



Universidad Central de Venezuela

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

**IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS PATOGENICOS  
OBTENIDOS DE TUBÉRCULOS DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) COLECTADOS  
EN EL MOLINO, ESTADO MÉRIDA, VENEZUELA.**

Trabajo Especial de Grado. Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Yurani María Yépez Cumana, como requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Biología.

Tutor: Dra. Maira Oropeza

Caracas, Venezuela

Julio, 2018

## RESUMEN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los rubros alimenticios más importantes del mundo por el alto contenido de agua y valor proteico con niveles elevados de vitaminas y minerales de sus tubérculos; ocupando el tercer lugar después del arroz y el trigo. En Venezuela se cultiva principalmente en la región de Los Andes, donde es afectada por diversas bacterias patógenas como *Ralstonia solanacearum*, *Burkholderia gladioli*, *Pectobacterium* sp. y *Dickeya* sp. Para la producción de semillas de papa sanas y libres de patógenos son necesarios el diagnóstico y detección de estas bacterias para así establecer medidas de control y manejo adecuado de la enfermedad. En función de esto, el presente trabajo se desarrolla con el fin de identificar y caracterizar bacterias patógenas aisladas de tubérculos de papa variedad ‘papa de año’ colectadas en El Molino, Estado Mérida, Venezuela. Para esto, se realizó el aislamiento bacteriano y se llevó a cabo una prueba preliminar de patogenicidad con cada aislado. Luego, estos aislados se caracterizaron a nivel morfológico, bioquímico y molecular y por último, se comprobaron los postulados de Koch empleando microtubérculos de la variedad ‘papa de año’ cultivados *in vitro* y se calcularon los índices de severidad e incidencia de la enfermedad. Los 4 aislados bacterianos obtenidos resultaron ser patogénicos luego de realizar la prueba de patogenicidad preliminar y fueron caracterizados como bacilos Gram negativos, formadores de colonias filamentosas, irregulares, color crema que producen una pigmentación verde excepto uno de ellos. Bioquímicamente, se caracterizaron como organismos móviles, oxidasa positivos, no fermentadores, capaces de utilizar la glucosa y el citrato como única fuente de carbono, no producen indol, reducen los nitratos a nitritos e hidrolizan la gelatina.

Con estos resultados podemos concluir que los 4 aislados pertenecen al género *Pseudomonas* y los aislados Año 1.2, 2.1 y 2.2 podrían pertenecer a la especie *Pseudomonas aeruginosa*. Los estudios moleculares corroboraron que estos aislados no pertenecen a los géneros *Ralstonia* o *Pectobacterium*. Finalmente, se cumplieron los postulados de Koch comprobando el agente causal de la enfermedad y se reportó la incidencia y severidad de la sintomatología producida por los aislados en rodajas de microtubérculos.

**Palabras claves:** *Solanum tuberosum*, bacterias patógenas, *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium* sp., *Pseudomonas* sp. *Pseudomonas aeruginosa*, caracterización morfológica, caracterización bioquímica, identificación molecular.

## FINANCIAMIENTO

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero que todo agradezco a Dios (yo me refiero a él como Chuito) por protegerme y siempre iluminarme hasta el final para llegar hasta este punto después de tanto esfuerzo.

A mis padres Rafael Yépez y Neyra Cumana, y a mi tía Magdalia Yépez. Comienzo con mis padres, ustedes me guiaron todo lo que pudieron por el camino correcto con cada aprendizaje, me mantuvieron enfocada en la meta y me enseñaron a no darme por vencida.

A mi tía, usted siempre estuvo presente este poco tiempo ayudando cada vez que se podía o había alguna inquietud. Sin ustedes no hubiese podido sobrevivir estos últimos años, gracias por cada comida y viaje que hicieron por mi para que todo fuera más sencillo.

A mis hermanas Zaira y Xiriana, están locas pero siempre estuvieron pendiente de mi hasta el último segundo de esta pequeña aventura que va a dictar mi futuro; cada risa, llanto y molestia valió la pena.

A mi tutora Maira Oropeza, usted me ha guiado durante todo este camino desde aquella vez que oí su presentación cuando dictó la materia de Fisiología vegetal e hizo todo lo posible para que llegara hasta este punto. Es una profesora excelente, súper dedicada y le agradezco por todo el apoyo que me brindó durante cada enseñanza, siempre estuve atenta a lo que me decía. Esta fue una de las mejores decisiones que he tomado en mi vida y me alegra que usted estuviera ahí para compartir eso conmigo.

A mis profesoras Teresa Edith y Ana Karina, lograron fomentar en mí la curiosidad por todo este mundo científico que tenemos. Agradezco porque nuestros caminos se cruzaron y lo más probable es que sigan conectados, por cada enseñanza, por cada broma en clases.

A mis amigos Genesis y Jose, la mejor de las sorpresas me la llevé cuando los conocí. Ustedes valen oro y están eternamente guardados en un rincón de mi corazón, no hubiese resistido nada pero nada de todo esto. Gracias por sus todos sus consejos.

A todos mis amigos de biología (el que entendió, entendió), con ustedes pase la mayoría de mi carrera siempre a toda marcha. Ustedes me conocen muchísimo y eso es peligroso si estamos con personas ajenas a nuestro grupo pero igual los quiero muchísimo, cada salida, incontables noches discutiendo sobre trabajos de las materias y estudiando. No cambiaría nada al respecto.

Gracias a la todos los del LMV, son una pequeña familia donde conocí personas estupendas como Maye, Mary Carmen, Yay, Raiza, Maybe, Ana, Antonio. Todos estuvieron presentes cuando lo necesite, me hicieron sentirme apoyada y por ayudarme desde el comienzo. Gracias por todos los momentos vividos, son experiencias que quedan en la memoria.

Gracias a Indira por cada asesoramiento y conocimiento que surgía hasta en lugares cotidianos como los pasillos de la facultad. Fuiste un apoyo más durante todo el proceso y te lo agradezco infinitamente.

A Juan Caraballo (mi novio), gracias por cada noche que te quedaste conmigo por si me surgía alguna duda hasta que encontrábamos la respuesta. Gracias por siempre mantener mis pies atados a la tierra y preocuparte por mí, te mereces un reconocimiento.

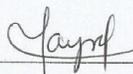
A la coral de la Facultad de Ciencias, como grupo de extensión me permitió conocer a un grupo de personas demasiado bonito con el que conecte muchísimo, no tengo palabras para explicar lo mucho que me ayudaron. En especial quiero agradecer a Gabriel, eres el mejor amiguito que se puede pedir dentro de toda esta locura; me has enseñando en todo momento y lo aprecio como un tesoro. Los quiero.

DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

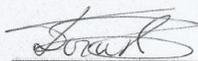
Br. Yurani María Yépez Cumana

Quienes suscribimos, los miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br Yurani María Yépez Cumana, CI: 23.616.488, titulado "Identificación de aislados bacterianos patogénicos obtenidos de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) colectados en El Molino, Estado Mérida, Venezuela" para optar al título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos, lo consideramos APROBADO, con una calificación de 20 puntos, CON (  ) SIN (  ) MENCIÓN HONORIFICA

Para dar fe de ello, se levanta la presente acta en Caracas, a los 26 días del mes de julio del 2018.

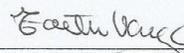


Dra. Maira Oropeza



Dra.: Nora Malaver

Jurado



Dra.: Teresa Edith Vargas

Jurado

## INDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCION</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1. La papa ( <i>Solanum tuberosum</i> ) .....	3
2.2. Origen de la papa .....	4
2.3. Importancia de la papa en Venezuela. ....	5
2.4. Bacterias patógenas de la Papa .....	7
2.5. Identificación de Bacterias Patógenas .....	14
2.6. Postulados de Koch .....	23
2.7. Importancia del cultivo <i>in vitro</i> para la demostración de los postulados de Koch y pruebas de patogenicidad.....	24
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	28
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	29
4.1. Material vegetal.....	29
4.2. Cepas bacterianas usadas como controles.....	29
4.3. Aislamiento, purificación y mantenimiento de los aislados bacterianos .....	29
4.5. Caracterización morfológica. ....	32
4.6. Caracterización bioquímica .....	33
4.7. Caracterización molecular .....	34
4.8. Micropropagación y microtuberización. ....	40
4.9. Postulados de Koch en microtubérculos. ....	41
4.10. Incidencia y severidad de la enfermedad .....	42
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	44
5.1. Obtención y mantenimiento de aislados bacterianos .....	44
5.2. Prueba preliminar de patogenicidad .....	44
5.3. Caracterización morfológica .....	46
5.4. Caracterización bioquímica .....	49
5.5. Identificación molecular .....	53
5.5.1. Extracción de ADN bacteriano. ....	53

5.5.2.	Cuantificación y pureza del ADN extraído. ....	55
5.5.3.	Electroforesis en gel de agarosa 0,8%.....	57
5.5.4.	Amplificación con iniciadores universales del gen 16S del ADNr.....	58
5.5.5.	Amplificación con iniciadores específicos. ....	59
5.5.6.	Amplificación de la región espaciadora transcrita intergénica (ITS).....	62
5.6.	Micropropagación y microtuberización.....	65
5.7.	Postulados de Koch .....	68
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>72</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>73</b>
<b>ANEXOS</b>	.....	<b>88</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Cultivo de papa. Estadísticas de FEDEAGRO.	7
<b>Tabla II.</b> Sintomatología causada por bacterias del género <i>Pectobacterium</i> y <i>Dickeya</i> .	9
<b>Tabla III.</b> Iniciadores de PCR, para la detección molecular de <i>R. solanacearum</i> y <i>P. carotovorum</i> .	38
<b>Tabla IV.</b> Descripción morfológica de las colonias de los aislados patogénicos a las 48 h de crecimiento.	47
<b>Tabla V.</b> Resultados de las pruebas bioquímicas para los aislados patogénicos y la cepa control CVCM 625.	51
<b>Tabla VI.</b> Valores de densidad óptica y concentración de ADN obtenidos para los aislados patogénicos, cepas controles y re-aislados de los postulados de Koch utilizando distintos métodos de extracción	56
<b>Tabla VII.</b> Respuesta de la variedad ‘papa de año’ al cultivo <i>in vitro</i> .	67
<b>Tabla VIII.</b> Valores de incidencia, severidad e índice de la enfermedad en microtubérculos para el aislado Año 1.1 en la variedad ‘papa de año’	70

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Morfología bacteriana a nivel celular.	32
<b>Figura 2.</b> Prueba preliminar de patogenicidad en tubérculos comerciales de papa a las 120 hpi.	45
<b>Figura 3.</b> Morfología bacteriana de los aislados patogénicos crecidos en medio LB sólido y YDC.	47
<b>Figura 4.</b> Tinción Gram de los aislados patogénicos	48
<b>Figura 5.</b> Pruebas bioquímicas de los aislados patogénicos y la cepa control CVCM 625.	50
<b>Figura 6.</b> Electroforesis en gel de agarosa 0,8% de los extractos de ADN obtenidos por el método de Gomes y col. (2000).	54
<b>Figura 7.</b> Electroforesis en gel de agarosa 0,8% de los extractos de ADN a una concentración de 50 ng/μl obtenidos por el método de Chen y col. (2003), modificado por Chavarro (2004).	55
<b>Figura 8.</b> Electroforesis en gel de agarosa 0,8% de los extractos de ADN obtenidos por el método de Gomes y col. (2000).	58
<b>Figura 9.</b> Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR para la amplificación de la subunidad menor del gen 16S del ADNr de procariotas utilizando los iniciadores U1 y U2.	59
<b>Figura 10.</b> Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR para la detección de <i>R. solanacearum</i> utilizando los iniciadores específicos OLI1 y Y2	60
<b>Figura 11.</b> Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos PCR	61

utilizando los iniciadores específicos Y1pel y Y2pel.

**Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos PCR utilizando los iniciadores específicos Y1pel y Y2pel. 62

**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos de PCR para la amplificación de la región espaciadora ITS utilizando los iniciadores G1 y L1 de los extractos de ADN de los aislados patogénicos y cepas controles (A) y de los extractos de ADN de los postulados de Koch (B) 63

**Figura 14.** Micropropagación de papa (*Solanum tuberosum* var. ‘papa de año’ 66

**Figura 15.** Microtubérculos de papa de la variedad ‘papa de año’ 67

**Figura 16.** Postulados de Koch en microtubérculos de papa variedad ‘papa de año’. 69

**Figura 17.** Pruebas bioquímicas y morfológicas para re-identificación de los re-aislados de Año 1.1 de los postulados de Koch. 71

## INDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Caldo LB (Luria.Bertaini)	88
<b>Anexo 2.</b> Agar LB	88
<b>Anexo 3.</b> Medio para punción	88
<b>Anexo 4.</b> Medio Murashige y Skoog (1962) semi-sólido.	88
<b>Anexo 5.</b> Medio Murashige y Skoog líquido.	89
<b>Anexo 6.</b> Agar extracto-dextrosa-CaCO <sub>3</sub> (YDC)	89
<b>Anexo 7.</b> Medio Hugh y Leifson (1953).	90
<b>Anexo 8.</b> Agar MacConkey	90
<b>Anexo 9.</b> Agar hierro de Kligler	90
<b>Anexo 10.</b> Agar Simmons citrato	91
<b>Anexo 11.</b> Agar cetrimide	91
<b>Anexo 12.</b> Medio de arginina deshidrolasa	92
<b>Anexo 13.</b> Medio de Sulfuro indol para motilidad	92
<b>Anexo 14.</b> Medio de reducción de nitratos	93
<b>Anexo 15.</b> Medio de hidrólisis de gelatina para punción	93
<b>Anexo 16.</b> Diferenciación de especies de <i>Pseudomonas</i>	93
<b>Anexo 17.</b> Matriz de datos de severidad en microtubérculos	94

## 1. INTRODUCCION

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es originaria del continente americano, se clasifica como uno de los rubros más importantes del mundo ocupando el tercer lugar después del arroz y el trigo. Pertenece a la familia de las solanáceas, género *Solanum* y se divide en dos subespecies: la *andigena* y *tuberosum* en temperaturas óptimas de 18 a 20°C. Por esta razón, el cultivo de papa en Venezuela puede encontrarse más que todo en climas templados como los estados Mérida, Táchira y Trujillo, donde la producción de papa se lleva a cabo durante todo el año.

El rendimiento y calidad de este cultivo se ha visto afectado en los últimos años debido a distintos factores; entre ellos, los factores abióticos como la calidad de semillas o condiciones climáticas y los bióticos como los patógenos, los cuales causan graves enfermedades que afectan al sistema de la planta de distintas formas; entre ellos, las bacterias patógenas implican una gran problemática en el aspecto económico y de la salud, pudiendo mencionar algunas como: *Ralstonia solanacearum*, *Burkholderia gladioli*, *Pectobacterium* sp., *Dickeya* sp. y *Pseudomonas*, causantes de pudrición, ennegrecimiento, clorosis y marchitamiento de las plantas de papa.

Actualmente, ha aumentado el riesgo fitosanitario del cultivo de papa así como ha disminuido la producción de papa contando sin semillas para su cultivo. Esto puede deberse a la existencia y diseminación de patógenos en tubérculos infectados. Además, ha disminuido la importación de este cultivo a Venezuela aunque las papas que llegan al territorio nacional ingresan en malas condiciones. Por lo que, los productores no cuentan con la materia prima para cultivar en campo.

Como técnica para resolver esta problemática se ha empleado el uso de la biotecnología, garantizando la producción de semilla sana. Sin embargo, es necesario identificar y caracterizar los posibles agentes causantes de las enfermedades en plantas para poder controlar las pérdidas ocasionadas por estas bacterias patógenas.

En función de esto, el presente trabajo se desarrolla con el fin de identificar y caracterizar bacterias patógenas aisladas de tubérculos de papa colectadas en El Molino, estado Mérida, así como evaluar la patogenicidad de los aislados en microtubérculos de papa variedad 'papa de año'.

## 2. ANTECEDENTES

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

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una planta herbácea, perteneciente a la familia de las solanáceas que crece en diversos sitios; solo en el continente americano, se puede encontrar desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Chile. El género *Solanum* tiene más de 300 especies que forman tubérculos, entre especies cultivadas y silvestres, se considera altamente polimórfico y muy complejo ya que incluye alrededor de 2400 especies alrededor del mundo (Huáman, 1986; Ochoa, 1990; Ochoa, 1999).

Por su parte, el cultivo de papa puede clasificarse según las especies reconocidas como en niveles de ploidía donde se encuentran en mayor proporción las especies diploides y el resto son poliploides (Rodríguez, 2010). Teniendo en cuenta esto, la papa se divide en dos tipos de subespecies: *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* y *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*, ambas con un nivel de ploidía tetraploide. La subespecie *andigena* proviene de *S. stenotomum* (se ha planteado como la primera papa cultivada) a través de repetidos procesos de poliploidización sexual a lo largo del tiempo, éstas forman tubérculos bajo condiciones de día corto (Hawkes, 1990; Sukhotu y Hosaka, 2006). Por otro lado, *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* se distribuye actualmente por todo el mundo, y pudo haberse originado a partir de cultivares andinos nativos tetraploides pertenecientes a *S. andigena* (Rodríguez, 2010).

Los cultivos de papa se pueden encontrar en zonas desde el nivel del mar hasta los 4000 m de altura en climas templados, subtropicales y tropicales con un hábito de crecimiento

rastrero, decumbente, semierecto y erecto, aunque esto varía entre las especies y dentro de cada especie (Huáman, 1986).

Desde el punto de vista morfológico, el desarrollo y crecimiento de la planta parte desde una semilla o de un tubérculo, formando una raíz axonomorfa o raíces adventicias en la base de cada brote, asimismo puede llegar a producir un solo tallo principal o varios tallos a la vez. De hecho, el tubérculo es una modificación del tallo siendo el principal órgano de almacenamiento de la planta. Cuando la planta crece, las hojas compuestas producen almidón que es desplazado hacia el extremo terminal de tallos horizontales subterráneos, también llamados estolones; estos sufren a consecuencia un engrosamiento produciendo hasta 20 tubérculos cerca de la superficie del suelo dependiendo de la disponibilidad de humedad y nutrientes del mismo (Huáman, 1986; FAO, 2008).

Cada tubérculo tiene entre dos y 10 brotes, los cuales crecen de las yemas que se encuentran en los ojos del tubérculo dispuestos en forma de espiral sobre su superficie, concentrándose en el extremo apical. Con respecto a la floración, sus inflorescencias son cimosas, con flores bisexuales de 5 estambres, 5 sépalos y 5 pétalos de coloraciones blancas, azules, rojas o moradas en diferentes tonos e intensidades. El ovario es súpero ya que los sépalos, pétalos y estambres están unidos a un receptáculo justo debajo del ovario (Huáman, 1986). Cuando el ovario es fertilizado, el fruto producto es de tipo baya, generalmente de una coloración verde y esférico.

## **2.2. Origen de la papa**

Según Morales (2007), el origen de este cultivo se determina por las regiones donde se encuentra la mayor diversidad genética de las especies. Se presume que las primeras papas

cultivadas datan de hace 6000 y 10000 años atrás en las regiones montañosas de los Andes, donde sucesivas generaciones de agricultores produjeron una gran cantidad de variantes cultivadas (Spooner y Hetterscheid, 2005). Con respecto a esto, la mayor diversidad de genotipos poliploides de la papa se halla al norte y sur del Lago Tititaca, en la frontera de Bolivia y Perú. En el lado sur del continente americano, las comunidades comenzaron a domesticar plantas silvestres de papa que se producían en abundancia en los alrededores del lago.

De esta manera, en el país, las variedades de papa están bien adaptadas a las condiciones que prevalecen en los Andes, a temperaturas diarias promedio de 18° a 20°C donde ocurre la mejor producción ubicando a esta planta como un cultivo líder en su rubro y muy importante en la alimentación de la población venezolana.

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

La papa se considera el tercer cultivo alimenticio más importante del mundo en términos de consumo humano después del arroz y el trigo (CIP, 2015) por su alto contenido de agua y calidad proteica con niveles elevados de vitaminas y minerales. En la actualidad, en Venezuela, la papa es considerado el segundo cultivo vegetal más importante después del maíz consumiéndose regularmente más de 50 kg al año, aproximadamente.

