



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



**Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE”**

**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

**Patogenicidad y taxonomía de bacterias pectolíticas asociadas a pudriciones blandas en cultivos solanáceos andinos**

Montatixe Llangari, Pamela Michelle

Director: Gavilanes Quizhpi, Petronio M. Sc.

Sangolquí, 22 de agosto 2022

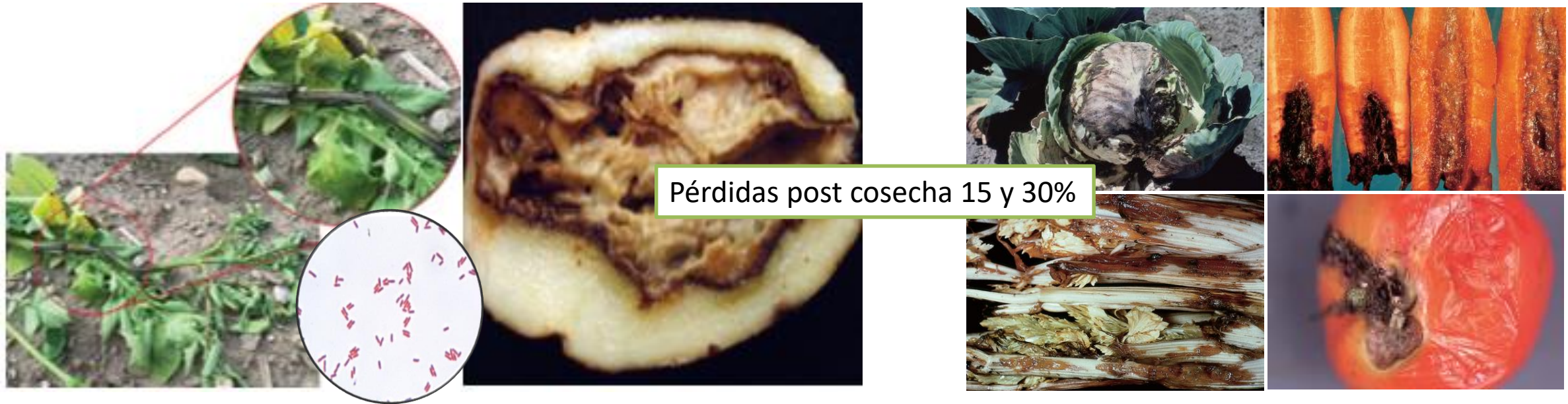


- 1 **Introducción**
- 2 **Objetivos**
- 3 **Hipótesis**
- 4 **Materiales y Métodos**
- 5 **Resultados y Discusión**
- 6 **Conclusiones**
- 7 **Recomendaciones**
- 8 **Agradecimientos**

