



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

**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 INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: OBTENCIÓN DE UN COCTEL DE BACTERIÓFAGOS  
LÍTICOS PARA EL CONTROL DE BACTERIOSIS EN CULTIVOS  
DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*) DEL CANTÓN AMBATO,  
PROVINCIA DE TUNGURAHUA.**

**AUTOR: LARA RAMOS LESLIE ELIZABETH  
DIRECTORA: AYALA NAVARRETE LIGIA, PhD.**

**SANGOLQUÍ**

**2015**



## CERTIFICACIÓN

Certifico que el siguiente trabajo titulado “**Obtención de un coctel de bacteriófagos líticos para el control de bacteriosis en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) del cantón Ambato, provincia de Tungurahua**”, fue realizado en su totalidad por la Srta. **LESLIE ELIZABETH LARA RAMOS** como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología.

Sangolquí, Noviembre del 2015

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Ligia Ayala Navarrete', is written over a horizontal line.

Ligia Ayala Navarrete, PhD.

DIRECTORA



### DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Leslie Elizabeth Lara Ramos

**Declaro que:**

El proyecto de titulación **“Obtención de un coctel de bacteriófagos líticos para el control de bacteriosis en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) del cantón Ambato, provincia de Tungurahua”** ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas colocadas al final de cada párrafo, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría. En virtud de esta declaración me responsabilizo de su contenido, veracidad y alcance científico.



---

Leslie Elizabeth Lara Ramos



## AUTORIZACIÓN

Yo, Leslie Elizabeth Lara Ramos

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE” la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo **“Obtención de un coctel de bacteriófagos líticos para el control de bacteriosis en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) del cantón Ambato, provincia de Tungurahua”**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, Noviembre del 2015.

---

Leslie Elizabeth Lara Ramos

## DEDICATORIA

Dedicado a todos quienes luchan y se esfuerzan por alcanzar algo;  
aquellos que tropiezan, aprenden y saben levantarse.

“Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes,  
porque Jehová tu Dios estará contigo en dondequiera que vayas.”

Josué 1:9

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, mi todo.

A mi familia, que ha sido siempre mi apoyo incondicional.

A mis profesores, quienes me han guiado e inspirado con su conocimiento.

A mis amigas y amigos que me han acompañado en esta experiencia.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA .....	v
AGRADECIMIENTOS .....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	vii
LISTADO DE TABLAS .....	x
LISTADO DE FIGURAS .....	xii
LISTADO DE CUADROS .....	xv
LISTADO DE ANEXOS .....	xvi
RESUMEN .....	xvii
ABSTRACT .....	xviii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Formulación del problema .....	1
1.2. Justificación del problema .....	2
1.3. Objetivos .....	2
1.3.1. Objetivo general .....	2
1.3.2. Objetivos específicos .....	3
1.4. Marco Teórico .....	3
1.4.1. El Tomate .....	3
1.4.1.3. Morfología .....	5
1.4.2. Condiciones del Cultivo .....	6
1.4.3. Enfermedades .....	9
1.4.4. Bacteriófagos .....	20
CAPÍTULO II: Materiales y Métodos .....	27
2.1. Participantes .....	27

2.2. Zona de Estudio .....	27
2.2.1. Campo .....	27
2.2.2. Laboratorio.....	27
2.3. Período de Investigación .....	28
2.4. Procedimiento .....	28
2.4.1. Muestreo.....	28
2.5.2. Aislamiento .....	29
2.5.3. Identificación Fenotípica .....	30
2.5.5. Identificación Molecular .....	34
2.5.6. Aislamiento de Bacteriófagos .....	38
2.5.6.3. Prueba de Spot Test.....	41
CAPÍTULO III: RESULTADOS.....	44
3.1. Aislamiento.....	44
3.2. Identificación Fenotípica y Bioquímica .....	45
3.3. Postulados de Koch .....	46
3.4. Identificación Molecular.....	49
3.4.1. Extracción y Cuantificación de DNA genómico bacteriano .....	49
3.4.2. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	49
3.5. Aislamiento de Bacteriófagos .....	51
3.5.1. Curva de crecimiento .....	51
3.5.2. Obtención de bacteriófagos .....	53
3.5.3. Título Viral.....	55
3.5.4. Descripción Morfológica.....	56
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN.....	58

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES .....	62
CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES .....	63
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA.....	64

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Taxonomía botánica del tomate riñón.....	5
<b>Tabla 2.</b> Temperaturas críticas del tomate.....	8
<b>Tabla 3.</b> Principales enfermedades que afectan al tomate.....	10
<b>Tabla 4.</b> Pruebas empleadas para la identificación bioquímica de las cepas... aisladas.	32
<b>Tabla 5.</b> Perfil térmico de incubación de la Proteinasa K para la extracción..... de DNA genómico bacteriano.	36
<b>Tabla 6.</b> Secuencias de los oligonucleótidos usados en la PCR para..... detectar aislados de <i>Pseudomonas</i> (género) y <i>Pseudomonas</i> <i>syringae</i> pv. <i>tomato</i> .	37
<b>Tabla 7.</b> Perfil térmico utilizado para la amplificación de la región..... conservada de la secuencia 16S rDNA para el género <i>Pseudomonas</i> .	38
<b>Tabla 8.</b> Perfil térmico utilizado para la amplificación del gen <i>hrpZ</i> para..... <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> .	39
<b>Tabla 9.</b> Presencia de bacteria “B” aislada como resultado de la..... introducción del material vegetal muestreado con síntomas de bacteriosis.	45
<b>Tabla 10.</b> Características fenotípicas y bioquímicas para la bacteria “B”..... aislada a partir de <i>Solanum lycopersicum</i> .	47
<b>Tabla 11.</b> Cuantificación de la concentración de DNA genómico y su..... pureza.	50

- Tabla 12.** Valores de OD y porcentaje de reducción bacteriana tras cada.....55  
enriquecimiento (E).
- Tabla 13.** Valores obtenidos en la titulación de bacteriófagos mediante.....57  
ensayo de doble capa.

**LISTADO DE FIGURAS**

- Figura 1.** Decoloración marrón-rojiza en un corte longitudinal del tallo.....12  
de una planta de tomate infectada con *Clavibacter michiganensis*.
- Figura 2.** Izquierda: Mancha café en fruto inmaduro causada por.....14  
*Xanthomonas campestris*. Derecha: Hoja de tomate con síntomas  
de mancha bacteriana.
- Figura 3.** Izquierda: hoja con mancha negra rodeada de halo.....17  
amarillo; Derecha: mancha negra irregular en tallo joven de  
tomate.
- Figura 4.** Muerte de cultivos de tomate por marchitez bacteriana.....19  
causada por *Ralstonia solanacearum*.
- Figura 5.** Representación de las 13 familias descritas para bacteriófagos.....22
- Figura 6.** Ciclo lítico de un bacteriófago.....24
- Figura 7.** Muestras de A) tallo, B) hoja y C) fruto de plantas de.....29  
*Solanum lycopersicum* con síntomas de bacteriosis.
- Figura 8.** Material vegetal seleccionado y cortado antes de la.....30  
desinfección.
- Figura 9.** Plántulas de tomate de 3 semanas de edad, dentro del.....33  
invernadero.
- Figura 10.** Inoculación por punción de suspensión bacteriana en.....34  
plantas sanas de *Solanum lycopersicum*.
- Figura 11.** Esquema de dilución bacteriana para la curva de.....40  
crecimiento.
- Figura 12.** Esquema de distribución de filtrado de fagos (F) y ADE (C).....43  
en prueba de Spot Test.

- Figura 13.** Visualización clara de la presencia de bacteria “B” en.....46  
fruto (A), tallo (B) y hoja (C) de tomate, en medio AN.
- Figura 14.** Hoja control (A) y evolución de la sintomatología en hoja.....48  
causada después de la inoculación de la bacteria "B" a los 5 (B),  
10 (C) y 15 (D) días.
- Figura 15.** Tallo control (A) y evolución de la sintomatología en tallo.....49  
causada después de la inoculación de la bacteria “B” a los 5 (B),  
10 (C) y 15 (D) días.
- Figura 16.** Bacteria “B” reaislada a partir de hoja en medio King-B (A).....49  
y vista bajo luz UV (B).
- Figura 17.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los productos.....51  
amplificados por PCR de la región conservada de la secuencia  
16S rDNA para el género *Pseudomonas* con el par de primers  
PsF/PsR. Muestras: (B) DNA bacterias aislamiento original, (BH)  
DNA bacterias re-aisladas de ensayo de patogenicidad, (H) DNA  
total de plantas infectadas con bacterias, (M) 100pb ladder y (-)  
control negativo.
- Figura 18.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los productos.....52  
amplificados por PCR del gen *hrpZ* para *Pseudomonas syringae*  
*pv. tomato* con el par de primers MM5F/MM5R. Muestras: (B)  
DNA bacterias aislamiento original, (BH) DNA bacterias re-  
aisladas de ensayo.
- Figura 19.** Curva de crecimiento para bacterias aisladas de plantas.....53  
con sintomatología de pudrición en tomate. Absorbancia vs.  
Tiempo.
- Figura 20.** Velocidad de proliferación para bacterias aisladas de plantas.....54  
con sintomatología de pudrición en tomate. UFC vs. Tiempo.
- Figura 21.** Cultivo de 24 horas de crecimiento de *Pseudomonas syringae*.....55  
*pv. tomato* en medio triptosa: A) control sin fagos, B) y C) con  
filtrado de fagos.

- Figura 22.** Halos de lisis en pocillos con filtrado de fagos en prueba.....56  
de Spot Test.
- Figura 23.** Ensayo de doble capa. (A) Dilución  $10^{-4}$ , número de placas.....57  
incontable. (B) Dilución  $10^{-5}$ , número de placas contable. (C)  
Dilución  $10^{-7}$ , ausencia de placas.
- Figura 24.** Micrografías de microscopía electrónica de transmisión de.....58  
bacteriófagos que infectan a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*,  
encontrados en los filtrados concentrados. Se diferencian la  
cabeza icosaédrica, la cola y la placa basal.

**LISTADO DE CUADROS**

<b>Cuadro 1.</b> Descripción morfológica de <i>Solanum lycopersicum</i> . .....	6
---	---

**LISTADO DE ANEXOS**

<b>Anexo 1.</b> Resultados de pruebas bioquímicas realizadas para.....	75
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> .	
<b>Anexo 2.</b> Preparación del inóculo bacteriano para pruebas de.....	77
patogenicidad en plantas.	
<b>Anexo 3.</b> Protocolo de extracción de DNA genómico a partir de tejido.....	78
vegetal (Wizard Genomic DNA Purification Kit).	

## RESUMEN

Esta investigación tuvo por objetivo diagnosticar bacteriosis en cultivos de *Solanum lycopersicum* de la localidad de Cunchibamba, Ambato, y obtener un coctel de bacteriófagos líticos como un método de biocontrol, en reemplazo a los métodos convencionales y/o agroquímicos. Se muestrearon cultivos de tomate bajo invernadero con síntomas de enfermedad bacteriana, se realizaron bioensayos para determinar la patogenicidad del microorganismo aislado y se identificó bioquímica y molecularmente la presencia de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, causante de la “Mancha Negra”. A partir de muestras de suelo agrícola de la misma localidad se obtuvo bacteriófagos que mostraron lisis de las bacterias en condiciones de laboratorio, provocando que la propagación de los fitopatógenos disminuya en medios de cultivo líquidos y sólidos. Consorcios de fagos fueron analizados en pruebas de spot test y agar doble capa, obteniéndose placas con diámetros entre 1 y 1.5 mm. Los fagos fueron visualizados bajo microscopia electrónica de transmisión (TEM) y se identificaron partículas con la morfología característica del orden *Caudovirales* y dentro de la familia *Myoviridae*.

### PALABRAS CLAVE:

- BACTERIOSIS
- TOMATE
- CONTROL BIOLÓGICO
- *Pseudomonas*
- BACTERIÓFAGOS

## ABSTRACT

This research aims at diagnosis of bacteriosis of *Solanum lycopersicum* crops from Cunchibamba, Ambato, and gets a cocktail of lytic bacteriophages as a biocontrol method, replacing conventional methods and/or agrochemicals.

Greenhouse tomato crops with symptoms of bacterial disease were sampled, bioassays were conducted to determine the pathogenicity of the isolated microorganism and the presence of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, causing the called "Black Spot", was identified by biochemical and molecular tests. Bacteriophages were obtained from agricultural soil samples from the same location and these showed lysis of bacteria in laboratory conditions causing the decrease of the proliferation of the pathogen in liquid and solid media culture. Phage cocktail was analyzed by spot test and double-layer agar; plates with diameters between 1 and 1.5 mm were founded. The phages were visualized under transmission electron microscopy (TEM) and the particles identified seem to have the characteristic morphology of *Myoviridae* family of *Caudovirales* order.

### KEY WORDS:

- BACTERIOSIS
- TOMATO
- BIOLOGICAL CONTROL
- *Pseudomonas*
- BACTERIOPHAGES

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

### 1.1. Formulación del problema

Las enfermedades bacterianas en plantas tienen un largo historial agrícola que ha venido esclareciéndose con el avance de la investigación. Varios son los géneros de bacterias identificados hasta el momento que son patogénicos en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*), estos son: *Clavibacter*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Ralstonia*, de los cuales, solo el primero es una bacteria gram positiva, el resto son bacterias gram negativas (Productores de Hortalizas, 2006).

Además, se sabe que la incidencia de bacteriosis en *Solanum lycopersicum* puede ir desde un 5% hasta un 100% del total de los cultivos produciendo pérdidas económicas representativas que se vuelven más probables con la tecnificación de las plantaciones bajo invernadero (Guevara Black & Estrella Coello, 2008).

En el Ecuador, existen sectores productores de tomate con una mayor concentración del cultivo en las provincias de Imbabura, Pichincha, Tungurahua y Chimborazo (Guevara Black & Estrella Coello, 2008), y a pesar de que el cultivo de esta hortaliza se ha incrementado en los últimos años, se conoce de escasos estudios de biocontrol que incluyen, por ejemplo, el empleo de microorganismos antagonistas como *Trichoderma* y *Bacillus* (Elizondo Pastén).

La identificación bacteriana y el modo en que se manifiestan en la planta ha constituido un gran apoyo para el establecimiento de programas de mejoramiento del tomate, ya que gracias a esta información se ha podido entender los factores ecológicos y patogénicos que influyen en la sensibilidad y/o resistencia de cada microorganismo (Carrillo Fasio J. A., Sánchez Bautista, García Estrada, Allende Molar, & Márquez Zequera, 2001).

## **1.2. Justificación del problema**

La importancia del tomate se ha incrementado debido a su alto consumo y porque representa un sustento para muchos agricultores de la serranía ecuatoriana. Su versatilidad para la gastronomía y sus propiedades antioxidantes, beneficiosas para la salud, hacen de este una de las hortalizas más cultivadas a nivel mundial

Los cultivos de tomate, al igual que muchos otros, son vulnerables ante diversos factores físicos, químicos y/o ambientales que se suscitan a lo largo del desarrollo de la planta; sin embargo, el mayor problema que enfrenta *Solanum lycopersicum* es sin duda la amplia variedad de microorganismos, entre los que incluyen principalmente hongos y bacterias, que atacan con facilidad estos cultivos (AAIC, 2003).