Hay que mencionar que en Venezuela, se cultiva la papa en distintos estados como Aragua, Lara y Carabobo que corresponden a zonas montañosas en los meses de febrero a abril, y Mérida, Trujillo y Táchira que encabezan la producción de este tubérculo en el país durante todo el año registrando volúmenes de 158.871 toneladas, 51.510 y 42.572 toneladas, respectivamente (Bayer, 2017; Potatopro, 2016).

Según datos emitidos en la Memoria y Cuenta del Ministerio de Agricultura y Tierras 2010-2014, reportado en las estadísticas de FEDEAGRO hasta el año 2015, el cultivo de papa a lo largo del tiempo ha aumentado en volumen de producción al igual que en la superficie cosechada desde el año 2010 en adelante excepto el año 2013 donde se registró una disminución de crecimiento. De igual manera, se pudo observar este comportamiento entre los años 2014-2015; para el año 2015 se reportó una disminución en la producción con respecto al año anterior obteniendo un volumen de producción de 602.522 toneladas, en una superficie cosechada de 33.478 hectáreas (Tabla I).

Cabe destacar, que el vicepresidente de la Asociaciones de Productores Agropecuarios (FEDEAGRO), Emmanuel Escalona, en el año 2015 recalca que el tomate, papa, cebolla, pimentón y zanahoria son rubros que representan del tercer al séptimo lugar de consumo en el país, mientras que la caída de producción estimada correspondía a un 60%. Con respecto a la papa, se encontró una importante cantidad de semillas en malas condiciones dañadas por fermentación. En ese mismo año, se estimó una cantidad preliminar entre 200 y 300 toneladas de pérdida en el cultivo, lo cual equivalía a 4 mil sacos de papas de 50 kg, aproximadamente. Esto generó a partir del 2015 una creciente crisis en el sector de la papa, calculando un déficit del 80% de los productos típicos para ese año (Tabla I) (El Carabobeño, 2015).

Aunado a esto, se puede señalar que el 13% del consumo nacional de papa se importa sin tomar en cuenta las pérdidas que ocurren debido al cambio climático, conflictos sociales y a plagas y enfermedades que afronta este cultivo. Algunas tácticas que se han empleado para combatir dichas enfermedades es incrementar el volumen de producción y un suministro constante de variedades nuevas. De igual manera, factores como el cambio climático ponen

en peligro la supervivencia de las papas afectando tanto la producción del cultivo como su biodiversidad.

**Tabla I.** Cultivo de papa. Estadísticas de FEDEAGRO.

AÑOS	2010	2011	2012	2013	2014	2015
VOLUMEN DE PRODUCCIÓN (toneladas)	512,544	554,852	578,080	419,580	636,367	602,522
SUPERFICIE COSECHADA (hectáreas)	28,985	34,351	33,183	21,205	33,150	33,478
VALOR DE LA PRODUCCIÓN (Miles de Bs. de 1997)	95,403	103,278	107,602	78,009	118,451	112,152
RENDIMIENTO (kilogramo/hectáreas)	17,683	16,152	17,421	19,787	19,197	17,998

Recientemente, Rodríguez (2017) reporta para El Nacional que la principal demanda de los rubros esenciales se ha visto insatisfecha por la caída de la productividad en campo ya que factores como la falta de semillas, agroquímicos, repuestos para maquinarias e inseguridad afectan a este sector. Tanto así que, afirman y cito: “los consumidores seguirán afectados con la escasez de comida durante todo 2017”.

#### **2.4. Bacterias patógenas de la Papa**

Los cultivos comerciales de papa que se han introducido a lo largo del tiempo han resultado en una estrecha base genética con un rango limitado de resistencia a varias enfermedades lo cual conlleva a la reducción en el rendimiento y calidad de los tubérculos. Según Ross

(1986), se estimaba un 22% de pérdidas para los cultivos de papas por causa de plagas y enfermedades virales, bacterianas y fúngicas; lo que equivale a una pérdida aproximada de más de 65 millones de toneladas para este año.

Para el año 2017 Aquiles Hopkins, presidente de FEDEAGRO, menciona los altos riesgos sanitarios y un declive importante en la productividad de papa ya que los productores han tenido que multiplicar la papa para el consumo utilizándola como semilla e inclusive destaca que el país no cuenta con la importación de semillas. Sin embargo, se ha declarado que las semillas de papa importadas que llegan a los productores se encuentran en malas condiciones. Por lo que, los productores no cuentan con materia prima y por ende, la superficie cultivada de este producto se ha reducido en un 70% (El impulso, 2017; Sojo, 2017)

Una de las enfermedades más importante de este cultivo, es el tizón tardío de la papa causada por el oomiceto *Phytophthora infestans*, el cual es responsable de pérdidas significativas en la cosecha e incrementos en los costos de producción debido a la necesidad de fungicidas (Grünwald y Flier, 2005; CIP, 2015). Por su parte, las enfermedades ocasionadas por virus se caracterizan por la presencia de clorosis, enanismo y deformaciones de hojas y tubérculos que pueden llegar a ocasionar grandes pérdidas según el tipo de daño; mientras que las enfermedades bacterianas generan marchitez, pudrición, manchas, entre otros síntomas que afectan los cultivos tanto en el campo como en su almacenamiento.

A continuación se señalarán las características de las principales enfermedades causadas por bacterias en este importante cultivo:

### 2.4.1. Erwinias

En 1917, el género *Erwinia* abarcaba a todos los miembros de la familia Enterobacteriaceae que se consideran patógenos para las plantas, incluidas las especies pectolíticas (*Erwinia carotovora* y *E. chrysanthemi*) y no pectolíticas (*E. amylovora*). *Pectobacterium* y *Dickeya* son nuevos géneros que se trasladaron de este grupo de *Erwinias* pectolíticas y se clasifican desde hace muchos años como bacterias patógenas oportunistas, que permanecen inactivas a menos que la planta se mantenga húmeda.

Por su parte, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *brasiliense*, *P. wasabiae* y varias especies de *Dickeya*, como *D. dianthicola*, *D. dadantii*, *D. zea* y una nueva especie *Dickeya solani* son las responsables por causar pierna negra en el campo y pudrición blanda en tubérculos y tallos de papa mundialmente. Estas se caracterizan por producir grandes cantidades de enzimas pectolíticas extracelulares, junto con una amplia gama de otras enzimas que se encargan de degradar la pared celular de las plantas para causar la enfermedad (Collmer y Keen, 1986).

Algunos de los síntomas que pueden causar las bacterias pertenecientes a los géneros *Pectobacterium* y *Dickeya* según Potrykus y col. (2016), y Rupp y Jacobsen (2017) se mencionan en la Tabla II.

**Tabla II.** Sintomatología causada por bacterias del género *Pectobacterium* y *Dickeya*.

<b>Pudrición blanda</b>	<b>Pierna negra</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Decadencia suave del tejido</li><li>• Incluye la maceración inodora o no del tejido vegetal</li><li>• Puede desarrollarse tanto en el campo como en almacenamiento</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Podredumbre suave</li><li>• Decoloración del tallo que se extiende desde los tubérculos en descomposición sobre el terreno</li><li>• Crecimiento disminuido</li></ul>

Cabe destacar que los síntomas de pierna negra se desarrollan en la planta cuando la invasión del patógeno se propaga al tallo después de la multiplicación microbiana en los tubérculos podridos. Las bacterias se transportan pasivamente del sistema vascular del tubérculo podrido a los vasos del xilema del tallo (Pérombelon, 2002).

Ambos géneros pueden causar dichos síntomas, el factor que las diferencia es la temperatura óptima de crecimiento reflejándose en la distribución geográfica de cada especie (Pérombelon, 1980). De acuerdo con varias investigaciones se conoce que de todas las especies de *Pectobacterium* que infectan a la papa, *P. carotovorum* tiene el mayor rango de hospederos en el mundo. Por su lado, *D. chrysanthemi* es patógeno de muchas plantas en regiones tropicales y subtropicales, así como también afecta ciertos cultivos en regiones templadas. Esto se debe a que su patogénesis es dependiente de la temperatura.

Por último, estas bacterias se describen como bacilos móviles Gram negativos, anaerobios facultativos, que no forman esporas. Son positivos para catalasa, fermentan glucosa y lactosa, y reducen nitratos. A su vez, son negativos para oxidasa, la producción de urea e indol exceptuando las especies de *Dickeya*. En medio YDC, pueden observarse colonias de color blanquecino a crema, no mucoides, con elevación central (Schaad y col., 2001; Luna-Rodríguez y col., 2009).

## 2.4.2. Pseudomonaceae

### 2.4.2.1. *Ralstonia solanacearum*

Es patógena en varios cientos de especies de plantas donde se incluyen cultivos de maní, papa, tomate, tabaco, plátano y otras plantas económicamente importantes. Esta bacteria usualmente infecta al huésped a través de las raíces, transportándose por el sistema vascular, causando síntomas de marchitez parda que a menudo son letales.

La marchitez bacteriana es una enfermedad de tipo vascular. Se caracteriza por la invasión de la bacteria *R. solanacearum* en el sistema vascular, distribuyéndose a los vasos de tejido xilemático de forma vertical u horizontal, produciendo un taponamiento de los conductos. Por lo tanto, la planta se ve afectada por una falta de hidratación celular, ocasionando de esta forma un marchitamiento vascular y por ende sistémico (Sánchez y col., 2006). Aunado a esto, el agente determinante de la patogenicidad, que contribuye en la oclusión de los vasos del xilema, es un exopolisacárido (EPS) que produce la bacteria. Este último juega un rol importante para la colonización de plantas.

Es una bacteria gram negativa, con forma de bastón, móvil que no forma espora ni cápsula, provoca la reducción de nitratos y formación de amoníaco. Sin embargo, en medio de cultivo líquido la bacteria de tipo silvestre, generalmente no presenta movilidad y carece de flagelo polar (Agrios, 1995; Denny y Hayward, 2001).

De hecho, *R. solanacearum* no crece a 40°C, es oxidasa y catalasa positiva, oxida la glucosa y utiliza el citrato como fuente de carbono mientras que es negativa para la prueba de hidrolasa (arginina), para la fermentación de lactosa por su característica de aerobio estricto, para la hidrólisis de almidón y licuefacción de gelatina aunque la gelatina pueda

ser hidrolizada levemente. Esta bacteria forma colonias con un rango de crecimiento medio, blancas, de márgenes lisos, brillantes, circulares o irregulares y convexas; mucoides y de color beige en medio YDC (Schaad y col., 2001; Hayward, 1964).

Según Kelman (1954), pueden observarse dos clases de colonias en cuanto a la morfología de la bacteria, una es fluida y mucoide por la abundante producción del EPS, de consistencia lisa, irregular y redonda; mientras que la otra es una colonia de apariencia seca, redonda translúcida y rugosa.

Por su parte, diferentes cepas del patógeno varían en el tamaño de su genoma desde 5,5 Mb hasta 6 Mb, con un cromosoma de 3,5 Mb

#### **2.4.2.2. *Burkholderia gladioli***

*Burkholderia* representa a un género bacteriano constituido por más de 60 especies, que ocupan un amplio rango de nichos ecológicos entre ellos el suelo, agua, plantas, animales y humanos (Stoyanova y col., 2007).

En plantas, se caracteriza por causar síntomas de pudrición y marchitamiento de raíces, tallos y pétalos. Otros síntomas comunes que se pueden presentar son lesiones marrones con un margen delineado en amarillo en las hojas de la planta como sucede en los gladiolos. En el caso de la papa, puede llegar a observarse síntomas de patogenicidad como marchitez y manchas hundidas o en la superficie del tejido variando en su tonalidad tanto en hojas, tubérculos y tallos dependiendo de la zona afectada descrito según Fonseca (2014), quien reportó este patógeno por primera vez para Venezuela.

Son bacilos Gram negativos aerobios, rectos o ligeramente curvados, que no forman esporas con colonias de borde irregular y apariencia cremosa. Cuenta con la presencia de uno o más flagelos polares; por ende, son móviles y su óptimo crecimiento ocurre a temperaturas entre 30°C y 37°C. Son catalasa positivos, además, son capaces de hidrolizar la gelatina, fermentar la glucosa y utilizar la arginina y citrato como fuente de carbono. Por otro lado, crecen en agar MacConkey pero no fermentan la lactosa, y son negativos para oxidasa e hidrólisis de almidón (Schaad y col., 2001; Vandamme y col., 2007).

El genoma de esta bacteria es de 9,05 Mb, y consta de dos cromosomas y cuatro plásmidos. El cromosoma 1 contiene 4.413.616 pb (con un contenido de 67,5% G+C) mientras que el cromosoma 2 contiene una cantidad de 3.700.833 pb (con un contenido 68,6% G+C), a su vez los plásmidos tiene un tamaño de 120.000-405.000 pb aproximadamente (Seo y col., 2011).

#### **2.4.2.3. *Pseudomonas* sp.**

Las especies del género *Pseudomonas* son organismos oportunistas conocidos por estar presente más que todo en el suelo y agua, algunos de estos son patógenos nosocomiales de humanos con un sistema inmunocomprometido aunque también existen especies patógenas de plantas (Lloria y col., 2009). Según Schaad y col. (2001), existen *Pseudomonas* fitopatógenas que causan una variedad de reacciones en el hospedero como necrosis, clorosis, decoloración y erupción del tejido, pudrición, entre otras; las especies de dicho género asociadas a estas enfermedades en plantas suelen ser los patovares de *Pseudomonas syringae*, *P. marginalis* y *P. viridiflava*.

El género *Pseudomonas* se caracteriza por ser bacilos Gram negativos, móviles, no fermentadores de compuestos orgánicos, negativos para la producción de indol, la mayoría reducen nitrato a nitritos; por otro lado, son positivos para catalasa, oxidasa y crecimiento en agar cetrímide. Además, algunas especies de este género producen pigmentos extracelulares difusibles o no en medios de cultivo como la piocianina, pioverdina y piorrubina que se utilizan como carácter taxonómico ya que hay especies como *Pseudomonas aeruginosa* que se caracterizan por su coloración verde-amarillento en ciertos medios de cultivo (Shivaji, 1989).

Otro carácter es que el grupo se divide en *Pseudomonas* fluorescentes y no fluorescentes, pudiendo crecer a un amplio rango de temperaturas (Sutter, 1968).

## **2.5. Identificación de Bacterias Patógenas**

El diagnóstico y detección de microorganismos fitopatógenos es una etapa fundamental para conocer la diversidad de estos. Además, proporcionan herramientas adecuadas que permiten enfrentar la problemática de la sanidad de los cultivos. Para ello, es esencial contar con técnicas específicas para realizar un correcto diagnóstico.

Al momento de la identificación de una posible causa, debe considerarse que existen distintos factores que puedan ser la causa del problema. En ocasiones, las condiciones ambientales a las que se enfrenta el cultivo no son las idóneas, por lo que se afectan los sistemas de las plantas produciendo pérdidas.

Por otro lado, cuando la planta se encuentra infectada por un agente biótico y este desarrolla la enfermedad, se identifican ciertos síntomas y signos característicos que pueden

variar significativamente. Las variaciones en la sintomatología mostradas por las plantas pueden resultar en un diagnóstico erróneo.

Dentro de los distintos tipos bacterianos existen particularidades que dan lugar a respuestas diferentes en los patrones de comportamiento metabólico, fisiológico y morfológico de los miembros de cada grupo. Tales diferencias nos permiten agrupar a los microorganismos en familias, géneros y especies. De esta manera, pueden llegar a diferenciarse utilizando una serie de pruebas bioquímicas y fisiológicas que permiten identificar los organismos en estudio, pudiendo controlar las enfermedades causadas por estas bacterias patógenas.

Existen casos en los que la concordancia entre las características observables, morfológicas y/o fenotípicas del aislamiento en estudio no se presenta, ya que las cepas de una misma especie pueden generar diferentes resultados en ensayos repetidos. Para solventar esta situación, se han empleado los métodos moleculares de identificación bacteriana (Bou y col., 2011).

### **2.5.1. Pruebas morfológicas**

Las bacterias son microorganismos unicelulares que pueden observarse al microscopio permitiendo su identificación y ubicación taxonómica, utilizando distintas técnicas.

Con respecto a esto, la mayoría de las bacterias son visibles como colonias cuando se aíslan en medios de cultivo que favorecen su rápido crecimiento. Las características de las colonias varían dependiendo de la bacteria en tamaño, forma (circular, irregular o filamentosa), borde (ondulado, dentado o liso), superficie (plana, convexa, umbilicada), consistencia (mucoide, lisa o rugosa), pigmentación (crema, amarilla, verde, grisácea) y comportamiento frente a la luz (opaca o brillante) (Pírez y Mota, 2008).

Asimismo, las bacterias pueden observarse sin tinción haciendo un examen en fresco, el cual no es el más usado para observar la morfología aunque permite evidenciar la capacidad de las bacterias de moverse; o con tinción utilizando distintos colorantes que se comportan distinto según el tipo de microorganismo.

Básicamente, pueden diferenciarse en Gram positivas y Gram negativas según la estructura de la pared celular del microorganismo y, según su forma son esféricas (cocos), en barra (bacilos) y espiral (espirilos) u otras como cuboidal o tetraédrica. Así, determinan su capacidad de sobrevivir y conseguir nutrientes (Pérez y Mota, 2008; Domínguez, 2011). Por otro lado, hay especies de bacterias que pueden vivir de forma individual o en agrupaciones que forman pares, cadenas, racimos o filamentos.

Para la tinción Gram se emplean varios compuestos que actúan sobre la pared celular de los organismos; primero, el cristal violeta es el colorante inicial que con lugol forma un complejo que interactúa con la gruesa capa de peptidoglicano en las células Gram positivas, al momento de decolorar la célula se fija este colorante. Por lo que, los organismos Gram positivos se observan de una coloración púrpura. Mientras que las células Gram negativas no fijan el cristal violeta cuando se decoloran con la solución de alcohol:acetona por la presencia de su membrana externa, entonces cuando se aplica el colorante de contraste como la safranina las células quedan con una coloración rosada (Brock, 2010).

### **2.5.2. Pruebas bioquímicas**

El metabolismo microbiano comprende la integración de todas las transformaciones químicas que se realizan en el microbio como la formación de nuevos productos que se acumulan en el medio y de la desaparición o consumo de componentes originales del

mismo. Las condiciones del cultivo y la actividad del microorganismo permiten diferenciar de un caso a otro; de esta manera, reconociendo una diversidad de microorganismos con características específicas (Parés y Juárez, 1997). Por lo tanto, se utilizan medios selectivos que provocan cambios visuales que permiten distinguir entre bacterias dependiendo de la utilización del sustrato o crecimiento que presenten estas últimas. Dicho esto, a continuación se detallan los fundamentos de algunas de las pruebas bioquímicas más utilizadas:

- Pruebas rápidas, que son de lectura inmediata para la identificación.

**KOH:** permite identificar a las bacterias Gram negativas.

**Catalasa:** probar la presencia de la enzima catalasa en la bacteria.

**Oxidasa:** presencia de enzimas oxidasas.

**Movilidad:** Comprobar la movilidad de la bacteria.

- Pruebas lentas, que su lectura es de aproximadamente de 18 a 48 horas.

**Crecimiento anaerobio:** permite evidenciar el metabolismo oxidativo-fermentativo de los hidratos de carbono por las bacterias en un medio basal desarrollado por Hugh y Leifson.

**Agar MacConkey:** diferenciar el metabolismo de bacterias que fermentan lactosa.

**Agar hierro de Kligler:** capacidad del microorganismo de fermentar un carbohidrato específico incorporado en un medio basal y la producción de ácido sulfúrico.

**Crecimiento en agar Cetrimide:** permite el crecimiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa* y de otras especies del género, además estimula la formación de pigmentos. La cetrimide es el agente selectivo y el glicerol estimula la formación del pigmento.

### **2.5.3. Pruebas moleculares**

En la actualidad los métodos de caracterización genotípica son una herramienta indispensable para la detección e identificación de bacterias fitopatógenas, si se quiere analizar un organismo en particular se debe comenzar por la extracción del ADN genómico de dicho organismo, sea vegetal, animal, o microbiano a partir de la respectiva lisis de sus células y la precipitación del ADN (Tortora y col., 2007).