1

# INTRODUCCIÓN

## Generalidades de la pudrición blanda



Pérdidas post cosecha 15 y 30%



Años 90: *Pectobacterium atrosepticum*

40 % pérdidas



Pitahaya



Tomate riñón

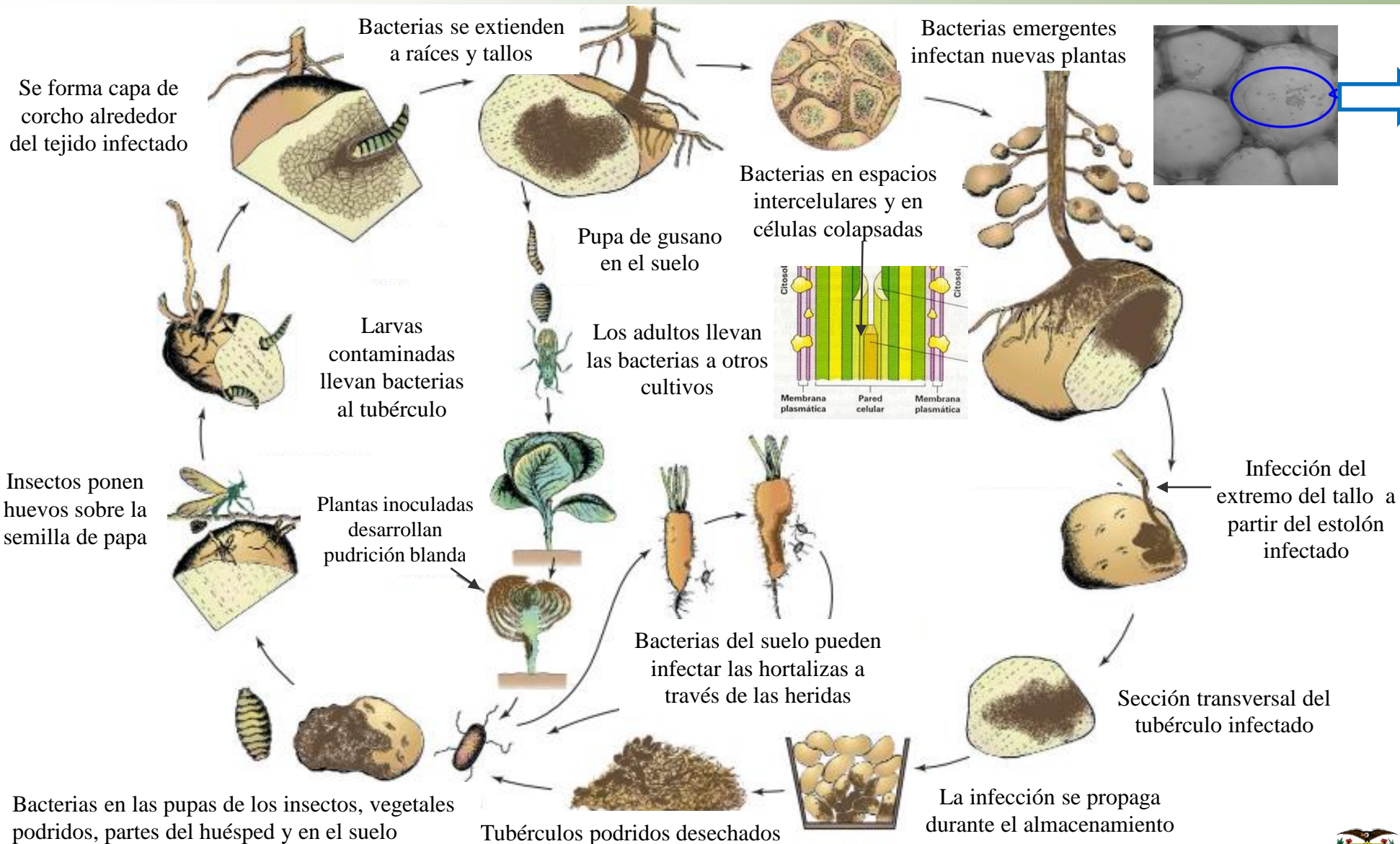


Maíz



**ESPE**  
 UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
 INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

## Ciclo de la pudrición blanda



Pruebas bioquímicas

### Pruebas moleculares

Sanger Sequencing



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

2

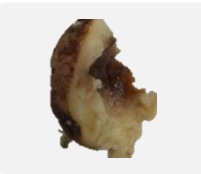
# OBJETIVOS

## Objetivo General



Determinar la patogenicidad y taxonomía de bacterias pectolíticas asociadas a pudriciones blandas en cultivos solanáceos andinos.

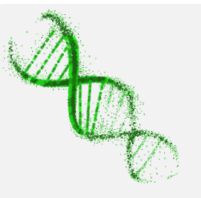
## Objetivos Específicos



Evaluar la patogenicidad de las bacterias pectolíticas aisladas, en papa (*Solanum tuberosum* L), tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav) y naranjilla (*Solanum quitoense* Lam).



Determinar de forma bioquímica el grupo de bacterias al que pertenecen los aislamientos obtenidos de papa (*Solanum tuberosum* L), tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav) y naranjilla (*Solanum quitoense* Lam).



Identificar molecularmente a los aislamientos de bacterias pectolíticas asociadas con pudriciones blandas de papa (*Solanum tuberosum* L), tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav) y naranjilla (*Solanum quitoense* Lam).

3

# HIPÓTESIS





Los aislamientos de las bacterias pectolíticas ocasionan pudrición blanda en cultivos solanáceos andinos y son identificados a nivel bioquímico y molecular.

# 4 MATERIALES Y MÉTODOS

## Material Vegetal

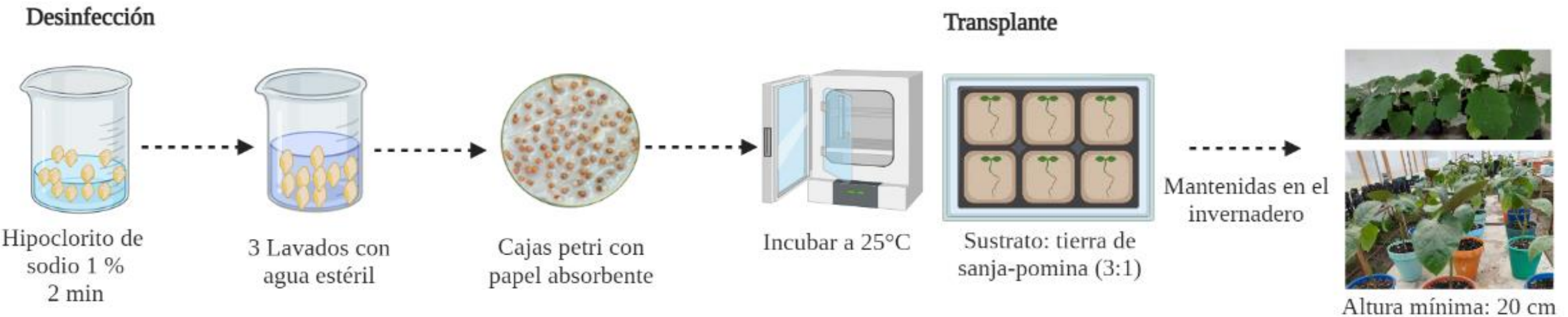
Tomate de árbol  
(amarillo puntón)Naranjilla  
(común)Papa  
(leona blanca)

## Material Biológico

Aislamiento	Origen	Ubicación geográfica	Denominación
P1		Carchi - Tulcán	Papa Pecto C*
P2	Papa		Papa Pedregal
P3		Pichincha - Mejía	Papa San Miguel
Ta1			Tomate de árbol (PM)
Ta2	Tomate de árbol	Pichincha - Mejía	Tomate de árbol (PP)
Ta3		Pichincha - Mejía - La Virgen	Tomate de árbol (N3)
N1		Pichincha - Mejía - La Virgen	Naranjilla 3 La Virgen*
N2	Naranjilla	Morona Santiago – Palora	Naranjilla Palora
N3		Pichincha - Mejía - La Virgen	Naranjilla 2 La Virgen*

