la hoja; y 4, hojas cloróticas o necróticas en un porcentaje mayor al 50%.

Sin embargo, si esta escala de severidad no es aplicable a un experimento, la misma debe adaptarse a los resultados de la prueba de patogenicidad que se realice. Para ello, se debe observar la sintomatología causada por el patógeno sobre la planta u órgano en estudio, tomando para las primeras escalas los síntomas observados en menor proporción y para las escalas mayores los síntomas más severos y comunes.

De este modo, para la fórmula propuesta por Rott y Chagvardieff (1987), X_1 corresponde al número de hojas con la severidad 1, X_2 al número de hojas con la severidad 2, y así sucesivamente hasta X_t que corresponde al número de hojas totales.

2.7. Postulados de Koch

En el año 1877, Robert Koch en su publicación sobre la etiología de la infección de la herida, propuso unos postulados para comprobar el agente causante de una enfermedad (Agrios, 1995). Estos postulados afirman lo siguiente:

1. El tejido infectado debe mostrar la presencia de un microorganismo particular que no se encuentra en los animales sanos.
2. El microorganismo debe ser aislado y cultivado en un cultivo puro.
3. Cuando se inyecta en un animal sano, el microorganismo debe causar la enfermedad asociada al mismo.
4. Este microorganismo "segunda generación", debe ser aislado del tejido que se infectó y se debe demostrar que es idéntico al microorganismo que se encuentra en el paso 1.

Para 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.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar aislados patogénicos obtenidos de hojas de papa colectadas en el Valle del Rio Mucujún, Estado Mérida, mediante el uso de pruebas bioquímicas y moleculares.

Objetivos específicos

1. Aislar y purificar las bacterias patógenas a partir de las hojas de papa colectadas en el Valle del Rio Mucujún, Estado Mérida.
2. Seleccionar los aislados bacterianos patogénicos, observando la sintomatología en hojas y rodajas de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) de la variedad 'Granola' y 'Arbolona negra' cultivadas *in vitro*, mediante pruebas de patogenicidad.
3. Caracterizar morfológicamente los aislados patogénicos.
4. Identificar bioquímica y molecularmente los aislados patogénicos.
5. Comprobar los postulados de Koch.

4. METODOLOGÍA

Las muestras fueron colectadas por el profesor Gustavo Fermín de la Universidad de los Andes, en el Valle del Río Mucujún, Municipio Libertador, Parroquia Gonzalo Picón Febres, Estado Mérida, Venezuela. Se visitaron todos los cultivos de la zona (más de 20 parcelas independientes) donde predominaba la variedad 'Granola', y se colectaron las muestras en tres parcelas aparentemente infectadas con *Ralstonia solanacearum*. Dichas parcelas estaban ubicadas según las siguientes coordenadas:

WP 305: 2.159msnm, 8° 40' 6,3" N, 71° 31' 3" O.

WP 306: 2.463msnm, 8° 42' 21" N, 71° 4' 59,6" O.

WP 307: 3.220msnm, 8° 44' 58,9" N, 71° 4' 7,7" O.

Las muestras consistieron en hojas completas con sintomatología de bacteriosis que se colocaron dentro de bolsas plásticas selladas con papel absorbente húmedo y se mantuvieron a 4°C para ser enviadas a Caracas y proceder con el estudio. Es importante para fines del estudio destacar que un productor comentó que los síntomas de marchitez solo se observan por debajo de los 2.500msnm, no en zonas más altas.

4.1. Obtención y mantenimiento de aislados bacterianos

Las hojas fueron lavadas con agua y jabón líquido Tween 20, y esterilizadas mediante un lavado con cloro comercial diluido (10%) durante 15 minutos, 10

minutos en agua destilada estéril, 15 minutos en alcohol 70% y nuevamente 10 minutos en agua destilada estéril.

Las hojas esterilizadas se maceraron por separado con 5 ml de caldo LB (Anexo 1), un medio rico con las condiciones nutricionales necesarias para el crecimiento de la mayor cantidad de microorganismos presente en las muestras colectadas. Se diluyó un poco de cada macerado en otros 5 mililitros de caldo LB y se mantuvieron en una cámara de agitación a 27°C durante 24h.

Luego se sembraron por agotamiento en una placa con agar LB (Anexo 2), incubándolas por 24 horas en una cámara de agitación a 27°C. Las colonias crecidas fueron separadas, sembrando por agotamiento cada colonia morfológicamente distinta en placas separadas con agar LB hasta lograr obtener cada aislado puro (Pírez y Mota, 2008). Cada uno de los aislados obtenidos se cultivaron y mantuvieron en punciones (Anexo 3) debidamente identificadas, para luego seleccionar los aislados patogénicos y proceder con la caracterización e identificación de los mismos.

4.2. Cepas bacterianas usadas como control

Como controles positivos se utilizaron las cepas LMV24 obtenida a partir de un cultivo de papa con sintomatología de marchitamiento procedente de Maracay Edo. Aragua e identificada por Fonseca (2014) como *Ralstonia solanacearum*, LMV01 donada por el profesor Luis Cedeño del Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (IIAP) de la Universidad de Los Andes, Mérida. e identificada por Fonseca (2014) como *Burkholderia gladioli* y la cepa

LMV30 obtenida de hojas de papa provenientes del Estado Mérida e identificada por Coppola (2015) como *Pectobacterium carotovorum*. Como control negativo se utilizó la cepa CVCM76 donada por el Centro Venezolano de Colección de Microorganismos, identificada como *Escherichia coli*.

4.3. Prueba preliminar de patogenicidad

Para la selección de los aislados bacterianos patogénicos, se llevó a cabo una prueba de patogenicidad en tubérculos comerciales de papa. Para esto se lavaron los tubérculos con agua y jabón líquido Tween 20, se pelaron y lavaron con agua destilada. Para eliminar los posibles microorganismos que puedan estar presentes en los tubérculos se procedió a desinfectarlos dejándolos 15 minutos en agua destilada estéril, seguido de 10 minutos en hipoclorito de sodio 0,5%, otros 15 minutos en agua destilada estéril, para finalmente flamearlos con alcohol 70%. Una vez desinfectados se cortaron rodajas de 5 milímetros de grosor y se dejaron 1 minuto en agua destilada estéril. Se prepararon cámaras húmedas utilizando placas de Petri estériles con 3 láminas de papel y una malla plástica estéril, conteniendo 10 mililitros de agua destilada estéril. En cada cámara se colocaron 2 rodajas que fueron inoculadas con 200 microlitros de una suspensión bacteriana de 24 horas de crecimiento, a partir de una colonia pura del aislado en 3 mililitros de caldo LB. Se incubaron las placas por una semana a 30°C, observando a diario la sintomatología causada por cada aislado, dejando una placa con las rodajas inoculadas con caldo LB estéril como control negativo.

4.4. Caracterización e identificación de los aislados patogénicos

Una vez que contamos con un cultivo puro de cada uno de los aislados patogénicos, iniciamos la caracterización de los aislados, comenzando con las características morfológicas, siguiendo con las características metabólicas para lo cual se realizaron una serie de pruebas bioquímicas, y finalizamos la identificación mediante pruebas moleculares.

4.4.1. Caracterización morfológica

Para caracterizar morfológicamente los aislados se observó forma, tamaño, color, borde, superficie y levantamiento de las colonias en placas de agar LB (Anexo 2) y YDC (Anexo 4), según reporta Rivera (2014). Además se realizó la prueba de Tinción Gram a cada uno para clasificarlos dentro de dos grandes grupos: Gram (+) y Gram (-) según la composición de la pared celular y se observó la forma de cada aislado bacteriano a nivel celular (Figura 2).

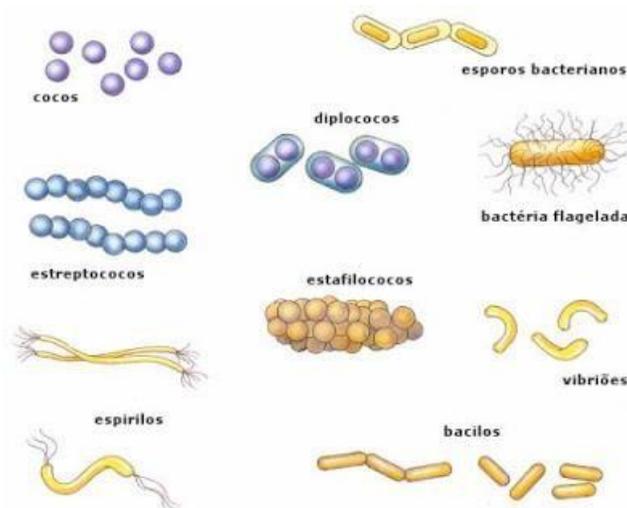


Figura 3. Morfología bacteriana

(Tomado de: <http://es.slideshare.net/patriciotavali/bacterias-y-virus-cuarto>).

Para la prueba de Tinción Gram, se siguió el protocolo de Shaad y col. (2001). Se tomó una muestra de los aislados de manera aséptica a partir de un cultivo fresco y puro de los mismos en placas con agar LB, y se hizo un frotis bacteriano de cada aislado patogénico en un portaobjetos. Se fijó la muestra pasando el portaobjetos por el mechero y se procedió a teñir los aislados. Con la fijación del frotis se pretende obtener la muerte de los microorganismos, la adhesión a la lámina y la conservación de su morfología. Después de preparar y fijar el frotis, se puede realizar cualquier tipo de coloración (Pírez y Mota, 2008).

Luego se tiñó durante 1 minuto con Cristal Violeta 0,1 g/L, y se lavó con agua destilada; posteriormente se incubó durante 1 minuto con lugol (yodo 0,1 g/L y yoduro de potasio 0,2 g/L), y se lavó con agua destilada; se aplicó un decolorante Alcohol:Acetona 70:30 y se lavó con agua destilada; finalmente se tiñó con Safranina 0,2 g/L y se retiró el exceso al minuto con agua destilada. Se secó el portaobjetos y se observaron las muestras en un microscopio óptico marca Nikon, con el objetivo de 100x.

Para finalizar con la caracterización morfológica, se realizó una prueba de motilidad, tomando una gota de caldo fresco de cada aislado y colocándola sobre un portaobjetos estéril para observar bajo el objetivo de 100x de un microscopio óptico marca Nikon, si las células bacterianas tienen movilidad (Fonseca, 2014).

4.4.2. Caracterización bioquímica

Para la caracterización de los aislados a nivel bioquímico, se llevaron a cabo las una serie de pruebas, siguiendo el protocolo propuesto por Schaad y col. (2001) para la identificación de los géneros de bacterias fitopatógenas más comunes, y

más específicamente para la identificación de los géneros *Ralstonia*, *Pectobacterium* y *Burkholderia*, por las razones expuestas previamente. De este modo se llevaron a cabo las siguientes pruebas:

Prueba de KOH: Se colocó una gota de una solución estéril de KOH 3% estéril y se disolvió una colonia del aislado en la solución y se levantó el asa para observar la formación o no de un hilo lechoso. Solo en las bacterias Gram (-) hay presencia de este hilo lechoso.

Oxidación-Fermentación: se sembró cada aislado en dos tubos distintos con medio de Hugh y Leifson (Anexo 7) suplementado con glucosa 10%. A uno de los tubos se le colocó parafina líquida y al otro no, para determinar si las bacterias tienen un metabolismo anaeróbico o aeróbico. Si ambos tubos se encuentran acidificados luego de 24-48 horas, la bacteria es anaeróbica; si solo el tubo sin parafina está acidificado, la bacteria es aeróbica.

Fermentación de carbohidratos: Se preparó medio Kligler (Anexo 8) estéril y se sirvieron en tubos de 10ml, dejándolos solidificar con el tubo ligeramente inclinado para formar un bisel. Se sembraron las bacterias patogénicas por punción en el taco y por estría en el bisel. Se observa viraje de color y/o producción de gas y SH_2 a las 24 y 48 horas. El uso de un carbohidrato se

observa como acidez en el medio, tornándose el medio de color amarillo.

Adicionalmente, según proponen Baghaee-Ravari y col. (2011) y Golkandan y col. (2013) para la diferenciación de subespecies de *P. carotovorum*, se sembraron los aislados en placas de agar LB, las cuales se incubaron a 37°C durante 72 horas para observar si son capaces de crecer a dicha temperatura y así identificar presuntamente los aislados como *P. carotovorum* subsp. *atroseptica* en caso de no crecer, o de lo contrario como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* o *Dickeya chrysanthemi*.

4.4.3. Identificación molecular

Para finalizar con la identificación de los aislados patogénicos obtenidos de las hojas, estudiamos el ADN de dichos aislados por métodos moleculares. Todos los geles fueron corridos a 80V y teñidos con una solución de Bromuro de Etidio (BrEt) 10mg/ml durante 10 minutos y luego se dejó en agua destilada durante 30 minutos para quitar el exceso de BrEt. Finalmente, se visualizaron los geles en un transiluminador GelDoc (BioRad) bajo luz ultravioleta para observar las bandas obtenidas.

Por su parte, las PCR fueron realizadas en un termociclador automatizado (GeneAmp PCR System) y se utilizó como control de contaminación de reactivos, una mezcla con todos los componentes de la reacción, excepto el ADN, el cual fue sustituido por agua miliQ.

4.4.3.1. Extracción del ADN bacteriano.

Para la identificación molecular de los aislados patogénicos, debemos primero obtener el ADN nuclear de cada uno, para lo cual se utilizó el método propuesto por Gomes y col. (2000), siendo este reportado por Alvez y col. (2011) y Barrios (2015) como un método eficiente que permite obtener material genético de calidad y con una pureza que permite llevar a cabo los análisis por PCR. Para ello se crecieron las bacterias en 5 ml de caldo LB suplementado con glicerol estéril 10% (Maringoni y col., 1988) durante 72 horas a 27 °C. De esta suspensión bacteriana se tomó 1,5 ml de cada aislado patogénico y se centrifugaron a 13000xg por 5 minutos. Se resuspendió el sedimento en 200 µL de solución Tris 0,1 mol/L, añadiendo posteriormente 200µL de solución de lisis (NaOH 0,2N y SDS 1%), y 100 µL de Proteinasa K 1mg/mL, pasando por el vortex hasta despegar el sedimento e incubar las muestras a 55°C por 1 hora.

Pasada la hora se hicieron dos lavados con 700 µL de Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1 v/v), se homogenizó por inversión y se centrifugó a 13000xg por 10 minutos. Tomando la fase acuosa únicamente se le añadió etanol 95% dejando por 20 minutos a -20°C para precipitar el ADN. Posteriormente se centrifugó a 13000xg por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µL de EtOH 70%, verificando que se despegara el pellet del fondo del tubo. Se centrifugó a 13000xg por 5 minutos y se dejó secar el precipitado de ADN por 20 minutos en una campana de extracción de gases. Finalmente el precipitado obtenido para cada aislado y los controles respectivos, se resuspendió en 50 µL de agua miliQ estéril para los estudios moleculares.

4.4.3.2. Cuantificación y evaluación de la calidad del ADN extraído

Para determinar la concentración y pureza del ADN extraído se midió en un espectrofotómetro Genesys 10 Bio la absorbancia de las muestras diluidas 200 veces (2,5µL de ADN en 497,5µL de agua destilada) a 260nm y a 280nm (Sambrook y Russell, 2001) en cubetas de cuarzo. La relación de absorbancia 260nm/280nm permite detectar la contaminación de las muestras de ADN con ARN o proteínas, siendo el valor óptimo de un extracto puro 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 de ADN y ARN cadena sencilla, y 33 µg/mL de oligonucleótidos cadena sencilla. Así, la concentración de ADN extraído se calculó mediante la siguiente ecuación:

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

4.4.3.3. Electroforesis en gel de agarosa 0,8%

Para determinar la calidad de los extractos de ADN, se desarrolló una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de los aislados patogénicos y de los controles utilizados en las pruebas bioquímicas. Para esto se mezclaron 8 µL del extracto con 2 µL de buffer de carga. Se empleó λHindIII como marcador de peso molecular.

Para las posteriores amplificaciones por PCR se prepararon alícuotas de ADN a una concentración de 50 o 25 ng/µL en agua miliQ estéril.