El fundamento para extraer el ADN de un organismo es bastante básico y consta de 5 pasos o etapas que algunos investigadores varían dependiendo del protocolo utilizado. De esta forma, se debe llevar a cabo la ruptura de las células en presencia de detergentes, enzimas o agentes desnaturantes, entre otros, que provocan la lisis. Además, se ha utilizado la acción de una sal disódica del ácido etilén-diamino-tetra-acético (EDTA) para inhibir las DNAsas. Posteriormente, se realizan pasos para la eliminación de proteínas, lípidos y ARN con enzimas proteolíticas, ARNasas y solventes orgánicos como fenol y cloroformo para la limpieza del ADN. Tanto el fenol como el cloroformo tienen la propiedad de desnaturar las proteínas, separando las proteínas desnaturadas del ADN quedando en una interfase y fase acuosa, respectivamente (Puerta y Ureña, 2005).

Muchos autores como Boucher y col. (1985) utilizaron métodos de extracción de ADN de *Pseudomonas solanacearum* (*Ralstonia solanacearum* en la actualidad) para aislar las células mutantes transformadas en dicha investigación.

Años más adelante, Wang y col. (1999) realizaron un método de extracción de DNA modificado con bromuro de cetiltrimetilamonio (CETAB) para la obtención de ADN más puro, para su posterior análisis por PCR.

Gomes y col. (2000) proponen un método de aislamiento de ADN de *Xanthomonas* spp. y compararon resultados con el método de Ausubel y col. (1992), obteniendo mejores resultados en el método propuesto por dichos autores ya que evaluaron su eficacia de manera cualitativa, por electroforesis del extracto en gel de agarosa al 0,8% y cuantitativa, por espectrofotometría.

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

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica que se basa en la obtención de un gran número de copias de un fragmento de ADN particular a partir de pequeñas cantidades de este (Olmos y col., 2010). Para ello, se amplifica el fragmento de ADN flanqueado por los cebadores que hibridan con las cadenas nucleotídicas de interés contando con ciertas etapas (Venuta y Lopardo, 2005):

- Desnaturalización (90-95°C): donde el ADN separa su doble cadena y queda libre en solución.
- Fijación o anillamiento de los iniciadores a cada hebra del ADN (40-60°C): los iniciadores hibridan específicamente cada uno con la cadena de ADN libre, a partir de aquí la DNA polimerasa se engancha y se comienza a generar la síntesis de la hebra complementaria.
- Extensión (70-75°C): síntesis de la doble cadena de ADN por medio de las polimerasas, en presencia de los desoxinucleótidos trifosfato y magnesio.

El ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 pb, codificado por el ADN ribosomal incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano; este presenta un alto grado de conservación que contiene regiones que han sido útiles en la diferenciación de géneros y especies en organismos procariontes, lo cual permite la amplificación y secuenciación del genoma con iniciadores universales complementarios a dichas regiones (Solano, 2010).

Según mencionan Clarridge (2004) y Olmos y col. (2010), el uso generalizado de esta secuencia genética es el hecho de que se comporta como un cronómetro molecular. La parte importante de esta secuencia para el diagnóstico molecular son los genes altamente conservados aunque el gen RNAr 16S, también llamado subunidad menor, está compuesto por regiones tanto conservadas como variables con suficientes polimorfismos interespecíficos; de esta forma, puede marcar la distancia evolutiva y la relación de los organismos.

Los cebadores universales generalmente elegidos para estudios de este tipo se eligen como complementarios a las regiones conservadas al inicio o al final de la secuencia completa. Un ejemplo de esto es la investigación de Lu y col, (2000), donde diseñaron un set de iniciadores basados en la naturaleza conservativa de los genes RNAr 16S de bacterias asociadas a infecciones en la sangre y el fluido cerebroespinal. La PCR realizada con el par de iniciadores U1 (5' - CCAGCAGCCGCGGTAATACG - 3') correspondiente a los nucleótidos 518 a 537 del gen ARNr 16S de *E. coli* y U2 (5'- ATCGG(C/T)TACCTTGTTACGACTTC - 3') correspondiente a los nucleótidos 1513 a 1491 de dicho gen, es conocida como PCR universal. La PCR universal para la identificación bacteriana mediante el análisis de esta secuencia consta de dos etapas: la

amplificación del ADN de la muestra estudiada y la posterior secuenciación del fragmento de PCR para la identificación del microorganismo.

Así como también, la existencia de estas regiones conservadas permite la diferenciación de especies bacterianas ya que la abundancia de secuencias permite el diseño de iniciadores específicos que se aparean con un ácido nucleico en particular (Forbes, 2009). Podemos mencionar algunos trabajos anteriores a esta investigación basados en el estudio de patógenos de papa utilizando PCR con iniciadores específicos.

En el caso de *Ralstonia solanacearum*, se han empleado comúnmente los iniciadores específicos OLI1 y Y2 propuestos por Seal y col. (1992), diseñados a partir de la región 16S del ADNr con una separación de 292 pb (Barrios, 2015). Por su parte, las investigaciones dirigidas a los géneros *Pectobacterium* y *Dickeya* han sido varias. Tenemos que Darrasse y col. (1994) proponen un par de iniciadores Y1 y Y2 separados por 434 pb, alineando las secuencias de regiones conservadas en los genes pel a partir de la familia Y para identificar especies y subespecies de dichos géneros bacterianos. En esta investigación encontraron que todas las cepas de *Pectobacterium carotovorum* pectolíticas en las condiciones utilizadas amplificaron este fragmento de 434 pb, a excepción de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *betavasculorum*, *Dickeya chrysanthemi* y otras especies de *Pectobacterium*.

Spilker y col. (2004) diseñaron un par de iniciadores, PA-GS-F y PA-GS-R, para la amplificación de todas las especies de *Pseudomonas* así como también diseñaron otro set de iniciadores específicos (PA-SS-F y PA-SS-R) para identificar únicamente a la especie *Pseudomonas aeruginosa*.

Guilbaud y col. (2015) diseñaron un par de iniciadores específicos Psy\_F (5'-ATGATCGGAGCGGACAAG -3') y Psy\_R (5'- GCTCTTGAGGCAAGCACT -3') para la detección e identificación del grupo de *Pseudomonas syringae*.

### **2.5.3.2. Amplificación de la región espaciadora transcripta intergénica (ITS)**

La secuencia genética del ARNr contiene unidades de genes como los genes 5S, 16S y 23S, los cuales se encuentran separados por regiones espaciadoras con un alto grado de variación. La amplificación de secuencias espaciadoras intergénicas transcritas (ITS) entre los genes 16S y 23S permite detectar polimorfismos y diversidad genética en bacterias. Este elevado grado de diversidad observado en las ITS en diferentes géneros, especies, cepas y en una misma cepa, constituye la base para su utilización en la identificación, filogenia y/o tipificación (Bou y col., 2011; Cazorla y col., 2008; Jensen y col., 1993).

Jensen y col. (1993) diseñaron un par de iniciadores universales, G1 y L1, para la amplificación de estas regiones ITS en todos los procariotas para identificar tanto patógenos de plantas como de humanos. De acuerdo a esto, Toth y col. (2001) describieron el uso de esta región para la rápida identificación de las bacterias causantes de la pudrición blanda del género *Pectobacterium*.

El año anterior, Guasp y col. (2000) examinaron la región ITS amplificada por los iniciadores 16F945 (5' - GGGCCCGCACAAGCGGTGG - 3') y 23R458 (5' - CTTTCCCTCACGGTAC - 3') propuestos por Lane y col. (1985) para diferenciar e identificar distintas especies de *Pseudomonas stutzeri*.

Franzetti y Scarpellini (2007) reportan la amplificación de la región ITS con la digestión de este producto con enzimas de restricción para diferenciar grupos dentro de las especies del género *Pseudomonas*.

Porotikova y col. (2017) amplificaron la región ITS utilizando el set de iniciadores D21 y D22 confirmando la presencia de *P. syringae* en muestras de uva con necrosis y manchas en las hojas.

## **2.6. Postulados de Koch**

En 1882, el médico alemán Robert Koch, pudo demostrar experimentalmente que cada enfermedad es causada por un microbio específico. Aunque existían casos inciertos en la causa de la enfermedad, ya que las bacterias u hongos aislados desde el tejido enfermo resultaban ser organismos saprófitos, los cuales coexisten con el microorganismo que causa la enfermedad pero por sí solos no pueden desarrollar los síntomas (Agrios, 2005).

Más adelante, en 1887, desarrolló ciertos criterios o postulados que permiten considerar al microorganismo antes aislado como la causa de la enfermedad. Dichos postulados se señalan a continuación (Agrios, 2005; Volcy, 2008):

1. El supuesto agente causal debe estar presente en cada hospedero enfermo que se examine.
2. El agente causal debe ser aislado desde el organismo enfermo y cultivado en un cultivo puro, para su posterior caracterización.
3. La inoculación de un hospedero sano con el agente causal debe reproducir y desencadenar el mismo cuadro patológico inicial.

4. El mismo agente causal recuperado nuevamente desde el hospedero infectado y el cultivo debe ser aislado y coincidir en las características del microorganismo que se encuentra en 1 y 2.

Debido a esto, la identificación y diagnóstico de las bacterias patógenas de plantas es importante demostrando la asociación específica de microorganismo con la enfermedad. Si estos postulados los combinamos con la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* que permiten asegurar la ausencia de otros microorganismos patógenos en el material; entonces el agente patógeno que se aisló, identificó e inoculó es el único responsable de la enfermedad.

### **2.7. Importancia del cultivo *in vitro* para la demostración de los postulados de Koch y pruebas de patogenicidad**

El cultivo *in vitro* de plantas es una de las técnicas más importantes, conocida por ser un conjunto de métodos donde un explante (una parte de la planta) se cultiva en condiciones de asepsia en un medio de cultivo de composición definida incubándose en condiciones ambientales controladas (Levitus y col., 2010). Estas técnicas cuentan con ciertas ventajas y aplicaciones, una de ellas ha sido mencionada anteriormente.

Las técnicas de cultivo *in vitro* representan un momento de estrés para el tejido vegetal, el cual tiene cierta actividad de respuesta gracias a la propiedad de totipotencia de las células vegetales propuesta por Haberlandt en 1902. La totipotencia se puede definir como la capacidad que tienen dichas células de regenerar una planta completa, así el tejido vegetal puede propagarse dependiendo de la competencia y estímulo que reciban las células (Mroginski y col., 2010).

Una de las herramientas *in vitro* que se ha convertido en una alternativa para propagación de la papa es la micropropagación. La micropropagación se puede definir como el proceso de multiplicación masiva *in vitro* en el que se incuba, en condiciones favorables en cuanto al balance hormonal apropiado, un inóculo con potencialidad de diferenciación capaz de regenerar un nuevo individuo (Villalobos y Thorpe, 1991; Salem y Hassanein, 2017).

Actualmente, podemos recalcar que las aplicaciones de estas técnicas son amplias, entre ellas caben destacar: la síntesis de nuevos productos químicos, la posibilidad de establecer programas de mejoramiento genético, la conservación de un banco de germoplasma de plantas de interés comercial o que se encuentran en peligro, la capacidad de establecer un sistema de producción definido con respecto a las demandas del mercado, propagación de plantas y obtención de plantas libres de patógenos, entre otras (Villalobos y Thorpe, 1991).

Con respecto a esto, la última aplicación mencionada es importante para el cultivo de papa ya que esta planta es susceptible a una serie de plagas y enfermedades que reducen su productividad y la calidad de los tubérculos que forman. Los patógenos se acumulan durante el desarrollo de la planta y en el suelo en donde se encuentran cultivadas. Por esta razón, se adoptó como técnica, en la industria de la papa, la micropropagación como sistema de regeneración para multiplicar plantas libres de enfermedades que puedan usar los agricultores, así como también la microtuberización.

Según Wang y Hu (1982) y Chaudhary y Mittal (2004), los microtubérculos de papa son utilizados en muchas partes del mundo para el crecimiento de la planta libre de enfermedades; y para establecer la microtuberización tiene que tomarse en cuenta ciertos

factores tales como: la temperatura (15-20°C), la concentración de sacarosa, el balance hormonal y fotoperiodo (Moreno y Oropeza, 2017; Salem y Hassanein, 2017).

La producción de microtubérculos (tubérculos *in vitro*) presenta ciertas ventajas, ya que estos se pueden obtener en cualquier época del año, pueden ser almacenados en espacios pequeños y su transporte es más fácil que el de las vitroplantas (Salas, 1995).

Murashige (1974) propuso tres pasos fundamentales para micropropagar eficientemente una especie aunque ahora se conoce que existen cinco etapas críticas para éste y otros sistemas de regeneración *in vitro*: Etapa (a) preparativa, selección del explante, por ejemplo meristemas o esquejes de tallo que contengan yemas axilares; (b) establecimiento aséptico del cultivo, incluye el protocolo de desinfección apropiado para el explante y el tamaño de este último en una cámara de flujo laminar y la definición de la composición del medio de cultivo; (c) multiplicación o crecimiento del inóculo, puede deberse a la división de células, el aumento de su tamaño o ambas; (d) enraizamiento, inducción de raíces para garantizar el éxito del trasplante al suelo; (e) aclimatización, independencia del medio de cultivo para regresar a la plantita a condiciones ambientales similares a las de la planta *in vivo*.

Murashige y Skoog (1962) propusieron un medio de cultivo empleado para el cultivo *in vitro* compuesto por sales inorgánicas, vitaminas y otros compuestos orgánicos para su elaboración en el desarrollo de plantas.

Gallardo y col. (1997), citado por Moreno (2012) menciona que 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.

Moreno y Oropeza (2017) estudiaron el efecto de la composición del medio de cultivo, en cuanto a giberelinas y benciladenina, y fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa con el fin de mejorar las condiciones y la cantidad de los microtubérculos por planta de dos variedades ‘Granola’ y ‘Arbolona negra’.

Salem y Hassanein (2017) estudiaron el efecto de varios factores para aplicar las condiciones adecuadas para la multiplicación y microtuberización de la papa *in vitro* aclarando el efecto que tiene el genotipo en estos procesos.

En 2013, Alva y Oropeza estudiaron el efecto de la consistencia del medio de cultivo y el nitrato de plata en la micropropagación de la papa, con el propósito de obtener los mejores valores de crecimiento para plántulas de dos variedades de papa; recomendando el uso de las hojas de estas plántulas para el estudio de la interacción papa-patógeno.

Barrios (2015), determinó que el uso del cultivo *in vitro* es apropiado para el desarrollo de pruebas de patogenicidad y cumplimiento de los postulados de Koch en rodajas de microtubérculos. Más adelante, Fernandes (2016) revalida estos sistemas para estudio de patogenicidad de una bacteria sobre órganos vegetales y estudia la resistencia y susceptibilidad de especies vegetales a fitopatógenos.

Estos estudios validan y comprueban que la papa se ha utilizado no sólo para la multiplicación masiva de plantas sanas, sino también para la producción de microtubérculos libres de enfermedades que pueden ser utilizados para estudios de la interacción planta-patógeno, pruebas de patogenicidad y demostración de los postulados de Koch junto con la caracterización de fitopatógenos bacterianos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Identificar aislados patogénicos obtenidos de tubérculos de papa colectados en El Molino, Estado Mérida.

#### **3.2. Objetivos específicos**

1. Aislar y purificar las bacterias patógenas a partir de los tubérculos de papa colectados en El Molino, Estado Mérida.
2. Caracterizar morfológicamente los aislados patogénicos.
3. Identificar bioquímica y molecularmente los aislados patogénicos.
4. Comprobar los postulados de Koch en microtubérculos de papa.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Material vegetal**

Se utilizaron tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* var. papa de año) colectados en El Molino, Estado Mérida, los cuales presentaban síntomas de pudrición. Los datos de la zona donde se tomaron las muestras se indican según las siguientes coordenadas:

WP: 8°11'27.0" N, 71°32'49.8" O

### **4.2. Cepas bacterianas usadas como controles**

Como controles se emplearon las cepas bacterianas mantenidas en punciones de: *Ralstonia solanacearum* donada por el Laboratorio de Bacteriología Vegetal del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), *Dickeya chrysanthemi*, las cepas LMV 30 y LMV 31 identificadas por Coppola (2015) como *Pectobacterium carotovorum* y como control positivo la cepa CVCM 625 (ATCC 10145 *Pseudomonas aeruginosa*) donada por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos.

### **4.3. Aislamiento, purificación y mantenimiento de los aislados bacterianos**

Los tubérculos fueron lavados con agua y jabón. Posteriormente se procedió a desinfectar el tejido mediante un lavado con hipoclorito de sodio al 20% por 15 minutos, 5 minutos en agua destilada estéril, luego se pasaron a una solución de alcohol al 70% por 1 minuto y por último, se lavaron nuevamente con agua destilada estéril por 5 minutos.

Seguidamente, los tubérculos desinfectados se cortaron en fragmentos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> y se colocaron en un mortero con 1 ml de caldo LB, un medio rico con las condiciones nutricionales necesarias para el crecimiento de cualquier microorganismo presente en el material vegetal macerado. Este macerado se diluyó en otros 5 mililitros de

caldo LB para permitir el crecimiento bacteriano y se incubó en una cámara con agitación a 27°C por 24 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se sembraron por agotamiento con un asa bacteriológica en una placa de agar LB, las cuales fueron incubadas por 24 horas en una cámara de agitación a 27°C. Las colonias morfológicamente distintas a simple vista con 24 horas de crecimiento fueron separadas, sembrando por agotamiento una colonia de cada morfología en placas distintas con agar LB, y este procedimiento se repitió hasta lograr el aislamiento puro de las colonias morfológicamente distintas. Una vez logrado esto, se inocularon y conservaron en tubos pequeños de punciones. Cada uno de los aislados mantenidos en punciones así como también los controles utilizados, se reactivaron mediante inoculación en 2 ml de caldo LB fresco y fueron sembrados en placas de agar LB, para proceder a la realización de las siguientes pruebas.

#### **4.4. Prueba preliminar de patogenicidad en tubérculos comerciales.**

Se realizó una prueba de patogenicidad inicial utilizando rodajas de papas obtenidas de tubérculos comerciales, con la finalidad de elegir las cepas bacterianas con capacidad de producir síntomas. Para ello se llevó a cabo la selección de tubérculos sanos, los cuales fueron lavados con agua y jabón, luego se pelaron y lavaron con agua destilada. Se procedió a desinfectar los tubérculos, lavándolos con agua destilada estéril por 15 minutos, seguido por un lavado por 10 minutos con hipoclorito de sodio 0,5% y 15 minutos más en agua destilada estéril. Una vez desinfectados, se cortaron las rodajas de aproximadamente 5 mm de grosor, las cuales se incubaron en una solución de ácido ascórbico estéril 0,05% por 1 minuto para evitar la posible oxidación del tejido durante el ensayo.

Para la preparación de las placas de cámara húmeda, se colocaron 3 láminas de toallín en el fondo de cada placa de Petri y luego una malla de plástico para soporte, se esterilizaron y se dejaron secar en la estufa. Posteriormente, se añadieron 10 ml de agua destilada estéril a cada placa para mantener la humedad durante la prueba. En cada cámara húmeda, se colocaron 3 rodajas, en el centro de cada una se realizó una incisión circular con un saca bocados estéril con la finalidad de conocer el sitio de inoculación de la cepa bacteriana y permitir su mayor penetración (Golkhandan y col., 2013).

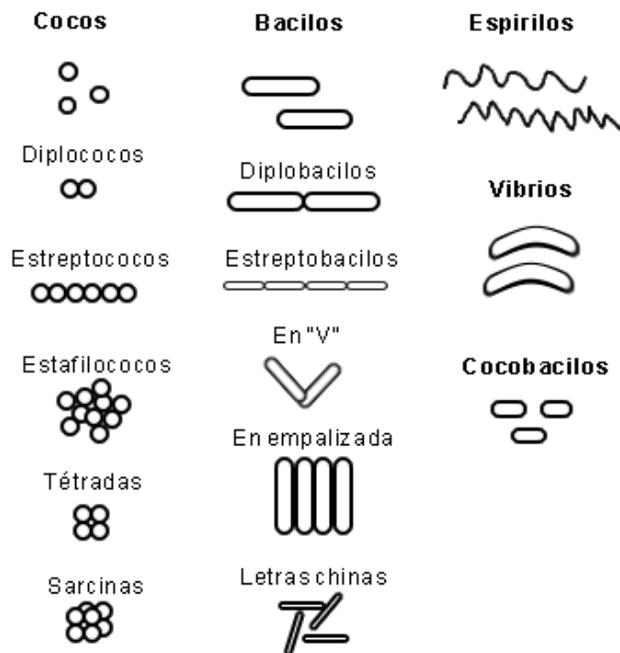
En simultáneo, se prepararon suspensiones bacterianas tomando una colonia de 24 horas de crecimiento en agar LB y se inoculó en 2 ml de caldo nutritivo LB, se procedió a incubarlos por 24 horas a temperatura ambiente con agitación continua. Después de las 24 horas, se diluyeron 200 µl de cada suspensión en 2 ml de caldo LB, las cuales fueron incubadas por 6 horas a temperatura ambiente con agitación continua.