Ante esta problemática, se citan a los bacteriófagos, virus que infectan específicamente bacterias, como un control natural. Estos virus actúan a través de un proceso lítico y pueden destruir completamente a la bacteria. Tienen una ventaja muy grande sobre los productos utilizados convencionalmente, y es que no contaminan el ambiente, no persisten en los alimentos y sobre todo no afectan la salud humana. Por último, sería el primer estudio de biocontrol de esta naturaleza en el país.

## **1.3. Objetivos**

### **1.3.1. Objetivo general**

Obtener un coctel de bacteriófagos líticos para el control de bacteriosis en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) del cantón Ambato, provincia de Tungurahua.

### 1.3.2. Objetivos específicos

- Aislar y caracterizar, mediante pruebas bioquímicas y moleculares, los agentes causales de bacteriosis en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) del cantón Ambato, Provincia de Tungurahua.
- Reproducir los postulados de Koch en plantas sanas de *Solanum lycopersicum* para comprobar la patogenicidad de las bacterias aisladas.
- Aislar un coctel de bacteriófagos líticos a partir de suelo agrícola y comprobar su funcionalidad mediante ensayos de doble capa.

## 1.4. Marco Teórico

### 1.4.1. El Tomate

#### 1.4.1.1. Origen y Distribución

Debido a la falta de evidencia de especies espontáneas, el tomate riñón tiene un origen incierto; sin embargo, la hipótesis más fuerte y aceptada por los botánicos señala que *Solanum lycopersicum* viene del Perú, en donde antiguamente tenía lugar el imperio inca, quienes lo cultivaban intercalando con plantaciones de maíz (Hernansaez Meoro & Pastor Manzano).

A pesar de ello, no es sino un tiempo después que esta planta comienza su domesticación lejos de su posible origen: México (Sanjuan Lara, y otros, 2014); pasando a extenderse paulatinamente por Europa a través de España y de ahí al resto de continentes (Hernandez Meoro & Pastor Manzano).

En la actualidad, su cultivo está ampliamente distribuido a nivel mundial, teniendo los índices más altos de producción en países como EE.UU, China, India, Turquía, Italia, Irán y México (Polanco Jácome, 2011). Ecuador, por su

parte, también ha ganado bastante terreno en la producción a mediana y gran escala de este producto, tal es así, que según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) en el año 2010 en el país existían alrededor de 2837 ha sembradas de tomate riñón, con una producción de 53 518 TM al año.

#### **1.4.1.2. Taxonomía**

El nombre “tomate” viene de las palabras “xi-tomate” o “xito-tomate”, palabras que utilizaban los aztecas para referirse a esta planta y que más tarde daría el punto de partida para su nombre vulgar o común (Argerich & Gaviola).

Según la clasificación de Miller (1768), el nombre de esta especie estaba dado por *Lycopersicon esculentum*, pero actualmente, el género *Lycopersicon* está incluido en el nuevo género *Solanum*, modificando con esto también la nomenclatura de la especie a *Solanum lycopersicum* (Pérez Rosero, 2010).

La clasificación taxonómica actual dada a esta especie consta en la Tabla 1.

**Tabla 1.**

Taxonomía botánica del tomate riñón.

Dominio	Eucariota
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales (Personatae)
Familia	Solanaceae
Subfamilia	Solanoideae
Género	<i>Solanum</i>
Especie	<i>S. lycopersicum</i>

**Fuente:**

(Guevara Black & Estrella Coello, 2008)

**1.4.1.3. Morfología**

Esta planta dicotiledónea perenne puede crecer de forma rastrera, semierecta o erecta hasta una altura de 1m, a veces más.

Las características morfológicas se describen en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.**

Descripción morfológica de *Solanum lycopersicum*.

<b>Órgano</b>	<b>Descripción</b>
Sistema Radicular	Superficial. Raíz principal corta y débil, desde la que se originan numerosas y potentes raíces secundarias y adventicias.
Tallo	Tallo principal con un grosor que va de 2 a 4 cm con ramificación simpoidal.
Hojas	Alternas. De hasta 25 cm de largo, compuesta, con folíolos peciolados, lobulados y borde dentado. Cubierta de pelos glandulares.
Flor	Color amarillo. Compuesta de 5 o más sépalos y número igual de pétalos dispuestos de forma helicoidal, formando una estrella. Las anteras con sus ápices delgados están unidas entre sí rodeando al estilo.
Fruto	Baya plurilocular carnosa que puede alcanzar un peso de hasta 600 gr. De color rojo en la maduración. Constituido por pericarpo, tejido placentario y semillas. Estas últimas numerosas, más o menos circulares, aplanadas y amarillas.

**Fuente:** (CONABIO, 2009)

**1.4.2. Condiciones del Cultivo**

Con la búsqueda de la explotación de esta hortaliza, la tecnificación ha dado como resultado su cultivo bajo invernadero, en donde se optimiza principalmente el manejo y uso del agua, así como también la diversificación de la producción (AAIC, 2003).

Los invernaderos pueden estar ubicados desde el nivel del mar hasta los 3200 msnm y el producto puede obtenerse en cualquier época del año (Orna Chávez, 2009), aunque se destacan dos ciclos de siembra: uno al inicio de la época de lluvia y otro al final de la misma con el objetivo de aprovechar la humedad generada (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 1991).

Aunque parezca muy versátil, el cultivo de esta hortaliza, como las demás cultivadas bajo esta técnica, tiene que ser minuciosamente cuidado desde la selección de la variedad hasta la poscosecha (AAIC, 2003). Tomando en cuenta las necesidades ambientales y físicas para el crecimiento y desarrollo de la planta, los principales parámetros a tener en cuenta son:

#### **1.4.2.1. Temperatura**

La fotosíntesis se ve influenciada positiva o negativamente con la temperatura. Las heladas (menor a 10°C) pueden provocar la muerte de la planta, sin embargo, el cultivo responde de manera favorable a una variación que puede oscilar entre los 21 y 24°C (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 1991).

**Tabla 2.**

Temperaturas críticas del tomate

Se hiela la planta		-2°C
Detiene su desarrollo		10 - 12°C
Desarrollo normal de la planta		18 - 25°C
Mayor desarrollo de la planta		21 - 24°C
Germinación óptima		25 - 30°C
<b>Temperaturas óptimas</b>		
Desarrollo	Diurna	23 - 26°C
	Nocturna	13 - 16°C
Floración	Diurna	23 - 26°C
	Nocturna	15 - 18°C
Maduración		15 - 22°C

**Fuente:**

(Escalona, Alvarado, Monardes, Urbina, &amp; Martin, 2009)

Se ha comprobado que el tomate es una planta termoperiódica, es decir, que puede aprovechar los cambios de temperatura para favorecer ciertos procesos fisiológicos como la germinación de la semilla, el alargamiento de los tallos, la fructificación, entre otros; siendo la variación más importante en la noche cuando el balance hídrico es óptimo (AAIC, 2003).

#### **1.4.2.2. Humedad**

Requiere un buen suministro de humedad, con valores óptimos entre el 65 y 70% de humedad relativa del ambiente, garantizando el desarrollo normal de la polinización (Burgos Torres, 2014). Las altas tasas de humedad permiten la proliferación de enfermedades, principalmente de hongos y bacterias; por el contrario, las bajas tasas de humedad hacen que la planta consuma más agua

que nutrientes, provocando la improductividad (Escalona, Alvarado, Monardes, Urbina, & Martin, 2009).

#### **1.4.2.3. Luminosidad**

La luz es un factor determinante en el desarrollo de las plantas. Las altas densidades poblacionales provocarán que la luz no llegue de manera adecuada a todas las plantas, dando como resultado plantas con tallos largos y delgados: débiles (AAIC, 2003).

#### **1.4.2.4. Suelo**

El tomate no tiene exigencias en cuanto a suelo. Puede cultivarse en suelos arenosos o arcillosos siempre y cuando tengan un rico contenido en materia orgánica (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 1991); además de profundos y bien drenados. Con respecto a pH, un rango óptimo está considerado entre 5,5 y 6,8 (Escalona, Alvarado, Monardes, Urbina, & Martin, 2009).

#### **1.4.3. Enfermedades**

Las enfermedades pueden ser de origen fisiológico o parasitario. En el primer caso, son provocadas por las malas condiciones de desarrollo ambiental, físico o químico en las que se encuentra la planta, se marchitan y mueren; mientras que en el segundo, se dan como consecuencia de la invasión de patógenos que alteran el equilibrio funcional de la misma llegando a provocar una limitada producción e incluso la muerte (Hernandez Meoro & Pastor Manzano) (Tabla 3). No se deja de lado que la enfermedad parasitaria también puede ser provocada por las altas tasas de humedad, principalmente la proliferación de hongos y bacterias.

**Tabla 3.**

Principales enfermedades que afectan al tomate.

Bacterianas	Fungosas	Virales
Cáncer bacteriano	Antracnosis	TMV
Mancha bacteriana	Alternariosis	ToMV
Mancha negra del tomate	Cenicilla	TYLCV
Marchitez bacteriana	Fusarium	TSWV
	Mancha gris de la hoja	CMV
	Moho gris	PVY
	Moho blanco	TVSV
	Tizón temprano	
	Tizón tardío	
	Verticillium	

**Fuente:**

(Hernandez Meoro &amp; Pastor Manzano)

**1.4.3.1. Enfermedades bacterianas**

Al estar sujetas al suelo por la raíz, las plantas pueden adquirir enfermedades sistémicas causadas por un sinnúmero de microorganismos,

entre ellos, las bacterias. La transmisión se da generalmente a través de las semillas y de esta manera se conserva también en los próximos cultivos en el suelo (Hernandez Meoro & Pastor Manzano).

Los principales y más frecuentes géneros de bacterias fitopatógenas reportados para este cultivo son: *Clavibacter*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Ralstonia*; este último con la incidencia más baja en comparación con las primeras (Guevara Black & Estrella Coello, 2008).

#### **1.4.3.1.1. Cáncer Bacteriano**

##### **Descripción:**

Es una enfermedad sistémica y superficial, no tiene cura pues es muy agresiva produciendo pérdidas devastadoras, es de fácil dispersión y una vez que está en el invernadero, es difícil erradicarla (Seebold, 2006).

##### **Síntomas:**

El microorganismo puede actuar en cualquier etapa de desarrollo de la planta. Las manifestaciones van desde el retraso del crecimiento hasta la muerte.

Los primeros síntomas son marchitez, rizado y bronceado en los bordes de la hoja (Productores de Hortalizas, 2006). A nivel de tallo, existen escisiones dando lugar a canchales, como su nombre lo indica; además presentan una decoloración marrón-rojiza del sistema vascular que se puede evidenciar realizando un corte longitudinal del mismo (Figura 1) (Seebold, 2006). Los síntomas inicialmente suceden a un solo lado de la planta (Burgos Torres, 2014).



**Figura 1.** Decoloración marrón-rojiza en un corte longitudinal del tallo de una planta de tomate infectada con *Clavibacter michiganensis*.

**Fuente:** (Admin, 2014).

En el fruto, inicialmente, aparecen lesiones necróticas pequeñas conocidas como “ojo de pájaro” y cuando ha llegado al tejido carnoso, da lugar una pudrición interna de color amarillo; después, en una etapa más avanzada de la infección, se evidencia una zona necrótica con levantamientos muy evidentes: el llamado cáncer (Seebold, 2006).

#### **Agente Causal:**

La bacteria causante del cáncer bacteriano es *Clavibacter michiganensis*. Fue identificada y estudiada por primera vez en Chile, por Nome y Docampo en 1983 (Sepúlveda, Salvatierra, Sandoval, & Gonzáles, 2013). Se caracteriza por no formar esporas, su tamaño va desde 0.6 x 0.7 a 1.2 um, aeróbica y sin flagelos (no mótil) (Rojas Linares, 2014). El dato más relevante, quizás, es que es una bacteria gram positiva, la única reportada para esta planta y una de las pocas fitopatógenas de este tipo.

Con respecto a su forma, es variable. Cuando el agente es aislado directamente del material vegetal tiene una forma típica de bacilo, mientras que

en su estado natural, dependiendo de las condiciones de crecimiento, se muestra pleomórfica, cocoide o en forma de mazo (Burgos Torres, 2014).

Su crecimiento óptimo se da a 28°C y es relativamente lento. Sus colonias son lisas, semifluidas, redondas u ovaladas y con borde definido. El color en medio de cultivo YDC es amarillo o naranja pálido, pero puede variar dependiendo del medio selectivo usado. Respecto a su bioquímica, es oxidasa positiva, glucosa oxidativa e hidroliza esculina. (Rojas Linares, 2014).

#### **Manejo:**

Debido a que la propagación se da a través de la semilla, es necesario un estricto control de ellas antes de la siembra, o a su vez, emplear semillas certificadas.

En el caso de existir sospecha en las plántulas bajo invernadero, se recomienda detener la polinización y realizar una fumigación a alta presión para reducir el ritmo de propagación. En el campo se recomienda enterrar el material vegetal y hacer rotación de cultivos (Productores de Hortalizas, 2006).

#### **1.4.3.1.2. Mancha Bacteriana**

##### **Descripción:**

Esta enfermedad es muy común en tomate y pimiento cuando existen altas tasas de precipitación y humedad (Escalona, Alvarado, Monardes, Urbina, & Martin, 2009). Fue observada por primera vez en EE.UU y Sudáfrica en los años 1912 y 1914, respectivamente, y es considerada la más limitante en la producción ya que ataca todas las partes de la planta (Guevara Black & Estrella Coello, 2008). En ocasiones puede ser confundida con la mancha negra del tomate (Productores de Hortalizas, 2006).

**Síntomas:**

Se manifiesta principalmente en las partes aéreas de la planta (Burgos Torres, 2014). En las hojas aparecen manchas cloróticas que aumentan rápidamente de diámetro, son circulares e irregulares con aspecto graso, agrietadas o rasgadas en su interior y rodeadas de un halo de color amarillo (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 1991).

Cuando la infección está avanzada, se observa coloración parda en los bordes que se va extendiendo a lo largo de las nervaduras de la hoja. Otros síntomas tardíos, son la defoliación y la reducción del tamaño de los frutos (Guevara Black & Estrella Coello, 2008).

Se diferencia de la “mancha negra” del tomate por los síntomas del fruto, en donde aparecen manchas pequeñas acuosas de unos 3-6 mm de diámetro con centro café ligeramente hundido (Burgos Torres, 2014).



**Figura 2.** Izquierda: Mancha café en fruto inmaduro causada por *Xanthomonas campestris*. Derecha: Hoja de tomate con síntomas de mancha bacteriana.

**Fuente:** (Schultz & French-Monar, 2011), (UBA, 2015).

**Agente Causal:**

Esta enfermedad es provocada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, un bacilo gram negativo, aerobio, con un solo flagelo polar y cuyo crecimiento óptimo se da a 25°C. Sus colonias son de color amarillo intenso y de consistencia mucoide (Carrillo Fasio J. A., Sánchez Bautista, García Estrada, Allende Molar, & Márquez Zequera, 2001).

Pruebas de oxidasa negativa, catalasa positiva, producción de ácido, pero no gas, a partir de glucosa, manosa, arabinosa, sacarosa, galactosa, trealosa, celobiosa y fructosa (Burgos Torres, 2014); así como la hidrólisis de almidón y ausencia de fluorescencia en agar selectivo King-B (Ramírez, Milena Castaño, & López, 2009), son indicativos bioquímicos característicos de esta bacteria.

Además, al existir diferencias fisiológicas dentro de la especie, en cuanto a patogenicidad y sensibilidad a ciertos agroquímicos, se han establecido tres grupos: XcvT, XcvP y XcvPT, de los cuales el primero incluye a 3 razas (T1, T2 y T3) y los dos últimos 9 razas cada uno (P0, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 y P8) (Carrillo Fasio J. A., Sánchez Bautista, García Estrada, Allende Molar, & Márquez Zequera, 2001).