4.4.3.4. Amplificación con iniciadores universales del gen 16S del ADNr.

Para corroborar que los aislados corresponden a organismos procarióticos y además que los extractos de ADN no presentan inhibidores para la PCR, se realizó una PCR con los iniciadores universales propuestos por Lu y col. (2000), U1 (nucleótidos del 518 a 537): 5'- CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG -3' y U2 (nucleótidos del 1513 a 1491): 5'- ATC GG(C/T) TAC CTT GTT ACG ACT TC -3' del gen 16S del ADNr de *E. coli*. Estos iniciadores permiten amplificar una banda específica de 996pb y otra inespecífica de 150pb del gen 16S del ADNr.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador automatizado (GeneAmp PCR System) según el protocolo descrito por Lu y col. (2000) a un volumen final de reacción de 25µl, conteniendo 1X Amortiguador de reacción, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP's, 0,2 µM Iniciadores, 50 ng ADN de la muestra bacteriana y 1 U de Taq Polimerasa.

Las condiciones de amplificación se fijaron según el protocolo planteado por Lu y col. (2000) con el siguiente 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 1 min. a 55°C, elongación durante 2 min. a 72°C (35 repeticiones).

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

Los fragmentos amplificados se separaron mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% (Lu y col., 2000).

4.4.3.5. Amplificación con iniciadores específicos

Según los resultados obtenidos en la caracterización morfológica y bioquímica de los aislados patogénicos, y comparando con los controles positivos utilizados, los aislados fueron preliminarmente identificados como *P. carotovorum*. Para comprobar la identidad de los mismos se realizó una PCR con iniciadores específicos diseñados para la identificación de dicha bacteria.

Se utilizaron los iniciadores Y1pel: 5'-TTACCGGACGCCGAGCTGTGGCGT-3' y Y2pel: 5'-CAGGAAGATGTTCGTTATCGCGAGT-3' propuestos por Darrase y col. (1994). Con estos iniciadores, se espera obtener un fragmento de 434pb para el control positivo de *P. carotovorum* y los aislados problemas que pertenezcan a dicha especie.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 25 µL, conteniendo 1X Amortiguador de reacción, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP's, 1 µM Iniciadores, 50 ng ADN de la muestra bacteriana y 1 U de Taq Polimerasa (Baghaee-Ravari y col., 2011; modificado por Coppola, 2015), con las condiciones de ciclado descritas por los mismos autores:

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

Ciclo 2: Desnaturalización durante 30 seg. a 94°C, hibridación de iniciadores durante 45 seg. a 61°C, elongación durante 1 min. a 72°C (35 repeticiones).

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

Los fragmentos amplificados se separaron mediante una electroforesis en gel de agarosa 1 % (Darrase y col., 1994).

4.4.3.6. Amplificación de la región espaciadora transcripta intergénica (ITS)

Adicionalmente se amplificó la región intergénica espaciadora transcripta (ITS-PCR) para determinar la subespecie de los aislados, utilizando los iniciadores G1 (5'-GAAGTCG TAACAAGG- 3') y L1 (5' - CAAGG CATC CACCGT -3') propuestos por Jensen y col. (1993). En este caso se espera obtener distintos patrones de bandas, dependiendo de la sub especie de *P. carotovorum*.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL que contiene: 1X Amortiguador de reacción, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP's, 1 µM Iniciadores, 50 ng ADN de la muestra bacteriana y 1 U de Taq Polimerasa (Baghaee-Ravari y col., 2011; modificado por Coppola, 2015).

Las condiciones de ciclado fueron las propuestas por Golkhandan y col. (2013):

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 productos amplificados se observaron en un gel de agarosa 2% (Toth y col., 2001; Nazerian y col., 2011; Golkhandan y col., 2013).

4.4.3.7. Caracterización de la variabilidad genética de los aislados LMV33 y LMV34

Como otra metodología para estimar y comparar la variabilidad genética de los aislados, se realizó la amplificación de las secuencias repetidas BOX dispersas en el genoma de especies bacterianas.

4.4.3.7.1. BOX

Se utilizó el iniciador BOXA1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') (Martin y col., 1992).

La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25µl, conteniendo: 1X de Amortiguador de reacción, 3 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 2 µM del iniciador, 1 U de Taq ADN polimerasa y 25 ng de ADN (Lopes y col., 2001, modificado por Junco, 2015).

Las condiciones de ciclado utilizadas fueron las propuestas por (Lopes y col., 2001):

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

Ciclo 2: Desnaturalización durante 1 min. a 94°C, hibridación de iniciadores durante 1 min. a 50°C, elongación durante 4 min. a 65°C (35 repeticiones).

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

Los fragmentos obtenidos se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,8 % (Junco, 2015).

4.5. Micropropagación

Se tomaron esquejes nodales de 1 cm aproximadamente de plantas de papa de dos meses de edad de las dos variedades en estudio (*Solanum tuberosum* var. 'Granola' y *Solanum tuberosum* var. 'Arbolona negra') del banco de germoplasma del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal del Instituto de Biología Experimental, cultivadas *in vitro* en medio semi-sólido de Murashige y Skoog (MS, 1962) (Anexo 5). Los esquejes nodales se pasaron a medio MS líquido (Anexo 6), 4 esquejes por fiola, y se incubaron por 1 mes bajo luz y agitación continua (Moreno, 2012), a una temperatura de 18°C.

4.5.1. Obtención de hojas de mayor tamaño

Siguiendo el protocolo propuesto por Alva y Oropeza (2013), pasado el mes de incubación en medio MS líquido, se tomaron esquejes nodales de 1 cm aproximadamente y se cultivaron 2 esquejes por cada frasco que contenía medio MS sólido suplementado con 25 g/L de sacarosa y 2 mg/L de nitrato de plata (AgNO_3). Fueron incubadas bajo condiciones de fotoperiodo de 16 horas luz (días largos) a 18°C.

4.5.2. Obtención de microtubérculos

Empleando el protocolo descrito por Moreno (2012), se tomaron cuatro microesquejes de vitroplantas crecidas en medio MS sólido y se incubaron en medio MS líquido por 2 meses. Luego se cambió dicho medio por medio para microtuberización, el cual consiste en medio MS líquido suplementado con 50 g/L de sacarosa y 5 mg/L de benciladenina (BA), una hormona del tipo citoquinina,

promovedora de la división y diferenciación celular. Se incubaron las plantas a 18°C y con un fotoperiodo de 8h luz (días cortos) durante 2 meses, para obtener la formación de microtubérculos de tamaño adecuado (0,6cm o más de diámetro), cuidando de renovar el medio cuando se haya consumido el mismo.

4.6. Pruebas de patogenicidad

Para conocer la sintomatología causada en tubérculos y hojas de papa por los aislados obtenidos así como para seleccionar los aislados patogénicos, estudiar la susceptibilidad o resistencia de las variedades de papa y como otra posible estrategia de identificación, nos planteamos realizar pruebas de patogenicidad en microtubérculos y hojas de vitroplantas, asegurando que los síntomas sean solo causados por el patógeno inoculado y no por otro preexistente como puede suceder en material *ex vitro*. Las pruebas se realizaron en las dos variedades de papa disponibles *in vitro* en el Banco de Germoplasma del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal del Instituto de Biología Experimental (*Solanum tuberosum* var. 'Granola' y *Solanum tuberosum* var. 'Arbolona negra').

4.6.1. Prueba de patogenicidad en microtubérculos

Se evaluó la sintomatología causada por los aislados bacterianos patogénicos mediante el uso de microtubérculos obtenidos por las técnicas de cultivo *in vitro*.

Obtención de las suspensiones bacterianas.

Se reactivó cada bacteria aislada en 2 ml de caldo LB, incubando en una cámara de agitación a 27°C por 24 horas. Luego de las 24 horas de incubación se sembró cada bacteria en placas con agar LB para comprobar la pureza del aislado y se

incubó nuevamente por 24 horas en cámara de agitación a 27°C. Se tomó una colonia y se suspendió en 2 ml de caldo LB, incubando por 6h.

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 y se colocaron 4 o 5 rodajas de microtubérculos de unos 2 mm de grosor en cada placa de cámara húmeda.

Inoculación

Se inocularon 10 µl de cada suspensión bacteriana crecida durante 4 horas, en el centro de cada rodaja de los microtubérculos de la placa correspondiente. Se espera obtener a las 4 horas de crecimiento un cultivo en fase exponencial de crecimiento con un título bacteriana de 10^8 UFC/mL, siendo esta una concentración y tamaño de inóculo óptima para el desarrollo de las pruebas de patogenicidad (Fonseca, 2014; Barrios, 2015; Coppola, 2015).

Como control negativo se preparó una cámara con las rodajas sin inocular, otra con las rodajas inoculadas con 10 µl de caldo LB y otra inoculada con la bacteria no fitopatógena *E. coli*. Por su parte, como controles positivos, se inocularon rodajas de microtubérculos con aislados de *R. solanacearum* y *P. carotovorum*.

Todas las placas se sellaron con parafilm y se incubaron por una semana bajo luz continua a 27°C, observando la sintomatología a diario.

4.6.2. Prueba de patogenicidad en hojas de vitroplantas

Para evaluar los síntomas causados en hojas de papa por los aislados obtenidos, se siguió el mismo protocolo tanto de infección como de preparación de las cámaras húmedas y preparación de los aislados, que el usado con los microtubérculos, inoculando 10µl de cada aislado y de cada control crecidos durante 4 horas (tiempo estimado para tener los aislados en fase exponencial según Fonseca (2014)). El inóculo se colocó en la cara abaxial de hojas y se observó la sintomatología a diario por una semana (Fonseca, 2014).

4.6.3. Incidencia y severidad de la enfermedad

Tanto para la prueba de patogenicidad en hojas como para microtubérculos se determinó la incidencia y severidad de la enfermedad a los 7 días post-inoculación.

Para la incidencia se estima el porcentaje de hojas de vitroplantas y rodajas de microtubérculos infectados respectivamente. Por su parte, la severidad se determinó asignando valores de severidad según la escala propuesta por Montanelli y col. (1995) y modificada por Fonseca (2014), de acuerdo a la sintomatología observada, de la siguiente manera para microtubérculos: 1 cuando sólo el borde se encuentra afectado, 2 cuando menos del 25% se encuentra afectado, 3 cuando del 26% al 50% se encuentra afectado, 4 cuando del 51% al 75% se encuentra afectado y 5 cuando del 76% al 100% se encuentre afectado. Para la severidad en hojas, la escala utilizada es la descrita por Fonseca (2014): 1 hojas con necrosis únicamente en el lugar donde se colocó el inóculo, 2 hojas con puntos negros en el área foliar, 3 hojas con una lesión necrótica o clorótica menor

al 50% de la hoja pero mayor al área de inóculo, 4 hojas cloróticas o necróticas en un porcentaje mayor al 50%. Siendo esta escala aplicable a los resultados obtenidos en las pruebas realizadas.

Con estos valores de severidad, luego se determinó el índice de la enfermedad, según la escala de gradiente de síntomas de Rott y Chagvardieff (1987):

$$ID = \frac{(X1x1) + (X2x2) + (X3x3) + (X4 x4) + (X5 x5)}{Xt x 5} x 100$$

Dónde:

X1 es el número de microtubérculos/hojas con una escala de severidad igual a 1,

X2 número de microtubérculos/hojas con una escala de severidad igual a 2,

X3 es el número de microtubérculos/hojas con una escala de severidad igual a 3,

X4 es el número de microtubérculos/hojas con una escala de severidad igual a 4,

X5 es el número de microtubérculos/hojas con una escala de severidad igual a 5 y

XT el número total de microtubérculos/hojas evaluados.

4.7. Postulados de Koch

Para cumplir con los postulados de Koch, se obtuvieron los aislados bacterianos a partir de los microtubérculos que mostraron síntomas en las pruebas de patogenicidad, tomando un microtubérculo infectado e incubándolo en caldo LB estéril a 27°C por 24h. A los re-aislados se les corroboró la identidad mediante pruebas bioquímicas y moleculares.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Obtención y mantenimiento de aislados bacterianos

Se obtuvieron un total de 14 aislados bacterianos provenientes de hojas colectadas en la parcela con la ubicación: WP 307: 3.220msnm, 8° 44' 58,9" N, 71° 4' 7,7" O, en cuyas muestras se observó una menor superficie foliar afectada.

Los aislados de las parcelas; WP 305: 2.159msnm, 8° 40' 6,3" N, 71° 31' 3" O y WP 306: 2.463msnm, 8° 42' 21" N, 71° 4' 59,6" O, se contaminaron, por lo cual no se ha podido llegar a una comparación de los patógenos que afectan a tres altitudes distintas.

Una vez obtenido los aislados puros por separado, se almacenaron en punciones (Anexo 3) para mantener las cepas que serán estudiadas.

5.2. Prueba de patogenicidad preliminar

Los tubérculos comerciales a pesar de no ser recomendados para estudios de patogenicidad por la posible presencia de patógenos en estado de latencia, permiten la selección de los aislados patogénicos evitando el gasto de una gran cantidad de material vegetal in vitro, considerando la gran cantidad de aislados bacterianos que suelen obtenerse de material vegetal con síntomas de patogenicidad.

De los 14 aislados que fueron aislados y purificados, se realizó una prueba de patogenicidad preliminar con tubérculos de papa comerciales aparentemente sanos, con la finalidad de descartar los aislados no patogénicos y seleccionar

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

aquellos aislados que causan pudrición en la papa para su posterior caracterización e identificación.

Se obtuvieron un total de 2 aislados patogénicos de los 14 aislados totales colectados en la parcela descrita anteriormente, a los cuales se les asignó el código LMV33 y LMV34, según la nomenclatura de cepas bacterianas del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal (LMV) del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela (Figura 4).

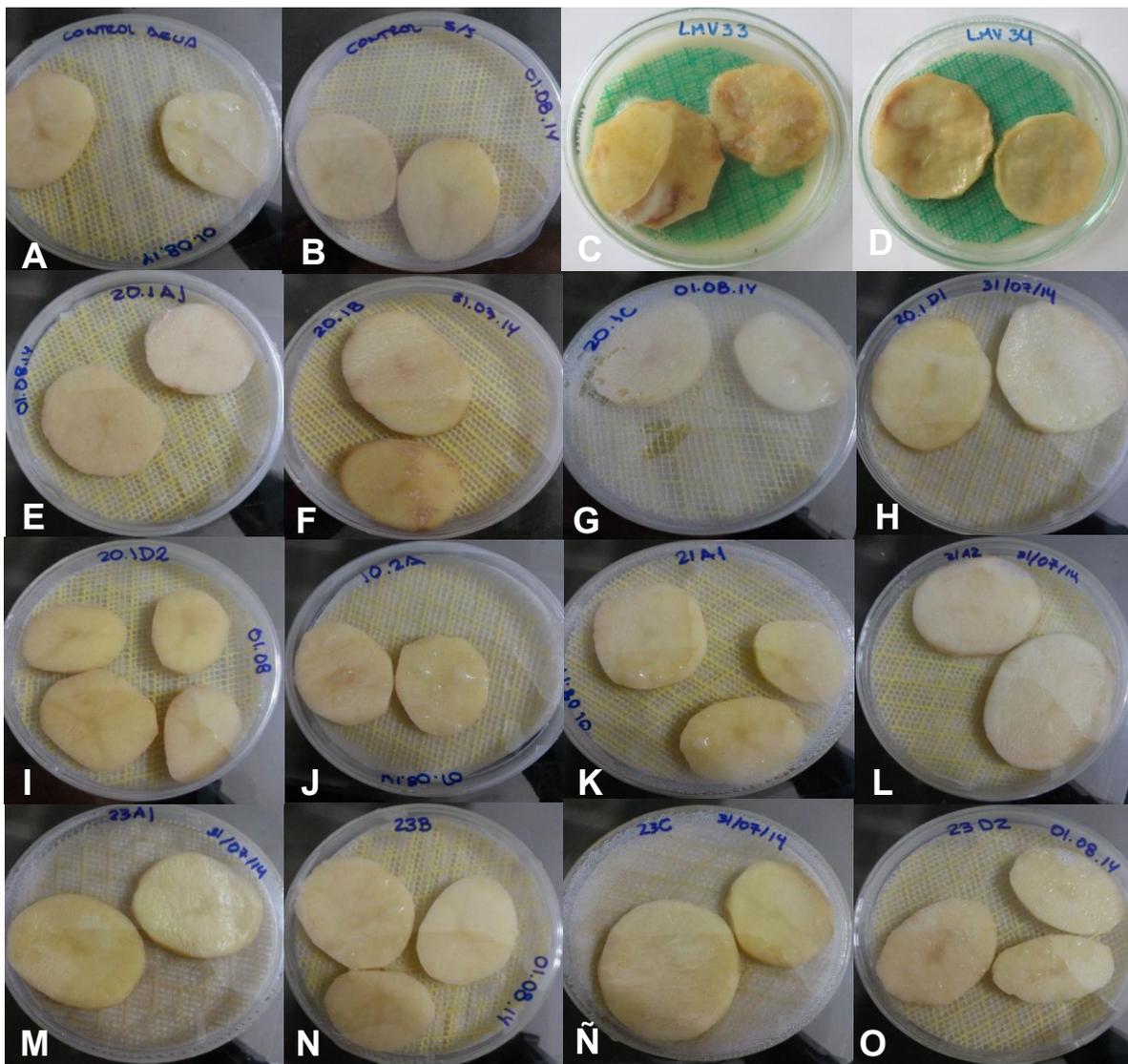


Figura 4. Prueba de patogenicidad preliminar en tubérculos comerciales a las 72hpi. A y B) Controles negativos, con agua y sin inóculo respectivamente. C y D) Aislados bacterianos patogénicos, LMV33 y LMV34 respectivamente. E-O) Aislados bacterianos no patogénicos.