(\*) Muestras conservadas en el Laboratorio de Fitopatología de la EESC-Iniap

## Siembra de semillas de tomate de árbol y naranjilla



## Siembra de tubérculos de papa



## Condiciones en el invernadero



Mañana: 18 a 21 °C  
Noche: 9 a 12 °C



Riego: moderado



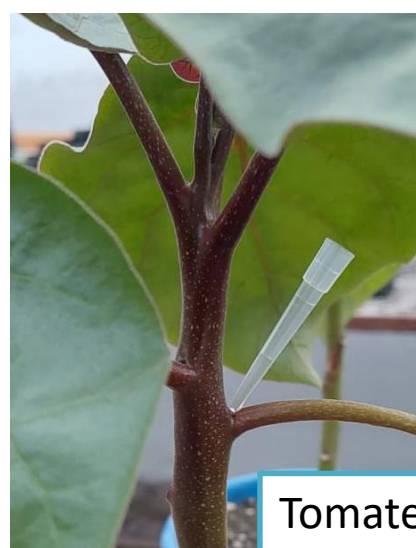
## Aislamiento bacteriano



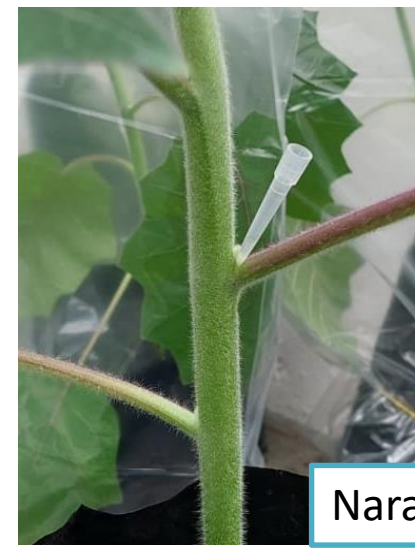
## Inoculación bacteriana



Papa



Tomate de árbol



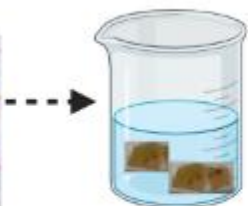
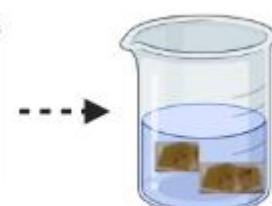
Naranjilla



## Re-aislamiento bacteriano



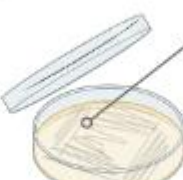
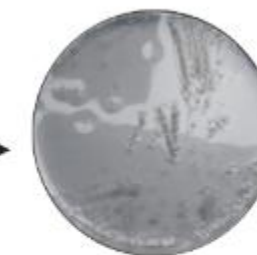
Tallo de tomate de árbol infectado

Hipoclorito de sodio 1 %  
30 s3 lavados con  
agua estéril

Pesar



Macerar

Sembrar por  
estriado en  
medio CVPIncubar a 25°C  
48 hColonias que  
forman cavidades

## Caracterización fenotípica

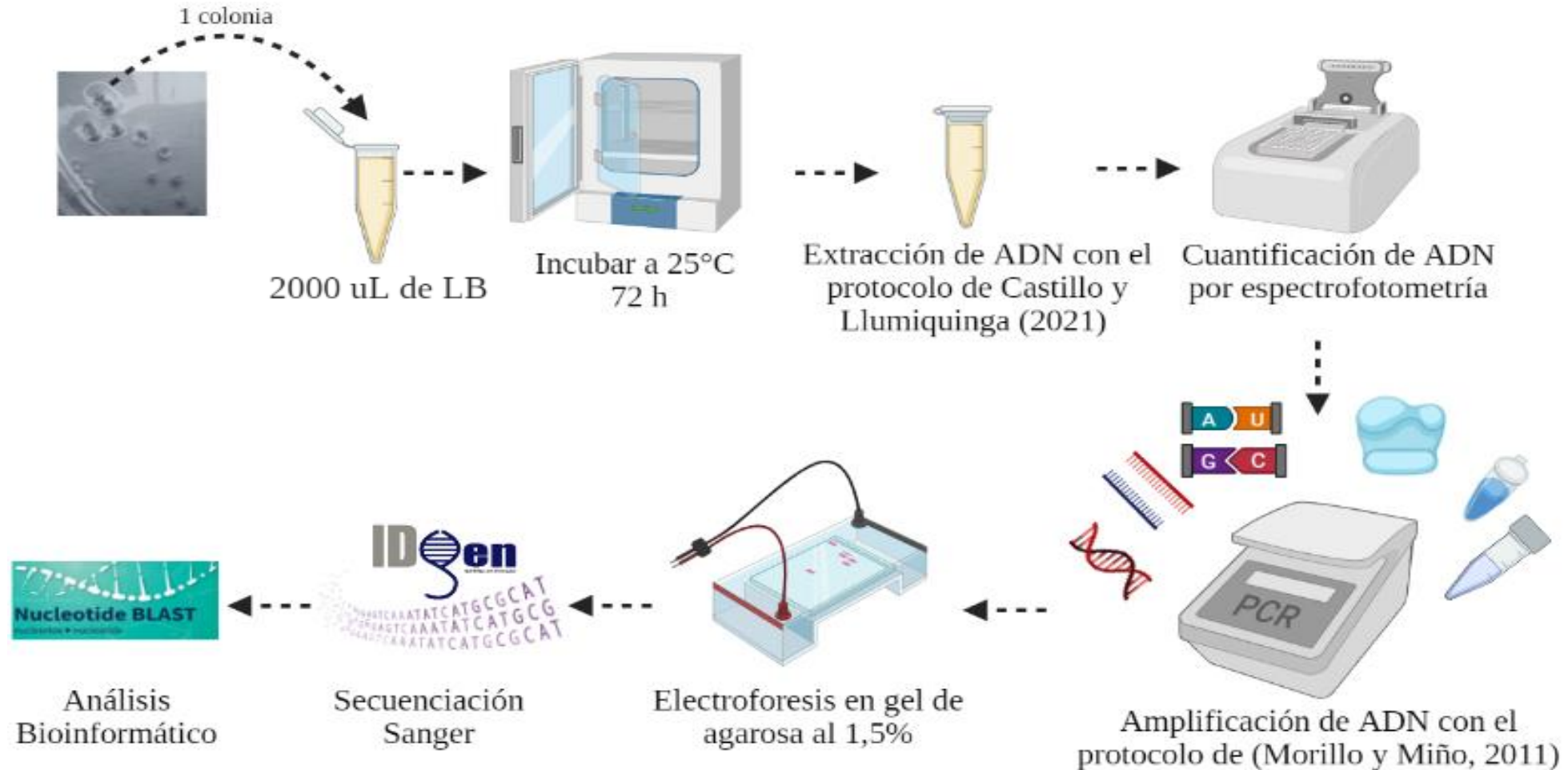
Pruebas	Reacción	
Tinción Gram	Gram positiva: células de color azul violáceo	Gram negativa: células de color rojo o rosa.
Degradación de pectato (CVP)	Formación de hoyos en el medio, color y forma de las colonias	