**Manejo:**

No existe una cura definitiva pero se puede evitar la presencia en los cultivos controlando la humedad y la presencia de agua libre en las plantas con ventilación dentro del invernadero (Colombo, 2002); además es necesario eliminar las malezas o plantas contaminadas o realizar trasplantes de plántulas sanas (López Montes).

Por otro lado, la fumigación equilibrada de los cultivos adultos con: bupirimato (Nimrod) al 1 por mil, fenarimol (Rubigan) al 0,2 por mil, miclobutanil 24% al 0,14 por mil y triadimefón al 0,5 por mil (López Montes), también es una alternativa muy utilizada.

#### **1.4.3.1.3. Mancha Negra del Tomate**

##### **Descripción:**

También conocida como “el moteado bacteriano de la hoja” (Guevara Black & Estrella Coello, 2008) o “la peca bacteriana” (García R. , 2013), puede manifestarse, al contrario de los otros fitopatógenos, cuando las temperaturas son bajas y la humedad es alta. Se transmite por semillas contaminadas, restos vegetales contaminados o por la rizosfera de algunas plantas silvestres (Productores de Hortalizas, 2006) y puede ser confundida generalmente con la mancha bacteriana, causada por diferentes aislamientos de *Xanthomonas*, o con el tizón temprano, causada por *Alternaria solani* (OST, 20??).

##### **Síntomas:**

El síntoma más evidente son las manchas de color negro en la hoja, de 1- 2 mm de diámetro rodeadas de un halo color amarillo (Figura 3) que pueden extenderse llegando a matar al foliolo (Productores de Hortalizas, 2006). Estas manchas características son conocidas vulgarmente como “excremento de mosca” (Colombo, 2002).

La enfermedad puede suscitarse en etapas jóvenes como adultas, pero en estadios tempranos puede afectar gravemente los procesos de fotosíntesis resultando en defoliación y abscisión de flores (Guevara Black & Estrella Coello, 2008); también es común la presencia de manchas negras irregulares en tallo (Figura 3), peciolo y bordes de sépalos (Productores de Hortalizas, 2006).



**Figura 3.** Izquierda: hoja con mancha negra rodeada de halo amarillo; Derecha: mancha negra irregular en tallo joven de tomate.

**Fuente:** (InfoJardín, 2009), (Giménez Crespo, 2011).

#### **Agente Causal:**

La enfermedad es atribuida a *Pseudomonas syringae*, un bacilo gram negativo, no formador de esporas, aerobio, mótil debido a la presencia de flagelos y con un tamaño variable de 0,69-0,97 x 1,8-2,8  $\mu\text{m}$  (Burgos Torres, 2014). Esta bacteria presenta fluorescencia en medio King B y es positiva para las pruebas bioquímicas de catalasa, hidrólisis de almidón, licuefacción de la gelatina, reducción de nitrato, actividad arginina-dehidrolasa y producción de ácido a partir de sorbitol, manitol, inositol, eritritol y L-lactato (Milijasevic, Todorovic, Rekanovic, Potocnik, & Gabrilovic, 2009). Sus colonias tienen un aspecto blanquecino, con un buen crecimiento a las 48 horas y un rango de temperatura óptimo de 13 a 25°C y una humedad relativa del 80% (Cassanello, 2003).

Es importante mencionar que del género *Pseudomonas*, sólo las fitopatógenas están provistas de genes que codifican enzimas capaces de degradar la pared celular (Ramos, Goldberg, & Filloux, 2015), por lo tanto la especie *P. syringae* no es la excepción; pero a pesar de esto, Lawton y Bogatsevskaja en los años 1986 y 1989, respectivamente, reportaron

adicionalmente dos razas (0 y 1) dentro de esta especie por la aparición de variedades resistentes a híbridos de tomate heterocigotos (Milijasevic, Todorovic, Rekanovic, Potocnik, & Gabrilovic, 2009).

### **Manejo:**

Se aconseja trabajar con semillas certificadas y la eliminación de plantas enfermas y malezas alledañas que puedan transmitir el patógeno (Guevara Black & Estrella Coello, 2008); también los bactericidas químicos controlan la enfermedad aunque se debe tener cuidado con las dosis (Productores de Hortalizas, 2006).

Esta enfermedad no es tan devastadora pero si no se logra controlar, se puede optar por la rotación del cultivo (Cassanello, 2003).

#### **1.4.3.1.4. Marchitez Bacteriana**

### **Descripción:**

También conocida como “La podredumbre bacteriana” (Burgos Torres, 2014), es una enfermedad común en solanáceas aunque tiene una amplia variedad de hospederos. Antiguamente era confundida con *Erwinia carotovora*, especie bacteriana que causa síntomas similares, y no es hasta el año 2000 en adelante en que este microorganismo es identificado como el patógeno responsable (García R. , 2013).

### **Síntomas:**

En la primera etapa de la infección, se observa flacidez en las hojas más jóvenes, lo que posteriormente termina en una marchitez total de las hojas alledañas y con esto la progresiva muerte de la planta (Figura 4) (Guevara Black

& Estrella Coello, 2008) debido al taponamiento de los tejidos vasculares (García R. , 2013).



**Figura 4.** Muerte de cultivos de tomate por marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*.

**Fuente:** (Melgar, 2012).

La raíz no presenta síntomas visibles, pero el desarrollo y crecimiento de la planta se ve retrasado y en el caso de los frutos, estos no llegan a madurar o se desprenden fácilmente del pedúnculo (García, García, & Delgado, 1999).

#### **Agente Causal:**

Esta enfermedad es provocada por la invasión de *Ralstonia solanacearum*, antes denominada como *Pseudomonas solanacearum*. Esta bacteria es un bacilo gram negativo de 0,5-0,7 x 1,5-2,0 um, aeróbica, mótil al poseer de uno a cuatro flagelos polares (Guevara Black & Estrella Coello, 2008) y con un crecimiento óptimo en ambientes húmedos con una temperatura de 29 a 35°C, aunque puede soportar muy bien rangos que van desde 15 hasta 37°C (Cassanello, 2003). En medio YDC, las colonias son de color blanco cremoso, lisas y con bordes ligeramente irregulares; mientras que en medio TCZ son

blancas pero se observa una coloración rosada en el centro (García, García, & Delgado, 1999).

La identificación bioquímica puede estar dada por pruebas positivas para oxidasa, catalasa, reducción de nitratos, hidrólisis de esculina, hidrólisis de almidón y prueba de fluorescencia negativa en medio King B (Burgos Torres, 2014). La capacidad metabólica para utilizar diversas fuentes de carbono ha llevado a la subdivisión de la especie en seis Biovares (BV1, BV2, BV3, BV4, BV5 y BV6) y, en función del rango de hospederos, se han establecido cinco razas (R1, R2, R3, R4 y R5) siendo las razas 1 y 3 las más invasivas en tomate (Perea Soto, y otros, 2011).

#### **Manejo:**

Su amplia gama de hospedantes, así como su distribución y variabilidad, dificultan el control de esta enfermedad. El manejo de buenas prácticas culturales es el principal método preventivo; también destacan el uso de aceites derivados de plantas como el timol y la palmarosa que actúan como fumigantes naturales bajo invernadero (González, Arias, & Peteira, 2009).

#### **1.4.4. Bacteriófagos**

Los bacteriófagos o fagos son virus, parásitos obligados intracelulares que utilizan la maquinaria de su hospedero bacteriano para replicarse, logrando reducir de esta manera la “población blanco” (Prada Peñaranda, Holguín Moreno, González Barrios, & Vives Flores, 2015).

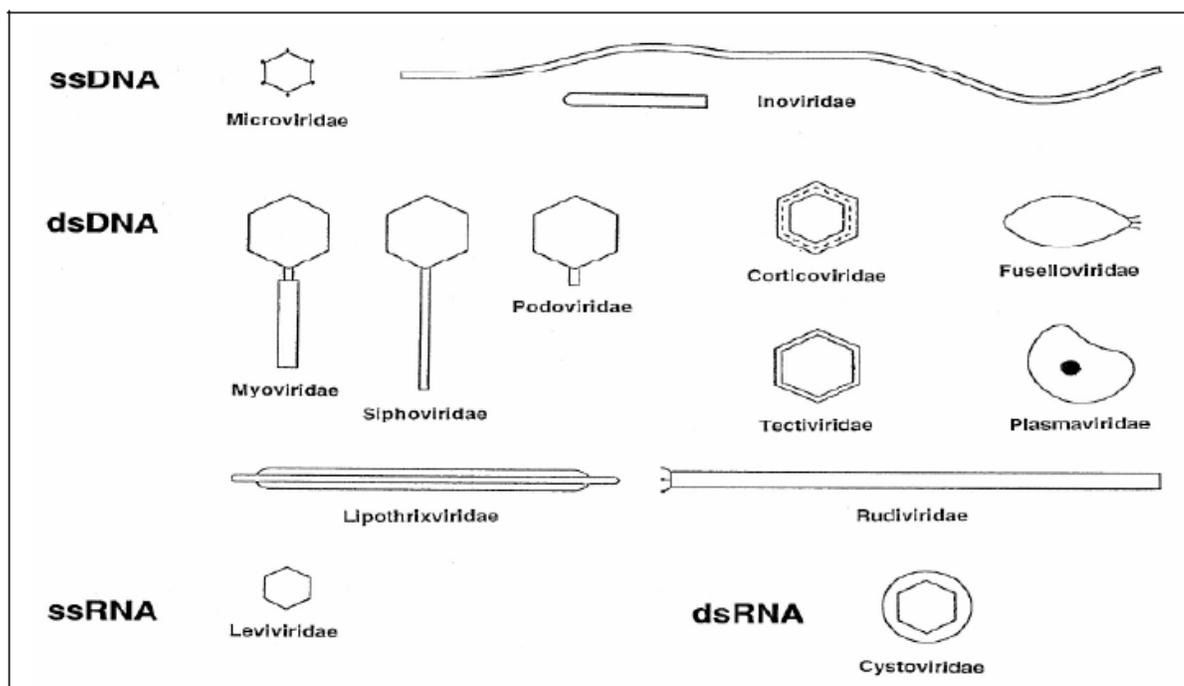
#### 1.4.4.1. Historia y Generalidades

El descubrimiento de estas entidades, específicamente para bacterias, se debe gracias al bacteriólogo inglés Frederick William Twort en 1915 y al científico franco-canadiense Felix d'Herelle en 1917, pero es este último quien reconoce la multiplicación del virus a expensas de la bacteria, llamándolo "bacteriófago" que viene del vocablo griego "fagein", que significa comer (Clokier & Kropinski, 2009).

Con la aparición de esta clase de virus, en la década de 1930, comienza la edad de oro de la virología y los científicos optan por utilizar fagos para el estudio de la morfología, genética y replicación viral (Clokier & Kropinski, 2009) por la relativa facilidad de manipulación del hospedador en el laboratorio (García Heredia, 2014).

En los años 1990 a 1996, la biotecnología comienza a explorar la terapia de fagos en el mundo occidental y entre los años 2002 y 2003 se realizó la primera fagoterapia para *Enterococcus* resistentes a vancomicina y *S. aureus* resistente a meticilina en ratones (Martins da Silva, 2011).

Desde entonces, hasta el año 2013, se han reconocido más de 5500 bacteriófagos entre cúbicos, con cola, filamentosos o pleomórficos (Ackermann, 2011) pertenecientes a 13 familias caracterizadas (Figura 5) y a 5 familias más pendientes de caracterizar, las mismas que se han dividido de acuerdo a los rasgos morfológicos, tipo de ácido nucleico e incluso la presencia o ausencia de cubierta (Herrero Sánchez, 2013).



**Figura 5.** Representación de las 13 familias descritas para bacteriófagos.

**Fuente:** (Martins da Silva, 2011).

De todos los bacteriófagos descritos, el 96% pertenece al orden *Caudovirales*, de estos, más del 60% son de la familia *Siphoviridae*, 25% de la familia *Myoviridae* o *Podoviridae* y el 4% restante es parte de las 10 familias restantes (Martins da Silva, 2011).

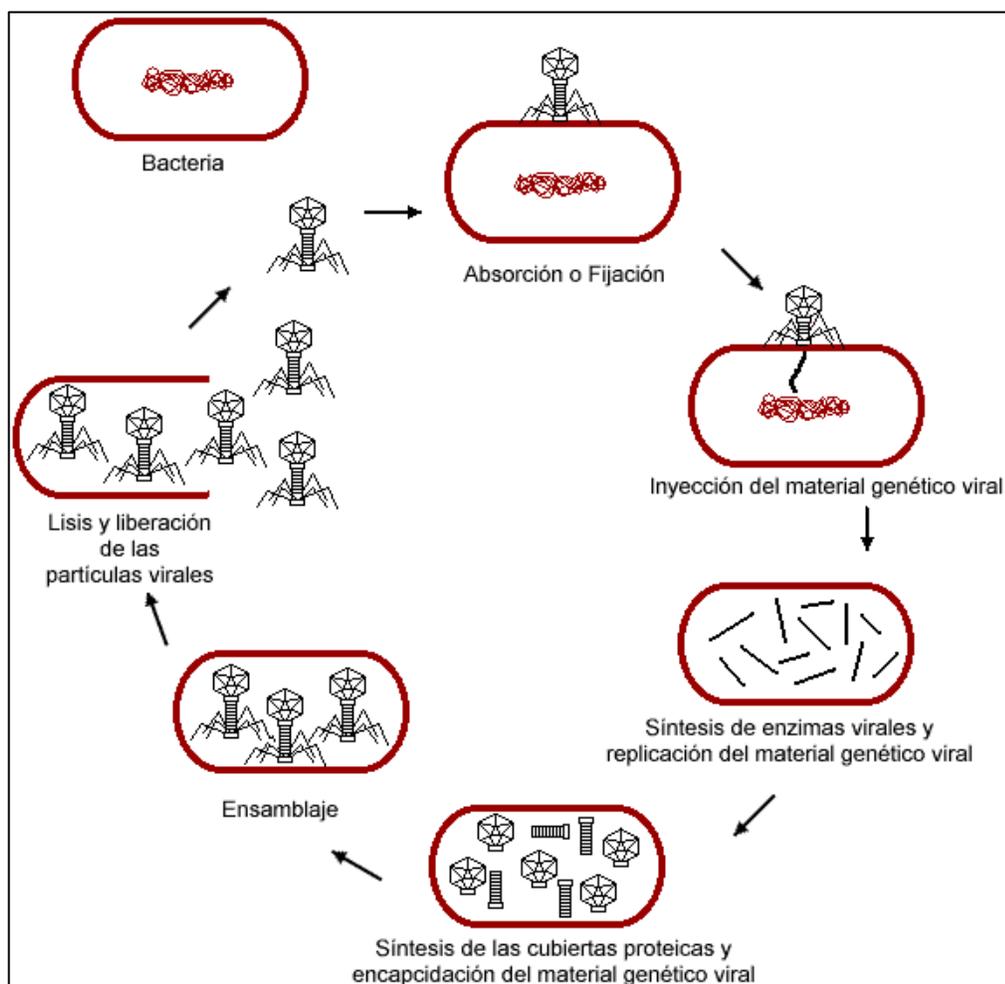
#### 1.4.4.2. Mecanismo de Acción

Las células bacterianas pueden ser infectadas por dos procesos virales: lítico o lisogénico y, de acuerdo al proceso dominante, los bacteriófagos son denominados fagos-T o fagos lambda, respectivamente (Todar, 2012); de estos, los de gran importancia para la fagoterapia son aquellos que cumplen un ciclo lítico (Chan, Abedon, & Loc-Carrillo, 2013).