A las 48hpi comenzó a observarse en el aislado LMV33 burbujas color crema en la superficie de los tubérculos, mientras que para el aislado LMV34 se mantuvieron los tubérculos sanos. Para el aislado LMV34 se comenzaron a observar los mismos síntomas a las 96hpi. A los 6dpi se observó en ambos aislados pudrición blanda color crema y bastante mucosa, aunque más en el aislado LMV33, el cual produjo el engrosamiento del tubérculo (Figura 4), donde se observó una sustancia mucosa con burbujas en su interior. Además en ambos aislados se notó un olor fétido al abrir las placas. Esta sintomatología de producción de manchas húmedas color café crema y de mal olor se le conoce como pudrición blanda y puede llegar a la descomposición total de los tubérculos (Montesdeoca y col., 2013).

De las principales bacterias patógenas de papa que afectan a los cultivos nacionales, *Pectobacterium* y *Dickeya chrysanthemi* son las causantes de esta sintomatología, por lo cual podemos sospechar estar en presencia en ambos aislados de *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atroseptica* o *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, que son las subespecies de *Pectobacterium carotovorum* que afectan a los cultivos de papa (García, 2000).

Sin embargo, esta prueba será llevada a cabo en microtubérculos obtenidos por cultivo *in vitro* y asépticamente para asegurar que los síntomas son ocasionados por las cepas con las que hemos inoculado puesto los tubérculos comerciales, al estar en contacto con el ambiente, pueden contener bacterias que no sean eliminadas en el proceso de desinfección.

5.3. Caracterización e identificación de los aislados patogénicos

Un principio para la prevención de enfermedades es que cuando las fuentes de infección de una enfermedad dada se conocen, se pueden implementar medidas efectivas para prevenir una mayor propagación y posteriores brotes de enfermedades (Alvarez, 2004). En este sentido, un requisito previo para el control exitoso de cualquier enfermedad es la detección e identificación apropiada del organismo causal (Shcherbakova, 2007), por lo cual los aislados patogénicos LMV33 y LMV34, y sus respectivos re-aislados fueron caracterizados a nivel morfológico, bioquímico y molecular para su identificación y cumplimiento de los Postulados de Koch. Se utilizaron además para la caracterización bioquímica los aislados controles para *Pectobacterium carotovorum*, *Ralstonia solanacearum*, *Burkholderia gladioli* y *Escherichia coli*, mencionados en la metodología.

5.3.1. Caracterización morfológica

La mayoría de las bacterias se multiplican rápidamente y son visibles como colonias cuando se las siembra en medios de cultivo sólidos adecuados. Requieren una incubación de aproximadamente 24 horas en una atmósfera que favorezca su desarrollo, a temperatura óptima. Una colonia está constituida por los

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

descendientes de una o unas pocas células y su característica dependen de la movilidad de la bacteria (Pírez y Mota, 2008).

Sembrando las bacterias en medio LB sólido y YDC, y observándolas bajo un microscopio estereoscópico, hemos caracterizado la morfología de los aislados bacterianos patogénicos. Se muestran las características en la figura 5 y la descripción en la tabla 5.

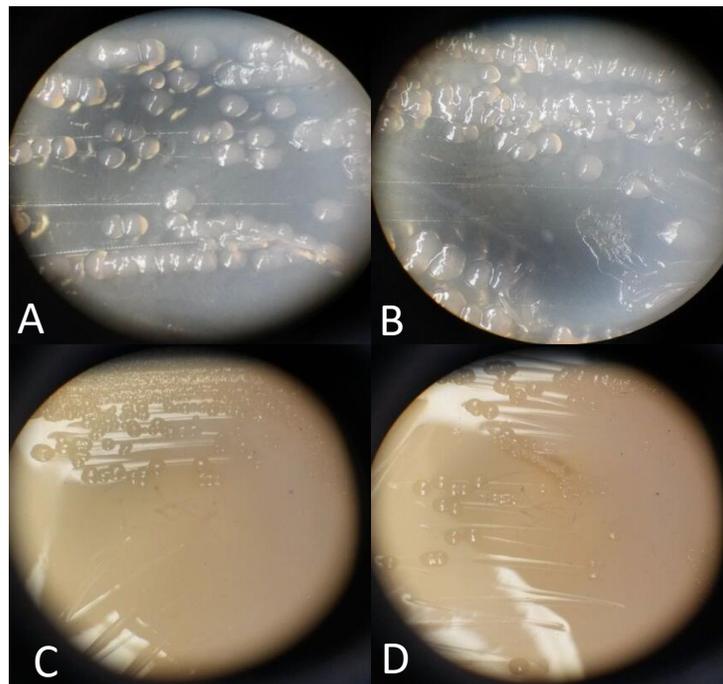


Figura 5. Morfología bacteriana de los aislados patogénicos crecidos en medio LB sólido y YDC. A) LMV33, B) LMV34 crecidas en medio LB sólido; C)LMV33, D)LMV34 crecidas en medio YDC.

Tabla 5. Descripción morfológica de las colonias de los aislados patogénicos en medio LB sólido y mucosidad en medio YDC.

	LMV33	LMV34
Forma	Circular	Circular
Tamaño	Mediana (1-2mm)	Mediana (1-2mm)
Color	Crema	Crema
Borde	Entero	Entero
Superficie	Lisa	Lisa
Levantamiento	Convexa	Convexa
Mucosidad	No mucosa	No mucosa

Las bacterias pueden observarse sin tinción (examen en fresco) si se las coloca en glicerol o soluciones no acuosas que aumenten el índice de refracción o con tinción usando distintas coloraciones que mejoran su visualización ya que son células incoloras. Dichas tinciones se basan en la afinidad que presentan los colorantes por las estructuras bacterianas. Los colorantes catiónicos por ejemplo, son atraídos por los componentes de carga negativa como los ácidos nucleicos y los polisacáridos. Ejemplo de este tipo son: el azul de metileno, el cristal violeta y la safranina (Pírez y Mota, 2008).

El examen en fresco no es el más usado para observar la morfología bacteriana porque las bacterias tienen citoplasma incoloro y su índice de refracción no difiere mucho del vidrio y del agua. Con esta técnica se puede verificar la existencia de bacterias y evidenciar su capacidad para moverse (Pírez y Mota, 2008). De esta manera se ha observado la movilidad tanto de los aislados como de las cepas controles.

La forma de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular. Básicamente, se diferencian según su forma en cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (cilíndrica o de bastones; rectos o curvos) y espirilos (espiral), oscilando su tamaño entre 0,5 y 3 μm (Pírez y Mota, 2008).

La coloración Gram es una coloración diferencial, dado que las bacterias pueden clasificarse según su respuesta en Gram-positivas o Gram-negativas. Las primeras se tiñen de color azul violeta y las segundas adquieren un color rosado o rojo. Mediante esta prueba de tinción se observó la morfología de bacteriana, obteniendo que todas son bacilos Gram-negativos (Figura 6).

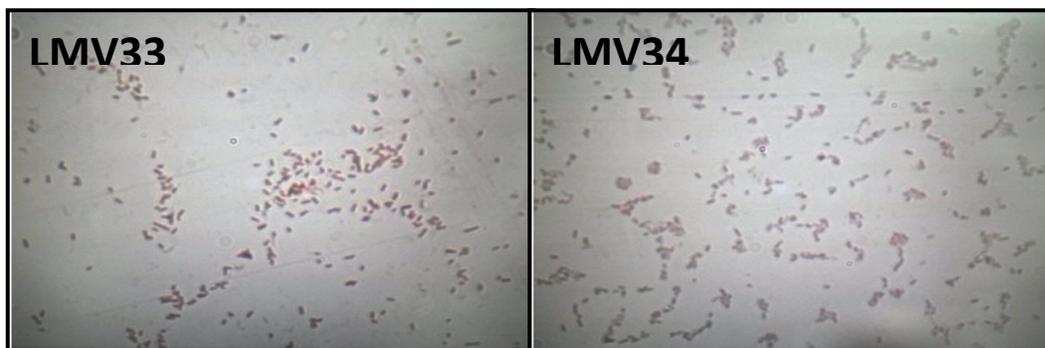


Figura 6. Prueba de tinción Gram para los aislados patogénicos.

5.3.2. Caracterización bioquímica

A partir de las características metabólicas de las bacterias es posible identificar los principales géneros de bacterias patógenas de plantas. Para esto, siguiendo el esquema propuesto por Schaad y col. (2001), hemos clasificado ambos aislados patogénicos como *Pectobacterium*, por ser bacterias Gram negativas (Figura 6), capaces de crecer anaeróbicamente en medio Hugh y Leifson suplementado con glucosa 10% (Figura 7). Además de ser móviles, fermentadoras de glucosa y no fermentadoras de lactosa (Figura 8).

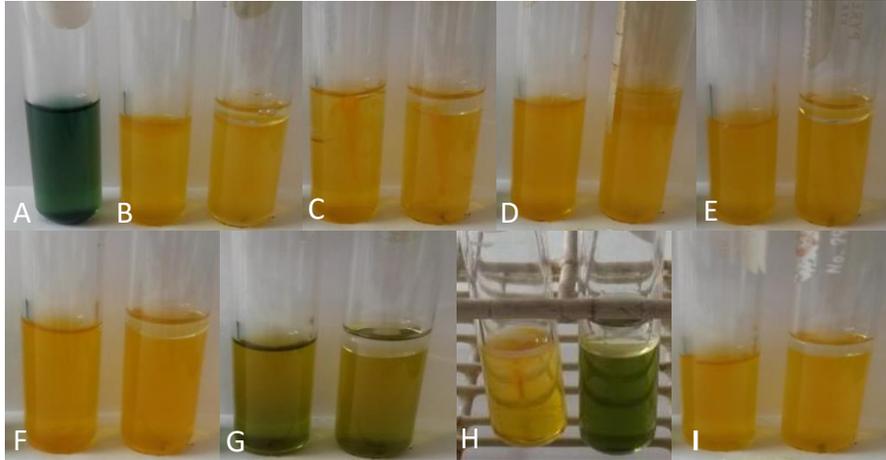


Figura 7. Prueba de Oxido-Fermentación 48 hpi para los aislados patogénicos y las cepas controles, en medio Hugh y Leifson suplementado con glucosa 10%. A) Medio sin inóculo (Control negativo); B) LMV33; C) LMV33 (Postulado de Koch); D) LMV34; E) LMV34 (Postulado de Koch); F) *Pectobacterium carotovorum*; G) *Ralstonia solanacearum*; H) *Burkholderia gladioli*; I) *Escherichia coli*.

Mediante esta prueba, descartamos automáticamente que las bacterias pertenezcan a los géneros *Ralstonia* y *Burkholderia*, las cuales son aerobias estrictas (Schaad y col., 2001). Sin embargo se realizaron otras pruebas adicionales para verificar que las características bioquímicas de los aislados correspondan igualmente al género *Pectobacterium*. La identificación por pruebas bioquímicas nos permitirán además simplificar y disminuir costos en la identificación molecular. Además que las pruebas adicionales permiten comprobar la identidad de las cepas controles.

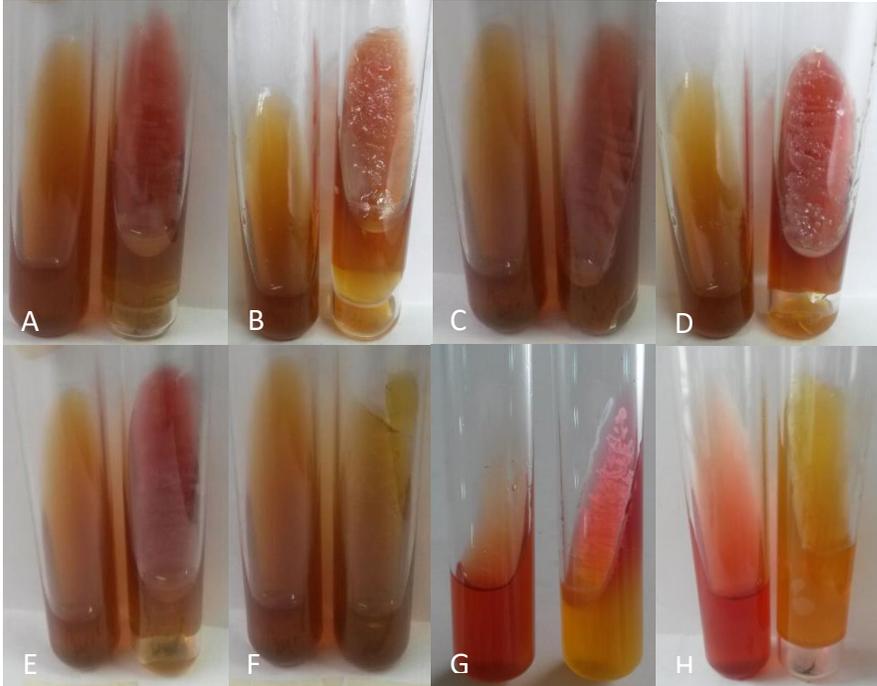


Figura 8. Crecimiento de los aislados patogénicos y las cepas controles en medio Kligler 24hpi. A) LMV33; A) LMV33 (Postulado de Koch); C) LMV34; D) LMV34 (Postulado de Koch); E) *Pectobacterium carotovorum*; F) *Ralstonia solanacearum*; G) *Burkholderia gladioli*; H) *Escherichia coli*. A la izquierda de cada muestra se encuentra el tubo con medio sin inóculo como control negativo.

Ambos aislados patogénicos son capaces de oxidar la glucosa, más no la lactosa. Así mismo producen gas y no producen ácido sulfhídrico, al igual que la cepa LMV30 identificada por Coppola (2015), utilizada como control positivo y que fue identificada como *Pectobacterium carotovorum*. Esta prueba permite también la diferenciación de las otras cepas controles ya que *R. solanacearum* no oxida glucosa ni lactosa y *B. gladioli* no produce gas en el medio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Finalmente se incubaron además las bacterias en medio LB sólido a 37°C para saber si los aislados pertenecen a la especie *Pectobacterium atrosepticum*, la cual no crece a dicha temperatura (Toth y col. 2001; Baghaee-Ravari y col., 2011; Golkhandan y col. 2013). Se obtuvo crecimiento de ambos aislados por lo cual descartamos la presencia de esta especie (Figura 9). De esta manera, se presume que los aislados LMV 33 y LMV34 sean *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* o *Dickeya chrysanthemi*, siendo estas capaces de crecer a 37°C.



Figura 9. Crecimiento de los aislados patogénicos a 37°C.

Los resultados obtenidos en las pruebas realizadas concuerdan con lo reportado por García y col. (1999), Schaad y col. (2001), Baghaee-Ravari y col. (2011), Fonseca (2014), Barrios (2015) y Coppola (2015); comprobando la identidad de los aislados como pertenecientes al género *Pectobacterium*, comprobando igualmente la identidad de los re-aislados, al obtenerse los mismos resultados que para los aislados originales.