## Pruebas bioquímicas

Pruebas	Reacción	
Oxido-fermentativa (Hugh and Leifson)	Metabolismo oxidativo	Metabolismo fermentativo
Catalasa	Desprendimiento de burbujas	
Oxidasa	Reacción positiva: rosa violáceo	Reacción negativa: amarillo tenue
Crecimiento en agar nutriente a 37°C	Formación de colonias	
Crecimiento en YDC	Colonias de color amarillo o anaranjado	

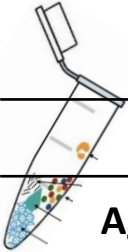
## Identificación molecular de los aislamientos

### Extracción, cuantificación y validación de ADN bacteriano





## Mix PCR



Reactivos	Concentración final	1X (μL)
Agua ultra pura		12,4
Tampón	1X	5
MgCl <sub>2</sub> (mM)	1,8	1,8
dNTPs (mM)	0,2	0,5
Primer 27F (pM) (5'- AGTTTGATCCTGGCTCAG -3')	0,8	2
Primer 1492R (pM) (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT -3')	0,8	2
Taq - polimerasa (U/μL)	0,06	0,3
ADN (ng/μL)	1,6	1,0
V <sub>f</sub>	-	25

## Condiciones de PCR para la amplificación del gen ARNr 16S.

Fases	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	94	1 min	
Alineamiento	54	45 s	34
Elongación	70	1 min	
Extensión final	70	8 min	1

## Análisis Estadístico

### Longitud de pudrición de las plantas inoculadas con los aislamientos bacterianos

N° de cultivos	3
N° aislamientos	9
Tratamientos	27
Repeticiones por tratamiento	5