El ciclo lítico inicia con la adsorción del fago a la bacteria susceptible. La adsorción ocurre en dos etapas, la primera reversible seguida de la irreversible. La interacción reversible es débil y alterable por cualquier cambio en el medio; la interacción irreversible es, por el contrario, mediada por estructuras o receptores específicos. Esta especificidad muestra que un fago sólo puede infectar las bacterias que tengan los receptores a los cuales el fago se pueda unir, lo que le confiere un potente control biológico contra un solo patógeno de interés (Prada Peñaranda, Holguín Moreno, González Barrios, & Vives Flores, 2015).

A continuación sucede la penetración. El fago inyecta su ADN en la célula bacteriana destruyendo parte de la pared celular con el empaquetamiento de lisozima en la base de la cola. No se sabe a ciencia cierta cómo el ADN penetra la membrana (Todar, 2012), pero al hacerlo, inmediatamente se apodera de la maquinaria celular de la bacteria y replica su material genético tanto como pueda para la transcripción y traducción de un segundo grupo de proteínas llamadas proteínas tardías, a esto se le conoce como la fase de eclipse (Rao, 2006). Paralelo a esto, se sintetizan también las enzimas necesarias para romper la pared celular en el momento de la liberación.

Por último, se realiza el ensamble de las proteínas para formar las nuevas partículas virales maduras que inmediatamente son liberadas por lisis celular y proceden a infectar células cercanas, completando el ciclo (Figura 6) (Todar, 2012).



**Figura 6.** Ciclo lítico de un bacteriófago (Sanchez Castillo , 2010).

#### 1.4.4.3. Fagoterapia

La fagoterapia se define como la aplicación de bacteriófagos para el control de bacterias patógenas (Kutter & Sulakvelidze, 2004) y ha venido practicándose por más de 90 años en países como EE.UU, Francia, Polonia, Georgia, Rusia y la antigua Alemania Oriental; sin embargo, con el auge de los antibióticos, esta técnica no logró extenderse sino hasta la actualidad que ha renacido el interés, principalmente en occidente (Prada Peñaranda, Holguín Moreno, González Barrios, & Vives Flores, 2015).

Las bacterias desarrollan diversos mecanismos de resistencia frente a los antibióticos y del mismo modo el antibiótico puede ser inactivado por mecanismos de sobrevivencia del microorganismo (Daza Pérez, 1998). El problema radica en que cada vez hay más cepas multi-resistentes pero menos tratamientos.

Por el contrario, los virus son altamente especializados y evolucionados, lo que les permite fabricar su propia defensa genética contra cualquier agente o molécula incluso antes que la bacteria. En el proceso de la infección, las bacterias no alcanzarían a desarrollar tal mecanismo puesto que basta únicamente que el virus esté adentro para que esta haya quedado inactiva genéticamente y sea destruida en su totalidad más adelante (Chan, Abedon, & Loc-Carrillo, 2013).

Se estima que la vida media de una partícula viral libre es de 48 horas. Centrándonos solo en ese lapso de tiempo, se generarían alrededor de  $10^{27}$  partículas cada minuto, lo que representa la muerte de  $10^{25}$  bacterias debido a la lisis (García Heredia, 2014). Este dato relevante proporciona una idea de la eficacia de los bacteriófagos eliminando la población bacteriana patogénica sin dañar el hospedero bacteriano, ya sea humano, animal, vegetal, medioambiental o también en algunos sectores de la industria, como la alimenticia (Hernández, Jiménez, & Reyes, 2011).

Los requisitos reunidos por Chan, et al. (2013) para el éxito experimental de la fagoterapia son:

- Los fagos deben ser únicamente líticos.
- Los fagos deben ser capaces de lisar cepas representativas de bacterias diana.
- Las preparaciones de fagos deben ser purificadas a un nivel apropiado para el modelo utilizado.

- Los modelos deben ser suficientemente representativos en aspectos relevantes del 'mundo real'.
- Poner a prueba las bacterias que muestran resistencia a los fagos, la retención de la patogenicidad y la relación genética con las bacterias inicialmente apuntadas.
- Las combinaciones de fagos deben ser probadas llegando a la optimización del cóctel.
- Evitar el contacto del fago con la bacteria durante la enumeración de las mismas.

#### 1.4.4.4. Aplicaciones y Biocontrol

La fagoterapia es considerada un método de control biológico efectivo que ha venido desarrollándose cada vez más como una tecnología prometedora (Hernández, Jiménez, & Reyes, 2011) en:

- ✓ Nuevas estrategias terapéuticas para el control de enfermedades bacterianas.
- ✓ Instrumento para detectar e identificar cepas bacterianas específicas.
- ✓ Preservación de alimentos.

Entre las publicaciones más recientes registradas del biocontrol con bacteriófagos, destacan: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Lysteria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium perfringes* y otros (Chan, Abedon, & Loc-Carrillo, 2013).

En plantas, la investigación con bacteriófagos no ha sido tan relevante, sin embargo existen reportes muy satisfactorios dirigidos a *Pectobacterium carotovorum* (Lim, et al., 2013) y *Pseudomonas syringae* (Frampton, y otros, 2014).

## CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Participantes

Este proyecto: Obtención de un coctel de bacteriófagos líticos para el control de bacteriosis en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) del cantón Ambato, provincia de Tungurahua, fue financiado por el Laboratorio de Virología-Inmunología de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE y por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

La colección de muestras fue facilitada por profesionales agropecuarios de INTEROC.

### 2.2. Zona de Estudio

#### 2.2.1. Campo

El muestreo se realizó en un invernadero del sector de Cunchibamba, cantón Ambato, provincia de Tungurahua, y cuyas coordenadas son: latitud 1.10351 (Sur), longitud 78.5968 (Oeste) y altitud 2540 msnm.

#### 2.2.2. Laboratorio

La investigación se realizó en el laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, ubicada en Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha.

### 2.3. Período de Investigación

El proyecto se realizó en un período de 7 meses, desde Marzo a Octubre del 2015.

### 2.4. Procedimiento

#### 2.4.1. Muestreo

Se escogió al azar un invernadero de la localidad y se procedió a recoger muestras de plantas con síntomas característicos de bacteriosis. Se recolectó frutos, hojas y tallos, los mismos que se etiquetaron y se almacenaron en un “cooler” hasta su procesamiento en el laboratorio.



**Figura 7.** Muestras de A) tallo, B) hoja y C) fruto de plantas de *Solanum lycopersicum* con síntomas de bacteriosis.

### 2.5.2. Aislamiento

Las muestras recolectadas fueron seleccionadas y cortadas en recipientes diferentes (Figura 8). Con la ayuda de un cepillo, y bajo agua corriente, se lavó cuidadosamente el material vegetal para retirar impurezas y saprófitos de la superficie.



**Figura 8.** Material vegetal seleccionado y cortado antes de la desinfección.

Se realizó una desinfección con NaClO (1%), Etanol (70%) y tres enjuagues con agua destilada estéril. Se dejó reposar 10 minutos en el agua del último enjuague y se sembró en medio agar nutritivo (AN) tanto el material vegetal como el agua que lo contenía, por separado, de cada recipiente. Se incubó a una temperatura de 28°C durante 48 horas.

Con la población bacteriana resultante se realizó una siembra por estriado en medio AN nuevo. Se realizó varias purificaciones de colonias aisladas hasta obtener cultivos puros.

### **2.5.3. Identificación Fenotípica**

Para la caracterización morfológica se observó directamente el color, aspecto y bordes de las colonias bacterianas aisladas en medio AN; mientras que para la identificación bioquímica, se realizaron las pruebas que se detallan en la Tabla 4, según Breed (1957) y Guevara (2008).

**Tabla 4.**

Pruebas empleadas para la identificación bioquímica de las cepas aisladas.

PRUEBA	MEDIO DE CULTIVO /		RESULTADO	
	REACTIVO		POSITIVO	NEGATIVO
<b>Gram</b>	Cristal violeta, lugol, safranina y alcohol acetona		Bajo el microscopio: azul o violeta	Bajo el microscopio: rosado
<b>Motilidad</b>	SIM		Difuminación de la bacteria hacia los lados	Crecimiento sólo en la línea de inoculación
<b>Fluorescencia</b>	King-B		Fluorescencia bajo luz UV	No fluorescencia
<b>Catalasa</b>	1 gota de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Formación de burbujas	Permanece igual
<b>Oxidasa</b>	Discos de oxidasa		Color púrpura	No hay cambio de color
<b>Indol</b>	SIM	2 a 3 gotas de reactivo de Kovac	Rojo (anillo)	Amarillo (anillo)
<b>H<sub>2</sub>S</b>	SIM		Negro	Permanece igual.
	Agar de Tres azucares y Hierro (TSI)		Negro	Permanece igual.
<b>Citrato</b>	Citrato Simmons		Azul	Verde
<b>Producción de gas</b>	Campana de Durham	Caldo Glucosa	Burbuja en la campana	No se produce burbuja
<b>Glucosa</b>	Caldo Glucosa (con Rojo Fenol)		Amarillo	Rojo
<b>Glucosa/Lactosa</b>	Agar de Tres Azucares y Hierro (TSI)		Utilización de glucosa (arriba) y lactosa (abajo): Am/Am	Utilización de peptonas: Rojo/Rojo

#### 2.5.4. Pruebas de Patogenicidad

Primero, se procedió a germinar semillas comerciales de *Solanum lycopersicum* en un frasco plástico transparente, humedecido con papel toalla y colocado bajo oscuridad.

A los cuatro días, se expusieron a luz manteniendo la humedad en el ambiente. A los diez días, con una altura aproximada de 3 a 4 cm, las plántulas fueron trasplantadas a envases plásticos con tierra abonada, dentro de un invernadero (Figura 9) con riego y humedecimiento diario del ambiente.

A la edad de dos meses y medio, las plantas fueron sometidas a nebulizaciones durante 24 horas para después ser inoculadas, de manera individual, con una suspensión bacteriana de  $1 \times 10^7$  UFC/ml (Guevara Black & Estrella Coello, 2008) en agua destilada estéril (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).



**Figura 9.** Plántulas de tomate de 3 semanas de edad, dentro del invernadero.

La infección se realizó por dos métodos. En el primero, realizado por inyección con la ayuda de una jeringa hipodérmica, se suministró de 0,5 a 1 mL de suspensión bacteriana debajo de una de las yemas axilares de la planta. En el segundo, por infiltración con el mismo material, se realizaron pequeñas heridas aleatorias en la hoja, al mismo tiempo que se dejaba liberar un poco de la suspensión (Figura 10). Se realizó lo mismo para el grupo control utilizando agua destilada estéril en lugar de la suspensión bacteriana.



**Figura 10.** Inoculación por punción de suspensión bacteriana en plantas sanas de *Solanum lycopersicum*.

Los síntomas fueron evaluados a los 15 y 30 días, tomando en cuenta cambios en las áreas infectadas así como posibles cambios a nivel sistémico.

Después de mostrados los síntomas, se recolectó material enfermo y se realizó el aislamiento e identificación del agente causal en medio del cultivo en medio AN (fenotípica), King-B (bioquímica), mencionados en los apartados

anteriores, y PCR (molecular), con el fin de completar los postulados de Koch (1881).

## **2.5.5. Identificación Molecular**

### **2.5.5.1. Extracción de DNA genómico bacteriano**

#### **2.5.5.1.1. A partir de cultivos bacterianos**

Siguiendo el procedimiento descrito por Recalde (2015), se tomó una colonia aislada de un cultivo bacteriano, inoculándola en caldo triptosa enriquecido con 10 mM de  $MgSO_4$  (caldo triptosa enriquecido) y se incubó a 28°C por 24 horas. Se colocó 1.5 mL del cultivo fresco en un tubo eppendorf de 2 mL, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante; en el mismo tubo, se agregó 1.5 mL de cultivo bacteriano y se resuspendió el pellet por pipeteo. Se realizó otra centrifugación con las mismas condiciones y se eliminó el sobrenadante. Se repitió este proceso hasta obtener una buena cantidad de bacteria o un pellet grande que nos dé suficiente DNA para la caracterización molecular.

Se hizo un lavado del pellet con 500 uL de buffer TE 1X, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió de nuevo el pellet con 200 uL de buffer y se sometió a un shock térmico en agua hirviendo (100°C) por 15 minutos, se transfirió a agua con hielo por 5 minutos y posteriormente, se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos.

En otro tubo eppendorf se colocó 54 uL de sobrenadante, se adicionó 6 uL de Proteinasa K (10 mg/mL) y se incubó en el termociclador siguiendo el protocolo de la Tabla 5.

**Tabla 5.**

Perfil térmico de incubación de la Proteínasa K para la extracción de DNA genómico bacteriano.

Estado	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
<b>Activación enzimática</b>	60	60
<b>Desnaturalización</b>	95	15
<b> Holding</b>	12	∞

#### **2.5.5.1.2. A partir de Material Vegetal**

Se recolectó 3 hojas enfermas, producto de la inoculación del microorganismo en el ensayo de patogenicidad, y se procedió a extraer el DNA con el kit “Wizard® Genomic DNA Purification Kit: Isolating Genomic DNA from Plant Tissue” siguiendo las recomendaciones del fabricante con ciertas modificaciones (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

#### **2.5.5.2. Cuantificación de DNA genómico bacteriano**

Se evaluó la concentración y calidad del DNA genómico con la ayuda de un NanoDrop 2000 Thermo Scientific. Se consideraron muestras de buena calidad aquellas con un ratio comprendido entre 1.8 y 2 en la medición con longitudes de onda 260/280 nm (Desjardins & Conklin, 2010), caso contrario las muestras fueron descartadas.

### 2.5.5.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la identificación molecular de la bacteria fitopatógica aislada, se amplificó una región conservada de la secuencia 16S rDNA del género *Pseudomonas* con el par de primers PsF/PsR. Adicionalmente, para identificar la especie y patovar del microorganismo, se amplificó el gen *hrpZ* que es altamente conservado entre *Pseudomonas* con el par de primers MM5F/MM5R, específicos para *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Los primers se describen en la Tabla 6.

**Tabla 6.**

Secuencias de los oligonucleótidos usados en la PCR para detectar aislados de *Pseudomonas* (género) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

Primer	Secuencias 5' → 3'	Tamaño del producto (pb)
MM5F	GAACGAGCTGAAGGAAGACA	527
MM5R	CAGCCTGGTTAGTCTGGTTA	
PsF	CTACGGGAGGCAGCAGTGG	150
PsR	TCGGTAACGTCAAACAGCAAAGT	

**Fuente:**

(Shenge, Stephan, Magabala, Mortensen, & Wydra, 2008) y (Purohit, Raje, & Kapley, 2003).

Para la reacción de PCR se utilizó GoTaq® Green Master Mix (Promega), la que contiene un buffer de reacción (pH 8.5), 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP, 3mM MgCl<sub>2</sub> y Taq polimerasa (Promega Corporation, 2012). Con un volumen final de reacción de 25 uL, se preparó la mezcla con los siguientes reactivos a concentración final, para los primers MM5F/MM5R: 10 uL de GoTaq 1X, 0.1 uL de primer “forward” 0.4 uM y 1 uL de primer “reverse” 0.4 uM, 12.9 uL de agua ultrapura grado reactivo y 1

uL de DNA genómico bacteriano de cada muestra a la misma concentración de extracción; y para los primers PsF/PsR: 10 uL de GoTaq 1X, 0.7 uL de cada primer “*forward*” y “*reverse*” 0.3 uM, 12.6 uL de agua ultrapura grado reactivo y 1 uL de DNA genómico bacteriano de cada muestra a la misma concentración de extracción. Adicionalmente, se trabajó con un control negativo que consistió en hacer la reacción con agua en lugar de DNA.