Para la inoculación de las rodajas, se tomaron 100 µl de cada una de las suspensiones bacterianas de 6 horas de crecimiento en caldo LB y se colocaron sobre la incisión realizada con el saca bocado en el centro de la rodaja. Así mismo, se inocularon rodajas de papa con caldo nutritivo estéril sin crecimiento bacteriano como control negativo y cepas bacterianas conocidas e identificadas previamente causantes de pudriciones y marchitamiento en papa como control positivo (*P. carotovorum*, *Dickeya chrysanthemi* y *R. solanacearum*).

Todas las cámaras húmedas se incubaron durante una semana a temperatura ambiente, observando y tomando un registro fotográfico a diario de la sintomatología causada por cada aislado durante todo el ensayo.

#### 4.5. Caracterización morfológica.

Se realizó la descripción macro y micromorfológica de los diferentes aislados bacterianos, de la siguiente manera: se observó la forma, tamaño, color, borde, superficie y levantamiento de las colonias en placas de agar LB y YDC, según López-Hontangas y col., (2007). Además se desarrolló la prueba de tinción Gram a cada uno, para identificar la forma de cada aislado bacteriano a nivel celular y también para determinar el tipo celular según la estructura de la pared en Gram (+) o Gram (-).



**Figura 1.** Morfología bacteriana a nivel celular. Tomado de:

<https://microbiosparaprincipiantes.wordpress.com/tag/morfologia-de-las-bacterias/>.

Para la prueba de tinción Gram, se siguió el protocolo de Schaad y col. (2001) que consiste en tomar una muestra de manera aséptica de cultivo bacteriano fresco y puro procedente de placas con agar LB de 24 a 48 horas de crecimiento, y se hizo un frotis bacteriano de cada

aislado patogénico en un portaobjetos limpio y estéril. Se fijó la muestra pasando el portaobjetos por el mechero y se procedió a teñir los aislados con una solución de cristal violeta (0,1 g/L) durante 1 minuto y se lavó el portaobjetos con agua destilada; posteriormente se cubrió con una solución de lugol (yodo 0,1 g/L y yoduro de potasio 0,2 g/L) por 1 minuto, y se lavó con abundante agua destilada; una vez realizado esto, se aplicó la solución decolorante alcohol:acetona (70:30), y se lavó el decolorante. Finalmente, se adicionó una solución de safranina (0,2 g/L) y se retiró el exceso al minuto con agua destilada. Después de esto, se secó el portaobjetos y se observó cada muestra en un microscopio óptico marca Nikon, con el objetivo de 100X colocando aceite de inmersión.

#### **4.6. Caracterización bioquímica**

Para la identificación de los aislados a nivel bioquímico, se llevaron a cabo una serie de pruebas descritas para bacterias patógenas de plantas, de acuerdo a algunas recomendaciones de Schaad y col. (2001). De este modo, se realizaron las siguientes pruebas:

- Prueba de KOH
- Prueba de Oxidación – Fermentación con glucosa al 10%
- Prueba de oxidasa
- Prueba de la actividad de la catalasa
- Crecimiento y fermentación de lactosa en agar MacConkey
- Fermentación de carbohidratos en agar hierro de Kligler
- Prueba Simmons Citrato
- Reducción de nitratos
- Crecimiento en agar Cetrimida

- Prueba SIM (Sulfuro Indol para Movilidad)
- Hidrólisis de la gelatina
- Prueba de arginina deshidrolasa

#### **4.7. Caracterización molecular**

Se realizaron estudios del ADN de los aislados patogénicos. Todas las electroforesis de geles de agarosa fueron corridas a 100V y los geles teñidos en una solución de Bromuro de Etidio (BrEt) 10 mg/ml. Para su análisis, los geles fueron observados en un transiluminador GelDoc (BioRad) bajo luz ultravioleta.

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

##### **4.7.1. Extracción del ADN bacteriano.**

Se llevaron a cabo los siguientes protocolos para la obtención del ADN bacteriano de los aislados patogénicos:

- Método propuesto por Gomes y col. (2000):

Para ello, se dejaron crecer los aislados en 5 ml de caldo LB durante 72 horas a 27°C. Se tomaron aproximadamente 1,5 ml de cada aislado crecido y se centrifugaron a 13000xg por 5 minutos. El sedimento se resuspendió en 200 µl de solución Tris 0,1 M y se le añadieron 200 µl de solución de lisis (NaOH 0,2 N y SDS 1%), pasando por el vórtex hasta despegar el sedimento e incubando las muestras a 55°C por 1 hora.

Transcurrido este tiempo, se agregaron 700 µl de una solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1 v/v/v), se homogenizó por inversión y se centrifugó a 13000xg durante 10 minutos. Luego de esta centrifugación, se observaron tres fases de las cuales se tomó la fase acuosa únicamente. Al sobrenadante, se le añadió etanol frío al 95% dejando por 20 minutos a -20°C para que precipite el ADN. Posteriormente, se centrifugó a 13000xg por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol al 70%, verificando que se despegara el pellet del fondo del tubo; se centrifugó a 13000xg por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado de ADN se dejó secar 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 destilada estéril.

➤ Método propuesto por Chen y col. (2003), modificado por Chavarro (2004):

Se crecieron los aislados en 1,5ml de caldo LB durante 72 horas a 28°C, se centrifugaron a 13000xg durante 3 minutos y se resuspendió el sedimento en 200 µl de buffer de lisis (40 mM Tris, 20 mM acetato de sodio, 1 mM de EDTA y SDS 1%) para disolverlo por vórtex durante 10 segundos. Se adicionaron 66 µl de NaCl 5M disolviéndolos con un vórtex 20 segundos y se centrifugó a 13000xg por 10 minutos a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se le adicionó 1 V de cloroformo, agitando hasta ver la formación lechosa para luego centrifugar a 12000 xg por 3 minutos a 4°C. Se tomó la fase acuosa y se adicionó 2 V de etanol absoluto para la precipitación del ADN durante 40 minutos a -20°C; se centrifugó a 13000xg por 5 minutos a 4°C y posteriormente se realizó un lavado con etanol al 80%. Se dejó secar por 1 hora aproximadamente a 35°C y se resuspendió el ADN en 50 µl de agua destilada estéril, se conservó a -20°C hasta su procesamiento.

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

### **4.7.2.1. Espectrofotometría**

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 280nm (Sambrook y Russell, 2001) en cubetas de cuarzo. La relación de absorbancia 260/280 indicó la pureza de la muestra en cuanto al contenido de material genético y otros compuestos, siendo el valor óptimo de un extracto puro comprendido entre 1.8 y 2. La cuantificación se basa en que 1 DO a 260 nm 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:

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

### **4.7.2.2. Electroforesis en gel de agarosa 0,8%**

Para determinar la calidad e integridad de los extractos de ADN, se desarrolló una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, preparado en solución tampón TBE 0,5X, de los aislados patogénicos y de los controles utilizados en las pruebas bioquímicas. Como marcadores de peso molecular se utilizaron 50 pb y 1kb de PROMEGA.

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

Se utilizó la PCR para la identificación de los aislados bacterianos. En todos los casos, los fragmentos amplificados se observaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Todos los geles fueron corridos a 100V y teñidos con BrEt 10 mg/ml y para su

análisis los geles se observaron en un transiluminador GelDoc (BioRad) bajo luz ultravioleta.

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

Para corroborar que los aislados corresponden a organismos procariontes y además que no presentan inhibidores para la PCR, se realizó una amplificación del ADN con iniciadores universales según el protocolo de Lu y col. (2000). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25µl que contenía: 1X amortiguador de reacción, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 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 los siguientes ciclos:

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

Ciclo 2: Desnaturalización durante 1 min a 94°C, hibridación de iniciadores durante 1 min a 48°C, elongación durante 2 min a 72°C (35 repeticiones).

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

Se esperaban como productos de amplificación, una banda específica de 996 pb y otra inespecífica del gen 16S del ADNr. Los iniciadores universales para la amplificación que se emplearon fueron los reportados 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*.

#### **4.7.3.2. Amplificación con iniciadores específicos.**

Se desarrolló una PCR con iniciadores específicos para la identificación de *R. solanacearum* y *P. carotovorum* (Tabla III), con el fin de determinar si los aislados patogénicos encontrados corresponden a alguna de estas especies bacterianas, comparando con los resultados obtenidos en la caracterización morfológica y bioquímica y con los controles positivos utilizados.

**Tabla III.** Iniciadores de PCR, para la detección molecular de *R. solanacearum* y *P. carotovorum*.

<b>Especie/ Iniciadores</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tamaño del fragmento esperado</b>
<i>R. solanacearum</i> / <b>Oli1 Y2</b>	5`GGGGGTAGCTTGCTACCTCC3` 5`ACTCCTACGGGAGGCAGTGGG3`	292 pb
<i>P. carotovorum</i> / <b>Y1 Y2</b>	5`-TTACCGGACGCCGAGCTGTGGCGT-3` 5`CAGGAAGATGTCGTTATCGCGAGT3	434 pb

En el caso de *P. carotovorum*, se utilizaron los iniciadores Y1 y Y2 propuestos por Darrase y col. (1994) para la amplificación del gen *pel*. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 25 µl, conteniendo 1X amortiguador de reacción, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 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 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).

En el caso de *R. solanacearum*, se llevó a cabo una PCR con los iniciadores OLI1 y Y2 propuestos por Seal y col. (1992) específicos para la identificación de esta bacteria, diseñados a partir de la región 16S ARNr. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 25 µl, conteniendo 1X amortiguador de reacción, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 1 µM iniciadores, 50 ng ADN de la muestra bacteriana y 1 U de Taq Polimerasa y las siguientes condiciones de ciclado:

Ciclo 1: Desnaturalización durante 2 min a 96°C (una repetición).

Ciclo 2: Desnaturalización durante 20 seg a 94°C, hibridación de iniciadores durante 25 seg a 66°C, elongación durante 30 seg a 72°C (35 repeticiones).

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

#### **4.7.3.3. Amplificación de la región espaciadora transcripta intergénica (ITS)**

Adicionalmente, se amplificó la región intergénica espaciadora transcripta (ITS-PCR) según lo descrito por Jensen y col. (1993), utilizando los iniciadores G1 (5' – GAAGTCGTAACAAGG – 3') y L1 (5' – CAAGGCATCCACCGT – 3'). En este caso, se esperaba obtener distintos patrones de bandas; los productos amplificados se observaron en un gel de agarosa 2% (Toth y col., 2001; Nazerian y col., 2011; Golkhandan y col., 2013).

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 25  $\mu$ l, conteniendo 1X amortiguador de reacción, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 1  $\mu$ M 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 (35 repeticiones).

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

#### **4.8. Micropropagación y microtuberización.**

Se tomaron esquejes nodales de 1 cm aproximadamente de plantas de papa (*Solanum tuberosum*) de la variedad ‘Papa de año’ del banco de germoplasma del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal del Instituto de Biología Experimental. Dichas plantas se encuentran cultivadas *in vitro* en medio semi-sólido de Murashige y Skoog (1962) (MS). Los esquejes nodales de aproximadamente 2 meses de edad se pasaron a matraces Erlenmeyer con medio MS líquido, 5 esquejes por matraz, procediendo a incubar por 1 mes en condiciones de luz y agitación continua a una temperatura de 18°C (Moreno, 2017).

Siguiendo el protocolo propuesto por Moreno y Oropeza (2017), pasado el mes de incubación se cambió el medio MS líquido de todos los matraces Erlenmeyer 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, promotora de la división y diferenciación celular. Se incubaron las plantas a 18 °C y fotoperiodo de 8

h luz durante 2 meses, para obtener la formación de microtubérculos de un tamaño adecuado, teniendo en cuenta la renovación del medio cuando se haya consumido el mismo.

#### **4.9. Postulados de Koch 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. Con el cultivo puro, se diluyeron 200 µl de cada suspensión en 2 ml de caldo LB, las cuales fueron incubadas por 7 horas a temperatura ambiente con agitación continua. Las cámaras húmedas se prepararon según lo explicado en el punto 4.4.

#### **Inoculación.**

Se inocularon 15 µl de cada suspensión bacteriana crecida durante 7 horas, en el centro de cada rodaja de los microtubérculos de la placa correspondiente. Como control negativo de la prueba se preparó una placa de cámara húmeda con las rodajas inoculadas únicamente con 10 µl de caldo LB. Todas las placas se incubaron por una semana bajo luz continua a 18 °C.

Para cumplir con los postulados de Koch, se obtuvieron los aislados bacterianos a partir de los microtubérculos inoculados que presentaron síntomas, tomando una muestra bacteriana del microtubérculo infectado por 48 h. La muestra se incubó en caldo LB estéril a 27°C por 24 h y se les corroboró su identidad mediante las mismas pruebas bioquímicas y moleculares que permitieron la identificación del aislado original.

#### **4.10. Incidencia y severidad de la enfermedad**

Se determinó la incidencia y severidad de la enfermedad a los 7 días post-inoculación, en las mismas rodajas de microtubérculos inoculadas para la comprobación de los postulados de Koch.

De esta manera, se observó la evolución de la enfermedad, la descripción de los síntomas y la cantidad de rodajas de microtubérculos infectados para determinar la incidencia. Por su parte, la severidad se determinó asignando valores de severidad según la escala propuesta por Montanelli y col. (1995), 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.

Una vez establecidos estos valores se calculó el índice de enfermedad empleando la escala de gradiente de síntomas de Rott y Chagvardieff (1987), descrita en la siguiente fórmula:

$$ID = \frac{(X1x1) + (X2x2) + (X3x3) + (X4x4) + (X5x5)}{Xt x 5} x 100$$

Dónde  $X_1$  es el número de microtubérculos con una escala de severidad igual a 1,  $X_2$  número de microtubérculos con una escala de severidad igual a 2,  $X_3$  es el número de microtubérculos con una escala de severidad igual a 3,  $X_4$  es el número de microtubérculos con una escala de severidad igual a 4,  $X_5$  número de microtubérculos con una escala de severidad igual a 5 y  $X_T$  es el número total de microtubérculos evaluado.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

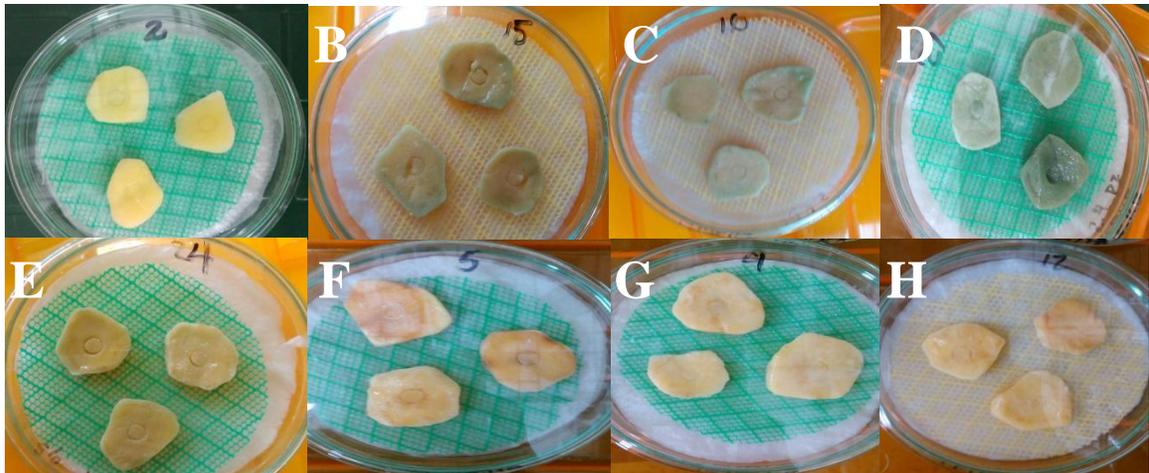
### **5.1. Obtención y mantenimiento de aislados bacterianos**

Se obtuvieron un total de 4 aislados purificados, los cuales provienen de un solo tubérculo de papa que mostraba síntomas, colectado en El Molino, Edo. Mérida, Venezuela. Una vez purificadas las distintas morfologías por separado, se almacenaron en punciones para su posterior análisis.

### **5.2. Prueba preliminar de patogenicidad**

A los aislados purificados obtenidos, se les realizó una prueba preliminar de patogenicidad utilizando rodajas de tubérculos de papas comerciales con una apariencia sana, con la finalidad de evaluar la capacidad de provocar pudrición de cada aislado por separado y seleccionar aquellos que causen la enfermedad para su posterior caracterización e identificación.

De los cuatro (4) aislados estudiados en el ensayo, se obtuvo que los cuatro resultaron aislados patogénicos presentando síntomas de pudrición con una coloración verde en tres de ellos característica del pigmento producido por la bacteria; mientras que el cuarto aislado no presentó esta coloración. Los aislados se denominaron Año 1.1, Año 1.2, Año 2.1 y Año 2.2, respectivamente (Figura 2).



**Figura 2.** Prueba preliminar de patogenicidad en tubérculos comerciales de papa a las 120 hpi. A. Control negativo, inoculado con caldo LB, B-E. Aislados patogénicos (Año 1.1, Año 1.2, Año 2.1 y Año 2.2, respectivamente), F-H. Controles positivos (cepas de *P. carotovorum*, *R. solanacearum* y *Dickeya chrysanthemi*, respectivamente).

El aislado Año 2.1, a las 24 hpi, comenzó a producir un exudado blanco en la superficie de los tubérculos justamente en la zona de incisión mientras que los otros aislados no presentaron ninguna afección. En el caso de los otros aislados se comenzaron a observar estos síntomas a las 48 hpi. A las 120 hpi los tubérculos con los aislados Año 1.1, Año 1.2 y Año 2.1 presentaron una pigmentación verde en los bordes de las rodajas de tubérculos que se extendió en toda la rodaja a lo largo del ensayo. Al cabo de los 6 dpi se observó en todos los aislados pudrición blanda con un 100% de infección, aunque el aislado de Año 2.1 produjo síntomas más severos con respecto a las demás con una pigmentación verde intensa. Además, en todas las cámaras con los aislados estudiados se notó un olor afrutado al abrir las placas.

Esta pudrición blanda puede explicarse, ya que existen organismos capaces de producir enzimas como las pectatoliasas, las cuales degradan los tejidos vegetales. Resultados similares fueron encontrados por Zucker y Hankin (1970), quienes encontraron que ciertas especies de *Pseudomonas* producen grandes cantidades de pectatoliasas, afectando las rodajas de papa durante el ensayo realizado por dichos autores. En cuanto a la pigmentación y olor producidos por los aislados, se tocará este punto más adelante en la discusión.