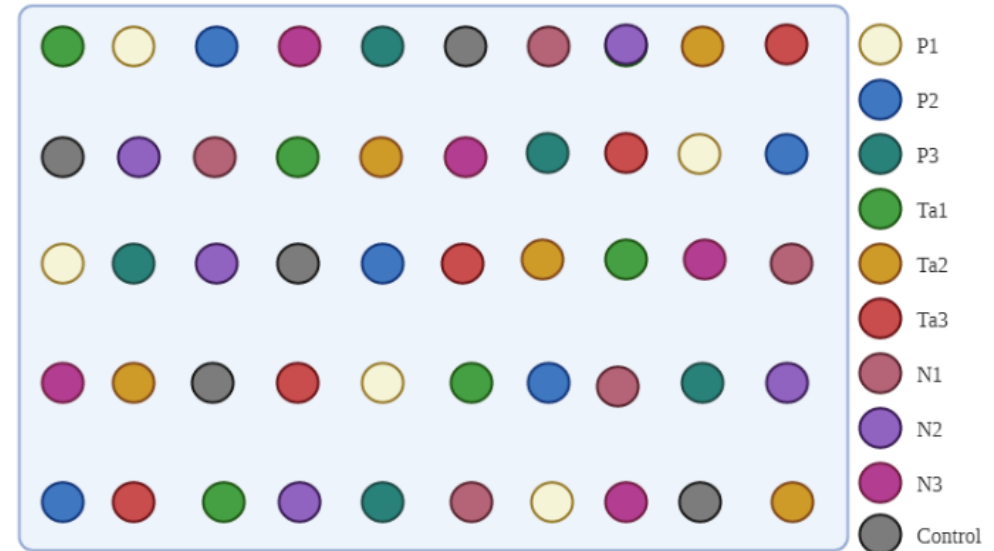
### Variables de respuesta

Longitud de pudrición

### Diseño experimental

Factorial 3 x 9 dispuesto en DCA

Esquema de distribución de los tratamientos



Prueba de normalidad  
Kolmogórov-  
Smirnov

ANOVA

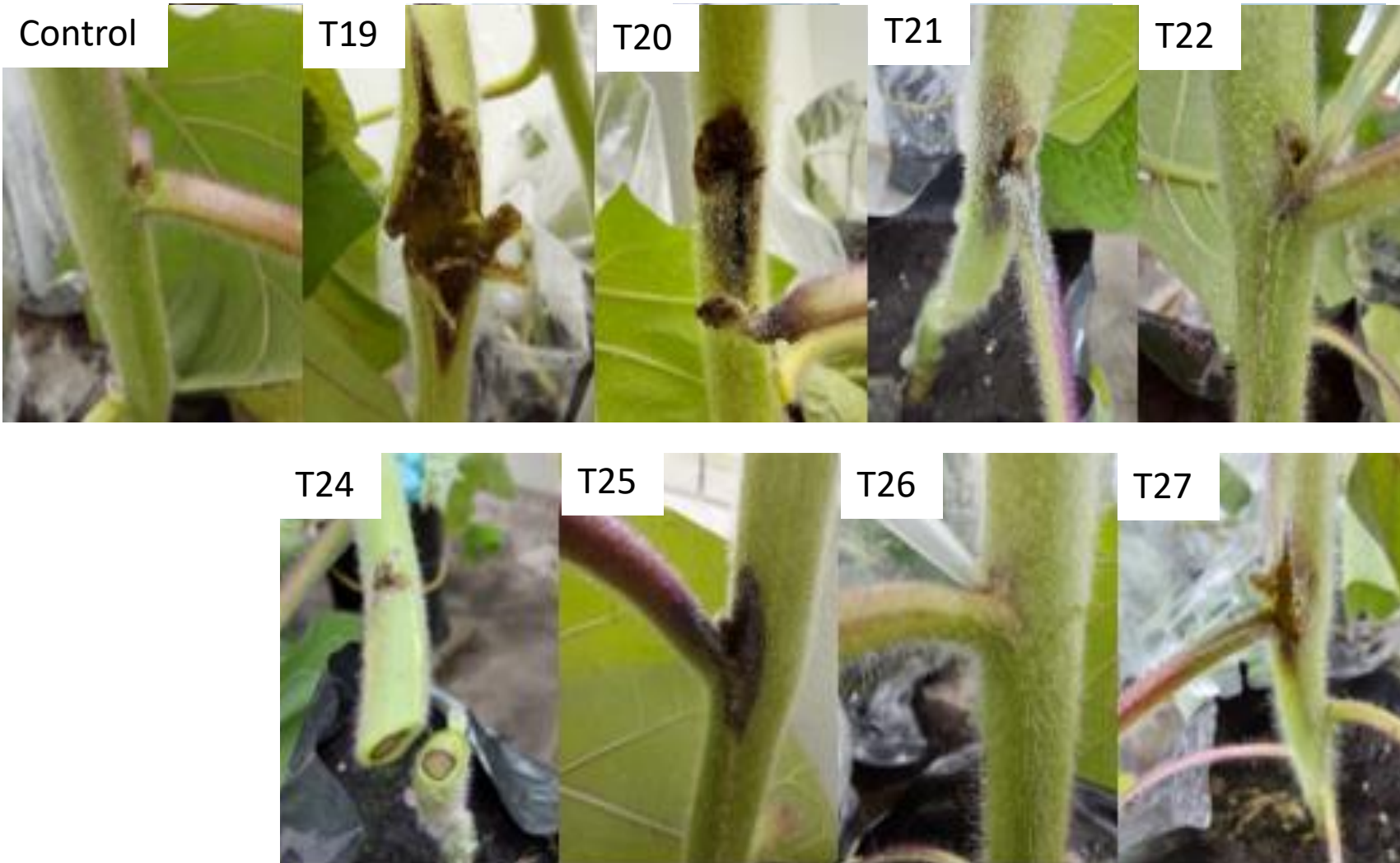
p valor 0.05

HSD de Tukey



# 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Prueba de patogenicidad

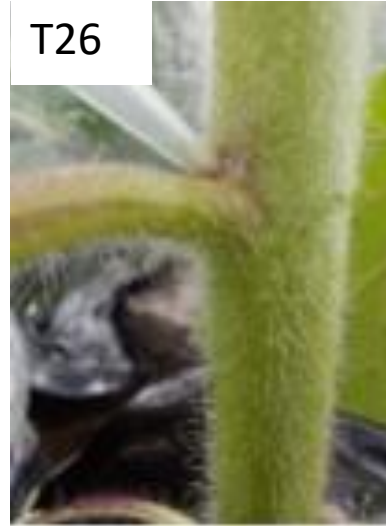


Chang (2017) factores de predisposición para la pudrición: lesiones, hematomas y heridas. Humedad y temperatura favorecen el desarrollo

Bhat et al., (2004) & Czajkowski, (2011) tejido se ablanda, superficie se decolora y parte interna viscosa

Agrios (2005b) la superficie exterior puede permanecer intacta mientras que el contenido se convierte en una masa viscosa que se exuda al exterior

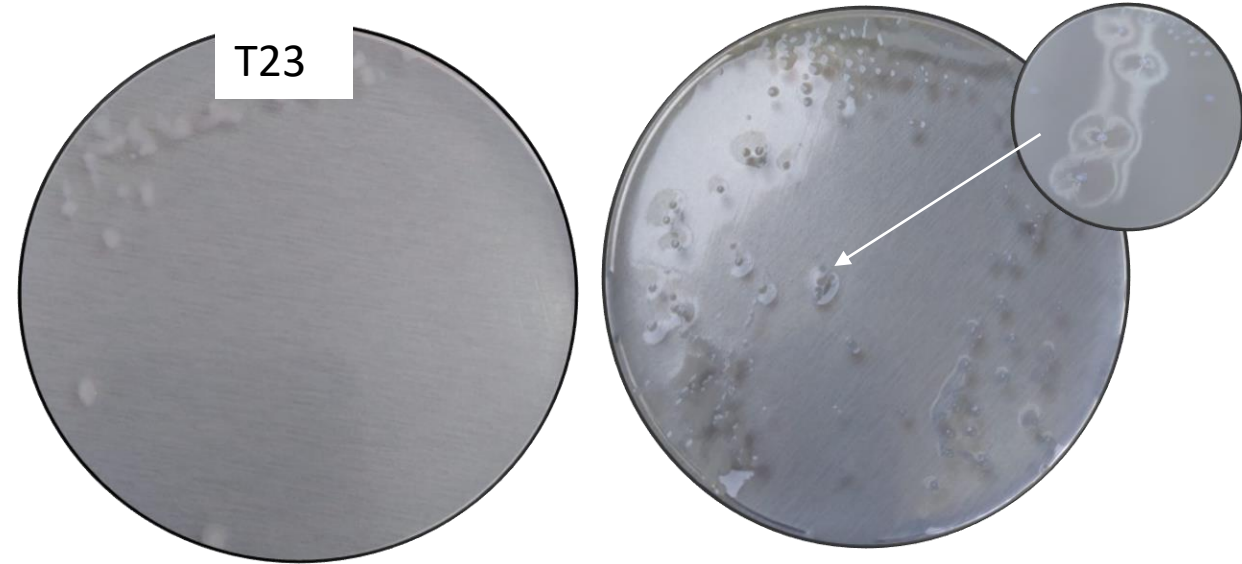
## Patogenicidad diferencial



Agrios (2005b) la superficie exterior puede permanecer intacta. Kubheka et al., (2013) Oclusión de los vasos del xilema por las bacterias.