Se sabe que factores ambientales como la temperatura, la humedad y la concentración de oxígeno en el suelo, tienen un gran efecto en el desarrollo de enfermedades causadas por el género *Pectobacterium* (Charkowski, 2015).

Considerando que la parcela donde se colectaron las muestras está a más de 3000 m.s.n.m. y que por lo tanto hay una menor temperatura que en las demás parcelas, podría explicarse el por qué la presencia de solo dos aislados patogénicos y la menor incidencia y severidad de enfermedades en los cultivos presentes a mayor altura. Esto, acorde además a lo observado por uno de los productores de la zona, que indicó que hay menos cultivos afectados por encima de los 2500 m.s.n.m.

Otro productor del Estado Mérida, cercano al valle del Río Chama, indicó igualmente que los síntomas de marchitez se observan en las regiones más bajas y cercanas al río, no en las más altas (Coppola, 2015). Los patógenos pertenecientes al género *Pectobacterium* se esparcen por varios mecanismos, como el agua, semillas, equipos e insectos contaminados (Charkowski, 2015). Considerando entonces el agua como un transporte importante de patógenos, es lógico obtener menos cultivos afectados a mayor altura.

5.1.1. Identificación molecular de los aislados patogénicos

Ya conociendo por las características metabólicas de los aislados, que los mismos pertenecen presuntamente a la especie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* o *Dickeya chrysanthemi*, se realizaron una serie de pruebas moleculares basadas en la técnica de la PCR para corroborar las identidades

obtenidas por las pruebas morfológicas y bioquímicas. Así mismo, tomando en cuenta los resultados de las pruebas bioquímicas, se utilizaron como controles únicamente *Pectobacterium carotovorum* (control positivo) y *Escherichia coli* (control negativo), además de los respectivos controles de reactivos para verificar que no haya contaminación en alguno de los reactivos o en el proceso de la mezcla de reacción, evitando así el uso de reactivos en controles innecesarios.

5.1.1.1. Extracción del ADN bacteriano.

Se corroboró nuevamente la efectividad del método de Gomes y col. (2000) para la extracción de ADN bacteriano, obteniéndose una concentración e integridad de ADN apropiada (Figura 10), tal como describe Barrios (2015) y como obtuvo Coppola (2015), ambas aislando ADN de *Pectobacterium*.

Se realizó la extracción del ADN de los 2 aislados problema, de sus re-aislados provenientes del postulado de Koch y de las cepas controles *P. carotovorum* y *E. coli*.

5.1.1.2. Cuantificación y pureza del ADN extraído

Mediante la técnica de espectrofotometría y por la relación de la absorbancia 260/280nm, se obtuvo el estimado de la pureza del ADN extraído, dado que el máximo de absorbancia para los ácidos nucleicos es a una longitud de onda de aproximadamente 260nm y de las proteínas a unos 280nm, permitiendo esta relación estimar el grado de impurezas protéicas en los extractos, siendo el valor óptimo entre 1,8 y 2 (Zarate y col., 2009; citado por Coppola, 2015).

La absorbancia a 260nm dada por los enlaces conjugados entre los ácidos nucleicos (Sambrook y Rusell, 2001; citado por Coppola, 2015), permite también estimar la concentración de ADN en el extracto, puesto que como se indicó en la metodología 1 DO equivale a 50µg/ml de ADN doble cadena. Los resultados de absorbancias se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Valores de densidad óptica y concentración de ADN obtenidos para los aislados patogénicos y las cepas controles.

Muestra	D.O. (260nm)	D.O. (280nm)	Relación 260/280	[ADN] (ng/µl)
LMV33	0,066	0,03	2,2	660
LMV33 Koch	0,067	0,035	1,9	670
LMV34	0,074	0,046	1,609	740
LMV34 Koch	0,061	0,034	1,794	610
<i>P. carotovorum</i>	0,061	0,031	1,968	610
<i>E. coli</i>	0,141	0,07	2,014	1410

Todos los valores de relación 260/280 estuvieron dentro o cerca del rango óptimo de 1,8–2, comprobando la pureza de los extractos del ADN y la efectividad del método de extracción empleado.

5.1.1.3. Electroforesis en gel de agarosa 0,8%

Mediante una corrida electroforética en gel de agarosa 0,8% es posible también estimar la calidad y concentración de los extractos de ADN pero de manera cualitativa. Para todos los extractos se observó una banda de alto peso molecular correspondiente al ADN genómico de los aislados (Figura 10), indicando una alta calidad y cantidad de los ADN aislados.

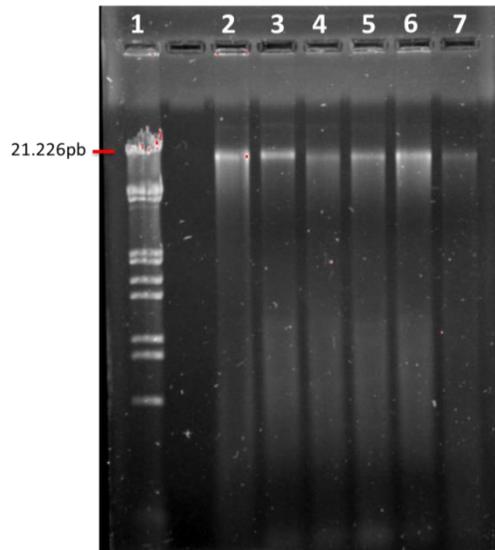


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa 0,8% de los extractos de ADN obtenidos. Carril 1: marcador de peso molecular Lambda HindIII/EcoRI (PROMEGA). Carril 2; LMV33. Carril 3: LMV33Koch. Carril 4: LMV34. Carril 5: LMV34Koch. Carril 6: *P. carotovorum*. Carril 7: *E. coli*.

5.1.1.4. Amplificación con iniciadores universales del gen 16S del ADNr.

Para todos los aislados se amplificó la banda de 996pb correspondiente al gen 16S del ADNr (Figura 11) conservada en todas las bacterias, además de una banda inespecífica de 150pb reportada por los autores que diseñaron los iniciadores empleados, Lu y col. (2000), indicando esto que son organismos procariontas y que no hay presencia de inhibidores de la PCR en los extractos de ADN.

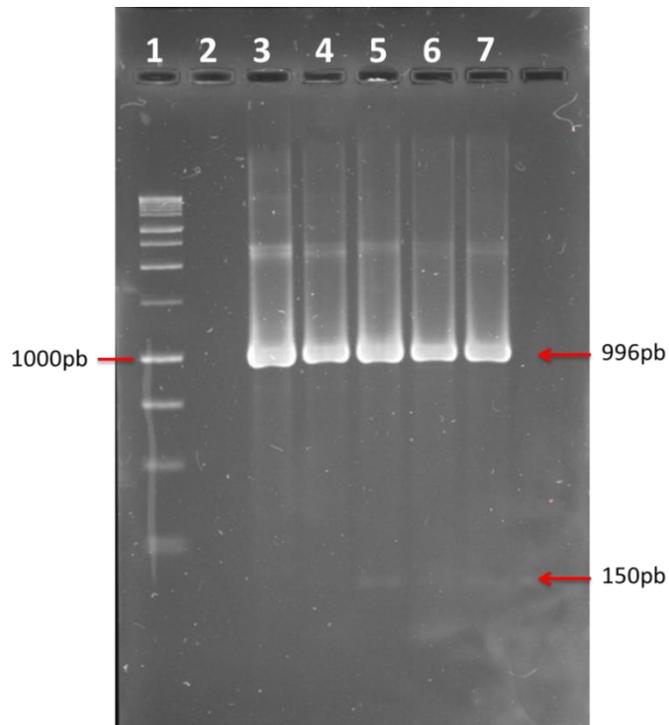


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa 1,6% de los productos de PCR para la amplificación de la subunidad menor del gen 16S del ADNr de procariotas. Iniciadores: U1 y U2. Carril 1: marcador de peso molecular 1Kb (PROMEGA). Carril 2: Control de reactivos. Carril 3: LMV33. Carril 4: LMV33 (Koch). Carril 5: LMV34. Carril 6: LMV34 (Koch). Carril 7: *Pectobacterium carotovorum*.

5.1.1.5. Amplificación con iniciadores específicos

Los síntomas causados por *P. carotovorum* son similares a los ocasionados por otras bacterias que causan pudrición blanda, por lo cual es importante el uso de un método rápido y específico que permita la identificación de dicha especie (Darrase y col., 1994).

En este sentido, se llevó a cabo una PCR para la amplificación de la familia Y de los genes codificantes para las enzimas pectato liasas presentes en algunas

cepas de *Pectobacterium carotovorum*, empleando los iniciadores Y1 y Y2 propuestos por Darrase y col. (1994).

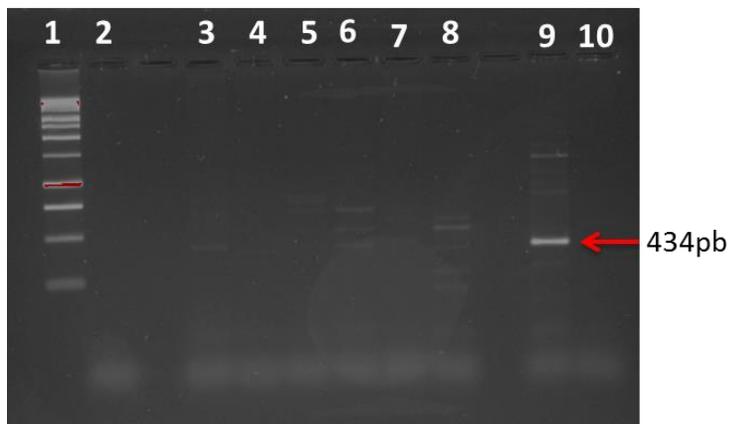


Figura 12a. Electroforesis en gel de agarosa 1,2% de los productos de PCR para la amplificación del gen de las pectato liasas. Iniciadores: Y1 y Y2. Carril 1: marcador de peso molecular 1Kb (PROMEGA). Carril 2: Control de reactivos. Carril 3: LMV33. Carril 4: LMV33 (Koch). Carril 5: LMV34. Carril 6: LMV34 (Koch). Carril 7: *Pectobacterium carotovorum*. Carril 8: *Escherichia coli*. Carril 9: *Pectobacterium carotovorum* (ADN aislado previamente por Coppola, 2015). Carril 10: *Escherichia coli*.

Mediante el protocolo propuesto por Baghaee-Ravari y col. (2011) se amplificaron una gran cantidad de bandas no esperadas y poco intensas (Figura 12a), por lo cual se decidió aumentar la temperatura de anillamiento a 61°C, obteniéndose que solo amplifica la banda esperada de 434pb el control positivo de *Pectobacterium carotovorum*, mas no en los aislados problema al igual que obtuvo Barrios (2015).

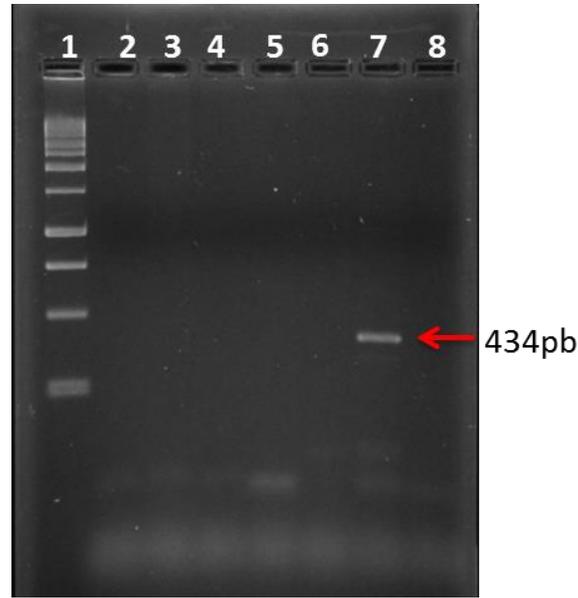


Figura 12b. Electroforesis en gel de agarosa 1,2% de los productos de PCR para la amplificación del gen de las pectato liasas. Iniciadores: Y1 y Y2. Carril 1: marcador de peso molecular 1Kb (PROMEGA). Carril 2: Control de reactivos. Carril 3: LMV33. Carril 4: LMV33 (Koch). Carril 5: LMV34. Carril 6: LMV34 (Koch). Carril 7: *Pectobacterium carotovorum*. Carril 8: *Escherichia coli*.

Al aumentar la temperatura de anillamiento, aumentamos la especificidad de unión de los iniciadores a su secuencia específica complementaria, en este caso específica de la especie *Pectobacterium carotovorum*, evitando que se una a otras regiones del ADN con secuencia similar a la del gen pel y consecuentemente eliminando las bandas inesperadas obtenidas anteriormente.

Darrase y col. (1994) reportan dos especies de *Pectobacterium* que no amplifican esta región: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *betavasculatorum* y *Dickeya chrysanthemi* proponiendo la hipótesis de que la incapacidad de amplificar esta región se deba a un cambio en la secuencia del gen pel por el alto grado de

acetilación de las pectinas de la remolacha azucarera, principal planta hospedera de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *betavasculatorum*. Sin embargo *Dickeya chrysanthemi* no se reporta como patógena de la remolacha azucarera.

Hélias y col. (1998) caracterizando cepas de *Pectobacterium carotovorum* por métodos moleculares igualmente obtuvieron la amplificación de la banda de 434pb con los iniciadores Y1 y Y2 propuestos por Darrase y col. (1994), excepto para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *betavasculatorum*.

Considerando que *Pectobacterium carotovorum* subsp. *betavasculatorum* no ha sido reportada como patógena de papa (Charkowski, 2015), y siendo capaces de crecer a 37°C los aislados problema, podemos identificar presuntamente los aislados como *Dickeya chrysanthemi*. No obstante, se realizó la amplificación de la región espaciadora ITS para complementar este resultado.

Se ha reportado en varias investigaciones un mutante no virulento de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *betavasculatorum* Ecbl68, que suprime el crecimiento de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* en cultivo y en las heridas de tubérculos de papa. La actividad antagonista de Ecbl68 se debe en parte a la producción del mismo de un antibiótico(s) con actividad contra una amplia gama de cepas de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Costa y Loper, 1994).

5.1.1.6. Amplificación de la región espaciadora transcrita intergénica (ITS)

La región espaciadora intergénica transcrita 16S-23S (ITS) que separa los genes de la subunidad mayor y menor del ADNr presenta una gran secuencia polimórfica

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

y altamente conservada, que puede ser estudiada mediante la técnica de PCR-RFLP, permitiendo diferenciar entre cepas bacterianas (Jensen y col., 1993; Toth y col., 2001).

De este modo, mediante una PCR utilizando los iniciadores G1 y L1 propuestos por Jensen y col. (1993), se obtuvo el mismo patrón de bandas para ambos aislados y a su vez igual al del control positivo de *Pectobacterium carotovorum* (Figura 13a). Sin embargo el re-aislado del LMV33 dio un patrón de bandas distinto al aislado original, indicando que no se logró el re-aislamiento del LMV33. Por esta razón fue necesario re-aislar nuevamente este aislado al realizar la prueba de patogenicidad en hojas de vitroplantas para comprobar los postulados de Koch en el aislado LMV33. Este patrón de bandas distinto en el re-aislado LMV33Koch puede deberse a una bacteria Gram positiva, posiblemente ambiental, que constantemente se encontraba contaminando las cepas y aislados bacterianos.