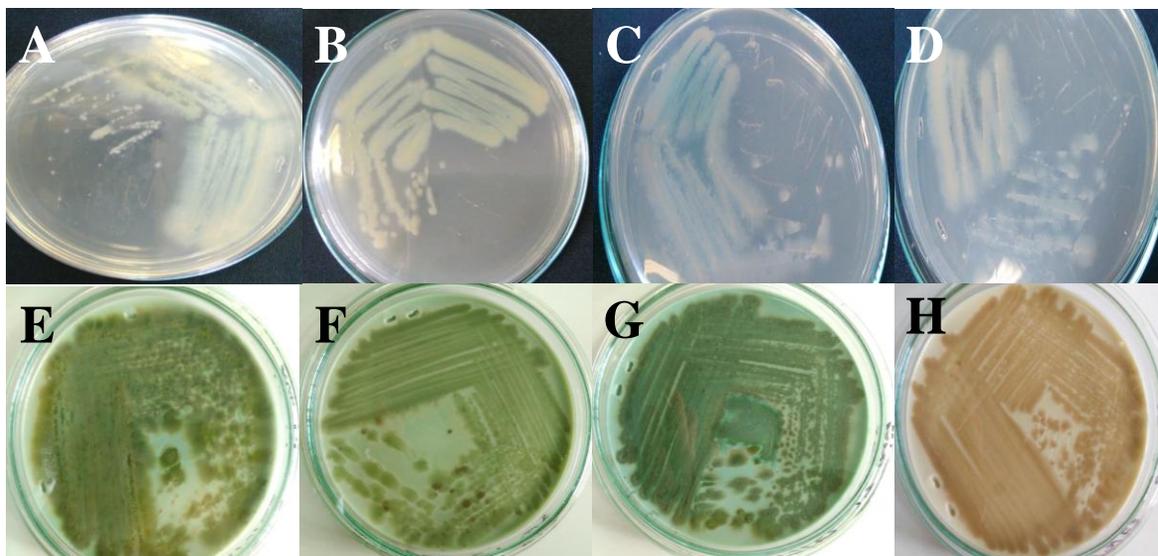
Esta prueba preliminar no permite asegurar que los síntomas ocasionados sean únicamente por efecto del aislado inoculado puesto que los tubérculos comerciales estuvieron en contacto con el ambiente y superficies que pueden comprometer el ensayo, por la posible presencia de bacterias que no hayan sido eliminadas en el proceso de desinfección.

### **5.3. 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 con todas las condiciones que favorezcan su desarrollo (Pirez y Mota, 2008). Para toda identificación es importante destacar las características clave de una colonia, a menudo las colonias de una especie presentan características casi indistinguibles de las muchas otras especies ocurriendo que las bacterias de una misma especie exhiban un comportamiento distinto (Forbes, 2009).

Para el estudio morfológico, los aislados se sembraron en placas de agar LB y se observaron bajo un microscopio estereoscópico. Las características descritas de cada aislado se encuentran en la Tabla IV y se muestran en la Figura 3. En este caso, se puede observar que las morfologías de las placas LB con respecto a las YDC son similares y es

posible diferenciar con mayor resolución la formación de pigmento verde de los aislados Año 1.1, Año 1.2 y Año 2.1.



**Figura 3.** Morfología bacteriana de los aislados patogénicos crecidos en medio LB sólido (arriba) y YDC (abajo). A, E. Año 1.1, B, F. Año 1.2, C, G. Año 2.1, D, H. Año 2.2.

**Tabla IV.** Descripción morfológica de las colonias de los aislados patogénicos a las 48 h de crecimiento.

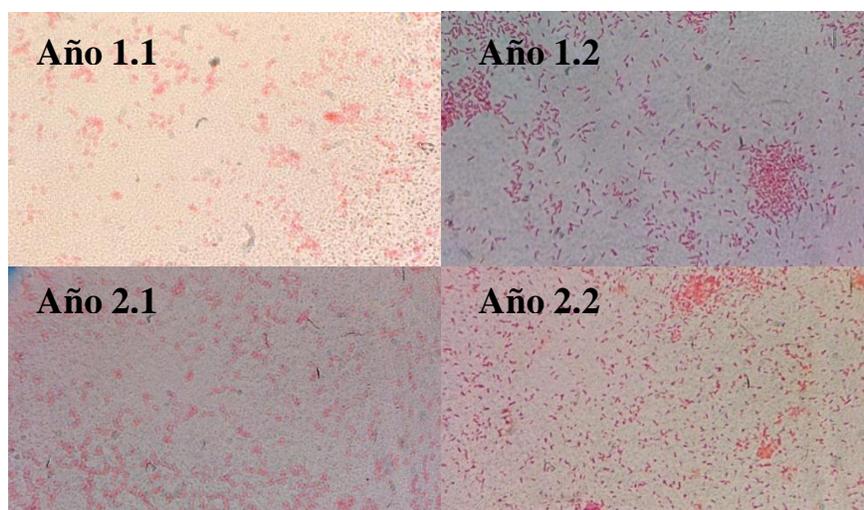
	<b>Año 1.1</b>	<b>Año 1.2</b>	<b>Año 2.1</b>	<b>Año 2.2</b>
<b>Forma</b>	Filamentosa	Filamentosa	Filamentosa	Filamentosa
<b>Borde</b>	Entero	Entero	Entero	Entero
<b>Color</b>	Crema	Crema	Crema	Crema
<b>Pigmento</b>	Verde pardo	Verde	Verde	NP
<b>Tamaño</b>	Mediana (1-2 mm)	Mediana (3 mm)	Mediana (4 mm)	Grande (6 mm)

<b>Superficie</b>	Rugosa	Rugosa	Rugosa	Rugosa
<b>Elevación</b>	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada

NP=No presenta

Tomando en cuenta la aparición de pigmentos, existe un reducido grupo de bacterias que durante su metabolismo, sintetizan este tipo de sustancias coloreadas. Algunas de estas sustancias puedan estar incorporadas en el citoplasma del organismo mientras que otras pueden difundir al medio de cultivo a medida que la bacteria crece (pigmentos hidrosolubles) (Vanegas, 2015; Pumarola, 1987). Esta característica puede emplearse como carácter taxonómico.

A su vez, el aislamiento de las colonias individuales durante los cultivos no solo es importante para examinar la morfología y las características sino que también es necesario para la realización de la tinción Gram (Forbes, 2009). A cada aislado se le realizó esta tinción como uno de los primeros pasos para la identificación, mediante la cual se pudo observar que todos los aislados patogénicos causantes de pudrición son bacilos Gram negativos como se muestra en la Figura 4. Esto concuerda con lo que exponen Vidaver y Lambrecht (2004), donde mencionan que la mayoría de las bacterias asociadas a plantas son bastones Gram negativos.



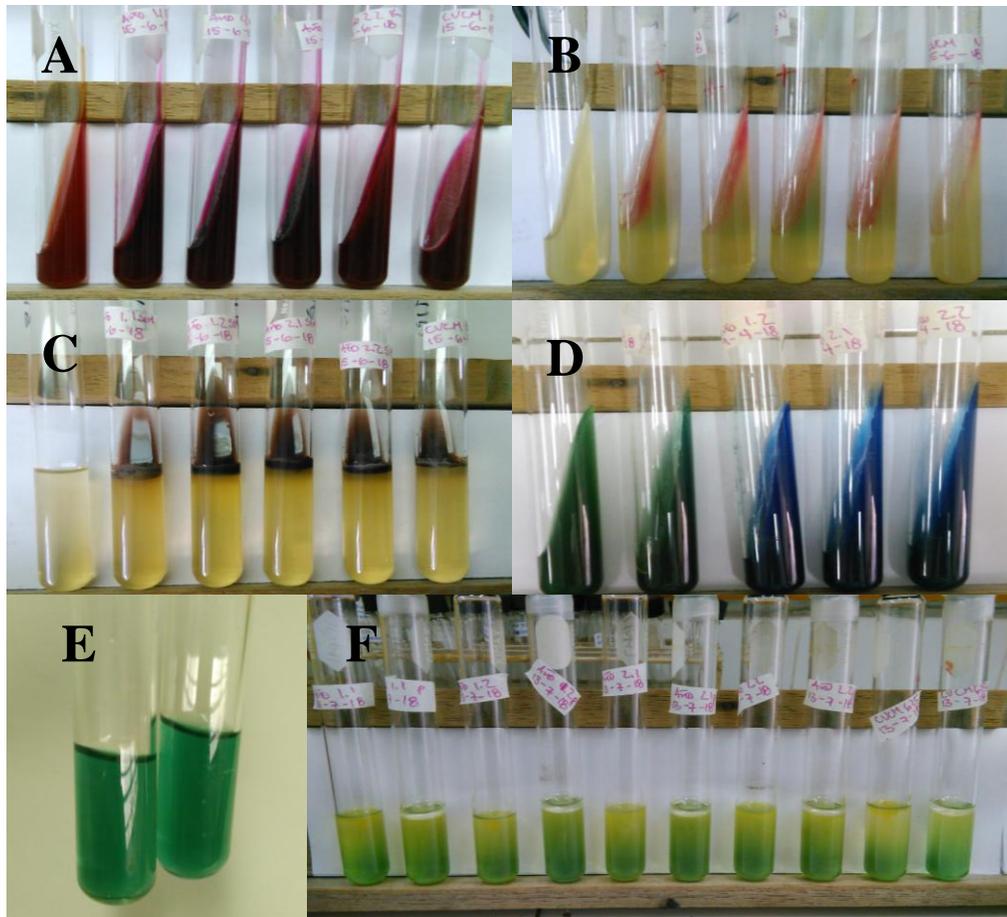
**Figura 4.** Tinción Gram de los aislados patogénicos

De esta forma, podemos inferir preliminarmente que los aislados bacterianos entran dentro del grupo de género *Pseudomonas* por las características específicas nombradas anteriormente en cuanto a la producción de pigmentos y el olor que presentaron dichos aislados en las pruebas de patogenicidad. Estos resultados coinciden con lo reportado por El-Fouly y col. (2015), Silvestre y Betloch (1999), Cox y Parker (1979), en donde señalan que este género produce una variedad de pigmentos extracelulares, los más importantes son la piocianina y pioverdina que explican el característico color verde tanto en la infección producida en los tubérculos comerciales de papa como en el medio de cultivo, así como también la presencia de metabolitos responsables del olor dulce y afrutado .

#### **5.4. Caracterización bioquímica**

Conociendo la información preliminar sobre la morfología de los aislados bacterianos, se decidió la serie de pruebas que se deben aplicar obtener más información con respecto a cada aislado a partir de sus características metabólicas. Para estas pruebas se incorporó como control positivo la cepa CVCM 625 identificada como *Pseudomonas aeruginosa*.

En la Figura 5 y en la Tabla V se muestran los resultados obtenidos al aplicar las pruebas seleccionadas.



**Figura 5.** Pruebas bioquímicas de los aislados patogénicos y la cepa control CVC6M 625.

De izquierda a derecha, en todos lo casos, se observan control negativo (tubo con medio sin inóculo), aislados patogénicos Año 1.1, Año 1.2, Año 2.1 y Año 2.2, respectivamente y de último, CVC6M 625. A. Crecimiento en medio agar hierro de Kligler 24 hpi, B. Prueba de reducción de nitratos 24 hpi, C. Prueba Sulfuro-Indol-Motilidad 48 hpi, D. Prueba de Simmons citrato, E. Tubo con medio sin inóculo como control negativo, F. Prueba de Oxido-Fermentación en medio Hugh y Leifson suplementado con glucosa 10% 72 hpi.

**Tabla V.** Resultados de las pruebas bioquímicas para los aislados patogénicos y la cepa control CVCM 625.

Aislado Prueba	Año 1.1	Año 1.2	Año 2.1	Año 2.2	CVCM 625
KOH 3%	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+
AHK	Glu-/Lac-, sin producción de H <sub>2</sub> S y gas				
Simmon's citrato	-	+	+	+	+
Agar cetrimide	Crecimiento + Pigmento +				
Gelatina	+	+	+	+	+
Reducción de nitratos	+	+	+	+	-
SIM	S-/I-/M+	S-/I-/M+	S-/I-/M+	S-/I-/M+	S-/I-/M+
OF Glucosa	O+/F-	O+/F-	O+/F-	O+/F-	O+/F-
Agar MacConkey	Crecimiento + Lac -				
Arginina deshidrolasa	+	+	+	+	+

\*AHK=agar hierro de Kligler, SIM=prueba de sulfuro indol para motilidad, OF= prueba de oxido-fermentación

Los aislados identificados como Año 1.1, Año 1.2, Año 2.1 y Año 2.2 todos fueron capaces de reducir los nitratos a nitritos, móviles, no productores de indol a partir del desdoblamiento del triptófano, cuentan con la presencia de la enzima oxidasa y son no fermentadores de carbohidratos, así mismo no producen gas ni ácido sulfhídrico, al igual que la cepa CVCM 625 (Tabla V).

Mediante las dos últimas pruebas, se puede descartar que las bacterias pertenezcan a los géneros que causan pudrición blanda en cultivos de papa: *Pectobacterium* y *Burkholderia*, ya que estos dos géneros son oxidasa negativos; así como descartar *Ralstonia solanacearum*, la cual fermenta al menos uno de los carbohidratos presentes en el agar hierro de Kligler. Asimismo, con dichas pruebas más el aislamiento en agar Cetrimide podemos decir que estos aislados se acercan al género *Pseudomonas*. En este caso, el agar Cetrimide es un medio selectivo para *Pseudomonas* ya que la cetrimida es un detergente catiónico que actúa como agente inhibidor de la flora acompañante ocasionando que las células bacterianas liberen fósforo y nitrógeno.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por autores como MacFaddin (2003), Schaad y col. (2001), Shivaji y col. (1989), Sutter (1968) y Bergey's (2006), quienes usando pruebas similares identificaron sus aislados como pertenecientes del género *Pseudomonas*.

MacFaddin (2003) según su marcha analítica, identificó a especies de *Pseudomonas* como organismos que hidrolizan la gelatina siendo negativo para algunas especies, no producen H<sub>2</sub>S excepto *P. putrefaciens*, no fermentan los carbohidratos en agar hierro de Kligler aunque el autor solo menciona a *P. aeruginosa*. La mayoría son móviles, reducen nitratos a nitritos, son oxidasa positivas y oxidan la glucosa, características señaladas en la Tabla IV.

Por su parte, Shivaji y col. (1989) mencionan que las *Pseudomonas* son bacterias móviles, crecen en citrato como única fuente de carbono aunque existen aislados que no lo hacen, son oxidasa y catalasa positivo y la producción de indol es negativa. Sutter (1968) identificó más de 29 cepas de *Pseudomonas* como microorganismos móviles y no fermentadores comparando las características en agar Cetrimide, su respuesta a la hidrólisis

de la gelatina y la actividad de arginina deshidrolasa y oxidasa; siendo positivas para la mayoría de las especies de *Pseudomonas* con sus excepciones, y siendo variables para la especie *P. pseudoalcaligenes*.

Forbes (2009) también menciona las diferencias entre *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, entre otras y se identifican por la capacidad que tienen de hidrolizar la gelatina las primeras dos, mientras que *P. putida* es negativa para esta prueba, así como también *P. fluorescens* y *P. putida* no reducen los nitratos mientras que otras especies de *Pseudomonas* si y todas oxidan la glucosa.

Finalmente, los aislados Año 1.2 y Año 2.1 podrían tratarse de la misma cepa bacteriana, muy similares a las respuestas obtenidas con el control positivo (CVCM 625) (Figura 5).

## **5.5. Identificación molecular**

Una vez obtenido el diagnóstico empleando las características morfológicas y bioquímicas, se procede a la caracterización basada en la técnica de la Reacción en de la Polimerasa (PCR) para corroborar la identidad de los aislados obtenida con los resultados anteriores.

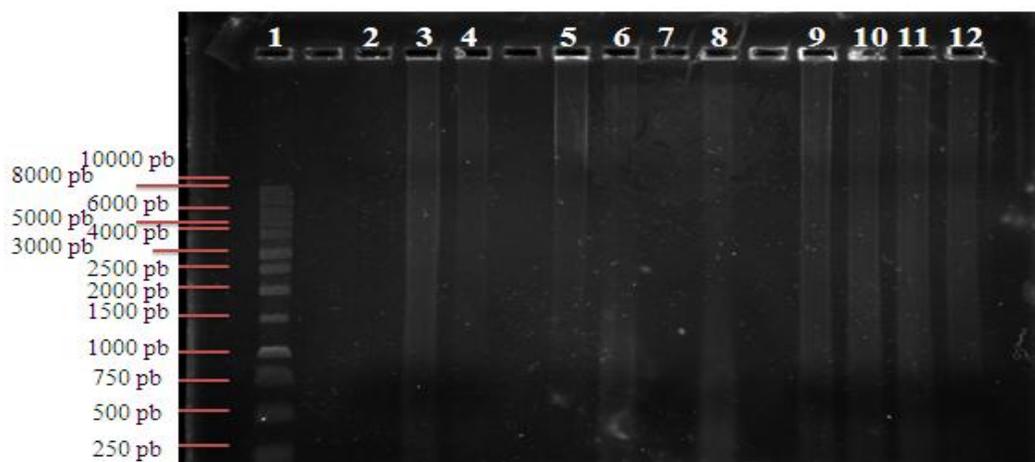
Basándonos en los resultados obtenidos hasta ahora y debido a que en el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal no se cuenta con los iniciadores específicos para identificar especies del género *Pseudomonas*, ni la capacidad de enviar a secuenciar el fragmento amplificado del ADN ribosomal, las pruebas moleculares tendrán como objetivo corroborar que estos aislados no pertenecen a los géneros *Ralstonia* o *Pectobacterium* y analizar la similitud del patrón de bandas obtenido al amplificar la región ITS del ADN de cada aislado problema.

### **5.5.1. Extracción de ADN bacteriano.**

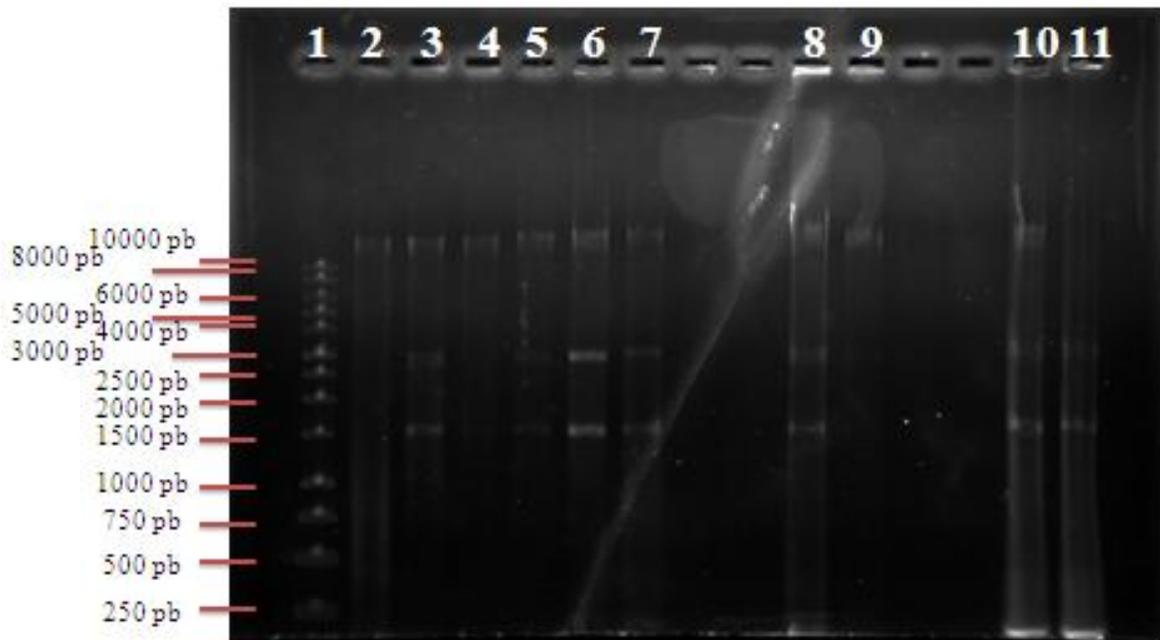
La extracción de ADN de cualquier organismo con un método simple, reproducible, económico y posible de utilizar para su obtención con una suficiente concentración y pureza, es un punto crucial para los análisis moleculares (Osorio-Cadavid y col., 2009; Lopera-Barrero y col., 2008).

Se realizó la extracción del ADN de los 4 aislados en cuestión, de las cepas controles y de los re-aislados causantes de síntomas de los postulados de Koch (ver más adelante, postulados de Koch).

El método de Gomes y col. (2000) para la extracción ADN no resultó ser tan efectivo como describen Alvez (2011), Barrios (2015) y Fernandes (2016) en sus trabajos (Figura 6); en comparación con el método propuesto por Chen y col. (2003) modificado por Chavarro (2004) con el cual se consiguieron resultados más favorables en cuanto a concentración e integridad (Figura 7). Sin embargo, con ambos métodos se observó el ADN, y ARN de bajo peso molecular degradado, pues, el ARN es un material susceptible a la degradación por la acción ARNsas como mencionan Díaz-Alonso y col. (2013).