Revelo et al., (2010)  
Naranjilla INIAP  
Palora es un híbrido

## Re-aislamiento bacteriano

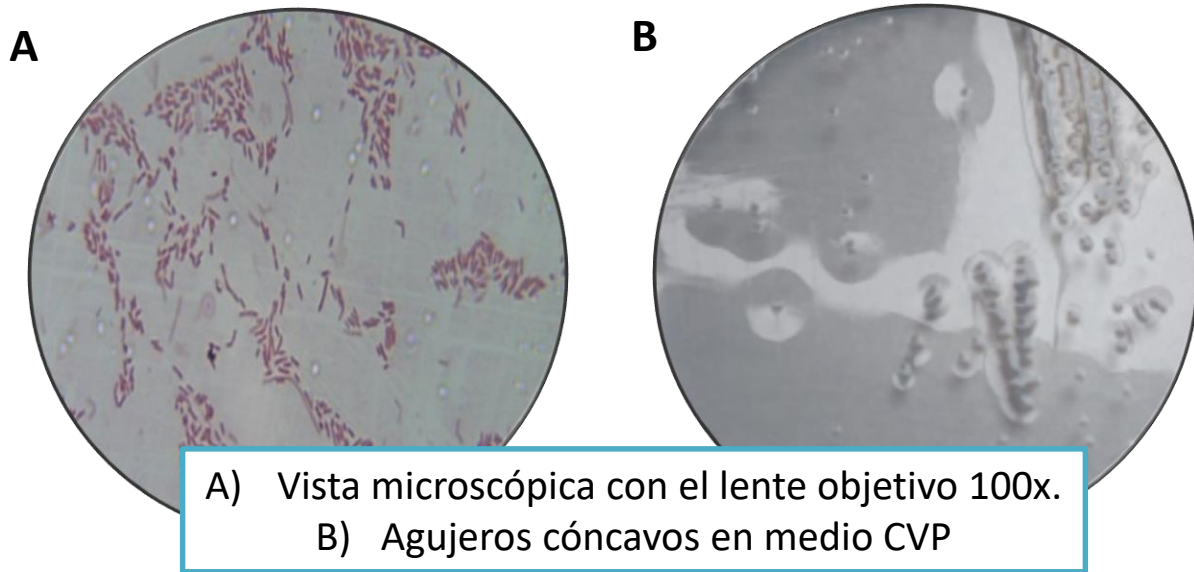


26 aislamientos bacterianos formaron cavidades en medio CVP

Agrios (2005a) el microorganismo debe ser aislado e idéntico al original



## Caracterización fenotípica



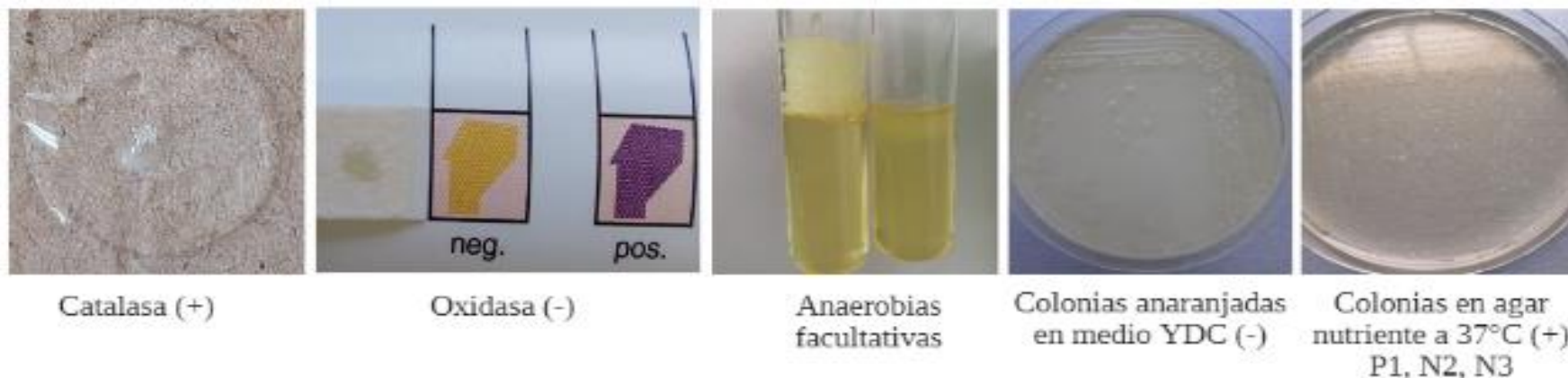
Tolga et al., (2018) familia Enterobacteriaceae bacilos Gram Negativos

Sangeetha et al., (2020) las bacterias pectolíticas forman cavidades en medio CVP.