Las reacciones se llevaron a cabo en un equipo Bio-Rad C1000 Touch™ Thermal Cycler con los perfiles térmicos que se detalla en las Tabla 7 y 8.

**Tabla 7.**

Perfil térmico utilizado para la amplificación de la región conservada de la secuencia 16S rDNA para el género *Pseudomonas*.

Estado	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	95°C	5 min	
<b>Desnaturalización</b>	94°C	30 s	
<b>Alineamiento</b>	57.5°C	30 s	35
<b>Extensión</b>	72°C	30 s	
<b>Extensión final</b>	72°C	5 min	
<b> Holding</b>	4°C	∞	

La visualización de los productos de PCR se realizó en gel de agarosa 1,5% (p/v), al que se agregó colorante SYBR® Safe DNA Gel Stain (invitrogen) en una relación de 0,05 uL/mL. La corrida del DNA en el gel se realizó en una cámara electroforética horizontal Bio-Rad Sub-Cell® GT Cell con solución buffer TBE 1X preparada a partir de una solución stock TBE 10X elaborada con Tris base 1M, ácido bórico 1M, y EDTA 0,02M ajustado a pH 8 en agua destilada.

**Tabla 8.**

Perfil térmico utilizado para la amplificación del gen *hrpZ* para *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

Estado	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	94°C	5 min	
<b>Desnaturalización</b>	94°C	30 s	
<b>Alineamiento</b>	58°C	45 s	35
<b>Extensión</b>	72°C	1 min	
<b>Extensión final</b>	72°C	5 min	
<b> Holding</b>	4°C	∞	

En cada pocillo del gel se cargó directamente 6,5 uL de producto de PCR y en el primer pocillo 5 uL de 100bp DNA Ladder (100 – 3,000bp) (Labnet) como marcador molecular para verificar el tamaño del amplicón. La corrida de electroforesis se realizó a 100 V durante 55 minutos en condiciones de oscuridad.

Transcurrido este tiempo, se observó los resultados de la amplificación en el gel bajo luz UV con la ayuda de un transiluminador Biodoc-it™ System. Finalmente, el resultado se fotodocumentó para su posterior análisis.

## **2.5.6. Aislamiento de Bacteriófagos**

### **2.5.6.1. Curva de Crecimiento Bacteriano**

Se midió la densidad óptica (OD) de un cultivo bacteriano de 24 horas en 5 mL de caldo triptosa, en un espectrofotómetro, a 600 nm. Con dicho cultivo, se ajustó un matraz, con 60 mL del mismo medio de cultivo, a una absorbancia entre 0.01 y 0.08 UA, con la siguiente fórmula:

$$V_1 = \frac{OD_2 * V_2}{OD_1}$$

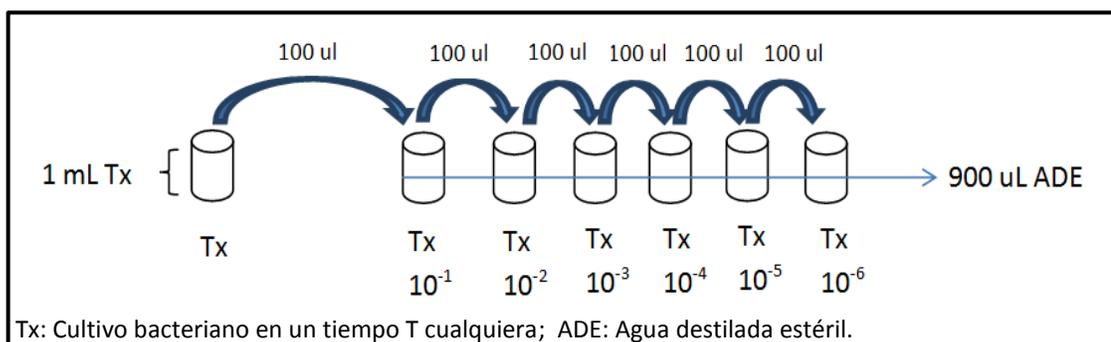
Donde:

OD<sub>1</sub>= absorbancia del cultivo bacteriano de 24 h.

OD<sub>2</sub>= absorbancia a ser ajustada.

V<sub>2</sub>= Volumen de trabajo.

Se tomó 1mL del matraz y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Mientras se realizaba la manipulación, se continuó incubando el matraz a 28°C y con 100 uL del volumen tomado se realizó diluciones seriadas desde 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-6</sup> en 900 uL de agua destilada estéril (ADE) (Figura 11). Después, se midió la absorbancia de los 900 uL restantes del cultivo (T0).



**Figura 11.** Esquema de dilución bacteriana para la curva de crecimiento.

Con 100 uL de la última dilución se realizó una siembra en cajas Petri con agar nutritivo (AN) distribuyendo sobre toda la superficie con la ayuda de una varilla de vidrio y se incubó a 28°C durante 48 horas.

A las dos horas de incubación, se volvió a tomar 1 mL del cultivo del matraz y se repitió el mismo procedimiento mencionado anteriormente. Se repitió esto (T1, T2, T3, T4, T5, ..., Tn) hasta alcanzar una absorbancia igual o menor al último valor máximo registrado.

A las 48 horas de incubación, se contabilizaron el número de colonias por caja Petri y se obtuvo el número real de unidades formadoras de colonias en cada dilución, con la fórmula:

$$UFC = \frac{\text{Colonias por caja}}{10^{-x} \cdot v}$$

Donde:

UFC= unidades formadoras de colonias.

x= número de dilución sembrada.

v= Volumen de bacteria diluida añadido a la caja.

### **2.5.6.2. Enriquecimiento de Bacteriófagos**

Primero, se realizó un proceso de pre-enriquecimiento de la siguiente manera:

En un frasco plástico estéril de 100 mL se colocó 4 g de muestra de suelo fresco, 1 mL de cultivo bacteriano de 48 horas y 25 mL de caldo triptosa enriquecido; se incubó a 28°C durante 48 horas.

Pasado el tiempo de incubación, se transfirió el contenido del frasco a un tubo Falcon de 50 mL y se centrifugó a 4000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se tomó 7 mL de sobrenadante y junto con 1 mL de cultivo bacteriano fresco de 48 horas y 25 mL de medio de cultivo nuevo, se colocó en un frasco plástico nuevo y se incubó a 28°C por otras 48 horas; después, se volvió a transferir el

contenido a un tubo Falcon de 50 mL y se repitió la centrifugación. Se recolectó 10 mL de sobrenadante y se hizo pasar por filtros de 0.4 y 0.2  $\mu\text{m}$ .

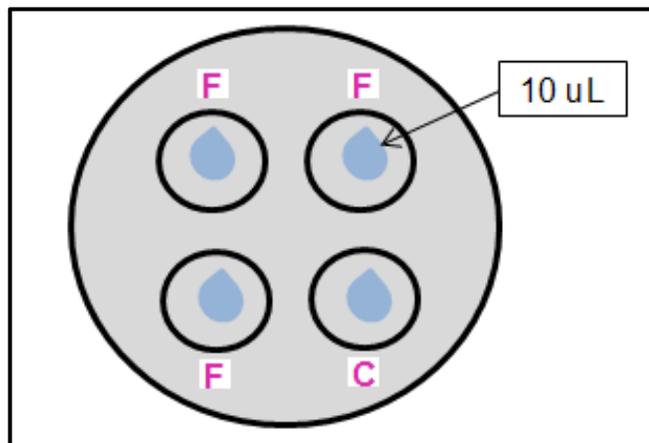
A continuación, para el proceso de enriquecimiento, se inocularon 3 caldos triptosa de 5 mL con 10  $\mu\text{L}$  de cultivo bacteriano fresco y se incubó a 28°C durante 15 horas. Al cabo de ese tiempo, se midió la OD a 600 nm de los cultivos y se colocó 5 mL de filtrado en el primer tubo, 5 mL de ADE en el segundo tubo (control) y nada en el tercero (cultivo fresco del día siguiente). Se incubó a 28°C y pasado las 24 horas se midió de nuevo la absorbancia de los 3 tubos para analizar el efecto de reducción bacteriana.

Se realizaron continuos enriquecimientos hasta obtener una disminución significativa de la OD del tubo con filtrado con respecto al control.

### **2.5.6.3. Prueba de Spot Test**

La confirmación de la presencia de bacteriófagos se realizó con la prueba de spot test. En cajas Petri con medio Agar Nutritivo, se colocó 100  $\mu\text{L}$  de cultivo bacteriano de 24 horas, se distribuyó por toda la superficie con la ayuda de un triángulo de vidrio y se dejó reposar por 30 minutos.

Después, se dibujaron cuatro círculos medianos en la base de la caja Petri y se colocó 10  $\mu\text{L}$  de filtrado de fagos en tres de los cuatro casilleros, mientras que en el cuarto círculo se colocó 10  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril como un control (Figura 12).



**Figura 12.** Esquema de distribución de filtrado de fagos (F) y ADE (C) en prueba de Spot Test.

Se dejó reposar en ambiente estéril por otros 30 minutos y se llevó a incubar a 28°C por 24 horas.

#### 2.5.6.4. Ensayo de Doble Capa

Para la titulación viral se tomó 100 uL de filtrado de fagos y se realizó diluciones seriadas desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-8}$  en tubos eppendorf con 900 uL de ADE. Posteriormente se tomó 100 uL de cultivo bacteriano fresco y 100 uL de cada dilución serial y se mezcló con 2.5 mL de agar blando (agar triptosa 0.4%) mantenido en baño maría a 50°C.

Se vertió cada suspensión sobre cajas Petri conteniendo agar triptosa 1.5% y se extendió uniformemente por toda la superficie con ligeros movimientos circulares. Se mantuvo a temperatura ambiente hasta que el agar solidifique por completo y se llevaron a incubación a 28°C durante 24 horas.

Al día siguiente, se contaron los puntos claros donde no hubo crecimiento tomando a cada uno de ellos como una unidad formadora de placa (UFP), y con el fin de minimizar el error, se tomaron en cuenta las cajas con 1 a 100 placas. El título viral se calculó con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{UFP}}{\text{ml}} = \frac{\text{Número de placas}}{\text{d.v}}$$

Donde:

d= dilución

v= volumen de virus diluido añadido a la caja

#### **2.5.6.5. Descripción Morfológica**

La morfología de los bacteriófagos se analizó por microscopía electrónica. Se realizó una previa centrifugación y filtración de la suspensión madre de fagos, es decir la más concentrada, como se detalla en los apartados anteriores, para asegurar la limpieza y claridad de la muestra. Después, se extrajo una alícuota de 0,5 uL del filtrado y se realizó una tinción con PTA al 2% a pH 5. Se llevó la muestra al microscopio electrónico de transmisión (TEM) y se observó con magnificación 37000.

## CAPÍTULO III: RESULTADOS

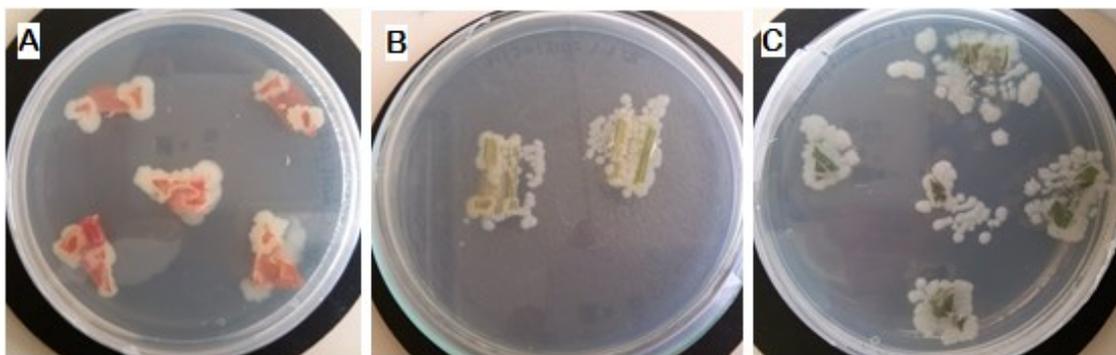
### 3.1. Aislamiento

Muestras vegetales con síntomas que señalaban fuertemente la presencia de bacteriosis se suspendieron en agua después de la desinfección. Se aisló un agente bacteriano, denominado temporalmente “B” que mostró predominancia en el material vegetal sembrado en medio AN (Tabla 9) (Figura 13).

**Tabla 9.**

Presencia de bacteria “B” aislada como resultado de la introducción del material vegetal muestreado con síntomas de bacteriosis.

Origen	Tipo de muestra	Presencia de Bacteria B
Fruto deforme con hundimientos	Muestra vegetal	Si
	Agua	No
Fruto normal con pequeñas costras	Muestra vegetal	Si
	Agua	No
Tallo joven con mancha oscura	Muestra vegetal	Si
	Agua	Si
Tallo adulto, grueso, con mancha oscura	Muestra vegetal	Si
	Agua	Si
Hoja con mancha oscura	Muestra vegetal	Si
	Agua	No



**Figura 13.** Visualización clara de la presencia de bacteria “B” en fruto (A), tallo (B) y hoja (C) de tomate, en medio AN.

### 3.2. Identificación Fenotípica y Bioquímica

De los cultivos puros aislados, se observó un crecimiento bacteriano óptimo sólo después de 48 horas de incubación a 28°C. Las características morfológicas y bioquímicas obtenidas (Anexo 1) se resumen en la Tabla 10.

**Tabla 10.**

Características fenotípicas y bioquímicas para la bacteria "B" aislada a partir de *Solanum lycopersicum*.

<b>Prueba / Característica</b>	<b>Bacteria B</b>
<b>Color</b>	blanco
<b>Bordes</b>	ligeramente irregular
<b>Crecimiento a 37°C</b>	-
<b>Tinción Gram</b>	-
<b>Morfología</b>	bacilo
<b>Motilidad</b>	+
<b>Fluorescencia</b>	+
<b>Catalasa</b>	+
<b>Oxidasa</b>	-
<b>Indol</b>	-
<b>H<sub>2</sub>S</b>	-
<b>Citrato</b>	+/-
<b>Producción de gas</b>	-
<b>Glucosa</b>	+
<b>Lactosa</b>	+

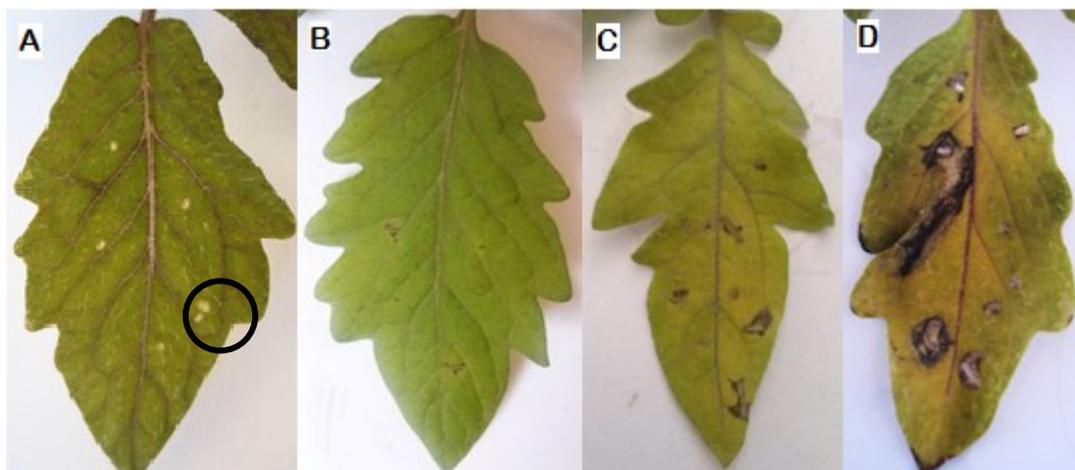
(+): Resultado positivo; (-): Resultado negativo

### 3.3. Postulados de Koch

Los primeros días, después de la inoculación de la suspensión bacteriana, no hubieron cambios significativos a nivel local o sistémico. A partir del quinto día, se observaron pequeñas manchas negras rodeadas de una coloración amarilla en las hojas, mientras que en el tallo se observó una coloración verde más clara, de tipo acuosa e irregular, ambas en el lugar de la lesión.