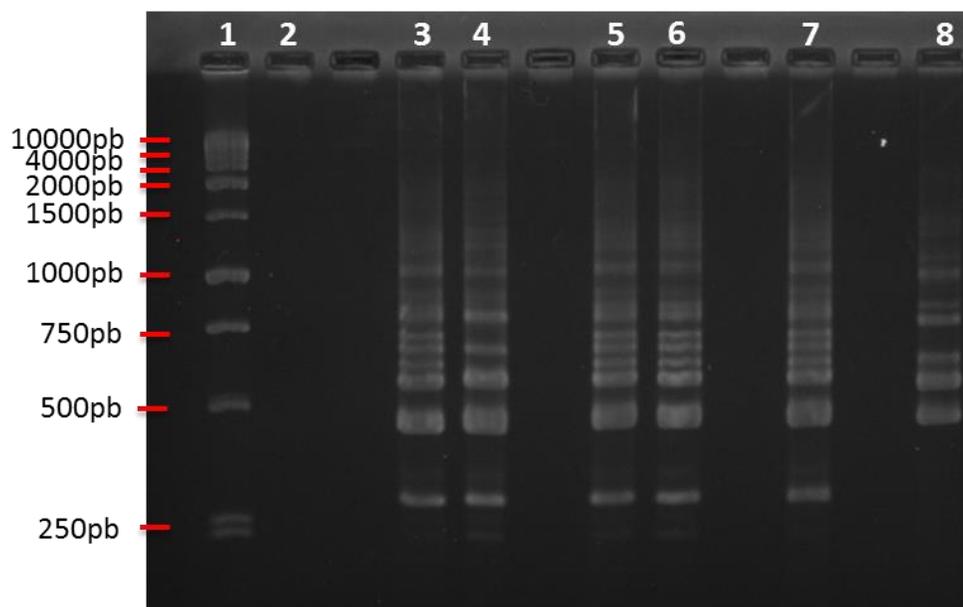


Figura 13a. Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos de PCR para la amplificación de la región espaciadora ITS. Iniciadores: G1 y L1. Carril 1: marcador de peso molecular 1Kb (PROMEGA). Carril 2: Control de reactivos. Carril 3: LMV33. Carril 4: LMV33 (Koch). Carril 5: LMV34. Carril 6: LMV34 (Koch). Carril 7: *Pectobacterium carotovorum*. Carril 8: *Escherichia coli*.

Al realizar la amplificación de la región ITS con el nuevo re-aislado se obtuvo efectivamente el mismo patrón de bandas que el aislado original (Figura 13b), solventando así el problema de contaminación del re-aislado LMV33Koch.

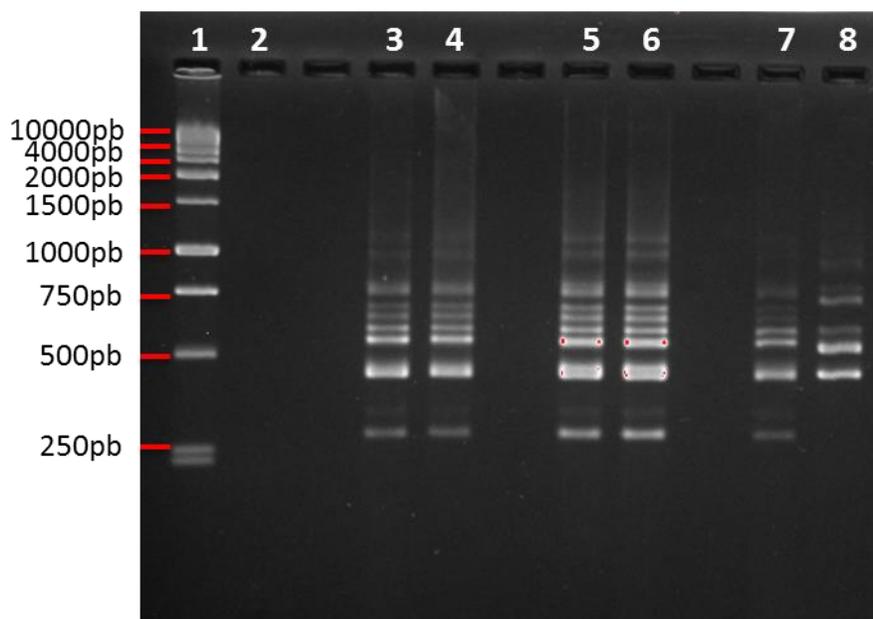


Figura 13b. Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos de PCR para la amplificación de la región espaciadora ITS. Iniciadores: G1 y L1. Carril 1: marcador de peso molecular 1Kb (PROMEGA). Carril 2: Control de reactivos. Carril 3: LMV33. Carril 4: LMV33 (Koch). Carril 5: LMV34. Carril 6: LMV34 (Koch). Carril 7: *Pectobacterium carotovorum*. Carril 8: *Escherichia coli*.

El patrón de bandas obtenido parece indicar que ambos aislados son idénticos entre sí y a su vez idéntico al control positivo de *Pectobacterium carotovorum* identificado por Coppola (2015); sin embargo, siendo esta una región específica en el genoma no puede considerarse un resultado definitivo para la identificación de LMV33 y LMV34 si los productos de amplificación no son digeridos con enzimas de restricción reportadas para la identificación de *Pectobacterium*. Además, según los resultados obtenidos al amplificar el gen de las enzimas pectato liasas, sabemos que no estamos en presencia de la misma especie. Aun así, se amplificaron las bandas de aproximadamente 535pb y 570pb esperadas para el género *Pectobacterium* con un patrón similar a los reportados en trabajos previos (Toth y col., 2001; Baghaee-Ravari y col., 2011; Nazerian y col., 2011; Golkhandan y col., 2013), y con mayor similitud con el patrón obtenido para *Dickeya chrysanthemi* por Toth y col. (2001), quienes reportan una banda de aproximadamente 450pb (Figura 14) similar a la banda obtenida en los aislados LMV33 y LMV34.

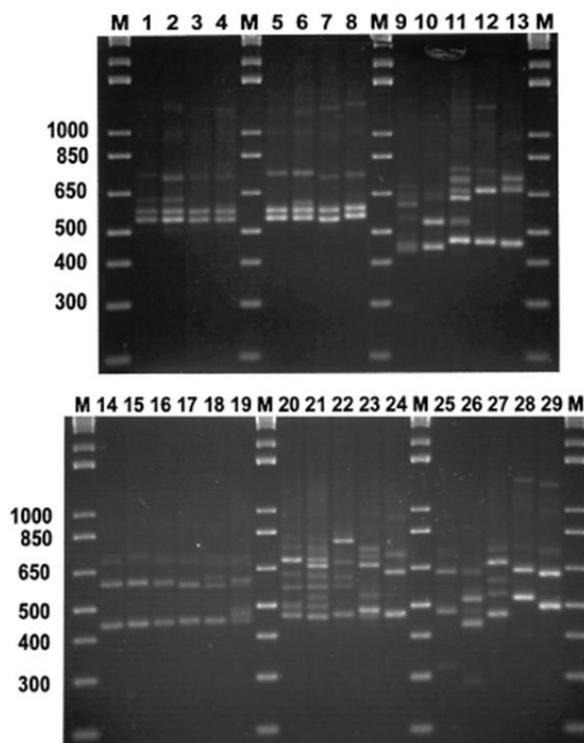


FIG. 1. ITS-PCR amplification patterns of species belonging to *Erwinia*, *Pantoea*, *Enterobacter*, and other *Enterobacteriaceae* genera. Lane 1, *E. carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI 1039; 2, *E. carotovora* subsp. *betavascolorum* SCRI 479; 3, ECC^a, *E. carotovora* subsp. *carotovora* SCRI 244; 4, ECC^b, *E. carotovora* subsp. *carotovora* SCRI 167; 5, ECO^a, *E. carotovora* subsp. *odorifera* SCRI 914; 6, ECO^b, *E. carotovora* subsp. *odorifera* SCRI 915; 7, *E. carotovora* subsp. *wasabiae* SCRI 481; 8, *E. cacticida* SCRI 484; 9, *Enterobacter cancerogenus* SCRI 489; 10 and 11, *E. cypripedii* SCRI 478 and SCRI 440; 12 and 13, *E. rhapontici* SCRI 421 and SCRI 472; 14, ECH^a, *E. chrysanthemi* SCRI 418; 15, ECH^b, *E. chrysanthemi* SCRI 4071; 16, ECH^c, *E. chrysanthemi* SCRI 4004; 17, ECH^d, *E. chrysanthemi* SCRI 4037; 18, ECH^e, *E. chrysanthemi* SCRI 4044; 19, ECH^f, *E. chrysanthemi* SCRI 409; 20 and 21, *Pantoea ananatis* SCRI 485 and SCRI 922; *P. stewartii* SCRI 475; 23 and 24, *P. agglomerans* SCRI 435 and SCRI 459; 25, *Enterobacter nimipressuralis* SCRI 491; 26, *Enterobacter dissolvens* SCRI 921; 27, *Erwinia uredovora* SCRI 433; 28, *E. quercinia* SCRI 442; 29, *E. rubrifaciens* SCRI 445

Figura 14. Producto de amplificación de la región ITS obtenida por Toth y col. (2001).

Toth y col. (2001) reportan para distintos aislados de *D. chrysanthemi* y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, patrones de bandas distintos, indicando una alta diversidad tanto entre distintas especies como entre la misma especie, por lo cual no es inesperado haber obtenido un patrón de bandas similar mas no idéntico a los reportados, especialmente tratándose de aislados provenientes de países y continentes distintos, presentándose diferencias genéticas entre las cepas.

Por lo antes expuesto, Toth y col. (2001), Baghaee-Ravari y col. (2011), Nazerian y col. (2011) y Golkhandan y col. (2013) recomiendan la amplificación de la región ITS seguido de RFLP para ampliar el nivel de discriminación entre especies. No obstante no se pudo realizar RFLP por falta de las enzimas de restricción, pero se

estudió la variabilidad genética mediante la amplificación de las secuencias repetidas BOX.

5.1.1.7. Caracterización de la variabilidad genética de los aislados LMV33 y LMV34

Las técnicas de rep-PCR se basan en la amplificación de secuencias cortas de ADN repetidas y distribuidas en el genoma de bacterias, conocidas como elementos BOX, REP y ERIC. La distribución de estos elementos pueden ser un indicativo de la estructura y evolución del genoma bacteriano. Además son elementos adecuados para la rápida caracterización e identificación de bacterias patógenas, permitiendo diferenciar entre patovares de una misma especie (Louws y col., 1994).

Las técnicas de rep-PCR consisten en el uso de iniciadores que amplifiquen secuencias repetidas altamente conservadas y presentes en múltiples copias en especies bacterianas de la mayoría de las bacterias Gram-negativas y algunas Gram-positivas (Lupski y Weinstock, 1992).

Como resultado de la amplificación se obtienen patrones de bandas únicos y distintos que permiten la diferenciación de dos organismos (Lopes y col., 2001).

5.1.1.7.1. BOX-PCR

Aunque los aislados parecían ser idénticos al control positivo de *Pectobacterium carotovorum* aislado igualmente en el Estado Mérida, Venezuela, e identificado por Coppola (2015), el patrón de bandas obtenido al amplificar las secuencias repetitivas BOX descarta esta teoría. Sin embargo los aislados obtenidos si

resultaron ser idénticos entre sí e igual a sus respectivos re-aislados, comprobándose nuevamente el cumplimiento de los postulados de Koch (Figura 15).

La identificación de dos bacterias distintas en el Estado Mérida y causantes de la misma sintomatología, hacen de gran importancia la identificación de los patógenos que afectan a nuestros cultivos, puesto que pueden ser confundidos tanto por sintomatología asociada como por pruebas bioquímicas. Además al ser encontrado a una altura mayor de los 3000m.s.n.m, siendo un patógeno de zonas tropicales y subtropicales, y por lo tanto no adaptado a bajas temperaturas, puede hacer pensar que los cambios de temperatura en los últimos años han facilitado la reproducción de este patógeno que además sobrevive fácilmente en el agua, pudiendo ser trasladados en los Ríos Chama (Aislados identificados por Coppola, 2015) y Mucujún (Aislados LMV33 y LMV34) respectivamente. De ser así es de gran importancia mantener los tubérculos almacenados bajo condiciones óptimas para evitar que patógenos presentes en estado de latencia pasen a un estado activo de infección. Adicionalmente fue reportada también en el Estado Lara por Barrios (2015), resaltando la importancia de buscar metodologías de control para las bacterias causantes de pudrición blanda en papa, como el uso variedades resistentes.

Sin embargo, los resultados no son comparativos con trabajos previos pues solo se ha encontrado un reporte para especies de *Pectobacterium*, de Tavasoli y col. (2011) quien amplificó mediante ERIC y BOX especies de *Pectobacterium* encontradas en Zajan, Iran, donde por presentarse un clima frío limita el

crecimiento de *D. chrysanthemi*, que crece en zonas tropicales y subtropicales (García, 2000).

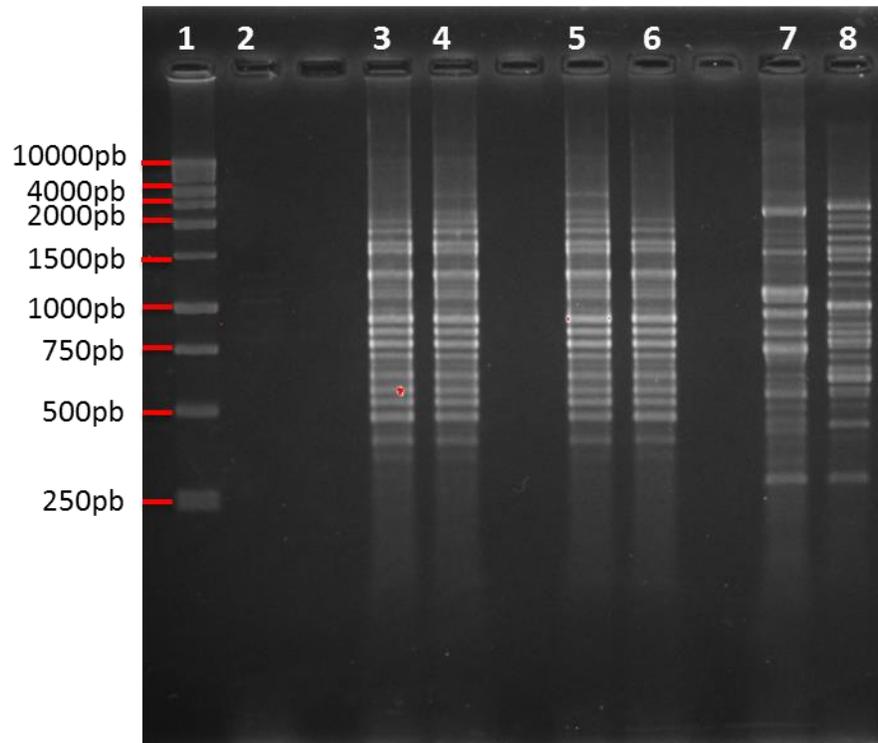


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa 1,8% de los productos de PCR con el iniciador BOXA1R. Carril 1: marcador de peso molecular 1Kb (PROMEGA). Carril 2: Control de reactivos. Carril 3: LMV33. Carril 4: LMV33 (Koch). Carril 5: LMV34. Carril 6: LMV34 (Koch). Carril 7: *Pectobacterium carotovorum*. Carril 8: *Escherichia coli*.

Con estos resultados podemos concluir que los dos aislados obtenidos (LMV33 y LMV34) son genéticamente idénticos entre sí y posiblemente pertenecientes a la especie *Dickeya chrysanthemi*. No obstante, se recomienda para una mayor seguridad en la identificación realizar la amplificación de las secuencias REP y adicionalmente la genotipificación mediante la amplificación de la región repetitiva

ERIC, lo cual no pudo realizarse en el presente trabajo por falta de los iniciadores adecuados. Tavasoli y col. (2011) reportan que para la amplificación de los elementos BOX de distintas especies de *Pectobacterium* pueden dar un patrón idéntico y al amplificar las secuencias ERIC resultar un patrón distinto, indicando la presencia de cepas no genéticamente idénticas. La genotipificación sin embargo, se recomienda especialmente si se cuenta con un número mayor de muestras que se quieren comparar, pero en este caso nos permitió diferenciar nuevamente los aislados problema del control positivo *P. carotovorum*.

Los aislados obtenidos, aunque no han sido idénticos a los obtenidos por Coppola (2015) en el valle del Río Chama, Estado Mérida, están genéticamente muy relacionados, pudiendo pensarse que estos patógenos son trasladados en los ríos y la fuente de contaminación son las aguas de riego.

5.2. Micropropagación

Al incubar las vitroplantas crecidas en medio líquido y ser transplantadas al medio e incubadas bajo las condiciones propuestas por Moreno (2012), se observó efectivamente la formación de microtubérculos en ambas variedades obteniéndose aproximadamente 3 por cada vitroplanta (Figura 16).