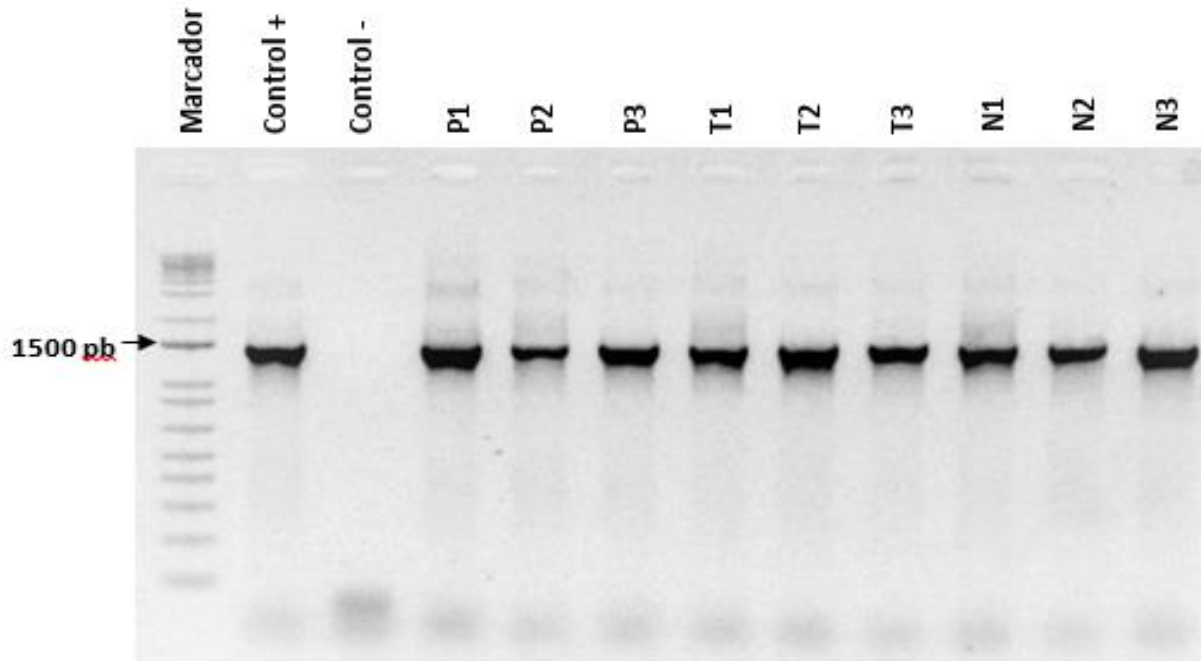
Czajkowski et al., (2014) y Peralta et al., (2021) especies del género *Pectobacterium* son: catalasa positiva, oxidasa negativa y son anaerobios facultativos

Luna (2007) las colonias color crema en medio YDC pertenecen a especies del género *Pectobacterium*

## Pruebas bioquímicas



## Identificación molecular



Lane (1991), cebadores universales para bacterias 27 F y 1492 R, amplifican una región de ~ 1500 pb

Denominación	Especie bacteriana homóloga	Porcentaje de cobertura (%)	Valor E	Porcentaje de identidad (%)
P1	<i>Pectobacterium polaris</i>	100	0.0	99,12
P2	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	99	0.0	99,34
P3	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	100	0.0	94,53
Ta1	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	100	0.0	94,53
Ta2	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	99	0.0	99,34
Ta3	<i>Pectobacterium punjabense</i>	100	0.0	100
N1	<i>Pectobacterium punjabense</i>	100	0.0	99,79
N2	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	100	0.0	100
N3	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	100	0.0	100

Prueba de normalidad  
Kolmogórov-Smirnov

p valor = 0.0643 ∴ datos normales

## ANOVA de la variable longitud de pudrición (cm)

Longitud de pudrición (cm)			
	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Pr (>F)
Planta	2	85.23	2e-16
Aislado Bacteriano	8	179.07	2e-16
Planta:Aislado Bacteriano	16	139.70	3.74e-15
Residuales	81	55.86	