A los 10 días, los síntomas se mostraron más marcados. En el caso de la hoja, las manchas se expandieron y en el caso del tallo, ya se diferenció una macha debajo de la yema axilar de un color verde más intenso con bordes negros.

Finalmente, a los 15 días, las manchas presentes en ambos órganos se observaron de un color negro definido, irregulares, y en un estado de expansión considerable (Figura 14 y 15). En el grupo control se comprobó la ausencia de síntomas patogénicos

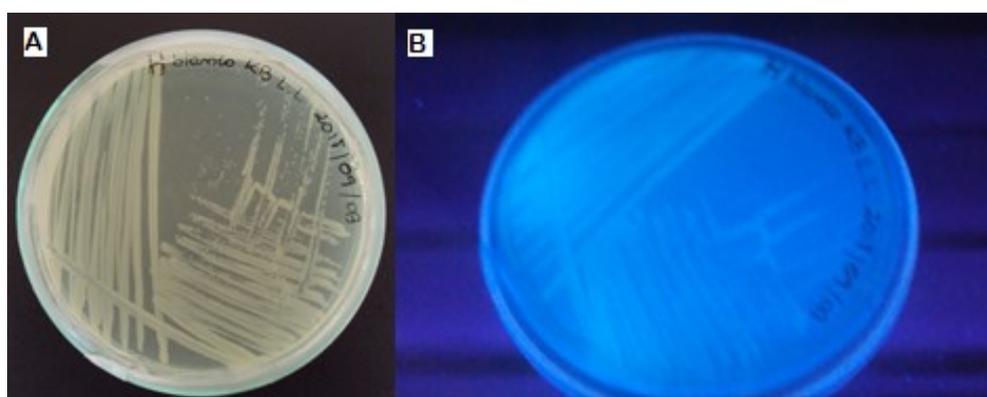


**Figura 14.** Hoja control (A) y evolución de la sintomatología en hoja causada después de la inoculación de la bacteria "B" a los 5 (B), 10 (C) y 15 (D) días.



**Figura 15.** Tallo control (A) y evolución de la sintomatología en tallo causada después de la inoculación de la bacteria “B” a los 5 (B), 10 (C) y 15 (D) días.

El reisolamiento del microorganismo mostró tener las mismas características fenotípicas en medio AN y dio una reacción positiva para fluorescencia en agar King-B (Figura 16).



**Figura 16.** Bacteria “B” reaislada a partir de hoja en medio King-B (A) y vista bajo luz UV (B).

### 3.4. Identificación Molecular

#### 3.4.1. Extracción y Cuantificación de DNA genómico bacteriano

Se obtuvieron 3 diferentes muestras de DNA con las que se trabajó: **B.**- Bacteria “B” aislada inicialmente de invernaderos de *Solanum lycopersicum* de la localidad de Cunchibamba, **BH.**- Bacteria reaislada a partir de las plantas del ensayo de los postulados de Koch, y **H.**- DNA bacteriano extraído directamente de la hoja con sintomatología a los 15 días del ensayo de los postulados de Koch. Los resultados de la cuantificación de la cantidad de DNA y su pureza se detallan en la Tabla 11.

**Tabla 11.**

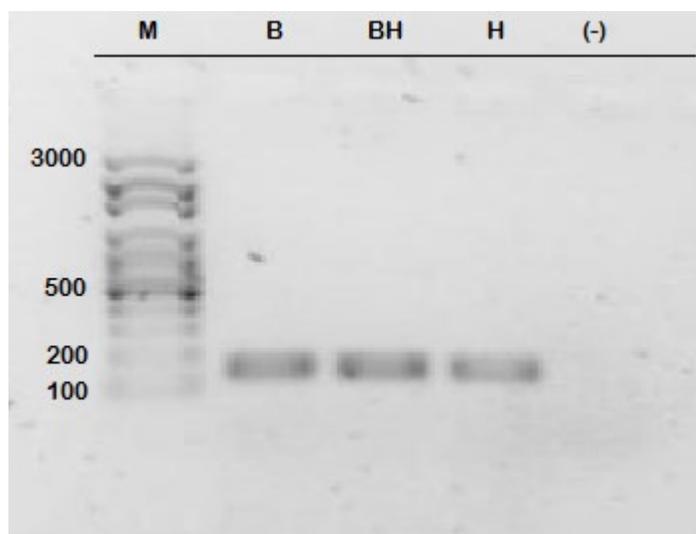
Cuantificación de la concentración de DNA genómico y su pureza.

Muestra	Concentración Ácido Nucleico (ng/ul)	260/280
<b>B</b>	532.3	1.80
<b>BH</b>	224.5	2.02
<b>H</b>	520.4	1.83

\*B: DNA bacterias aislamiento original; BH: DNA bacterias re-aisladas de ensayo de patogenicidad; H: DNA total de plantas infectadas con bacterias.

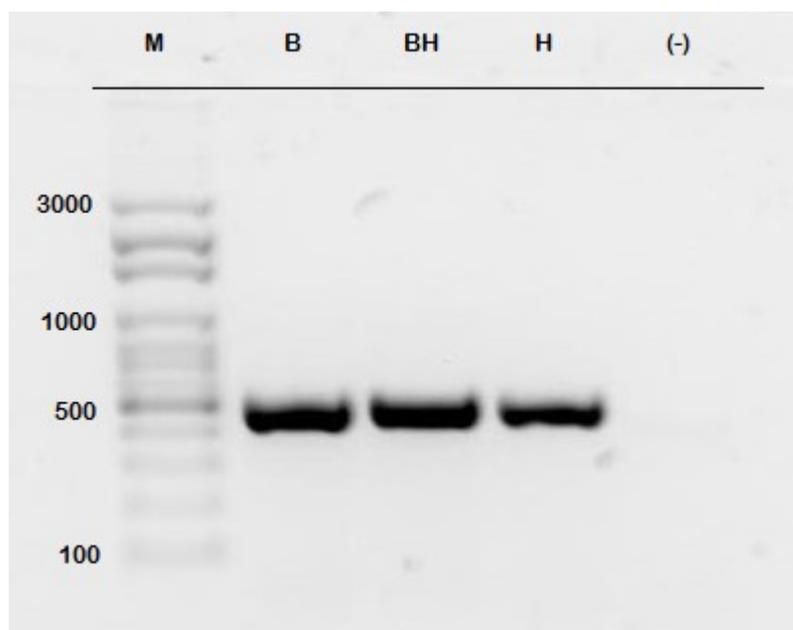
#### 3.4.2. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Los productos de PCR obtenidos de la amplificación de las muestras descritas en el apartado anterior, fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%. La presencia de bandas del tamaño de 150 pb, pertenecientes a la región conservada para *Pseudomonas* confirma el género del fitopatógeno (Figura 17).



**Figura 17.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los productos amplificados por PCR de la región conservada de la secuencia 16S rDNA para el género *Pseudomonas* con el par de primers PsF/PsR. Muestras: (B) DNA bacterias aislamiento original, (BH) DNA bacterias re-aisladas de ensayo de patogenicidad, (H) DNA total de plantas infectadas con bacterias, (M) 100pb ladder y (-) control negativo.

Además, la aparición de bandas de aproximadamente 500pb, confirma la presencia del gen *hrpZ* que identifica la presencia del microorganismo *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en las plantas muestreadas (Figura 18).



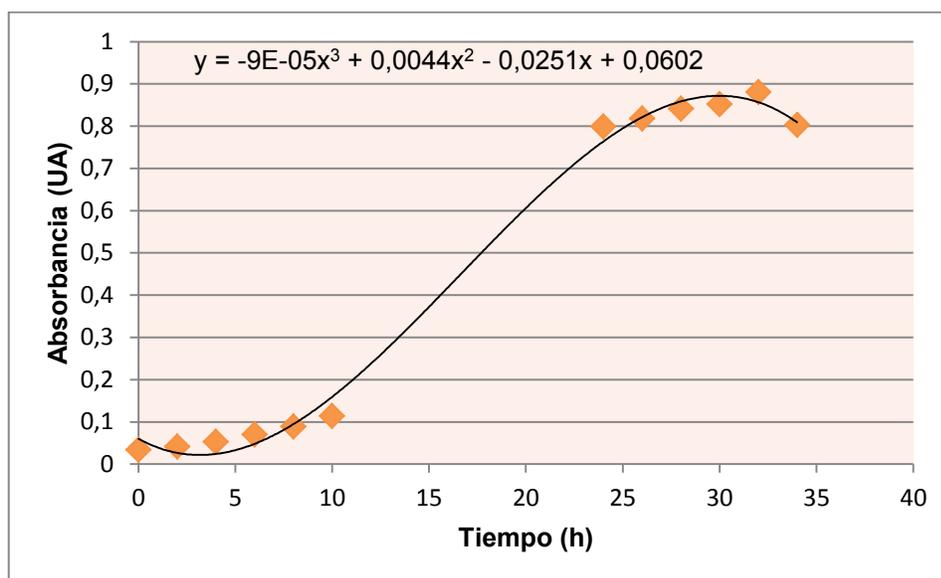
**Figura 18.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los productos amplificados por PCR del gen *hrpZ* para *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* con el par de primers MM5F/MM5R. Muestras: (B) DNA bacterias aislamiento original, (BH) DNA bacterias re-aisladas de ensayo.

### 3.5. Aislamiento de Bacteriófagos

#### 3.5.1. Curva de crecimiento

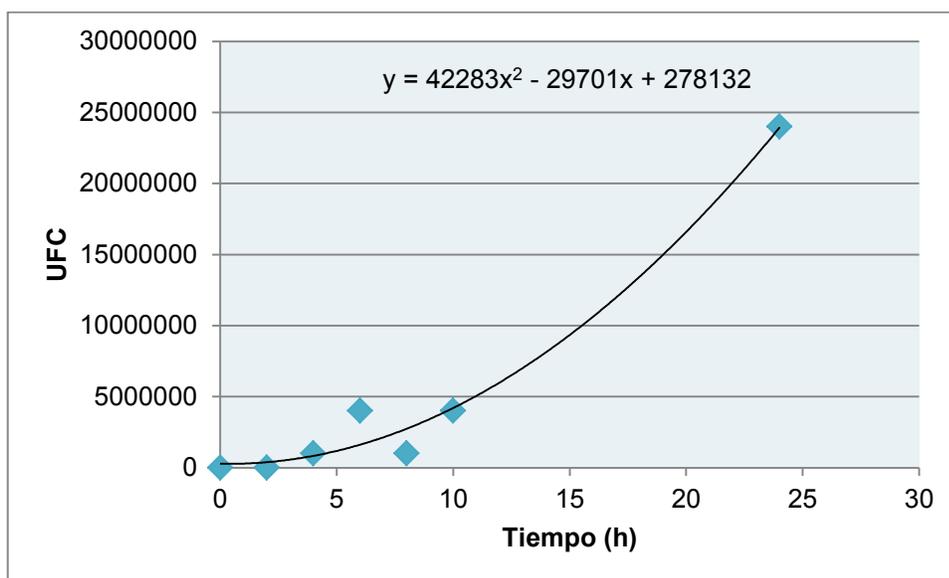
Con una OD inicial de 0.034 UA, se obtuvo una curva de crecimiento aproximada hasta las 34 horas de incubación a 28°C.

La fase exponencial de la bacteria empieza a las 10 horas y culmina a las 25 horas, tiempo en que la OD deja de mostrar un aumento lineal y comienza a detener su división. La absorbancia máxima registrada en el ensayo fue de 0.880 UA (Figura 19).



**Figura 19.** Curva de crecimiento para bacterias aisladas de plantas con sintomatología de pudrición en tomate. Absorbancia vs. Tiempo.

El número de unidades formadoras de colonias (UFC) no fue tan consistente con el pasar del tiempo; sin embargo, a partir de las 25 horas, el conteo de colonias fue considerado como “incontable”. Con la ecuación obtenida en la Figura 20, se puede obtener el número de UFC, aproximado, en un tiempo cualquiera hasta la finalización de la fase exponencial.

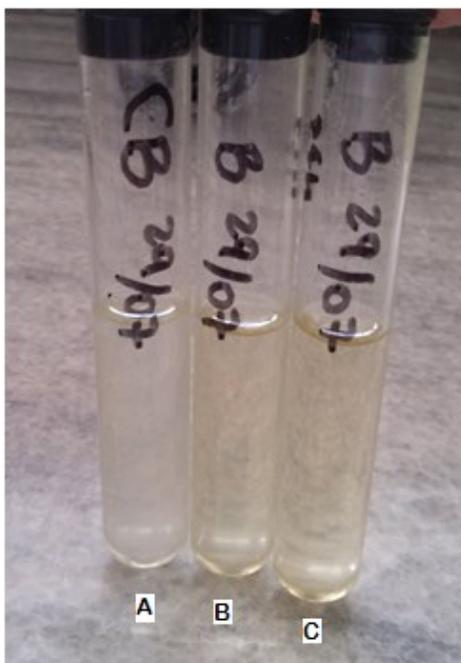


**Figura 20.** Velocidad de proliferación para bacterias aisladas de plantas con sintomatología de pudrición en tomate. UFC vs. Tiempo.

### 3.5.2. Obtención de bacteriófagos

De acuerdo a los resultados de la curva de crecimiento, el aislamiento de bacteriófagos se realizó con cultivos bacterianos de 15 horas de incubación, tiempo en que los microorganismos se encontraban en fase logarítmica, con una OD entre 0.136 y 0.240 UA.

Pasadas las 24 horas de incubación de las bacterias con el filtrado de fagos, los valores de absorbancia disminuyeron mientras que el del cultivo control, sin fagos, aumentó (Tabla 12) (Figura 21). Se evidenció un porcentaje de reducción bacteriana satisfactorio, con un valor máximo de 79.29%.



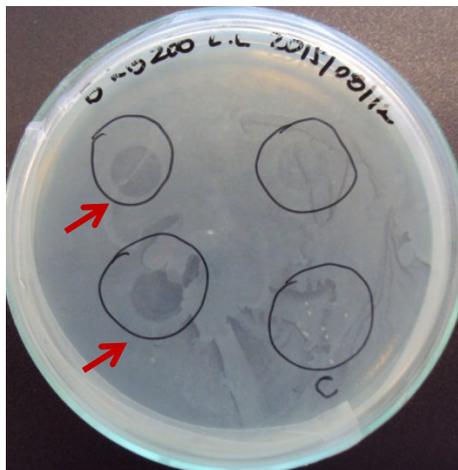
**Figura 21.** Cultivo de 24 horas de crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en medio triptosa: A) control sin fagos, B) y C) con filtrado de fagos.