**Figura 6.** Electroforesis en gel de agarosa 0,8% de los extractos de ADN obtenidos por el método de Gomes y col. (2000). Carril 1: Marcador de peso molecular (1 Kb, PROMEGA), Carril 2: *R. solanacearum* INIA, Carril 3: *P. carotovorum*, Carril 4: *D. chrysanthemi*, Carriles 5-8: aislados 2.7.1, 2.7.2, 2.8.1.1 y 2.8.2.2 (otros aislados problemas del LMV), Carriles 9-12: aislados Año 1.1, Año 1.2, Año 2.1, Año 2.2.



**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa 0,8% de los extractos de ADN a una concentración de 50 ng/μl obtenidos por el método de Chen y col. (2003), modificado por Chavarro (2004). Carril 1: Marcador de peso molecular (1 Kb, PROMEGA); 2-5: aislados Año 1.1, Año 1.2, Año 2.1 y Año 2.2; 6: CVCM 625; 7: *R. solanacearum* INIA; 8: Año 1.1 (Koch 1); 9: Año 1.1 (Koch 2); 10: Año 1.1 (Koch 1) extracto original; 11: Año 1.1 (Koch 2) extracto original.

### 5.5.2. Cuantificación y pureza del ADN extraído.

Con la espectrofotometría, se evaluó el estimado de pureza de ADN extraído para determinar la eficiencia de cada método utilizado. Una relación de absorbancia superior a 1,8 es considerada como un indicador de buena calidad, los valores óptimos en el índice de pureza oscilan en un rango de 1,8 a 2 obteniendo un ADN libre de contaminantes celulares (Sambrook y Rusell, 1989; Manchester, 1996).

Dado que los ácidos nucleicos presentan un máximo de absorción de luz a una densidad óptica de 260 nm, podemos estimar la concentración de ADN a partir del valor de 260 nm (Sambrook y Rusell, 2001; citado por Coppola, 2015). Así, 1 DO equivale a 50 µg/ml de ADN doble cadena. Los valores obtenidos se encuentran en la Tabla VI.

**Tabla VI.** Valores de densidad óptica y concentración de ADN obtenidos para los aislados patogénicos, cepas controles y re-aislados de los postulados de Koch utilizando distintos métodos de extracción

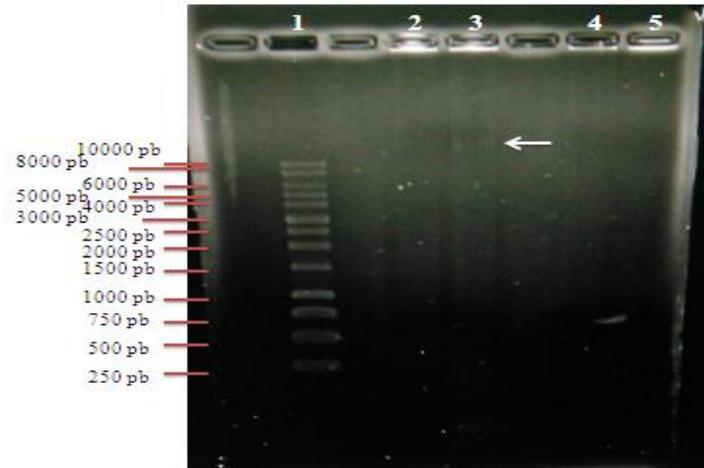
<b>Método</b>	<b>Muestra</b>	<b>D.O. (260 nm)</b>	<b>D.O. (280 nm)</b>	<b>Relación 260/280</b>	<b>[DNA] (ng/µl)</b>
<b>Método de Gomes y col. (2000)</b>	Año 1.1	0,312	0,201	1,552	3120
	Año 1.2	0,372	0,290	1,283	3720
	Año 2.1	0,123	0,082	1,500	1230
	Año 2.2	0,074	0,059	1,254	740
	<i>P. carotovorum</i> (LMV 31)	0,027	0,018	1,500	270
<b>Método de Chen y col. (2003), modificado por</b>	Año 1.1	0,101	0,059	1,712	1010
	Año 1.1 Koch 1	0,164	0,119	1,378	1640
	Año 1.1 Koch 2	0,109	0,067	1,627	1090
	Año 1.2	0,154	0,094	1,638	1540
	Año 2.1	0,057	0,043	1,326	570

<b>Chavarro (2004)</b>	Año 2.2	0,236	0,167	1,413	2360
	CVCM 625	0,134	0,080	1,675	1340
	<i>R. solanacearum</i>	0,112	0,060	1,867	1120
	<i>P. carotovorum</i> (LMV 30)	0,310	0,233	1,330	3100

La mayoría de los valores de absorbancia se muestran cercanos o dentro del rango del índice óptimo, comprobando así su pureza y la eficiencia del método de Chen y col. (2003), modificado por Chavarro (2004) como se mencionó anteriormente para la extracción de ADN de cepas identificadas presuntivamente como pertenecientes al género *Pseudomonas*.

### **5.5.3. Electroforesis en gel de agarosa 0,8%**

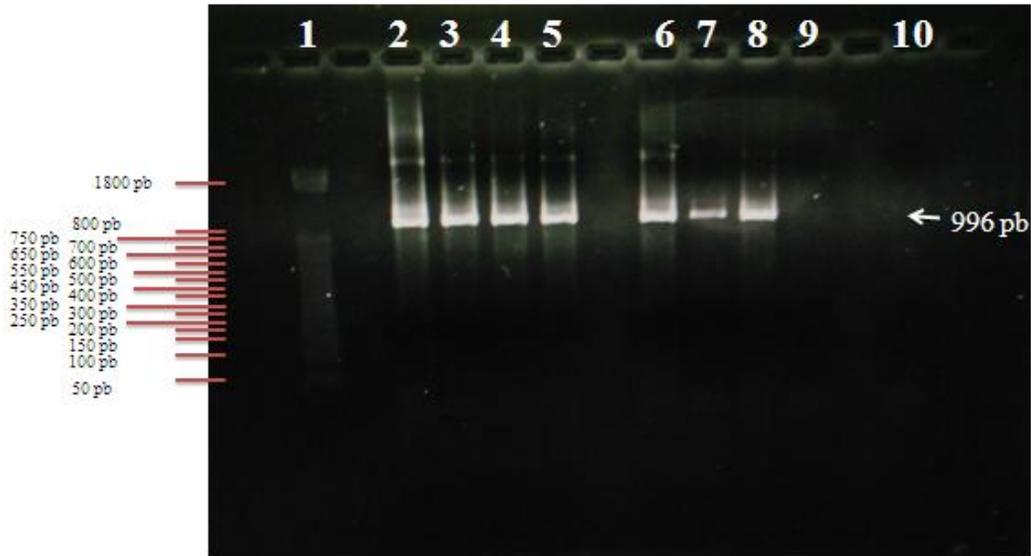
Mediante la electroforesis en gel de agarosa 0,8% de los extractos de ADN obtenidos, se pudo observar la presencia de una banda de alto peso molecular (Figura 7), que permite estimar la calidad y concentración de cada extracto de ADN con respecto a los otros aunque de forma cualitativa. En este sentido, todos los extractos presentaron una alta calidad y cantidad de ADN excepto el extracto de *P. carotovorum* (LMV 30). Por esta razón, se utilizó un extracto de ADN identificado como *P. carotovorum* previamente aislado y se procedió a extraer el ADN de los controles LMV 29 y LMV 31 identificados como *P. carotovorum* por Coppola (2015), obteniéndose ADN únicamente para la cepa LMV 31 (Figura 8).



**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa 0,8% de los extractos de ADN obtenidos por el método de Gomes y col. (2000). Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb (PROMEGA), Carriles 2: LMV 29 (extracto original), Carril 3: LMV 31 (extracto original), Carril 4: LMV 29 (50 ng/μl), Carril 5: LMV 31 (50 ng/μl)

#### 5.5.4. Amplificación con iniciadores universales del gen 16S del ADNr.

En la Figura 9, se puede observar como todos los aislados al igual que los controles amplificaron el fragmento específico de aproximadamente 996 pb al igual que los resultados obtenidos por Lu y col. (2000) en su investigación. Este resultado implica que todos los organismos en estudio son procariontes y que los extractos de ADN no presentan inhibidores para la reacción de PCR. En este caso, no se presenció la banda inespecífica de 150 pb que reportan dichos autores.

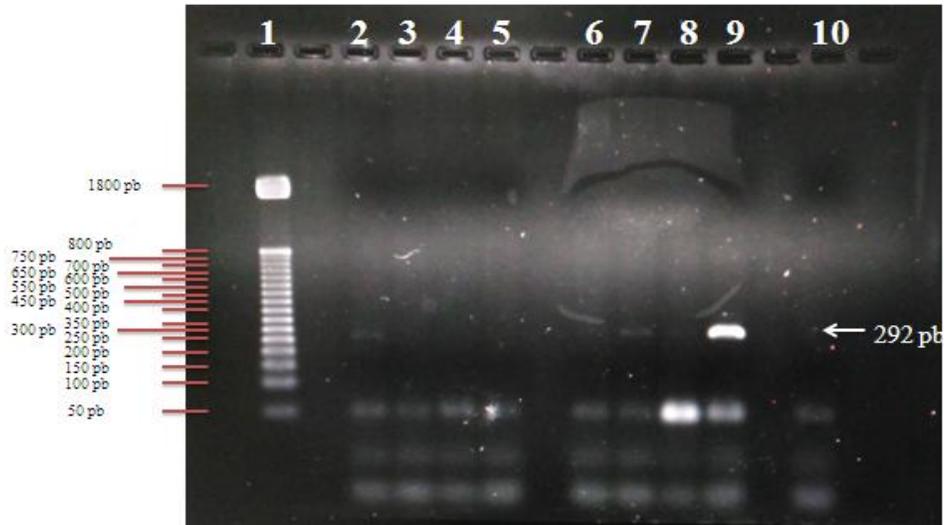


**Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR para la amplificación de la subunidad menor del gen 16S del ADNr de procariontas utilizando los iniciadores U1 y U2. Carril 1: Marcador de peso molecular (50 pb, PROMEGA); Carriles 2-5: aislados Año 1.1, Año 1.2, Año 2.1 y Año 2.2; Carril 6: CVCM 625; Carril 7: *P. carotovorum*; Carril 8: *R. solanacearum* INIA; Carril 9: *R. solanacearum*; Carril 10: control de reactivos.

#### 5.5.5. Amplificación con iniciadores específicos.

Con el propósito de corroborar que los aislados problema no pertenecen a los géneros *Pectobacterium* o *Ralstonia*, se realizó el análisis molecular usando PCR con iniciadores específicos.

Para el descarte de *R. solanacearum*, se realizó la PCR empleando los iniciadores OLI1 y Y2 propuestos por Seal y col. (1992) con los aislados y cepas controles, obteniéndose un fragmento amplificado de aproximadamente 292 pb en los carriles 2, 7 (muestras problema) y 9 (control positivo) como se observa en la Figura 10.

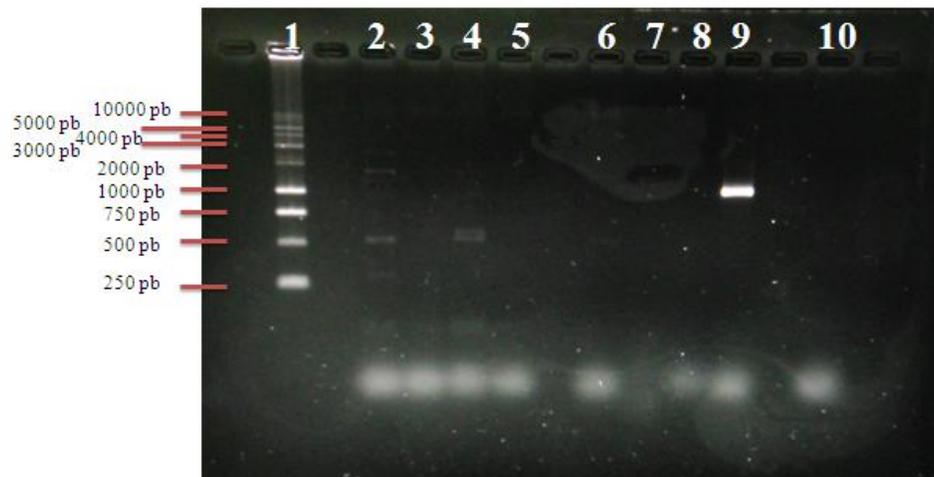


**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR para la detección de *R. solanacearum* utilizando los iniciadores específicos OLI1 y Y2. Carril 1: Marcador de peso molecular de (50 pb, PROMEGA); Carriles 2-5: aislados Año 1.1, Año 1.2, Año 2.1 y Año 2.2; Carril 6: CVCM 625; Carril 7: *P. carotovorum*; Carril 8: *R. solanacearum* INIA; Carril 9: *R. solanacearum*; Carril 10: control de reactivos.

De esta manera, se puede descartar que los aislados patogénicos pertenezcan a la especie *R. solanacearum*. Sin embargo, el aislado de Año 1.1 reaccionó levemente positivo ante el análisis, esto podría indicar que dicho aislado posee similitudes con el genoma de esta cepa bacteriana, recordando así que *R. solanacearum* antes formaba parte del género *Pseudomonas*.

Para la detección de *P. carotovorum*, se llevó a cabo una PCR empleando los iniciadores Y1pel y Y2pel esperando una banda específica de 434 pb para amplificar genes de la familia Y, ya que estos genes *pel* codifican para pectatoliasas que están involucradas en las enfermedades con síntomas de pudrición (Darrasse y col., 1994).

Las condiciones empleadas para la amplificación del gen *pel* fueron las descritas por Golkhandan y col. (2013), modificado por Coppola (2015). En un primer ensayo, se observó la amplificación de fragmentos en los carriles 2, 4 y 9 aunque en ninguno de estos casos se observó la banda esperada de 434 pb (Figura 11). Por lo que, se confirma que estos aislados y cepas bacterianas no pertenecen a la especie *Pectobacterium carotovorum*. Sin embargo, los controles positivos tampoco presentaron la banda de tamaño adecuado. Por esta razón, se procedió a repetir el aislamiento del ADN de dos cepas de *Pectobacterium carotovorum* identificadas por Coppola (2015) y repetir esta PCR (Figura 12).



**Figura 11.** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos PCR utilizando los iniciadores específicos Y1pel y Y2pel. Carril 1: Marcador de peso molecular (1 Kb PROMEGA); Carriles 2-5: aislados Año 1.1, Año 1.2, Año 2.1 y Año 2.2; Carril 6: CVCM 625; Carril 7: *P. carotovorum* (LMV 30); Carril 8: *P. carotovorum*; Carril 9: *R. solanacearum* INIA; Carril 10: control de reactivos.



**Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos PCR utilizando los iniciadores específicos Y1pel y Y2pel. Carril 1: Marcador de peso molecular (1 Kb PROMEGA); Carriles 2-5: aislados Año 1.1, Año 1.2, Año 2.1 y Año 2.2; Carril 6: Año 1.1 Koch 1; Carril 7: CVCM 625; Carril 8: LMV 31 (*P. carotovorum*); Carril 9: control de reactivos.

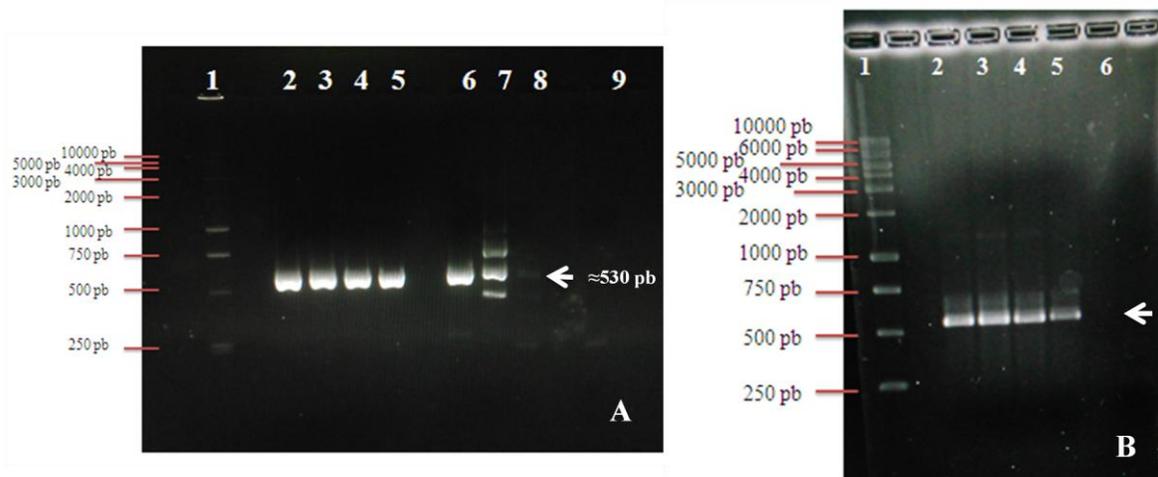
Una posible explicación para la amplificación de los fragmentos inespecíficos observados en las figuras 11 y 12, es que los aislados Año 1.1, Año 2.1 y Año 2.2, así como el control *R. solanacearum* INIA pueden codificar para cierta familia de pectatoliasas que se encargan de degradar el tejido de vegetales como la papa. De acuerdo a resultados obtenidos por Janse (1992) y Zuker y Hankin (1970) existen especies de *Pseudomonas* que tienen actividad pectolítica debido a la acción de pectatoliasas; por lo tanto, es posible que reaccionen de forma inespecífica para la PCR.

#### **5.5.6. Amplificación de la región espaciadora transcrita intergénica (ITS)**

La región espaciadora intergénica transcrita 16S-23S (ITS) que separan los genes de la subunidad menor y mayor del ARNr presenta una gran variedad polimórfica y altamente

conservada, que puede ser estudiada mediante la técnica de PCR, permitiendo diferenciar entre especies de un mismo género (Jensen y col., 1993; Toth y col., 2001).

De esta manera, se obtuvo para todos los aislados en estudio y a su vez igual para el control CVCM 625 el mismo patrón de bandas (Figura 13) mostrando una única banda del mismo tamaño, similar al resultado que consiguió Guasp y col. (2000) con cepas de *P. stutzeri*, *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes* y *P. tolaasii*. Sin embargo, por lo antes expuesto, esta región específica en el genoma no puede considerarse un resultado definitivo para identificación de los aislados pero se corrobora su identidad como pertenecientes al género *Pseudomonas*.



**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos de PCR para la amplificación de la región espaciadora ITS utilizando los iniciadores G1 y L1 de los extractos de ADN de los aislados patogénicos y cepas controles (A) Carril 1: Marcador de peso molecular (1 Kb PROMEGA); Carriles 2-5: aislados de Año 1.1, Año 1.2, Año 2.1 y Año 2.2; Carril 6: CVCM 625; Carril 7: *P. carotovorum*; Carril 8: *R. solanacearum* INIA, Carril 9: control de reactivos; y de los extractos de ADN de los postulados de Koch (B)

Carril 1: Marcador de peso molecular (1 Kb PROMEGA); 2: Año 1.1; 3 y 4: Año 1.1 Koch 1 y Año 1.1 Koch 2; 5: CVCM 625; 6: control de reactivos.

Por todas las razones y resultados antes expuestos, podemos mencionar que los aislados Año 1.2 y Año 2.1 son similares entre sí en sus características morfológicas y fisiológicas, esto implica que ambos aislados pueden pertenecer a una misma cepa bacteriana. De igual forma sucede con el aislado Año 2.2; éste tiene características similares a los aislados antes mencionados aunque la única diferencia entre ellos es la producción de un pigmento verde en medio LB sólido en el caso de los aislados Año 1.2 y Año 2.1. Según Shivaji y col. (1989), Schaad y col. (2001) y MacFaddin (2003), estos tres aislados podrían identificarse presuntivamente como *Pseudomonas aeruginosa* ya que concuerdan con todas las características fisiológicas de esta especie descrita en la marcha analítica para su identificación de dichos autores, aunque el aislado Año 2.2 no presente el pigmento verdoso. Además, el control positivo utilizado (CVCM 625) identificado como *Pseudomonas aeruginosa*, responde igual que dichos aislados.