p valor < 0.05

Influencia significativa de los factores y su interacción

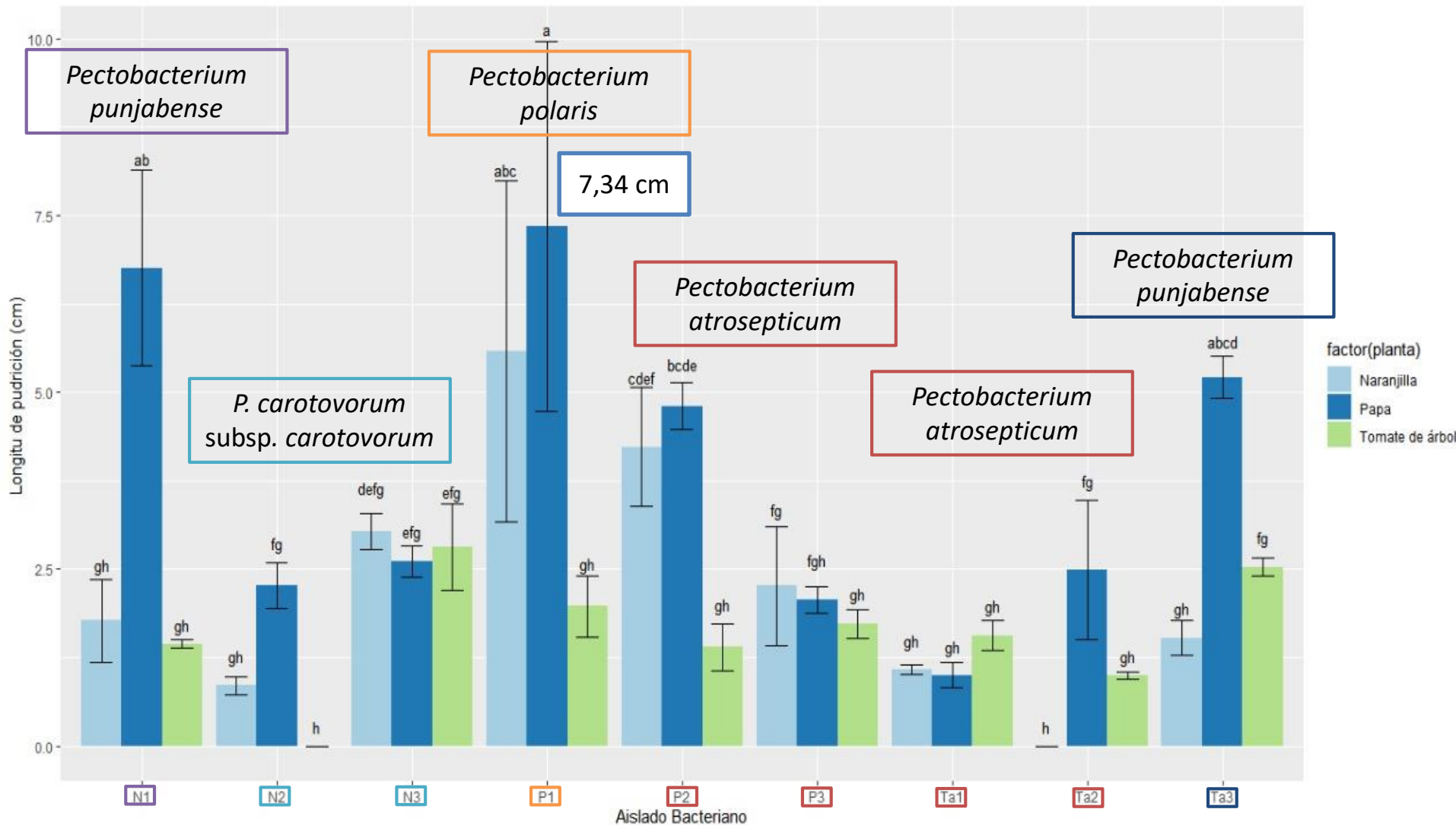


Test HDS de Tukey





## Longitud de pudrición



Sarfraz et al., (2018) y Cigna et al., (2021)

*Pectobacterium punjabense* identificada en Pakistán y Europa como hospedero principal de papa.

Park et al., (2012) y Abd El-kafie et al., (2019)

*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* tiene como hospederos diferentes especies vegetales



6

# CONCLUSIONES



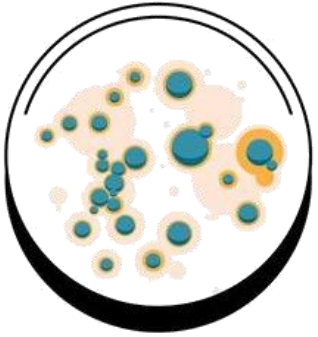
Los aislamientos bacterianos más patogénicos fueron *Pectobacterium polaris* (P1), *P. atrosepticum* (P2, P3 y Ta1), *P. punjabense* (Ta3, N1) y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (N3); ya que infectaron a los tres cultivos estudiados, ocasionando síntomas como: maceración del tejido, necrosis, liberación de exudados y olor fétido, característico de este tipo de bacterias.



Los dos aislamientos restantes tuvieron patogenicidad diferencial, es decir que *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (N2) infectó papa y levemente a naranjilla produciendo un cambio tenue en la coloración del tallo; mientras que en tomate de árbol se observó la colonización de los haces vasculares, el aislamiento correspondiente a *P. atrosepticum* (Ta2) infectó a papa, tomate de árbol, pero no a naranjilla.



El cultivo más susceptible a la pudrición blanda fue papa inoculada con *Pectobacterium polaris*, dando una longitud de pudrición de 7,34 cm, seguido de la naranjilla inoculada con *Pectobacterium polaris* con una longitud de pudrición de 5,58 cm, mientras que el tomate de árbol inoculado con *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* arrojó 2,81 cm en la longitud de pudrición.



Los nueve aislamientos bacterianos presentaron similar respuesta a las pruebas bioquímicas: catalasa (+), oxidasa (-), anaerobias facultativas (cambio de coloración de azul a amarillo), formación de colonias amarillas en medio YDC (-) y formación de cavidades en medio CVP (+). Además, el fenotipo característico fue bacilos Gram negativos, por lo que se determinó que pertenecen al género *Pectobacterium*.



Las pruebas moleculares sustentaron a lo predicho por las pruebas bioquímicas, ya que el género de todos los aislamientos bacterianos fue *Pectobacterium*.



# RECOMENDACIONES

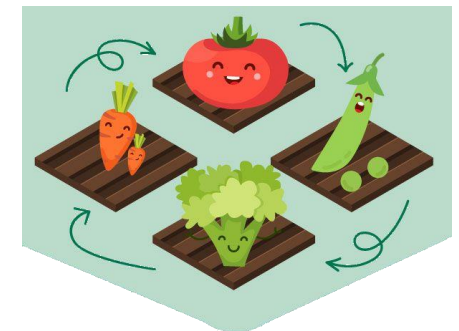
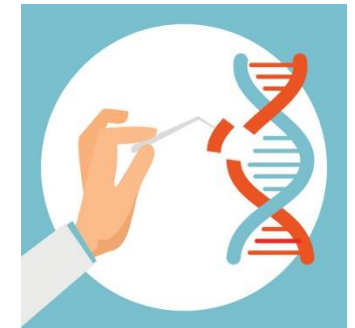
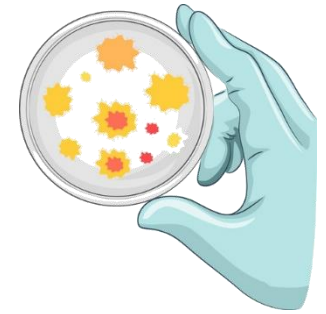
Complementar a las pruebas bioquímicas realizadas con pruebas API, que permiten la identificación rápida de Enterobacterias y otras bacterias Gram negativas, a nivel de género o especie.

Caracterizar molecularmente a los aislamientos bacterianos por medio del uso de otros cebadores u otras regiones de ADN, para así complementar el análisis molecular obtenido en este estudio.

Implementar secuenciación de nueva generación (NGS), para obtener resultados más precisos y óptimos; permitiendo un análisis genómico de mejor calidad.

Aplicar un screening en las diferentes variedades de los cultivos estudiados para así conocer si existe resistencia varietal ante las bacterias pectolíticas.

Para el manejo de esta enfermedad se recomienda considerar, la rotación de cultivos, donde no deberían constar solanáceas, ya que se encontró como hospedantes de todas las especies estudiadas.





# AGRADECIMIENTOS



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



**FAMILIA Y AMIGOS**

Dr. Petronio Gavilanes  
**Director del proyecto**

Blanca Naranjo MSc.  
**Codirectora del proyecto**

Dra. María Luisa Insuasti  
**Directora externo del proyecto**

Dr. José Ochoa  
**Asesor externo**

Ing. Pablo Llumiquinga  
**Asesor externo**

Ing. Judith Zapata  
**Asesor externo**