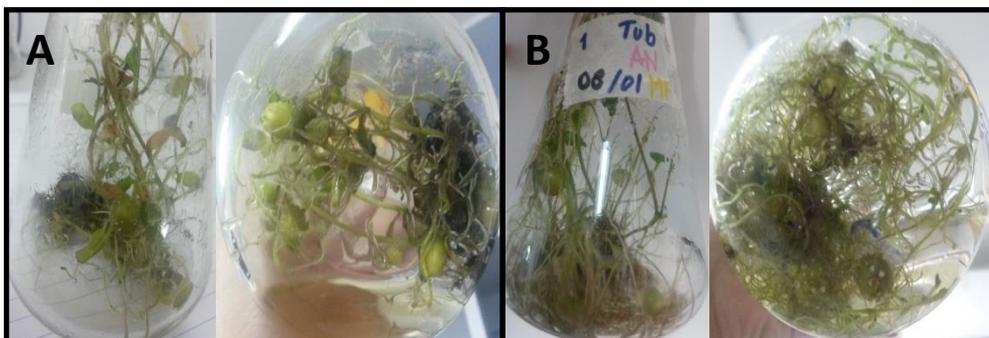


Figura 16. Microtubérculos de papa de las variedades 'Granola' (A) y 'Arbolona negra' (B).

Igualmente, tal como reportan Alva y Oropeza (2013), al ser incubadas las vitroplantas en medio semi-sólido se obtienen plantas más altas pero frágiles, y en medio líquido plantas más robustas pero de menor altura y con menor área foliar (Figura 17).

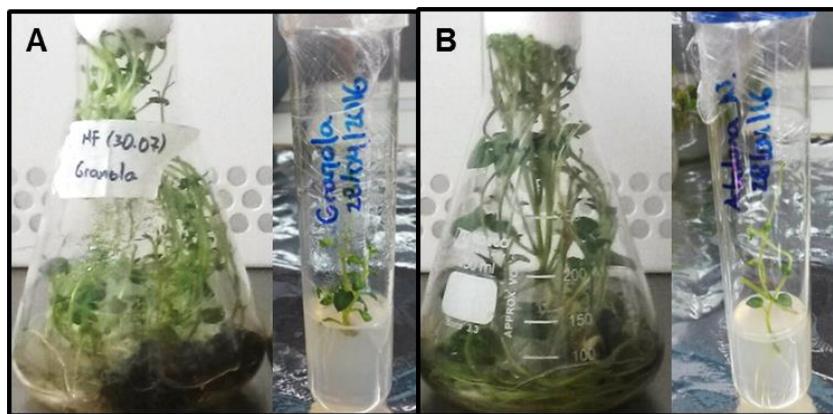


Figura 17. Cultivo *in vitro* de papa de las variedades 'Granola' (A) y 'Arbolona negra' (B) en medio MS líquido y semi-sólido.

Esto hace de las vitroplantas cultivadas en medio líquido apropiadas para distintos estudios, como los de patogenicidad. Por su parte, el cultivo en medio semi-sólido es apropiado para el mantenimiento de bancos de germoplasma por obtenerse más hojas y mantenerse en buen estado por más tiempo.

De igual modo, el área foliar aumentó ligeramente respecto a las hojas obtenidas en medio MS sólido, al ser incubadas las plantas en medio semi-sólido suplementado con nitrato de plata (Figura 18); sin embargo, no se obtuvo el área foliar esperada de aproximadamente 1,5cm (Alva y Oropeza, 2013) por problemas

externos con la temperatura y el fotoperíodo, lo cual resalta la importancia de mantener las condiciones ambientales óptimas como expone Salas (1995) para el buen desarrollo de las vitroplantas en la micropropagación.

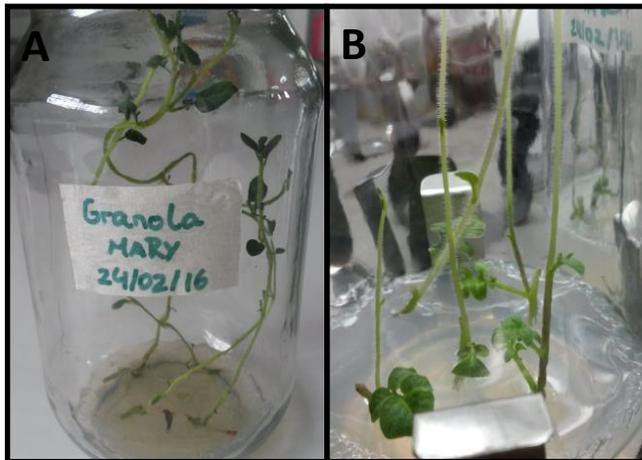


Figura 18. Vitroplantas de papa de las variedades 'Granola' (A) y 'Arbolona negra' (B), en medio MS semi-sólido suplementado con nitrato de plata.

Esto nos permitió posteriormente estudiar la sintomatología causada por los aislados patogénicos tanto en hojas como en tubérculos de papa, así como evaluar la susceptibilidad o resistencia de la planta al patógeno.

5.2.1. Pruebas de patogenicidad

Para corroborar que los síntomas de los aislados patogénicos concuerdan con la patogenicidad reportada en la literatura para *P. carovorum* o *D. chrysanthemi* así como para evaluar la resistencia o susceptibilidad de las variedades 'Granola' y 'Arbolona negra' a dicho patógeno, se realizó una prueba de patogenicidad de dichos aislados en rodajas de microtubérculos y de hojas de vitroplantas de ambas variedades.

5.2.1.1. Prueba de patogenicidad en microtubérculos

En los microtubérculos, se observaron los síntomas a las 24hpi para *P. carotovorum*, *R. solanacearum*, LMV33 y LMV34, y a las 48hpi para *B. gladioli*, mostrándose pudrición de los tubérculos y ennegrecimiento en los aislados LMV33 y LMV34 (excepto para la variedad 'Arbolona negra' donde todas las sintomatologías observadas fueron pudrición de los microtubérculos); y pudrición de los tubérculos en las rodajas inoculadas con *R. solanacearum*, el control de *P. carotovorum* y *B. gladioli* (Figura 19).

Estas sintomatologías observadas concuerdan con las reportadas en campo por Elphistones (1987) y en vitroplantas por Barrios (2015) y Coppola (2015) para *Pectobacterium* y *Dickeya chrysanthemi*, corroborando así la identificación previa.

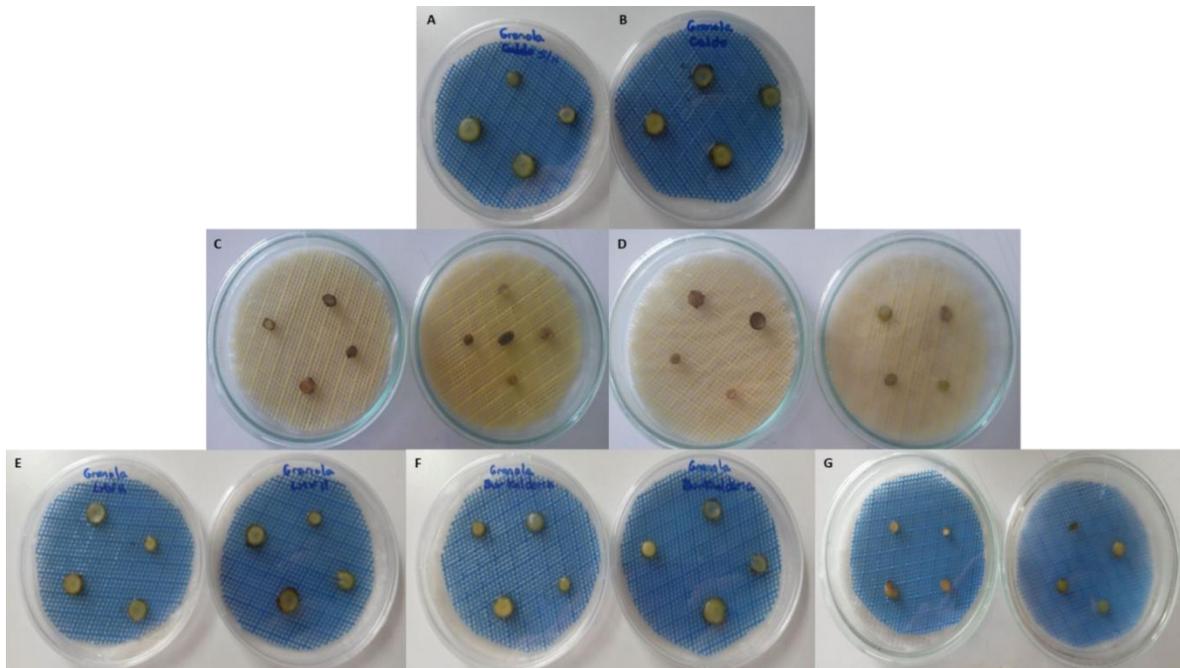


Figura 19. Prueba de patogenicidad en microtubérculos de la variedad 'Granola'. A) Control negativo sin inocular; B) Control negativo inoculado con caldo LB; C)

LMV33; D) LMV34; E) *Pectobacterium carotovorum*; F) *Burkholderia gladioli*; G) *Ralstonia solanacearum*.

Al comparar los resultados obtenidos para ambas variedades, en general se observó menor afección para la variedad 'Arbolona negra' que para la variedad 'Granola' (Figura 20), corroborando los resultados obtenidos por Fonseca (2014), Barrios (2015) y Coppola (2015), destacándose nuevamente la tolerancia de la variedad 'Arbolona negra' a los patógenos del cultivo de la papa, haciendo conveniente su cultivo para evitar la pérdida de los cultivos nacionales por infecciones bacterianas y la contaminación ambiental.

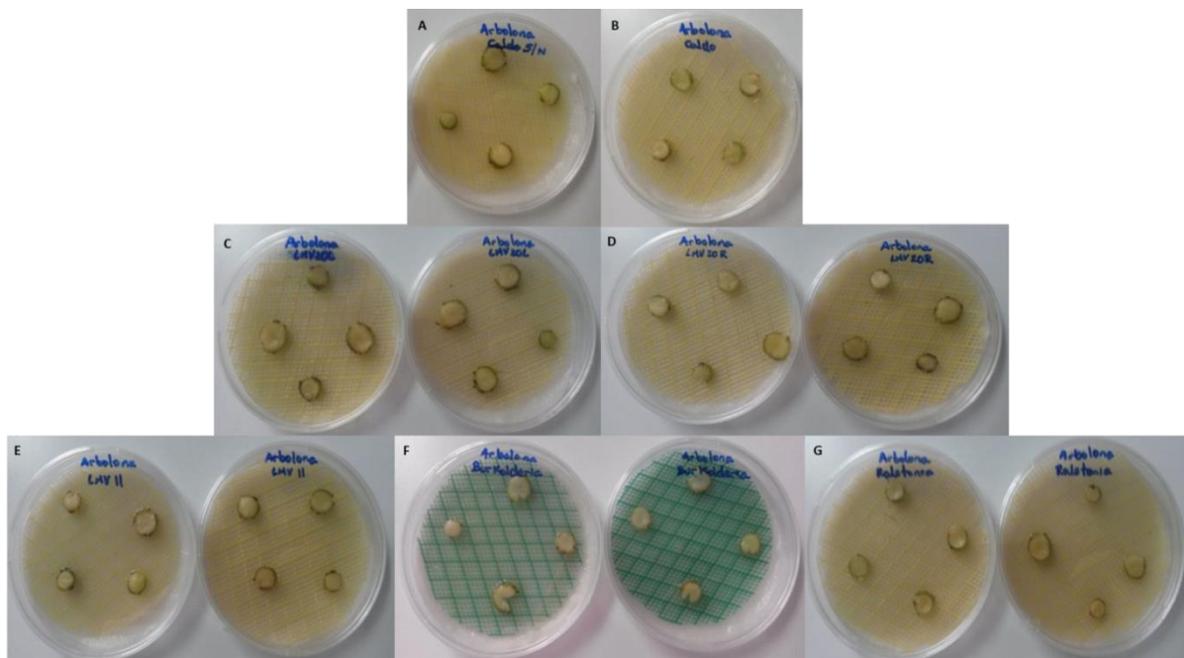


Figura 20. Prueba de patogenicidad en microtubérculos de la variedad 'Arbolona negra'. A) Control negativo sin inocular; B) Control negativo inoculado con caldo LB; C) LMV33; D) LMV34; E) *Pectobacterium carotovorum*; F) *Burkholderia gladioli*; G) *Ralstonia solanacearum*. ¿

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De este modo, al determinar y calcular los valores de incidencia, severidad e índice de la enfermedad (Anexo 9), los aislados LMV33 y LMV34 presentaron una mayor incidencia y severidad, seguido por las cepas *R. solanacearum*, *P. carotovorum* y *B. gladioli*. Cabe destacar que *Burkholderia gladioli* no infectó a los microtubérculos de la variedad 'Arbolona negra' (Tabla 7).

Tabla 7. Valores de incidencia, severidad e índice de la enfermedad en microtubérculos para cada cepa control y aislado en la variedad 'Granola' y 'Arbolona negra'.

Cepa/aislado	Incidencia		Cepa/aislado	Severidad	
	Granola'	Arbolona negra'		Granola'	Arbolona negra'
LMV33	88,88%	37,50%	LMV33	4 y 5	3
LMV34	62,50%	25,00%	LMV34	5	3
<i>P. carotovorum</i>	25,00%	25,00%	<i>P. carotovorum</i>	2	3
<i>B. gladioli</i>	25,00%	0,00%	<i>B. gladioli</i>	1	0
<i>R. solanacearum</i>	50,00%	12,50%	<i>R. solanacearum</i>	4 y 5	2

Cepa/aislado	Índice de la enfermedad	
	Granola'	Arbolona negra'
LMV33	84,44%	22,50%
LMV34	62,50%	15,00%
<i>P. carotovorum</i>	10,00%	15,00%
<i>B. gladioli</i>	5,00%	0,00%
<i>R. solanacearum</i>	42,50%	5,00%

De estos microtubérculos que mostraron pudrición con los inóculos LMV33 y LMV34 se tomó una muestra y se incubaron en caldo LB estéril para su re-aislamiento y re-identificación, con la finalidad de comprobar el cumplimiento de los postulados de Koch. Los resultados se han venido mostrando en simultáneo con los aislados problema.

5.2.1.2. Prueba de patogenicidad en hojas de vitroplantas

En las hojas, los síntomas fueron observados a partir de las 72 hpi, tardando más en observarse que en los microtubérculos. La sintomatología observada consistió en marchitez, encrespamiento, clorosis y perforación en el sitio de inóculo para el aislado LMV33, marchitez, encrespamiento y necrosis para el aislado LMV34, necrosis y clorosis para el control *R. solanacearum* y marchitez y necrosis para el control *P. carotovorum* (Figura 23).

Los síntomas observados tanto para el control de *Pectobacterium carotovorum*, como para los aislados LMV33 y LMV34 coinciden con los reportados por Elphinstone (1987), Barrios (2015) y Coppola (2015) para *Pectobacterium*.

Los síntomas de la enfermedad ocasionados por este patógeno son a menudo indistinguibles de los demás patógenos pertenecientes a la especie *Pectobacterium carotovorum* causantes de pudrición blanda y pierna negra. Sin embargo *Dickeya chrysanthemi* puede iniciar la enfermedad a partir de los niveles de inóculo más bajos, tienen una mayor capacidad de propagarse a través del tejido vascular de la planta, son considerablemente más agresivos, y tienen temperaturas superiores óptimas para el desarrollo de la enfermedad (Elphinstone,

1987). Esto explica la presencia de un mayor índice de la enfermedad para los aislados LMV33 y LMV34 respecto al control *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Tabla 8).