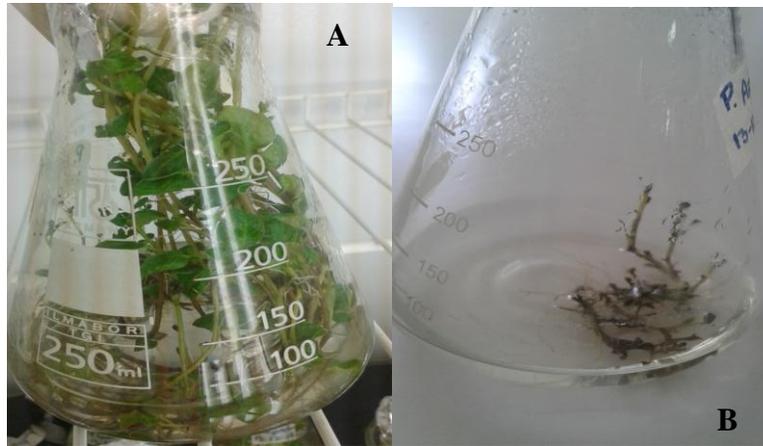
Por su parte, el aislado Año 1.1 presenta características similares a los otros aislados aunque a nivel molecular amplificó para la PCR de *Ralstonia solanacearum*. Por consiguiente, podría pensarse que el aislado pertenece a este género. Sin embargo, el aislado Año 1.1 tiene ciertas características a nivel metabólico que no concuerdan con *R. solanacearum*; entre ellas, se encuentran la producción de pigmento verde que esta especie no produce y la utilización del citrato como única fuente carbono por parte de *R. solanacearum* (Torres-González y col. 2013). El aislado Año 1.1 no utilizó el citrato y resultó positivo para la hidrólisis de la gelatina. Por consiguiente, se puede decir que el aislado Año 1.1 entra dentro del género *Pseudomonas*, muy similares a las características

de *Pseudomonas aeruginosa* con una variante en la utilización del citrato aunque también podríamos estar en presencia de una especie diferente a esta o una especie nueva.

Además, podemos mencionar que las *Pseudomonas* pueden producir olores característicos asociados a olores frutales usualmente comparados con el de las uvas derivado de la producción de unos metabolitos como el 2-aminocetofenona (Cox y Parker, 1979; El-Fouly y col., 2015). Asimismo, Silvestre y Belltoch (1999) mencionan la producción de un compuesto trimetilamino como el metabolito orgánico responsable de este olor característico, usualmente utilizado para la identificación de infecciones ocasionadas por *Pseudomonas aeruginosa*.

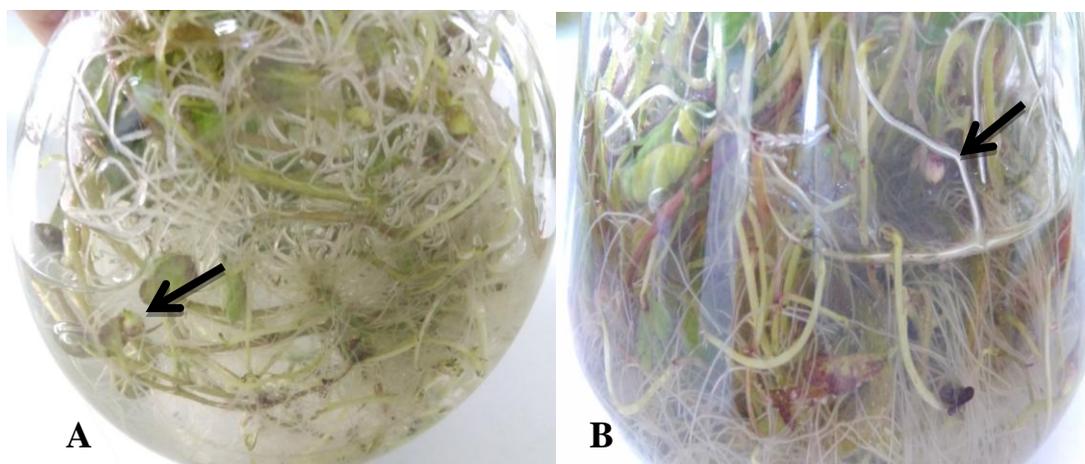
## **5.6. Micropropagación y microtuberización**

Se partió de 30 microesquejes nodales cultivados distribuidos en 6 matraces siguiendo el protocolo establecido por Moreno y Oropeza (2017) obteniéndose el desarrollo y elongación de 28 vitroplantas después de 2 meses de incubación, una por cada esqueje; no se reportó contaminación en esta etapa del establecimiento *in vitro*. Cabe destacar que las plantas de la variedad ‘papa de año’ tardaron en reaccionar un poco más del tiempo esperado (Figura 14) reportado por dichos autores que trabajaron con las variedades ‘arbolona negra’ y ‘granola’, estudiando el efecto de distintas hormonas sobre el alargamiento del vástago y producción de microtubérculos. En cuanto al alargamiento del vástago, ellos encontraron que la variedad ‘granola’ mostró la mayor longitud cuando fueron cultivadas en MS líquido suplementado con 5 mg/L de benciladenina (BA) y sin ácido giberélico (GA) bajo condiciones de fotoperiodo, luego de tres meses de incubación obteniéndose plantas robustas.



**Figura 14.** Micropropagación de papa (*Solanum tuberosum* var. ‘papa de año’), A. Plantas *in vitro* después de 2 meses de incubación en medio MS líquido; B. Planta con poco desarrollo después de 2 meses de incubación.

En la Figura 15, se observó efectivamente la formación de microtubérculos a partir de 20 vitroplantas, para un total de 185 microtubérculos de la variedad ‘papa de año’ de tamaños variables oscilando en un rango de 0,3 cm a 4 cm de longitud y de 0,2 cm a 2 cm de diámetro siguiendo las condiciones propuestas por Moreno y Oropeza (2017). Dichos autores obtuvieron un promedio de microtubérculos por planta producidos en ‘arbolona negra’ de 1,9 y en ‘granola’ de 3,8 a los 2 meses y medio de crecimiento aunque en su investigación reportan que el mayor diámetro obtenido en microtubérculos para ambas variedades resultó observarse en un tratamiento con 1 mg/L de BA bajo condiciones de luz blanca continua. En general, en esta etapa de tuberización en nuestra investigación, se obtuvo un 71,4% de plantas tuberizadas con un promedio de 9,25 microtubérculos por planta (Tabla VII).



**Figura 15.** Microtubérculos de papa de la variedad Papa de año (A) como microtubérculos aéreos (B).

**Tabla VII.** Respuesta de la variedad ‘papa de año’ al cultivo *in vitro*.

Tratamiento	Nº de matracas	Nº total de explantes	Nº de explantes desarrollados	Porcentaje de desarrollo de vitroplantas alargadas (%)	Porcentaje de tuberización (%)	Microtubérculos promedio por planta
Medio MS líquido de Micropropagación	6	30	28	93,3	-	-
Medio MS líquido de Microtuberización (50 g/l de sacarosa y 5 mg/l de BA)	4	20	-	-	71,4	9,25

De esta forma, el cultivo de vitroplantas en medio líquido resultó eficiente, ya que pueden ser utilizadas para distintos estudios, como la comprobación de los postulados de Koch. Por su parte, según reportan Alva y Oropeza (2013) las vitroplantas incubadas en medio semi-

sólido son más altas pero frágiles que plantas en medio líquido, las cuales son más robustas pero de menor altura y área foliar, similar al comportamiento observado en ‘papa de año’.

Así, los microtubérculos obtenidos se usaron para comprobar los postulados de Koch y evaluar la capacidad de los aislados de causar síntomas en rodajas de microtubérculos libres de patógenos.

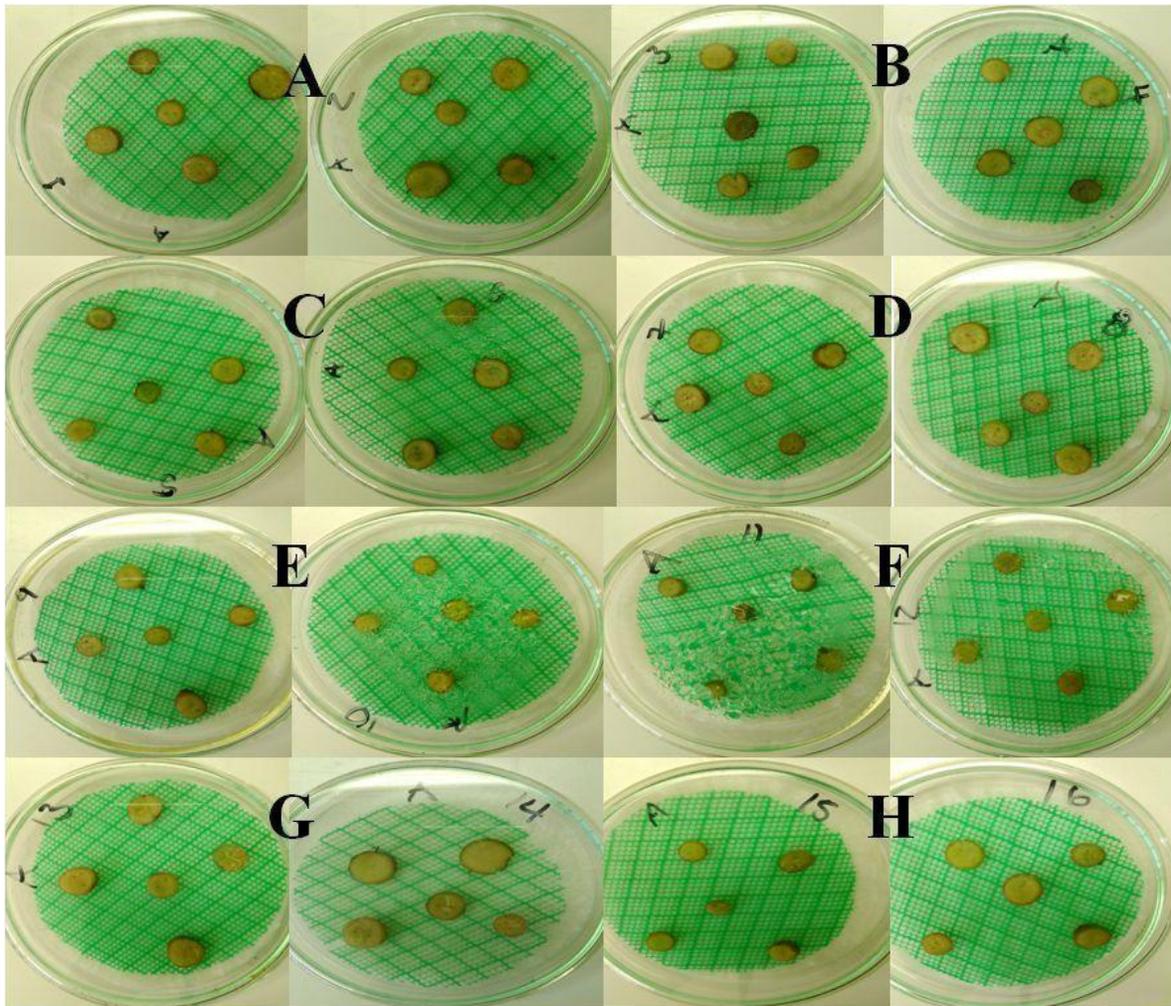
### **5.7. Postulados de Koch**

Para completar cualquier diagnóstico de identificación de un patógeno se debe considerar el cumplimiento de los postulados de Koch (Agrios, 1995), considerando los apartados de dichos postulados en donde se tiene que re-aislar el agente causal de una planta infectada y, además, verificar la identidad de este re-aislado; así como corroborar que la patogenicidad causada por este sea igual al aislado original causante de la enfermedad.

En este caso, se logró re-aislar el microorganismo patógeno correspondiente al aislado Año 1.1 de distintas rodajas de microtubérculos siguiendo el protocolo propuesto por Schaad y col. (2001), ya que este provocó síntomas de pudrición con ennegrecimiento del tejido en microtubérculos de papa cultivados *in vitro* y se escogió para comprobar los postulados (Figura 16). Dichos re-aislados de Año 1.1 se identificaron con las pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares más discriminatorias, comprobando que los re-aislados eran idénticos al aislado original y los resultados se mostraron simultáneamente con los del aislado original (Figura 17).

Teniendo en cuenta lo expuesto en los postulados, se puede decir que los re-aislados cumplieron y produjeron los mismos síntomas en microtubérculos de papa de la variedad ‘papa de año’. Esto indica que el aislado Año 1.1 puede ser una de las especies del género

*Pseudomonas* que son patógenas de plantas o podemos estar hablando de una especie nueva, aunque para corroborar esto último se necesitan análisis más específicos para el diagnóstico de dicho aislado.

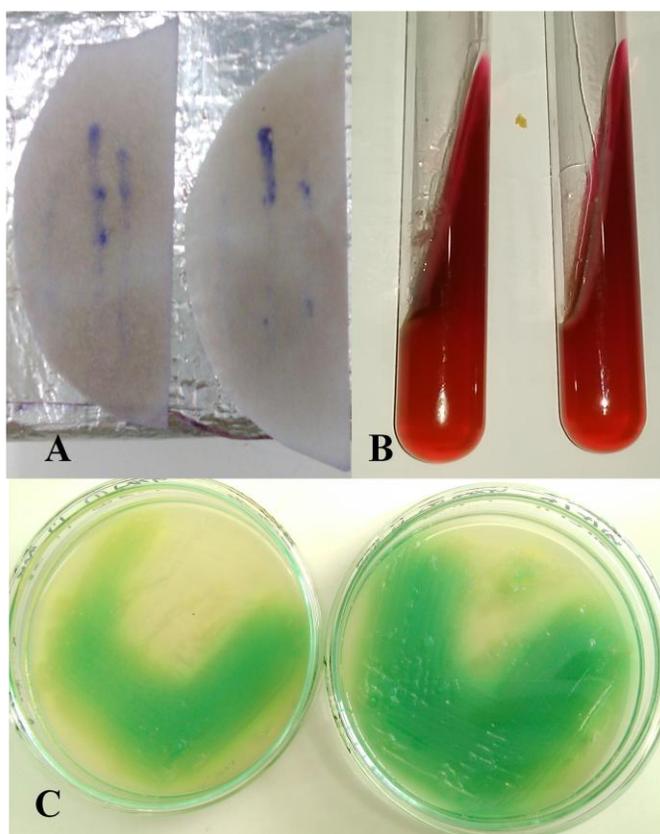


**Figura 16.** Postulados de Koch en microtubérculos de papa variedad Papa de año. A. Control negativo inoculado con caldo LB, B. Año 1.1, C. Año 1.2, D. Año 2.1, E. Año 2.2, F. CVCM 625, G. *R. solanacearum* INIA, H. *P. carotovorum* (LMV 30).

Además, se determinó la incidencia, severidad e índice de la enfermedad de dicho aislado, a las 120 hpi, quedando constancia de cómo afecta este microorganismo patógeno al cultivo de papa, en específico a la variedad ‘papa de año’ (Tabla VIII).

**Tabla VIII.** Valores de incidencia, severidad e índice de la enfermedad en microtubérculos para el aislado Año 1.1 en la variedad ‘papa de año’

<b>Aislado/cepa</b>	<b>Incidencia</b>	<b>Severidad</b>	<b>Índice de la enfermedad</b>
Año 1.1	20%	5	20%



**Figura 17.** Pruebas bioquímicas y morfológicas para re-identificación de los re-aislados de Año 1.1 de los postulados de Koch. A. Prueba de Oxidasa; B. Crecimiento en medio agar hierro de Kligler 24 hpi; C. Crecimiento en agar Cetrimide 48 hpi.

Este trabajo recalca la importancia del estudio en la identificación de bacterias patógenas de plantas para la detección de enfermedades que afectan al cultivo de papa en Venezuela. En este caso, podría tratarse de una nueva especie del género *Pseudomonas*, patógena de papa, sobre la cual no se encontraron antecedentes reportados. Además, se destaca la importancia que tiene la combinación de técnicas como pruebas de diagnóstico y cultivo *in vitro* para lograr el cumplimiento exacto de los postulados de Koch con el re-aislamiento y re-identificación del patógeno causal.

## 6. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron cuatro aislados purificados cuya patogenicidad fue comprobada en tubérculos comerciales.
- Las pruebas morfológicas permitieron caracterizarlos como bacilos Gram -, que formaban colonias irregulares, de mediano a gran tamaño con producción de pigmentos verdes para tres aislados de los cuatro.
- Las pruebas bioquímicas principales que permitieron la identificación de los aislados Año 1.1, Año 1.2, Año 2.1 y Año 2.2 como organismos pertenecientes al género *Pseudomonas* fueron: Fermentación de carbohidratos en agar Kligler, reacción a la prueba de oxidasa y crecimiento en agar Cetrimide.
- El método de Chen y col. (2003), modificado por Chavarro (2004) fue un método eficiente para la extracción de ADN de buena calidad y en cantidades significativas para estos aislados. Mediante la amplificación de fragmentos específicos por PCR para *Ralstonia solanacearum* y *Pectobacterium carotovorum*, se corroboró que los aislados no pertenecen a ninguno de estos géneros.
- La respuesta de los aislados fue similar al control positivo identificado como *Pseudomonas aeruginosa* de acuerdo a su metabolismo e identificación molecular.
- Se estableció la micropropagación y microtuberización de la variedad nativa ‘papa de año’ obteniéndose 9,25 microtubérculos/planta.
- Los síntomas producidos por el aislado Año 1.1 de pudrición y ennegrecimiento en microtubérculos de papa, permitieron comprobar los postulados de Koch.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Agrios G. N. 1995. Fitopatología. Segunda Edición. Limusa, México. p. 821.
2. Agrios G. N. 2005. Plant Pathology. Quinta Edición. Academic Press, Estados Unidos. p. 952.
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, 15(2): 55-62.
4. 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. Agronomía Tropical, 61:27-36.
5. Baghaee-Ravari S., Rahimian H., Shams-Bakhsh M., Lopez-Solanilla E., Antúnez-Lamas M., Rodríguez-Palenzuela P. 2011. Characterization of *Pectobacterium* species from Iran using biochemical and molecular methods. European Journal of Plant Pathology, 129: 413-425.
6. Barrios R. 2015. Identificación de bacterias patógenas aisladas de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) con síntomas de pudrición blanda, colectadas en Sanare, Estado Lara. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. p. 114.
7. Bou G., Fernández-Olmos A., García C., Sáez-Nieto J. A., Valdezate S. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 29(8): 601-608.

8. Boucher C.A., Barberis P.A., Trigalet A., Demery D.A. 1985. Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum*: isolation of Tn5-Induced avirulent mutants. *Journal of General Microbiology*, 131-2449-2457.
9. Cazorla F. M., Pérez-García A., Ramos C., de Vicente A. 2008. Capítulo 8: Estrategias moleculares en el diagnóstico y análisis de la diversidad bacteriana en plantas. En: Pallás V., Escobar C., Rodríguez P., Marcos J. F. 2008. *Herramientas biotecnológicas en fitopatología*. Mundi-Prensa, Primera Edición, Madrid, España. p. 147-166.
10. Chaudhary B., Mittal P. 2014. The effects of different concentrations and combinations of growth regulators on the micropropagation of potato (*Solanum tuberosum*). *International Journal of Scientific Research*, 1: 65-70.
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 La Salud*, 18: 67-68.
12. Clarridge J. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 4: 840-862.
13. Collmer A, Keen N.T. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, 24: 383-409.
14. 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.

15. Cox C.D., Parker J. 1979. Use of 2-aminocetophenone production in identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 9(4): 479-484.
16. 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.
17. Denny T. P., Hayward A. C. 2001. Gram-negative bacteria. In Schaad, N. W., Jones, J. B., Chun, W. (eds). 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. St. Paul, MN, US, The American Phytopathological Society. p. 151-173.
18. Díaz-Alonso C., Garrote-Santana H., Amor-Vigil A.M., Suárez-González Y., González-Mugica R. 2013. Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT-PCR. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 29(3): 1-6.
19. El-Fouly M.Z., Sharaf A.M., Shahin A.A.M., El-Bialy H.A., Omara A.M.A. 2015. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(1): 36-48.
20. Fernandes M. 2016. Identificación de aislados bacterianos patogénicos obtenidos de hojas de papa (*Solanum tuberosum* L.) colectadas en el valle del Río Mucujún, Estado Mérida. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. p. 120.
21. 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. p. 305.