**Tabla 12.**

Valores de OD y porcentaje de reducción bacteriana tras cada enriquecimiento (E).

E	OD Filtrado Fago	OD Control	OD reducido	Reducción bacteriana (%)
1	0.047	0.277	0.230	79.29
2	0.104	0.224	0.120	53.57
3	0.046	0.167	0.121	64.94
4	0.052	0.111	0.059	53.15

Una vez concluido este procedimiento, la presencia de bacteriófagos se vio confirmada con la formación de halos de lisis en la prueba de spot test (Figura 22). El control mostró crecimiento bacteriano normal.



**Figura 22.** Halos de lisis en pocillos con filtrado de fagos en prueba de Spot Test.

### 3.5.3. Título Viral

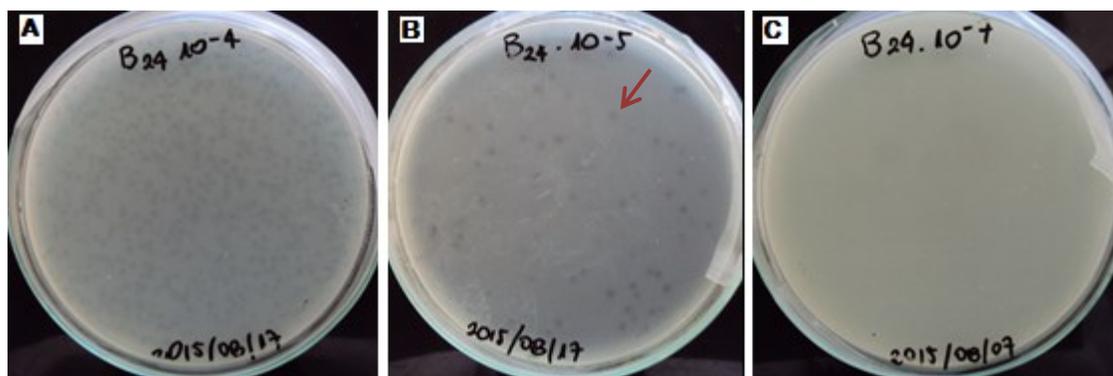
Al realizar el ensayo de doble capa, se obtuvo un título viral de fagos de  $3 \times 10^7$  UFP/mL, con placas que iban desde 1 a 1,5 mm (Figura 23B). Se consideraron como contables aquellas cajas con un número de placas menor a 100.

En las primeras cinco diluciones, el número de placas fue incontable y en la última dilución no hubo placas. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 13.

**Tabla 13.**

Valores obtenidos en la titulación de bacteriófagos mediante ensayo de doble capa.

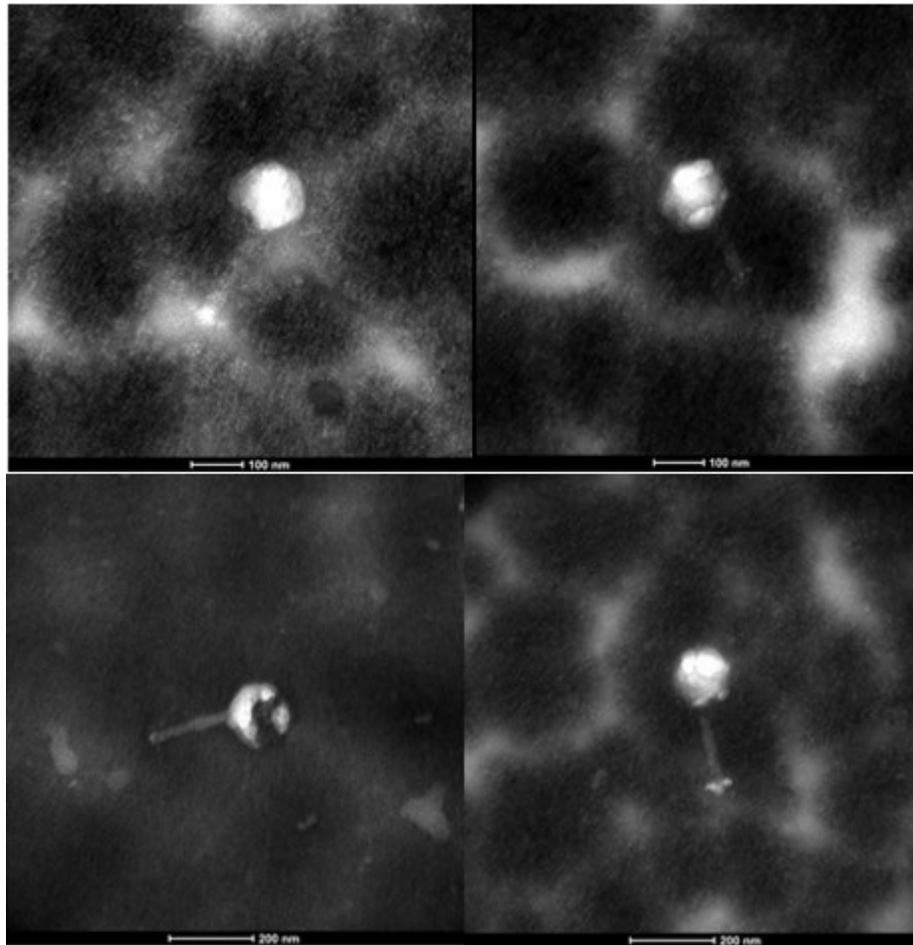
Dilución	Placas/caja	UFP/mL
$10^{-1} - 10^{-4}$	incontable	incontable
$10^{-5}$	61	$61 \times 10^6$
$10^{-6}$	3	$3 \times 10^7$
$10^{-7} - 10^{-8}$	0	-



**Figura 23.** Ensayo de doble capa. (A) Dilución  $10^{-4}$ , número de placas incontable. (B) Dilución  $10^{-5}$ , número de placas contable. (C) Dilución  $10^{-7}$ , ausencia de placas.

### 3.5.4. Descripción Morfológica

En los concentrados de bacteriófagos analizados en el TEM, se encontró bacteriófagos de una sola morfología que consta de cabeza icosaédrica, cola, placa basal y posiblemente fibras (Figura 24).



**Figura 24.** Micrografías de microscopía electrónica de transmisión de bacteriófagos que infectan a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, encontrados en los filtrados concentrados. Se diferencian la cabeza icosaédrica, la cola y la placa basal.

## CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) se ve afectado por enfermedades bacterianas cuya propagación en ambientes como invernaderos puede ser devastadora. Órganos de plantas con síntomas de “bacteriosis” se colectaron en un invernadero de la localidad de Cunchibamba, para el aislamiento e identificación morfológica, bioquímica y molecular del agente bacteriano fitopatógeno causante de la enfermedad.

En el aislamiento, el crecimiento bacteriano se mostró similar para el caso de tallos, hojas y frutos. La misma bacteria se observó en el 70% de las muestras, lo que nos permitió suponer que se trataba del posible patógeno. El color blanco característico y bordes ligeramente irregulares de las colonias en Agar Nutriente, así como su lento crecimiento y gram negativa, descartó bacterias fitopatógenas más comunes del tomate del género *Xanthomonas*, *Clavibacter* y *Ralstonia*, apuntando únicamente a especies del género *Pseudomonas* (Cassanello, 2003).

El perfil metabólico obtenido concuerda con aquel descrito por Breed (1957) para estas bacterias, con resultados positivos para motilidad, citrato y fermentación de glucosa y lactosa, y con resultados negativos para producción de indol, H<sub>2</sub>S y gas. Adicionalmente, la producción de fluorescencia bajo luz ultravioleta en medio King-B (Ramírez, Castaño, & López, 2009), así como la presencia de bandas del tamaño de 150 pb para la región conservada de la secuencia 16S rDNA del género *Pseudomonas* (Purohit, Raje, & Kapley, 2003), permitió reafirmar la presencia de dicho género bacteriano.

Según Guevara (2008), las especies de *Pseudomonas* que causan bacteriosis en tomate son *P. corrugata* y *P. syringae*, esta última con los patovares *tomato* y *syringae*. La diferenciación bioquímica entre ambas especies radica en que *P. corrugata* no produce fluorescencia en agar

*Pseudomonas* y es oxidasa positiva (Zainsoft, 2015), contrario a lo que sucede con *P. syringae* para estas pruebas, como lo menciona Rivera & Castaño (2011) y que concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio.

Más adelante, los postulados de Koch comprobaron la patogenicidad de la bacteria causando manchas oscuras parecidas a las de las plantas muestreadas tanto en hojas como en tallo, en un período de 15 días. La sintomatología concuerda con la enfermedad del tomate denominada “Mancha negra” (bacterial speck) causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Castilla Prados, 2007), en la que las manchas en las hojas se muestran como lesiones negras con bordes amarillos llegando a necrosar el tejido y secarlo parcial o completamente. En el tallo también se forman manchas cloróticas que se tornan oscuras pero que frecuentemente son más alargadas (Blancard, 2011).

En el reisolamiento del microorganismo, se realizó únicamente la prueba de fluorescencia en medio selectivo King-B dando una reacción positiva, hecho que fue comprobado después con la identificación molecular.

Los primers MM5F y MM5R, específicos para *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, probados en las muestras descritas en el capítulo anterior, amplificaron bandas del tamaño aproximado de 500 pb, lo que resulta similar con los resultados reportados por Shenge (2008) que obtuvo un tamaño de bandas de 527 pb para el gen *hrpZ* de esta especie. Con esta prueba discriminatoria, se corroboran los datos obtenidos hasta el momento sobre el fitopatógeno y se cumplen los postulados de Koch.

Los bacteriófagos por su parte, se aislaron a partir de suelo proveniente de cultivos de tomate. Se obtuvo un título viral de  $3 \times 10^7$  UFP/mL con un cultivo microbiano de 15 horas de incubación. La posible razón por la que el título no fue tan alto como en otros reportes, puede ser debido a que los cultivos bacterianos superaron las 0.097 UA antes de cada enriquecimiento, valor

referencial recomendado por Alvarado (2013), el cual asegura tener mejor rendimiento del título trabajando con tales condiciones.

Con respecto a las placas observadas en el ensayo de doble capa, estas fueron siempre circulares y muy individualizadas, con diámetros generalmente de 1 a 1.5 mm. El tamaño de las placas es uniforme, característica no muy frecuente comparado, por ejemplo, con aquellos obtenidos para *Vibrio cholerae* que van desde 1 hasta 9 mm (Talledo, Gutiérrez, Merino, & Rojas, 1998) o para *Salmonella enteritidis* y *Salmonella infantis* que van desde 0.5 hasta 7 mm (Quiroz, 2015), cocteles mucho más variados y posiblemente compuestos de varios tipos de fagos que hay que seleccionar posteriormente. Esta dimensión, según Dini (2011), nos indica el alcance de un solo virus en el organismo huésped, llevándonos de nuevo a recalcar la importancia del título viral, es decir la cantidad de cápsulas producidas (partículas virales) en el caso de tener tamaños de placa pequeños como en este caso. Por otro lado, se comprobó la eficacia de la lisis bacteriana con un porcentaje máximo de 79.29%, por lo que se puede asegurar que los bacteriófagos son funcionales.

En otro punto, aún se desconoce el motivo por el cual los fagos mostraron menor reducción de OD bacteriano tras cada enriquecimiento, pero por la experiencia adquirida de la autora en la realización de esta investigación, se sugiere ampliar más el estudio con respecto a las condiciones de conservación de los bacteriófagos a corto plazo, aparte de la ausencia de luz y temperaturas bajas (4°C) (Clokier & Kropinski, 2009).

Finalmente, los análisis en el TEM, mostraron una morfología común en todos los virus observados, la cual consta de una cabeza icosaédrica, cola y placa basal. Frampton (2014), en su reporte de bacteriófagos para *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, describe los mismos rasgos morfológicos de los fagos, encontrados también en suelo, dentro del orden *Caudovirales*, y que, de acuerdo a la descripción detallada del mismo, se sugiere que aquellos

encontrados en este estudio pertenecen a la familia *Myoviridae*. Estos bacteriófagos se caracterizan por poseer un genoma con DNA de doble cadena, ausencia de envoltura viral en la cápside y cola corta; además, los fagos que hasta el momento han sido clasificados dentro de esta familia (*T4*, *T2*, *P1*, *P2*, *Mu*, *SPO1*,  $\phi H$ ) (Villalba, Martos, & García, 200?), han mostrado un ciclo de infección exclusivamente lítico, lo que les confiere una posible garantía de que la bacteria no desarrolle resistencia al presentarse ciclos lisogénicos alternados, como lo asegura Romero (2015).

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

El análisis metabólico y molecular de la bacteria aislada coincidió con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, por lo tanto, se concluye que la bacteriosis reportada en cultivos de *Solanum lycopersicum* en la localidad de Cunchibamba, provincia de Tungurahua, es causada por tal microorganismo y corresponde a la enfermedad comúnmente llamada “mancha negra”.

El fitopatógeno mostró síntomas claros de la enfermedad en tallo y hojas a los 15 días de haber entrado en contacto con la planta y así mismo mantuvo sus características después de ser reaislado, cumpliendo de esta manera los postulados de Koch.

Se obtuvo un coctel de bacteriófagos líticos con un título viral de  $3 \times 10^7$  UFP/mL, con placas de diámetros de entre 1 y 1.5 mm, que mostraron controlar y detener la proliferación bacteriana patogénica tanto en medios líquidos como sólidos.

El análisis de microscopía electrónica reveló una morfología homogénea de la población de fagos en el coctel, los cuales pertenecen al orden *Caudovirales* y están dentro de la familia *Myoviridae*, formados por cabeza icosaédrica, cola contráctil y placa basal con fibras.

## CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

Es importante mantener los bacteriófagos en condiciones de oscuridad y bajas temperaturas para un almacenamiento a corto plazo, incluyendo enriquecimientos continuos para mantener el título viral, o en tal caso, es necesario seguir con los estudios de optimización, mantenimiento y almacenamiento.

Se recomienda probar rango de huéspedes de los bacteriófagos obtenidos para conocer el alcance del control biológico, especialmente con los demás fitopatógenos bacterianos más frecuentes de *Solanum lycopersicum*.

Se deberían realizar estudios de caracterización molecular y purificación de los bacteriófagos, acompañada del desarrollo de técnicas de conservación a largo plazo con el fin de obtener un producto biotecnológico funcional.

Como perspectivas futuras, se sugiere llevar a cabo ensayos de biocontrol a pequeña, mediana y gran escala en plantas de tomate probando también técnicas de suministro en los cultivos.

## CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA

- AAIC. (2003). *El cultivo de tomate riñón en invernadero (Solanum lycopersicum)*. Asociación de Agrónomos Indígenas del Cañar, Cañar.
- Ackermann, H. (Mayo de 2011). *Under the Microscope*. Recuperado el 8 de 9 de 2015, de [http://microbiology.publish.csiro.au/?act=view\\_file&file\\_id=MA11090.pdf](http://microbiology.publish.csiro.au/?act=view_file&file_id=MA11090.pdf)
- Admin. (18 de Diciembre de 2014). *Avance Biotechnologies*. Recuperado el 8 de Agosto de 2015, de <http://www.avancebt.com/es/curacion-cancro-tomates/>
- Alvarado Jasso, G. M. (2013). *Identificación de algunos factores que afectan la interacción jitomate-Ralstonia solanacearum-bacteriófago ITL-1*. Tesis de Maestría, Yautepec - México.
- Argerich, C., & Gaviola, J. (n.d.). *Manual de Producción de Semillas Hortícolas*. Argentina.
- Blancard, D. (2011). *ENFERMEDADES DEL TOMATE*. Madrid, España: Mundi-Prensa Libros.
- Breed, R., Murray, E., & Smith, N. (1957). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Séptima ed.). Baltimore, EE.UU: The Williams & Wilkins Company.
- Burgos Torres, D. A. (2014). *Identificación, caracterización y control del agente causal de la enfermedad "Mancha negra del tallo", que ataca al tomate de mesa (Solanum lycopersicum), bajo condiciones de invernadero*. Tesis de grado, Universidad Central de Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas, Quito.

- Carrillo Fasio, J. A., Sánchez Bautista, L., García Estrada, R. S., Allende Molar, R., & Márquez Zequera, I. (2001). Razas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye. presentes en el Estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19(2), 248-250.
- Carrillo Fasio, J. A., Sánchez Bautista, L., García Estrada, R. S., Allende Molar, R., & Márquez Zequera, I. (2001, Diciembre). Razas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye. Presentes en el Estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19(2), 248-250.
- Cassanello, M. E. (2003). Algunas Enfermedades del Tomate: Problemática Fitosanitaria. *Protección Vegetal Hortícola*.
- Castellanos, G., Jara, C., & Mosquera, G. (n.d.). *Guías Prácticas de Laboratorio para el Manejo de Patógenos del Frijol*. Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Castilla Prados, N. (2007). *Invernaderos de plástico: Tecnología y Manejos* (Segunda Edición ed.). Madrid, España: Mundi-Prensa Libros.
- Chan, B., Abedon, S., & Loc-Carrillo, C. (2013). Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiology*, 8(6), 769 - 783.
- Clokie, M., & Kropinski, A. (2009). *Bacteriófagos: Métodos y Protocolos*. Humana Press.
- Colombo, M. (2002). *MANEJO DE ENFERMEDADES EN CULTIVOS PROTEGIDOS DE TOMATE*. Manual, INTA - Estación Agropecuaria Bella Vista, Centro Regional Corrientes.
- CONABIO. (2009). *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*. Recuperado el 8 de Agosto de 2015, de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/lycopersicon->

esculentum/fichas/ficha.htm#5.%20Biolog%C3%ADa%20y%20ecolog%C3%ADa

- Daza Pérez, R. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 22(3), 57 - 67.
- Desjardins, P., & Conklin, D. (22 de 11 de 2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. (45).
- Dini, C. (2011). *Aislamiento y caracterización de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Departamento de Ciencias Biológicas. .
- Elizondo Pastén, R. (n.d.). Enfermedades fungosas y bacterianas del tomate en la zona de Arica y su manejo. *Proyecto Eliminación Bromuro de Metilo - Componente Tomates*, (p. 37).
- Escalona, V., Alvarado, P., Monardes, H., Urbina, C., & Martin, A. (2009). *MANUAL DE CULTIVO DE TOMATE (Lycopersicon esculentum Mill.)*. (N. Hortícola, Ed.) Chile.
- Frampton, R., Taylor, C., Holguín, A., Visnovsky, S., Petty, N., Pitman, A., & Fineran, P. (Abril de 2014). Identification of Bacteriophages for Biocontrol of the Kiwifruit Canker Phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. (H. Goodrich-Blair, Ed.) *Applied and Environmental Microbiology*, 80(7), 2216 - 2228.
- García Heredia, I. (2014). *Aproximación al Estudio de Bacteriófagos Ambientales de Medios Acuáticos. (I) Halofagos de un cristalizador de una salina solar. (II) Fagos de la bacteria marina Alteromonas macleodii*. . Tesis Doctoral, Universidad Miguel Hernández de Elche, Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC), San Juan.

- García, R. (2013). Enfermedades Bacterianas Asociadas a Solanáceas y en Especial *Ralstonia solanacearum* en Tubérculo de Papa. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31.
- García, R., García, A., & Delgado, L. (1999). MARCHITEZ BACTERIANA DEL TOMATE CAUSADA POR EL BIOVAR 2 A, DE *Ralstonia solanacearum* EN ALGUNAS LOCALIDADES DEL ESTADO MERIDA-VENEZUELA. *Revista Forestal Venezolana*, 43(2), 183 - 189.
- Giménez Crespo, G. (14 de Diciembre de 2011). (Plantilla Awesome Inc.) Recuperado el 9 de Agosto de 2015, de <http://morethanagrower.blogspot.com/2011/12/primeros-ataques-de-pseudomona-syringae.html>
- González, I., Arias, Y., & Peteira, B. (2009). INTERACCIÓN PLANTA-BACTERIAS FITOPATÓGENAS: CASO DE ESTUDIO *Ralstonia solanacearum*- PLANTAS HOSPEDANTES. *Revista de Protección Vegetal*, 24(2), 69 - 80.
- Guevara Black, T. F., & Estrella Coello, N. M. (2008). *Determinación y caracterización de enfermedades bacterianas del tomate riñón (Lycopersicon sculentum), cultivado bajo invernadero en doce áreas de la cordillera central del Ecuador*. Tesis de grado, Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, IASA, Sangolquí.
- Guevara Black, T. F., & Estrella Coello, N. M. (2008). *Determinación y caracterización de enfermedades bacterianas del tomate riñón (Lycopersicon sculentum), cultivado bajo invernadero en doce áreas de la cordillera central del Ecuador*. Tesis de grado, Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, IASA, Sangolquí.
- Hernandez Meoro, P., & Pastor Manzano, J. (n.d.). *El Tomate, su cultivo y sus enfermedades*. Murcia, España.

- Hernández, R., Jiménez, Z., & Reyes, P. (Julio-Septiembre de 2011). Aplicación de Bacteriófagos en Alimentos. *RESPYN: Revista Salud Pública y nutrición*, 12(3).
- Hernansaez Meoro, P., & Pastor Manzano, J. (n.d.). *El Tomate, su cultivo y sus enfermedades*. Murcia, España.
- Herrero Sánchez, M. E. (2013). *Evaluación de bacteriófagos y bacteriocinas para la eliminación de Listeria monocytogenes*. Tesis de Maestría, Universidad de Oviedo, Oviedo - España.
- InfoJardín. (15 de Junio de 2009). *InfoJardín*. Recuperado el 9 de Agosto de 2015, de <http://www.infojardin.com/foro/showpost.php?p=2543870&postcount=11>
- Kutter, E., & Sulakvelidze, A. (2004). *Bacteriophages: Biology and Applications*. EE.UU: CRC Press.
- Lim, J., Jee, S., Lee, D., Rho, E., Jung, K., Oh, C., & Heu, S. (2013, Agosto). Biocontrol of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Using Bacteriophage PP1. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(8), 1147 - 1153.
- López Montes, J. (n.d.). *Manual de Buenas Prácticas Agrícolas del Cultivo de Tomate (Lycopersicon esculentum Mill)*. (U. Universidad Politécnica de Nicaragua, Ed.) Managua, Nicaragua.
- MacFaddin, J. F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica* (Tercera Edición ed.). Uruguay: Editorial Médica Panamericana.
- Martins da Silva, E. M. (2011). *Aplicaciones de la terapia con bacteriófagos como control microbiológico*. Tesis de Especialización, Universidad Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciencias Biológicas, Belo horizonte.

- Melgar, J. (2012). *MARCHITEZ BACTERIANA EN SOLANÁCEAS: SU RECONOCIMIENTO Y MANEJO INTEGRADO*. Manual, Fundación Hondureña de Investigación Agrícola, La Lima - Honduras.
- Milijasevic, S., Todorovic, B., Rekanovic, E., Potocnik, I., & Gabrilovic, V. (2009). Races and hosts of *Pseudomonas syringae* pv. tomato in Serbia. *61*(1), 92 - 102.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (1991). El Tomate. En D. G. Agrícola. (Ed.), *Aspectos Técnicos sobre Cuarenta y Cinco Cultivos Agrícolas de Costa Rica*. San José, Costa Rica.
- NeoFronteras. (2010 , Marzo 1). *NeoFronteras*. Retrieved Julio 16, 2015, from <http://neofronteras.com/?p=3025>
- Orna Chávez, Á. R. (2009). *Evaluación del efecto de la aplicación de micorrizas en la producción de tomate riñón (Solanum lycopersicum) bajo invernadero*. Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, Facultad de Recursos Naturales, Riobamba.
- OST. (20??). *The Ohio State University*. Recuperado el 9 de Agosto de 2015, de Department of Plant Pathology: <http://u.osu.edu/vegetablediseasefacts/files/2014/05/pecaBacterianaDelTomate01-1vn4x6i.pdf>
- Perea Soto, J. M., García Estrada, R. S., Allende Molar, R., Carrillo Fasio, J. A., León Félix, J., Valdez Torres, B., & López Soto, F. S. (2011). Identificación de Razas y Biovares de *Ralstonia solanacearum* Aisladas de Plantas de Tomate. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *29*(2), 98 - 108.
- Pérez Rosero, M. (2010). *MEJORAMIENTO GENÉTICO EN Solanum lycopersicum PARA LA RESISTENCIA AL PASADOR DEL FRUTO Neoleucinodes elegantalis Gueneé (Lepidoptera:Crambidae)*. Tesis de

maestría, Universidad nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Palmira.

Polanco Jácome, C. H. (2011). *Uso de alternativas de reemplazo a los ditiocarbamatos en la prevención de phytophthora infestans causante del tizón tardío en el cultivo de tomate riñón (Solanum lycopersicum), cultivado a campo abierto en el sector de Cuambo, cantón Ibarra*. Tesis de grado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), Ibarra.

Prada Peñaranda, C., Holguín Moreno, A. V., González Barrios, A. F., & Vives Flores, M. J. (2015). Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. Perspectivas en Colombia. (A. Acosta, Ed.) *Universitas Scientiarum*, 20, 43-59.

Productores de Hortalizas. (2006). *Plagas y enfermedades del Tomate*. Meister Media Worldwide.

Promega Corporation. (2012). *GoTaq® Green Master Mix Product*. Information Sheet, USA.

Purohit, Raje, & Kapley. (22 de Mayo de 2003). Identification of signature and primers specific to genus Identification of signature and primers specific to genus. *BMC Bioinformatics*, 19(4).

Quiroz, E. (2015). *Aislamiento y caracterización de bacteriófagos líticos específicos para Salmonella spp. aisladas de aves de corral*. Tesis de Pregrado, Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Sangolquí.

Rahaman, M., Rahaman, M., Rahaman, M., Khan, M., Hossen, M., Parvej, M., & Ahmed, S. (2014). Poultry Salmonella Specific Bacteriophage Isolation and Characterization. *Bang. J. Vet. Med*, 107-114.

- Ramírez, L. A., Castaño, S. M., & López, R. (2009). Identificación de Bacterias que afectan el establecimiento in vitro de segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth. *Revista de Investigaciones Universidad del Quindío*(19), 151-158.
- Ramírez, L. A., Milena Castaño, S., & López, R. (2009). Identificación de Bacterias que afectan el establecimiento in vitro de segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth. *Revista de Investigación de la Universidad del Quindío*(19), 151-158.
- Ramos, J. L., Goldberg, J., & Filloux, A. (2015). *Peudomonas* (Vol. 7). London, Sevilla, Virginia, UK, España, EE.UU: Springer.
- Rao, S. (Junio de 2006). *BACTERIOPHAGE*. Recuperado el 9 de Agosto de 2015, de <http://www.microrao.com/micronotes/bacteriophage.pdf>
- Recalde, J. (2015). *Aislamiento y caracterización de Salmonella en aves de corral utilizando pruebas bioquímicas y moleculares*. Tesis de grado, Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Sangolquí.
- Rivera Hoyos, L. D., & Castaño Zapata, J. (Marzo de 2011). ETIOLOGÍA DE LA MUERTE DESCENDENTE DEL DURAZNERO [PRUNUS PERSICA (L.) BATSCH] EN LOS MUNICIPIOS DE MANIZALES Y VILLAMARÍA, DEPARTAMENTO DE CALDAS. *Revista Académica Colombiana de Ciencia*, 35(134), 61-69.
- Rojas Linares, L. (2014). *Control biológico del Cáncer Bacteriano Clavibacter michiganensis susp. michiganensis con dos cepas de Bacillus subtilis en Tomate Solanum lycopersicum Mill. Variedad Cherry y Saladette In Situ*. Tesis de Grado, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología, Coahuilla - México.

- Romero, J. (Junio de 2015). Fagoterapia: Alternativa para el control de enfermedades bacterianas. *Technical Report*, 3.
- Sanchez Castillo , J. (14 de Septiembre de 2010). *Biología Médica*. Recuperado el 9 de Agosto de 2015, de <http://biologiamedica.blogspot.com/2010/09/los-virus-ciclo-litico-y-lisogenico.html>
- Sanjuan Lara, F., Ramírez Vallejo, P., Sánchez García, P., Livera Muñoz, M., Sandoval Villa, M., Carrillo Rodríguez, J., & Perales Segovia, C. (Abril-Junio de 2014). Variación en características de interés agronómico dentro de una población nativa de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37(2).
- Schultz, D., & French-Monar, R. (19 de Septiembre de 2011). Mancha Bacteriana del Tomate y el Pimiento. (L. Serrato, Ed.) *AgriLife Extension*.
- Seebold, K. (2006). Bacterial Canker of Tomato. *Plant Pathology Fact Sheet*.
- Sepúlveda, G., Salvatierra, R., Sandoval, C., & Gonzáles, R. (2013, Mayo-Agosto). First report of tomato bacterial canker *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato crops in Arica. *IDESIA*, 31(2), 99-101.
- Shenge, K., Stephan, D., Magabala, R., Mortensen, C., & Wydra, K. (2008, Agosto). Molecular Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Isolates from Tanzania. *Phytoparasitica*, 36(4), 338-351.
- Sosa, M. A. (2013). *Guía para el Reconocimiento de Enfermedades en Cultivos de Tomate* (primera ed.). El Colorado, Formosa, Argentina.
- Talledo, M., Gutiérrez, S., Merino, F., & Rojas, N. (Diciembre de 1998). DETECCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE BACTERIÓFAGOS INDICADORES DE *Vibrio cholerae*. *Revista Peruana de Biología*, 5(2).

- Todar, K. (2012). *TODAR'S TEXTBOOK OF BACTERIOLOGY*. Recuperado el 9 de Agosto de 2015, de [http://textbookofbacteriology.net/phage\\_2.html](http://textbookofbacteriology.net/phage_2.html)
- UBA. (2015). *Mancha Bacteriana*. Obtenido de Facultad de Agronomía - Universidad de Buenos Aires: <http://www.agro.uba.ar/users/romeroa/Sintomas.htm>
- Villalba Torres, J. A., Martos López, C. M., & García Asensio, M. J. (20??). *Bacteriófagos y la Terapia Fágica*.
- Villalba, J. A., Martos, C. M., & García, M. J. (200?). *Bacteriófagos y la Terapia Fágica*.
- Young. (2015). *Fitodiagnóstico*. Retrieved Julio 16, 2015, from <http://www.fitodiagnostico.com/Elemento/d924262ad89249278a4c4c396d6b73a8>
- Zainsoft. (2015). *FitoDiagnóstico*. Recuperado el 10 de Octubre de 2015, de <http://www.fitodiagnostico.com/Elemento/68031f0ac8324979973985d3447b2b38>