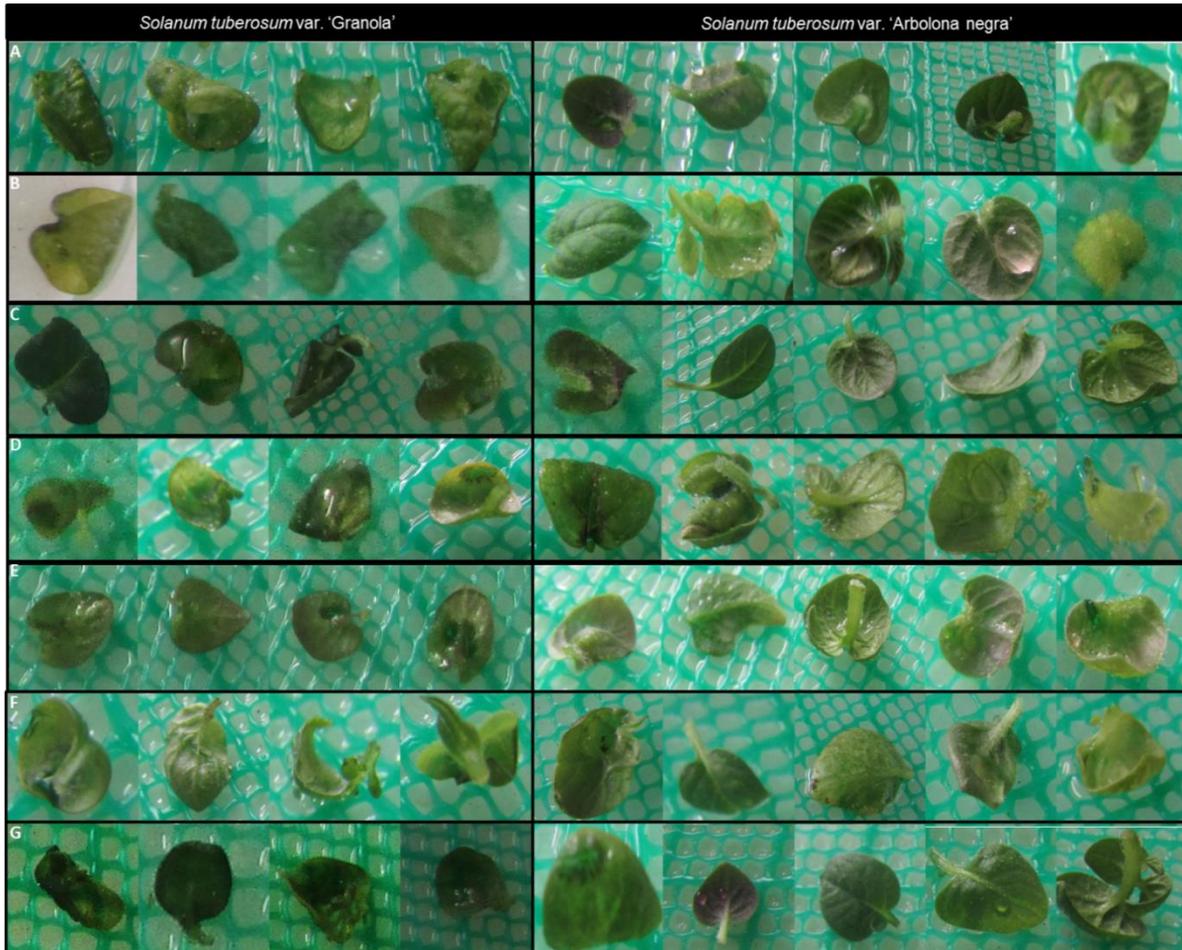


Figura 21. Pruebas de patogenicidad en hojas de vitroplantas de papa de las variedades 'Granola' y 'Arbolona negra'. A) Control negativo inoculado con caldo LB estéril; B) LMV33; C) LMV33 Koch; D) LMV34; E) LMV34 Koch; F) Inoculado con *Ralstonia solanacearum*; G) Inoculado con *Pectobacterium carotovorum*.

Los síntomas de la enfermedad fueron más severos (Anexo 10) y con mayor incidencia en la variedad 'Granola' que en la variedad 'Arbolona negra' (Tabla 8),

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

tal como se obtuvo en los microtubérculos y como reportan Fonseca (2014), Barrios (2015) y Coppola (2015). No se observaron síntomas en las hojas de la variedad 'Arbolona negra' inoculadas con el aislado LMV33.

Tabla 8. Valores de incidencia, severidad e índice de la enfermedad en hojas de vitroplantas para cada cepa control y aislado en la variedad 'Granola' y 'Arbolona negra'.

Incidencia			Severidad		
Cepa/aislado	Granola'	Arbolona negra'	Cepa/aislado	Granola'	Arbolona negra'
LMV33	75,00%	0,00%	LMV33	3 y 4	0
LMV33 Koch	0,00%	0,00%	LMV33 Koch	0	0
LMV34	75,00%	40,00%	LMV34	1 y 4	3
LMV34 Koch	75,00%	20,00%	LMV34 Koch	1 y 3	1
<i>R. solanacearum</i>	75,00%	40,00%	<i>R. solanacearum</i>	1 y 3	1 y 3
<i>P. carotovorum</i>	75,00%	20,00%	<i>P. carotovorum</i>	4	1

Índice de la enfermedad		
Cepa/aislado	Granola'	Arbolona negra'
LMV33	68,75%	0,00%
LMV33 Koch	0,00%	0,00%
LMV34	37,50%	30,00%
LMV34 Koch	31,25%	5,00%
<i>R. solanacearum</i>	31,25%	20,00%
<i>P. carotovorum</i>	75,00%	5,00%

Para el aislado LMV34 se observó menor índice de la enfermedad posiblemente debido a una menor virulencia bacteriana al ser re-aislado que al tratarse del aislado original.

Para la prueba de patogenicidad en vitroplantas de papa se recomienda para una mejor observación de los síntomas el uso de microtubérculos o la inoculación de vitroplantas completas para poder observar la sintomatología de pierna negra,

siendo esta sintomatología temperatura dependiente para *Dickeya chrysanthemi* y *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Cabe destacar que el re-aislado LMV34 produjo los mismos síntomas de marchitez y necrosis, cumpliéndose los postulados de Koch para este aislado. Sin embargo el re-aislado de LMV33 (LMV33 Koch) no causó patogenicidad en ninguna de las dos variedades, lo cual comprueba que el re-aislado se contaminó probablemente con una bacteria no patogénica durante el procedimiento de aislamiento y cultivo. El ADN de esta bacteria no patogénica arrojó también un patrón diferente del aislado original en la amplificación de la región ITS (Figura 13a), como habíamos explicado antes. Por esta razón, se obtuvo nuevamente el aislado a partir de la parte afectada de las hojas inoculadas con el aislado LMV33 y se re-aisló y se comprobó su identidad por pruebas bioquímicas y moleculares como se mostró previamente en los resultados, cumpliéndose finalmente los postulados de Koch también para el aislado LMV33, a pesar que por razones de tiempo no se pudo re-inocular el patógeno.

5.3. Postulados de Koch

Para complementar el diagnóstico de un patógeno se debe considerar el cumplimiento de los postulados de Koch (Agrios, 1995) re-aislando el agente causal de una planta infectada, y verificando que la identificación del re-aislado así como la patogenicidad causada por este es igual a la del aislado original.

De esta manera, se logró re-aislar los microorganismos patógenos LMV33 y LMV34 y se identificaron tanto por pruebas morfológicas como por pruebas

bioquímicas y moleculares, comprobando que dichos re-aislados eran idénticos a los aislados originales, cumpliendo con lo expuesto en los postulados de Koch con los aislados LMV33 y LMV34 que produjeron los mismos síntomas en hojas de vitroplantas de la variedad 'Granola' y 'Arbolona negra'.

El error al re-aislar el aislado LMV33 a partir de los microtubérculos, aun obteniéndose resultados idénticos en la re-identificación, recalca la importancia de la identificación no solo por pruebas bioquímicas, sino también por pruebas moleculares, siendo estas más específicas al estudiar directamente el ADN del organismo.

La estrategia empleada en este Trabajo Especial de Grado demuestra la importancia de combinar las pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares para la identificación de patógenos bacterianos. Los aislados LMV33 y LMV34 a pesar de ser provenientes del estado Mérida al igual que los aislados de *P. carotovorum* recientemente identificados por Coppola (2015), no pertenecen a esta especie, sino que el análisis de los resultados obtenidos en conjunto, nos permitió identificarlos como *Dickeya chrisantemi*. Además, en este trabajo se demuestra la importancia de comparar los resultados siempre con un control positivo y realizar los re-aislamientos, re-inoculaciones y re-identificaciones para dar cumplimiento exacto de los postulados de Koch. Finalmente se destaca nuevamente la fortaleza del cultivo *in vitro* para obtener el material vegetal a utilizarse en el establecimiento de los patosistemas para estudiar sintomatología, incidencia, severidad, resistencia o susceptibilidad de variedades de plantas

pertenecientes a una misma especie o de especies distintas, y para realizar el aislamiento del patógeno.

El uso del cultivo in vitro para la producción de semillas certificadas en grandes cantidades, en poco espacio y en tiempo reducido, en conjunto con el cultivo de variedades resistentes de papa nativa permitirían el incremento de la producción nacional de papa con bajas probabilidades de infección con agentes bacterianos patogénicos.

6. CONCLUSIONES

- ✓ Las pruebas morfológicas permitieron caracterizar a los aislados como bacilos Gram -, móviles, anaeróbios facultativos, fermentadoras de glucosa y no fermentadoras de lactosa, ubicando los aislados LMV33 y LMV34 como pertenecientes al género *Pectobacterium* o *Dickeya*, siendo esenciales las pruebas de Oxidación-Fermentación y el crecimiento en agar Kligler. Sin embargo, estas pruebas bioquímicas no son suficientes para la identificación a nivel de especie.
- ✓ Se validó el método de Gomes y col. (2000) como un método eficiente para obtener ADN de buena calidad y en cantidades apreciables para estudios moleculares por PCR.
- ✓ Mediante la amplificación por PCR del gen de las enzimas pectato liasas se pudo concluir que los aislados LMV33 y LMV34 no pertenecen a la especie *Pectobacterium carotovorum*, en cambio permitieron identificarlas como *Dickeya chrysantemi*.
- ✓ Los aislados LMV33 y LMV34 son aparentemente idénticos al *P. carotovorum* usado como control positivo según los resultados obtenidos en la amplificación de la región ITS; sin embargo, los patrones obtenidos al amplificar los elementos repetitivos BOX, permiten corroborar la similitud de los aislados LMV33 y LMV34 entre sí, pero diferenciarlos del aislado LMV30 (*P. carotovorum*) utilizado como control positivo.

- ✓ El uso de pruebas bioquímicas y morfológicas en conjunto con las pruebas moleculares permitió la identificación específica de los aislados LMV33 y LMV34 como pertenecientes a la especie *Dickeya chrysanthemi*, permitiendo con la identificación previa por características morfológicas y bioquímicas, el uso de menos controles en las pruebas moleculares, así como el empleo de menos pruebas destinadas a la identificación de otros géneros bacterianos de interés.
- ✓ Se validó el uso del cultivo *in vitro* para el estudio de la patogenicidad de una bacteria sobre órganos vegetales, así como sistema para cumplir con los postulados de Koch, y estudiar resistencia y susceptibilidad de especies vegetales a fitopatógenos bacterianos.
- ✓ Los aislados LMV33 y LMV34 causaron pudrición blanda en los microtubérculos, así como ennegrecimiento de los mismos. En hojas produjeron marchitez y encrespamiento de las mismas, y en algunos casos clorosis y necrosis.
- ✓ Los valores de incidencia y severidad de la enfermedad fueron mayores para la variedad 'Granola' que para la variedad 'Arbolona negra', indicando que ésta última es menos susceptible a la pudrición blanda y pierna negra causada por *Dickeya chrysanthemi*. Sin embargo, los microtubérculos son más efectivos para observar la sintomatología asociada por este patógeno en vitroplantas de papa.

7. RECOMENDACIONES

Para la identificación de patógenos se recomienda el uso de técnicas moleculares que permitan discrepar entre especies y subespecies de un mismo género; sin embargo, el uso de pruebas bioquímicas y morfológicas permiten una identificación previa a nivel de género o especie que facilitan y reducen costos en la identificación molecular, siempre y cuando se tengan los controles apropiados.

Para una identificación más precisa se recomienda la secuenciación del gen 16S del ADNr de procariotas y la comparación de la secuencia en las bases de datos.

Se recomienda establecer un protocolo de mejoramiento asistido con marcadores moleculares, mediante cruces mendelianos de la variedad 'Arbolona negra' con variedades comerciales de tuberización rápida, para transferir los genes de tolerancia que indudablemente posee esta variedad.

Se recomienda además el aprovechamiento de las técnicas de cultivo *in vitro* en laboratorios especializados para la obtención de semillas certificadas de tubérculos de consumo nacional para la potenciación de la producción nacional, disminuyendo la importación de tubérculos.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios P. 1995. Plant diseases caused by prokariotes: bacteria and mollicutes. In: Agrios, G. N. Plant Pathology. 5th edition. Elsevier Academic Press.
2. Alva S. 2014. Evaluación de la resistencia a *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary mediante el uso de marcadores AFLP en plantas de *Solanum tuberosum* (L.) cultivadas *in vitro*. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
3. Alva S., Oropeza M. 2013. Effect of culture medium consistence and silver nitrate on micropropagation of two potato (*Solanum tuberosum*) cultivars. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 13: 47-56.
4. Alvarez A. 2004. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 339–66.
5. 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. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
6. Alvez B., Carballo J., Alonso G., Oropeza M. 2011. Diagnóstico molecular de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson en Venezuela, agente causal de la escaldadura foliar de la caña de azúcar. *Agron. Trop.* 61: 27-36.

7. Baghaee-Ravari S., Rahimian H., Shams-Bakhsh M., Lopez-Solanilla E., Antúñez-Lamas M., Rodríguez-Palenzuela P. 2011. Characterization of *Pectobacterium* species from Iran using biochemical and molecular methods. *Eur J Plant Pathol.* 129: 413–425
8. Barrios R. 2015. Identificación de bacterias patógenas aisladas de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) con síntomas de pudrición blanda, colectadas en Sanare, Estado Lara. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
9. Castro-Alarcón N., Alonso-Morales A., Silva-Sánchez J., Armenta-Solís A. 2009. Validación de dos variantes de la técnica rep-PCR para la tipificación molecular de aislados de *Enterobacter cloacae* productores de β -lactamasas de espectro extendido. *Bioquímica.* 34: 165-174.
10. Charkowski A. 2015. Biology and control of *Pectobacterium* in potato. *Am. J. Potato Res.* 92(2): 223-229.
11. Chavarro M., Angel D., Martinez H. 2004. Utilización de iniciadores específicos para el diagnóstico molecular de *Ralstonia solanacearum* a partir de aislamientos provenientes del departamento de Antioquia. *Revista de La División de Ciencias de La Salud.* 18: 67–68
12. Centro Internacional de la Papa (CIP). 1995. Principales Enfermedades, nemátodos e insectos de la Papa. Editorial Stella. Lima, Perú.
13. Clarridge J. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 4: 840-62.

14. Coenye T., Spilker T., Martin A., LiPuma J. 2002. Comparative assessment of genotyping methods for epidemiologic study of *Burkholderia cepacia* Genomovar III. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 3300-3307.
15. Constantine M., Henke R., Hughes K., Conger B. 1981. Propagation of higher plants through tissue culture: Emerging technologies and strategies. *Environ. Exp. Bot.* 21: 269-452.
16. 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.
17. Costa J., Loper J. 1994. Derivation of mutants of *Erwinia carotovora* subsp. *betavasculorum* deficient in export of pectolytic enzymes with potential for biological control of potato soft rot. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 2278-228
18. Darrasse A., Priou S., Kotoujansky A., Bertheau Y. 1994. PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gen as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation of potato diseases. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 1437-1443.
19. Dubnau D., Smith I., Morell P., Marmur J. 1965. Gene conservation in *Bacillus* species. Conserved genetic and nucleic acid base sequence homologies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 54: 491-498.

20. Elphinstone J. 1987. La pudrición blanda y la pierna negra de la papa *Erwinia* spp. Boletín de información técnica 21. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Peru. pp. 18.
21. Estrada, N. 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. PROINPA. Centro de información para el desarrollo-CIP. La Paz, Bolivia.
22. FAO Statistical Yearbook. 2013. World Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italy. pp. 307.
23. FAO Statistical Pocketbook. 2015. World Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italy. pp. 236.
24. 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.
25. García R. 2000. Especies y sub-especies de *Erwinia*, causantes de pudrición blanda y pierna negra en la papa cultivada en el estado Mérida – Venezuela. *Rev. Forest. Venez.* 44: 107 -114.
26. García R., García A., Delgado L. 1999. Distribución, incidencia y variabilidad de *Ralstonia solanacearum*, agente causal de la marchitez bacteriana de la papa en el Estado Mérida. Mérida, Venezuela. *Bioagro* 11: 12- 23.
27. Gomes L., Roncato K., Andrino F., Almeida F. 2000. A simple method for DNA isolation from *Xanthomonas* spp. *Scientia Agricola.* 57: 553-555.