22. Forbes B.A., Sahm D.F., Weissfeld A.S. 2009. Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana, Doceava Edición, Buenos Aires, Argentina. p. 1160.

23. Franzetti L., Scarpellini M. 2007. Characterization of *Pseudomonas* spp. isolate from foods. *Annals of Microbiology*, 57(1): 39-47.

24. Furuya N., Ura H., Liyama K., Matsumoto M., Takeshita M., Takanami Y. 2002. Specific oligonucleotide primers based on sequences of the 16S-23S ADNr spacer region for the detection of *Burkholderia gladioli* by PCR. *Journal of General Plant Pathology*, 68: 220-224.

25. Golkhandan E., Kamaruzaman S., Sariah M., Zainal M., Nasehi A. 2013. Characterization of Malaysian *Pectobacterium* spp. from vegetables using biochemical, molecular and phylogenetic methods. *European Journal of Plant Pathology*, 137: 431-443.

26. Gomes L., Roncato K., Andriano F., Almeida F. 2000. A simple method for DNA isolation from *Xanthomonas* spp. *Scientia Agricola*, 57: 553-555.

27. Grünwald N., Flier W. 2005. The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 171-90.

28. Guasp C., Moore E., Lalucat J., Bennasar A. 2000. Utility of internally transcribed 16S-23S rDNA spacer regions for the definition of *Pseudomonas stutzeri* genomovars and other *Pseudomonas* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 1629-1639.

29. Guilbaud C., Morris C.E., Barakat M., Orlet P., Berge O. 2015. Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* facilitated by a PCR targeting the whole *P. syringae* group. FEMS Microbiology Ecology, 1-20.
30. Hawkes J.G. 1990. The potato: evolution, biodiversity and genetic resources. Belhaven Press, First Edition, London, England. p. 259.
31. Hayward A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. Journal Applied Bacteriology, 27: 265-277.
32. Huamán Z. 1986. Botánica sistemática y morfología de la papa. Boletín de Información Técnica 6. Centro Internacional de la Papa (CIP). p. 26.
33. Janse J.D., Derks J., Spit B.E., Van der Tuin W. 1992. Classification of fluorescent soft rot *Pseudomonas* bacteria, including *P. marginalis* strains, using whole cell fatty acid analysis. Systematic and Applied Microbiology, 15: 538-553.
34. Jensen M. A., Webster J. A., Straus N. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. Applied and Environmental Microbiology, 59(4): 945-952.
35. Kelman A. 1954. The relationship of pathogenicity in the *Pseudomonas solanacearum* to colonies appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology, 44: 57-61.
36. Lane D.J., Pace B., Olsen G.J., Stahl D.A., Sogin M.L., Pace M.R. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for filogenetic analyses. Proceedings of the National Academy of Sciences, 82: 6955-6959.

37. Levitus G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E., Mroginski L. 2010. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina. p. 648.
38. Lopera-Barrero N.M., Peovh J.A, Ribeiro R.P., Gomes P.C., Jacometo C.B., da Silva T. 2008. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35(1): 77-86.
39. López S. A., Damann K., Grelen L. 2001. *Xanthomonas albilineans* diversity and identification base don Rep-PCR fingerprint. *Current Microbiology*, 42: 155-159.
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. Luna-Rodríguez M., Toledo-González A., Iglesias-Andreu L. G. 2009. Identificación de Enterobacterias causantes de pudriciones blandas en *Cucurbita pepo* L. en Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(1): 64-68.
42. MacFaddin J.F. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana, Tercera Edición, España. p. 850.
43. Madigan M. Martinko J.M., Parker J. 2010. Brock: Biología de los microorganismos. Pearson Prentice Hall, Décima Edición, Madrid, España. p. 1087.

44. Manchester K.L. 1996. Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations. *BioTechniques*, 19: 208-210.
45. 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.
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. Morales F.J. 2007. Sociedades precolombinas asociadas a la domesticación y cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en Sudamérica. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 14(1): 1-9.
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. Moreno M., Oropeza M. 2017. Efecto de las hormonas vegetales y el fotoperiodo en la producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(2): 29-38.
50. Murashige T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, 25: 135-166.
51. Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15: 473-497.

52. Nazerian E., Sijam K., Meor Z., Keshavarz K. 2011. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* causing a new soft rot disease on okra in Malaysia. *Journal of General Plant Pathology*, 77: 292-294.
53. Ochoa C.M. 1990. The potatoes of South America: Bolivia. Cambridge University Press, First Edition, Cambridge, United Kingdom. p. 512.
54. Ochoa C.M. 1999. Las papas de Sudamérica: Perú (parte I). Centro Internacional de la Papa (CIP), apartado 1558, Primera Edición, Lima, Perú. p. 1036.
55. Osorio-Cadavid E., Ramírez M., López W.A., Manbuscay L.A. 2009. Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1): 125-131.
56. Parés R., Juárez A. 1997. Bioquímica de los microorganismos. Reverte, Primera Edición, Barcelona, España. p. 404.
57. Pérombelon M. C. M. 2002. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology*, 51: 1-12.
58. Pérombelon M.C.M., Kelman A. 1980. Ecology of the soft rot erwinias. *Annual Review of Phytopathology*, 18: 361-387.
59. Porotikova E.V., Dmitrenko U.D., Atapina E.E., Volkov Y.A., Risovannaya V.I., Stranishevskaya E.P., Gorislavets S.M., Kamionscaya A.M., Vinogradova S.V. 2017. First report of the bacterial leaf spot caused by *Pseudomonas syringae* on grapevine (*Vitis vinifera*) in Russia. *The American Phytopathological Society*, 101(2): 380.

60. Potrykus M., Golanowska M., Sledz W., Zoledowska S., Motyka A., Kolodziejska A., Butrymowicz J., Lojkowska E. 2016. Biodiversity of *Dickeya* spp. isolated from potato plants and water sources in temperate climate. *Plant Disease*, 100: 408-417.
61. Puerta C., Ureña C. 2005. *Prácticas de biología molecular*. Editorial Pontificia Universidad Javeriana, Primera Edición, Bogotá, Colombia. p. 100.
62. Pumarola A., Rodríguez-Torres A., García-Rodríguez J.A., Piedrola-Angulo G. 1987. *Microbiología y parasitología médica*. Elsevier España, Segunda Edición, España. p. 916.
63. Reinert J. 1958. Morphogenese und ihre kontrolle an Gewebekulturen aus Karroten. *Naturwissenschaften*, 43: 344-345.
64. Rodríguez L. E. 2010. Origen y evolución de la papa cultivada. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 28(1): 9-17.
65. Ross H. 1986. *Potato breeding problems and perspectives*. Berlin, Germany: Paul Parey Scientific Publishers, *Advances in Plant Breeding series* no. 13.
66. 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.
67. Rupp J., Jacobsen B. 2017. Bacterial and fungal diseases of potato and their management. Montana State University Extension. EB 0225. p. 1-12.
68. Salem J., Hassanein A.M. 2017. In vitro propagation, microtuberization, and molecular characterization of three potato cultivars. *Biologia Plantarum*, 61(3): 427-437.

69. Sambrook J., Rusell D. 1989. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Third edition. p. 570.
70. Sambrook J., Rusell D. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Third edition. p. 2100.
71. Sánchez A., Mejía L., Allen C. 2006. Estudio filogenético y de distribución de la bacteria *Ralstonia solanacearum* en Guatemala. Tikalia, 24(1): 17-33.
72. Schaad N. W., Jones J. B., Chun W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. The American Phytopathological Society. PRESS. Third Edition. Minnesota. pp. 372.
73. Seal L., Jackson J., Young W. 1992. Use of tARN consensus primer to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by Polimerase Chain Reaction amplification. Applied and Environmental Microbiology, 58: 3759-3761.
74. Seo Y., Lim J., Choi B., Kim H., Goo E., Lee B., Lim J., Choi I., Moon J.S., Kim J., Hwang I. 2011. Complete genome sequence of *Burkholderia gladioli* BSR3. Journal of Bacteriology, 193 (12): 3149.
75. Shivaji S., Rao S., Saisree L., Sheth V., Reddy G.S.N., Bhargava P. 1989. Isolation and identification of *Pseudomonas* spp. from Schirmacher Oasis, Antarctica. Applied and Environmental Microbiology, 55(3): 767-770.
76. Silvestre J.F., Betlloch M.I. 1999. Cutaneous manifestations due to *Pseudomonas* infection. International Journal of Dermatology, 38: 419-431.

77. Solano M. 2000. Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias causantes de pudrición blanda en malanga (*Colocasia esculenta* Schott). Tesis Experimental. Universidad Veracruzana, México.
78. Spilker T., Coenye T., Vandamme P., LiPuma J.J. 2004. PCR-based assays for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5): 2074-9.
79. Spooner D.M., Hettterscheid W.L.A. 2005. Origins, evolution, and group classification of cultivated potatoes. p. 285-307. En: Motley T.J., Zerega N., Cross H. (eds.). Darwin's harvest: new approaches to the origins, evolution and conservation of crops. Columbia University Press, New York, NY.
80. Steward F. C., Mapbs M. O., Mears K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from suspended cells. *American Journal of Botany*, 45: 705-708.
81. Stoyanova M., Pavlina I., Moncheva P., Bogatzevska N. 2007. Biodiversity and incidence of *Burkholderia* species. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 21(3): 306-310.
82. Sukhotu T., Hosaka K. 2006. Origin and evolution of Andigena potatoes revealed by chloroplast and nuclear DNA markers. *Genome*, 49: 636-647.
83. Sutter V. 1968. Identification of *Pseudomonas* species isolated from hospital environment and human sources. *Applied Microbiology*, 16(10): 1532-1538.

84. Torres-González C., Casas M., Díaz J.E. Manejo de *Ralstonia solanacearum* raza 2 a través de productos químicos y biológicos. Revista de la división de Ingenierías y Arquitectura, 10(2)
85. Tortora G., Funke B., Case C. 2007. Introducción a la microbiología. Editorial Médica Panamericana, Novena Edición, España. p. 959.
86. 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.
87. van Belkum A. 2006. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. Springer Verlag Science and Business, Segunda Edición, Estados Unidos. p. 1256.
88. Vandamme P., Govan J., LiPuma J. 2007. Diversity and role of *Burkholderia* spp. En: Coenye T. y Vandamme P. (eds.) *Burkholderia*: Molecular microbiology and genomics. Horizon Bioscience, primera edición, Norfolk, U.K. p. 1-18.
89. Vanegas M. 2015. Guías para el laboratorio de bacteriología. Ediciones Uniandes-Universidad de Los Andes, Primera Edición, Colombia. p. 186.
90. Vidaver A.K, Lambrecht P.A. 2004. Las bacterias como patógenos vegetales. The Plant Health Instructor.
91. Villalobos V. M., Thorpe T. A. 1991. Capítulo 6: Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Roca W. M., Mroginski L. A. (eds.). 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT

(Centro Internacional de Agricultura Tropical), Primera Edición, Cali, Colombia. p. 127-142.

92. Volcy C. 2008. Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26(1): 107-115.

93. Wang P.J., Hu C.Y. 1982. *In vitro* mass tuberization and virus-free seed potato production in Taiwan. *American Journal of Potato Research*, 59: 33-39.

94. Wang Z.K., Comstock J.C., Hatziloukas E., Schaad N.W. 1999. Comparison of PCR, Bio-PCR, DIA, ELISA and isolation on semi-selective médium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. *Plant Pathology*, 48: 245-252.

#### **Consultas en línea:**

95. Bayer. Crop Science. Nuestro tesoro, nuestro futuro [En línea] 2017. Disponible en: <https://www.cropscience.bayer.co.ve/es-VE/Productos-e-innovacion/Principales-cultivos/Papa.aspx>. [Consulta: 30/07/2017].

96. CIP. Centro Internacional de la Papa. Cómo crecen las papas. [En línea] 2015. Disponible en: <https://cipotato.org/es/lapapa/como-crecen-las-papas/>. [Consulta: 19/07/2017].

97. Domínguez M. Morfología de las bacterias [En línea] 2011. Disponible en: <https://www.vix.com/es/btg/curiosidades/2011/07/28/morfologia-de-las-bacterias>. [Consulta: 26/10/2017].

98. FAO. Año Internacional de la Papa. [En línea] 2008. Disponible en: <http://www.fao.org/potato-2008/es/lapapa/index.html>. [Consulta: 20/07/2017].
99. FEDEAGRO. Fedegro advierte que la producción de hortalizas está en jaque. Por: Cristhopher Borrero [En línea] 2015. Disponible en: <http://www.fedeagro.org/detalle5.asp?id=2862>. [Consulta: 10/08/2017].
100. Laboratorios Britania. Productos [En línea] 2017. Disponible en: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/>. [Consulta: 26/10/2017].
101. Lloria M. Modulo 1: infecciones por Pseudomonas aeruginosa. Manejo de las infecciones por organismos multirresistentes. Sociedad Argentina de Terapia Intensiva [En línea] 2009. Disponible en: <https://www.sati.org.ar/files/infectologia/2009-Infecciones-por-p-aeruginosa-en-Uti-%20Revision.pdf>. [Consulta: 22/06/2017].
102. Olmos A.F., de la Fuente C.G., Saéz J.A., Valdzate S. Procedimientos en microbiología clínica: Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [En línea] 2010. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>. [Consulta: 19/06/2018].
103. Pérez M., Mota M. Morfología y estructura bacteriana [En línea] 2008. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>. [Consulta: 22/10/2017].
104. PotatoPro. El cultivo de papa en Venezuela: algunas estadísticas [En línea] 2016. Disponible en: <https://www.potatopro.com/news/2016/el-cultivo-de-papa-en-venezuela-algunas-estad%C3%ADsticas>. [Consulta: 31/07/2017].

105. Rodríguez D.M. Producción agrícola apenas cubrirá 30% del consumo del primer trimestre. El Nacional [En línea] 2017. Disponible en: [https://www.el-nacional.com/noticias/economia/produccion-agricola-apenas-cubrira-del-consumo-del-primer-trimestre\\_79439](https://www.el-nacional.com/noticias/economia/produccion-agricola-apenas-cubrira-del-consumo-del-primer-trimestre_79439). [Consulta: 14/05/2017].
106. Salas J. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Producción de semilla pre-básica de papa [En línea] 1995. Disponible en: [https://www.sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas\\_tec/FonaiapDivulga/fd48/texto/pordpapa.htm](https://www.sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd48/texto/pordpapa.htm). [Consulta: 11/06/2017].
107. Venuta M.E., Lopardo H.A. Aplicación de métodos moleculares en el diagnóstico microbiológico de las enfermedades infecciosas. Medicina infantil, 54(1): 301-311 [En línea] 2005. Disponible en: [https://www.medicinainfantil.org.ar/images/stories/volumen/2005/xii\\_4\\_301.pdf](https://www.medicinainfantil.org.ar/images/stories/volumen/2005/xii_4_301.pdf). [Consulta: 12/06/2017].

## ANEXOS

### Anexo 1. Caldo LB

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

### Anexo 2. Agar LB.

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

### Anexo 3. Medio para punción.

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

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

Al medio no se le añade hormonas vegetales y se le ajusta el pH a 5.6. Posteriormente, el medio se esteriliza en autoclave a 120°C, 15 libras de presión, durante 20 minutos.

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

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

Tiene la misma composición del medio Murashige y Skoog sólido, pero sin añadirle el agar.

#### **Anexo 6. Agar extracto-dextrosa-CaCO<sub>3</sub> (YDC).**

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

### **Anexo 7. Medio Hugh y Leifson (1953).**

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

Se preparan dos tubos con 5 mL por cada cepa, uno se cubre con parafina (anaeróbico) y otro sin parafina (aeróbico).

### **Anexo 8. Agar Mac Conkey.**

Compuesto	Concentración
Peptona	17 g/L
Pluripeptona	3 g/L
Lactosa	10 g/L
Mezcla de sales biliares	1,5 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L
Agar	13,5 g/L
Rojo neutro	0,03 g/L
Cristal violeta	0,001 g/L
pH	7,1±0,2

### **Anexo 9. Agar hierro de Kligler.**

Añadir 55 g del medio Kligler a 1 L de agua destilada estéril, disolver completamente y distribuir en tubos de ensayo (7 ml 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	13 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L
Lactosa	10 g/L
Tripteína	10 g/L
Glucosa	1 g/L
Citrato de hierro y amonio	0,5 g/L
Tiosulfato de sodio	0,3 g/L
Rojo de fenol	0,025 g/L
Agar	15 g/L
pH	7,3±0,2

#### Anexo 10. Agar Simmons citrato

Compuesto	Concentración
Sulfato de magnesio	0,2 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L
Fosfato de amonio	1 g/L
Fosfato dipotásico	2 g/L
Citrato de sodio	2 g/L
Azul de bromotimol	0,080 g/L
Agar	15 g/L
pH	6,8±0,1

#### Anexo 11. Agar Cetrimide

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

Compuesto	Concentración
Peptona de gelatina	16 g/L
Cloruro de magnesio	1,4 g/L
Hidrolizado de caseína	10 g/L
Sulfato de potasio	10 g/L
Bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB)	0,3 g/L

Agar	11 g/L
pH	7,2±0,2

### Anexo 12. Medio de Arginina deshidrolasa

Se agregan 4 ml del medio a cada tubo. A los tubos después de inocular la muestra se le añade una capa de parafina estéril.

Compuesto	Concentración
Peptona	1 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L
Fosfato dipotásico	0,3 g/L
Arginina-HCl	10 g/L
Rojo fenol	0,010 g/L
Agar	3 g/L
pH	7,2±0,2

### Anexo 13. Medio de Sulfuro indol para motilidad

Se agregan 6 ml a cada tubo dejando solidificar. Posteriormente las muestras se siembran por picadura o punción, se incuban y se revela la prueba utilizando el reactivo de Kovacs.

Compuesto	Concentración
Peptona	6,1 g/L
Digerido pancreático de caseína	20 g/L
Citrato ferroso de amonio	0,2 g/L
Tiosulfato de sodio	0,2 g/L
Agar	3,5 g/L

#### Anexo 14. Medio de reducción de nitratos

Se agregan 5 ml del medio a cada tubo y dejar solidificar en bisel. La prueba se revela con los compuestos  $\alpha$ -naftol al 0,5% y ácido sulfanílico al 0,8%, en tal caso de que no se desarrolle una coloración rojiza debe agregarse polvo de zinc (Zn).

Compuesto	Concentración
Peptona	5 g/L
Extracto de carne	3 g/L
Nitrato de potasio	1 g/L
Agar	12 g/L

#### Anexo 15. Medio de hidrólisis de gelatina para punción

Compuesto	Concentración
Peptona	5 g/L
Extracto de carne	3 g/L
Gelatina	120 g/L

#### Anexo 16. Diferenciación de especies de *Pseudomonas*

Características	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. alcaligenes</i>	<i>P. caryophilli</i>	<i>P. cichorii</i>	<i>P. delafieldii</i>
Motilidad	+	+	+	+	+
Arginina deshidrolasa	+	+	+	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+
Hidrólisis de la gelatina	+	V	-	-	-
Utilización de la glucosa	+	-	+	+	+
Nitrato utilizado como fuente de nitrógeno	+	+	+	+	+

### Diferenciación de especies de *Pseudomonas* (continuación)

Características	<i>P. diminuta</i>	<i>P. facilis</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. pseudoalcaligenes</i>	<i>P. putida</i>
Motilidad	+	+	+	+	+
Arginina deshidrolasa	NP	-	+	V	+
Oxidasa	+	+	+	+	+
Hidrólisis de la gelatina	-	+	+	V	-
Utilización de la glucosa	-	+	+	-	+
Nitrato utilizado como fuente de nitrógeno	-	+	+	+	+

\*NP = No presenta, V = variable

### Anexo 17. Matriz de datos de severidad en microtubérculos

Caldo LB	Año 1.1	Año 1.2	Año 2.1	Año 2.2	CVCM 625	<i>R. solanacearum</i>	<i>P. carotovorum</i> (LMV 30)
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	5	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	5	0	0	0	0	0	0