28. González L. 2013. Catálogo de variedades de Papa Nativa y de uso local en el estado Mérida, Venezuela. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. pp. 88.
29. González L., Osorio M., Ordoñez E. 2013. Recetario gastronómico con papas nativas de uso local en el Estado Mérida, Venezuela. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Aragua, Venezuela. pp. 106.
30. Golkhandan E., Kamaruzaman S., Sariah M., Zainal M., Nasehi A. 2013. Characterization of Malaysian *Pectobacterium* spp. from vegetables using biochemical, molecular and phylogenetic methods. *Eur J Plant Pathol.* 137: 431–443
31. Hélias V., Le Roux A., Bertheau Y., Andrivon D., Gauthier J., Jouan B. 1998. Characterisation of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato plants, soil and water extracts with PCR-based methods. *European Journal of Plant Pathology* 104: 685–699.
32. Herrera J., Gamba G. 1996. Biología molecular en medicina. VI. La PCR en la práctica clínica. *Rev Invest Cli.* 48: 479-82.
33. Jensen M., Webster J., Straus N. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of Polymerase Chain Reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology.* 59: 945-952.
34. Junco M. 2015. Caracterización morfológica, bioquímica y molecular de seis aislados venezolanos de *Xanthomonas* sp. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

35. Kerr E., Cahill G., Fraser K. 2009. Detection of four major bacterial potato pathogens. Págs. 101-114. En: Burns, R. (ed.). *Methods in Molecular Biology, Plant Pathology*. Vol. 508. Springer Science + Business Media.
36. Lévesque C., Piché L., Larose C., Roy P. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39: 185–191.
37. Lopes, C., Boiteux L. 2012. Breeding for resistance to bacterial diseases. Págs. 37-55. En: Fritsche-Neto, R., Borém, A. (eds.). *Breeding for biotic stress resistance*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Brasilia, Brasil.
38. Lopes S. A., Damann K., Grelen L. 2001. *Xanthomonas albilineans* diversity and identification based on Rep-PCR fingerprint. *Current Microbiology*. 42: 155-159.
39. Louws F., Fulbright D., Taylor C., Brujin F. 1994. Specific genomic fingerprint of fitopatogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with Repetitive Sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 2286-2295.
40. Lu, J., Perng, C., Lee, S., 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.
41. Lupski J., Weinstock G. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* 174(14): 4525-4529.

42. Malathum K., Singh K., Weinstock G., Murray B. 1998. Repetitive sequence-based PCR versus Pulsed-Field Gel Electrophoresis for typing of *Enterococcus faecalis* at the subspecies level. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 211-215.
43. Marín E. 2015. Bioquímica de la interacción entre *Phytophthora infestans* y hojas de vitroplantas de variedades de papa 'Granola' (susceptible) y 'Arbolona negra' (resistente). Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
44. Maringoni A., Leite R., Komori N. 1988. Nova doença bacteriana do pepino (*Cucumis sativus* L.), causada por *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*. (BRYAN) DYE Phytopathological. *Brasilia*. 1:225-230.
45. Martin B., Humbert O., Camara M., Guenzi E., Walker J., Mitchell T., Andrew P., Prudhomme M, Alloing G., Hakenbeck R. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res*. 20: 3479-3483.
46. Montanelli C., Chiari, A., Stefanini, F., Nascari, G. 1995. Evaluation of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato under controlled conditions. *Euhytica*. 81: 35-43.

47. Montesdeoca F., Panchi N., Navarrete I., Pallo E., Yumisaca F., Taípe A., Espinoza S. y Andrade-Piedra J. 2013. Guía fotográfica de las principales plagas del cultivo de papa en Ecuador. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Centro Internacional de la Papa (CIP), Consorcio de Productores de Papa (CONPAPA), McKnight Foundation. Quito, Ecuador. pp. 68.
48. Moreno M. 2012. Efecto de la composición del medio de cultivo y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L). Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
49. Murashige T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135-166.
50. Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* 15: 173-197.
51. Mushin R., Naylor J., Lahovary N. 1959. Studies on plant pathogenic bacteria. Cultural and biochemical characters. *Australian Journal of Biological Sciences.* 12: 223-232.
52. Narayanasamy P. 2008. Molecular variability of microbial plant pathogens. En: Molecular biology in plant pathogenesis and disease management: Microbial plant pathogens, Vol. 1. Springer.
53. Narayanasamy P. 2011. Detection of bacterial and phytoplasmal pathogens. En: Microbial plant pathogens-detection and disease diagnosis: Bacterial and Phytoplasmal Pathogens, Vol.2. Springer.

54. Nazerian E., Sijam K., Meor Z., Keshavarz K. 2011. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* causing a new soft rot disease on okra in Malaysia. *J Gen Plant Pathol.* 77: 292–294.
55. Pérombelon M. 2002. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology.* 51: 1-12.
56. Poehlman J., Allen D. 2003. Mejoramiento genético de las cosechas. Editorial Limusa. Segunda edición. México.
57. Poggi H., Guzmán A., García P., Lagos M. 2009. “PCR universal o de amplio espectro”: un aporte a la detección e identificación de bacterias y hongos en la práctica clínica. *Rev. Méd. Chile.* 137: 1122-1125.
58. Portillo L., Santacruz-Ruvalcaba F. 2004. Totipotencia celular: una revision y aplicación del concepto. *ScientiaCUCBA.*6: 13-18.
59. Rademaker J., Bruji F. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. pp: 151-171. En: DNA markers: Protocols, Applications and Overviews. Edited by G. Caetano-Anolle!s & P. M. Gresshoff. New York: John Wiley.

60. 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 el elemento box (BOX). Tesis de Maestría. 3º premio a la investigación del Colegio Nacional de Bacteriología de Colombia 2008. pp. 81.
61. Rivas J., Redondo C., Alonso G. 2006. Genotipificación de cepas de enterobacterias procedentes de 4 centros de salud del área de Caracas. *Act. Cient. de la Soc. Venez. de Bioanal.* 9: 3-7.
62. Romero R. 2007. Exploración del subsistema semilla dentro del circuito agroproductivo de la papa en las zonas paperas del Estado Mérida, para el diseño de estrategias de competitividad. Trabajo Especial de Grado. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
63. Romero L., Monasterio M. 2008. Papas Negras, papas del páramo. Un pasivo socioambiental de la modernización agrícola en los Andes de Venezuela. *Boletín Antropológico.* 64: 107-138.
64. Rott P., 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.
65. Sambrook J., Russell D. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Third edition.

66. Seal L., Jackson J., Young W. 1992. Use of tARN consensus primer to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by Polimerase Chain Reaction amplification. *Appl. Environment. Microbiol.* 58: 3759-3761.
67. Shaad, N., Jones, J., Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS. PRESS. Third Edition. Minnesota. pp. 372.
68. Shchervakova L. 2007. Advanced methods for plant pathogen diagnostics. Págs. 75-116. En: Dyakov Y., Dzhavakhlyav. Comprehensive and molecular phytopathology. Elsevier.
69. Solano M. 2010. Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias causantes de pudrición blanda en malanga (*Colocasia esculenta* Schott). Tesis Experimental. Universidad Veracruzana. Veracruz, México.
70. Spooner D., McLean K., Ramsay G. Waugh R., Bryan G. 2005. A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *PNAS.* 102: 14694–14699.
71. Stead D. 1999. Bacterial diseases of potato: relevance to *in vitro* potato seed production. *Potato Research* 42: 449-456.
72. Stefanova M., Amat Z., Rodríguez R., Nélide I. 1986. Fase no parasítica de las bacterias fitopatógenas. Curso de post-grado. La Habana. Cuba.
73. Tavasoli E., Marefat A., Hassanzadeh N. 2011. Identify and fenetic diversity of *Pectobacterium* spp., causal agents of potato soft rot in Zanjan, Iran. *African journal of Plant Science.* 5: 329-336.
74. Thorpe T., Harry I. 1991. Clonal propagation of conifers. *Plant Tissue Culture Manual.* 3: 1-16.

75. Torres H. 2002. Manual de las enfermedades más importantes de la papa en el Perú. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. pp. 68.
76. Tortoli E. 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 319-354.
77. Toth I., Avrova A., 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. *Applied and Environmental Microbiology.* 67: 4070-4076.
78. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in Eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acid Research.* 19: 6823-6831.
79. Villalobos V., Thorpe T. 1993. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Roca W.M., Mroginsky L.A. (ed.). CIAT. Colombia, p. 128-141.
80. Wang Z., Comstock E., Hatziloukas P., Schaad N. 1999. Comparison of PCR, Bio-PCR, DIA, ELISA and isolation on semi-selective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald. *Plant Pathol.* 48: 245-252.

Consultas en línea:

81. Arellano M., Villavicencio G., García S. 2010. Producción de plántulas y semilla prebásica de variedades comerciales de papa libres de enfermedades. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias México. En: <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/123456789/2699/1/851.pdf>. [Consulta: 08/04/2015]
82. AVN. 2014. Agricultores de Mérida impulsan producción nacional de semillas de papa. En: <http://m.avn.info.ve/contenido/agricultores-m%C3%A9rida-impulsan-producci%C3%B3n-nacional-semillas-papa>. 2014. [Consulta: 09/01/2016]
83. Centro Internacional de la Papa. Cómo crecen las papas. 2015 En: <http://cipotato.org/es/lapapa/como-crecen-las-papas/>. [Consulta: 17/10/2015]
84. Graffe, R. 2015. En 80% se reduce la producción de papas en Venezuela. En: <http://archivo.globovision.com/en-80-se-reduce-la-produccion-de-papas-en-venezuela/>. [Consulta: 09/01/2016]
85. Laboratorios Britania, hoja técnica de Kliger Hierro Agar. 2016. En: <http://britanialab.com.ar/esp/productos/b02/kliglerhierroagar.htm>. [Consulta: 13/04/2016]
86. Laboratorios Britania, hoja técnica de Mac Conkey Agar. 2016. En: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/maconkeyagar.htm>. [Consulta: 26/05/2015]

87. Mas E, Poza J, Ciriza J, Zaragoza P, Osta R, Rodellar C. 2001. Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Revista AquaTIC*, N° 15. En: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=128>. [Consulta: 11/04/2016]
88. MAT. Anuncian aumento de producción de alimentos estratégicos en primer semestre del año. 2012 En: <http://economia.noticias24.com/noticia/101680/reportan-aumento-de-produccion-de-alimentos-estrategicos-en-primer-semester-del-ano/>. [Consulta: 12/01/2016]
89. MedlinePlus. Fibrosis quística. 2014. En: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000107.htm>. [Consulta: 21/03/2016]
90. Ortega E., González L., Osorio M. 2005. La biodiversidad ancestral de las papas nativas: su contribución a la diversificación de productos para los pequeños productores altoandinos. *Revista Digital del CENIAP N° 8*. En: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/ceniaphoy/articulos/n8/arti/ortega_e1/ortega_e1.htm. [Consulta: 09/01/2016]
91. Pérez M., Mota M. 2008. Morfología y estructura bacteriana. En: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pf>: [Consulta: 14/01/2016]

92. Rivera M. 2014. Productores de papa se declaran en emergencia. En: <http://www.elmundo.com.ve/noticias/economia/politicas-publicas/productores-depapa-se-declaran-en-emergencia.aspx>. [Consulta: 13/06/2015]
93. Salas J. 1995. Producción de semilla pre-básica de papa. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. En: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd48/texto/prodpapa.htm. [Consulta: 12/03/2016]
94. Salas J., Quintero N., Delgado L. 2000. Efecto de la concentración de sacarosa y el fotoperiodo en la producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) var. Andinita, Caribay y Monserrate. XX Congreso de la Asociación Latinoamericana de la papa. En: <http://es.scribd.com>. [Consulta: 16/04/2015]

9. ANEXOS

Anexo 1. Caldo LB (Luria-Bertaini)

Compuesto	Concentración
Triptona	10g/L
Extracto de levadura	5g/L
Cloruro de sodio	5g/L

Anexo 2. Agar LB

Compuesto	Concentración
Triptona	10g/L
Extracto de levadura	5g/L
Cloruro de sodio	5g/L
Agar bacteriológico	16g/L

Anexo 3. Medio para punciones

Compuesto	Concentración
Triptona	10g/L
Extracto de levadura	5g/L
Cloruro de sodio	5g/L
Agar bacteriológico	6g/L

Anexo 4. Agar extracto-dextrosa-CaCO₃ (YDC)

Compuesto	Concentración
Extracto de levadura	10g/L
Dextrosa	20g/L
Carbonato de calcio	20g/L
Agar bacteriológico	15g/L

Anexo 5. Medio Murashige y Skoog (1962) semi-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^oc, 15 libras de presión, durante 20 minutos.

NOMBRE	CONSTITUYENTE	CONCENTRACION DEL STOCK	VOLUMEN PARA 1L DE MEDIO (mL)
A	NH ₄ NO ₃	82,5	20
B	KNO ₃	95,2	20
C	H ₃ BO ₃	1,24	5
	KH ₂ PO ₄	34	
	KI	0,166	
	Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O	0,05	
	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,005	
D	CaCl ₂ .6H ₂ O	88	5
E	MgSO ₄ .7H ₂ O	74	5
	MnSO ₄ .4H ₂ O	4,46	
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1,72	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,005	
F	Na ₂ EDTA	3,72	10
	FeSO ₄ .7H ₂ O	2,76	
G	Tiamina	0,08	5
	Mio-inositol		8 g
	Agar		6g

Anexo 6. Medio Murashige y Skoog líquido

Igual composición del medio Murashige Skoog sólido, pero sin añadirle el agar.

Anexo 7. Medio Hugh y Leifson (1953)

Compuesto	Concentración
Tripteína	2g/L
Cloruro de sodio	5g/L
Fostatodipotásico	0,3g/L
Azul de bromotimol	0,03g/L
Agar	2,5g/L
pH	7,1

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

Anexo 8. Agar Kligler

Añadir 55g del medio Kligler a 1 L de agua destilada estéril, disolver completamente y distribuir en tubos de ensayo (7ml cada uno), esterilizar los tubos con el medio y dejar solidificar en bisel, dejando un taco de unos 2 cm de profundidad.

Compuesto	Concentración
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±0,2

(Laboratorios Britania)

Se sirven 5 mililitros del medio en tubos de ensayo, se esterilizan y se deja enfriar en pico de flauta, dejando los tubos inclinados.

Anexo 9. Matriz de datos de la severidad en microtubérculos.

S/N		Caldo		LMV33		LMV34		<i>P. carotovorum</i>		<i>R. solanacearum</i>		<i>B. gladioli</i>	
G	AN	G	AN	G	AN	G	AN	G	AN	G	AN	G	AN
0	0	0	0	5	0	5	3	0	3	4	0	0	0
0	0	0	0	5	3	5	3	2	3	0	0	0	0
0	0	0	0	5	3	5	0	2	0	4	0	0	0
0	0	0	0	5	3	0	0	0	0	4	0	0	0
				0	0	0	0	0	0	5	0	1	0
				5	0	5	0	0	0	0	2	1	0
				5	0	5	0	0	0	0	0	0	0
				4	0	0	0	0	0	0	0	0	0

S/N: sin inocular; G: *Solanum tuberosum* var. 'Granola'; AN: *Solanum tuberosum* var. 'Arbolona negra'.

Anexo 10. Matriz de datos de la severidad en hojas

Caldo		LMV33		LMV33 Koch		LMV34		LMV34 Koch		<i>P. carotovorum</i>		<i>R. solanacearum</i>	
G	AN	G	AN	G	AN	G	AN	G	AN	G	AN	G	AN
0	0	3	0	0	0	4	3	3	0	4	1	3	1
0	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
0	0	4	0	0	0	0	0	1	0	4	0	1	3
0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	4	0	0	0
	0		0		0		3		1		0		0

G: *Solanum tuberosum* var. 'Granola'; AN: *Solanum tuberosum* var. 'Arbolona negra'.