



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

Montatixe Llangari, Pamela Michelle

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de Titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Dr. Gavilanes Quizhpi, Alvaro Petronio M. Sc.

09 de agosto del 2022



[Enviar a copyleaks.docx](#)

Scanned on: 15:22 August 9, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	20
Words with Minor Changes	0
Paraphrased Words	35
Omitted Words	0

ALVARO
PETRONIO
GAVILANES
QUIZHPI

Firmado
digitalmente por
ALVARO PETRONIO
GAVILANES QUIZHPI
Fecha: 2022.10.09
21:01:08 -0500

Dr. Gavilanes Quizhpi, Alvaro Petronio M. Sc.

C.C: 0102778586



Website | Education | Businesses



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: "Patogenicidad y taxonomía de bacterias pectolíticas asociadas a pudriciones blandas en cultivos solanáceos andinos" fue realizado por la señorita **Montatixe Llangari, Pamela Michelle**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 09 de agosto de 2022



Dr. Gavilanes Quizhpi, Alvaro Petronio. MSc.

C.C: 0102778586



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Montatixe Llangari, Pamela Michelle**, con cédula de ciudadanía No. **1724199334**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: "**Patogenicidad y taxonomía de bacterias pectolíticas asociadas a pudriciones blandas en cultivos solanáceos andinos**" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 09 de agosto de 2022

Montatixe Llangari, Pamela Michelle

C.C: 1724199334



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Montatixe Llangari Pamela Michelle**, con cédula de ciudadanía No. **1724199334**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: "**Patogenicidad y taxonomía de bacterias pectolíticas asociadas a pudriciones blandas en cultivos solanáceos andinos**" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 09 de agosto del 2022



Montatixe Llangari, Pamela Michelle

C.C: 1724199334

Dedicatoria

A Dios, a mis padres, Consuelo y Gonzalo, por su amor y entrega incondicional en cada etapa de mi vida.

A mi abuelita Magdalena, por ser mi compañera en todo momento.

A mi amiga Katherine, por su apoyo, cariño y amistad.

A mis mascotas, por permanecer a mi lado.

Pamela Michelle

Agradecimientos

A Dios, por guiar mis pasos y permitirme culminar esta etapa con salud y rodeada de las personas que más quiero.

A mi madre Consuelo, por ser un ejemplo de tenacidad y entrega, que me ha enseñado que, con esfuerzo y dedicación, se cumplen todos los objetivos planteados.

A mi padre Gonzalo, por ser mi apoyo incondicional a lo largo de mi vida, por enseñarme que, con amor y paciencia, todo se puede lograr.

A la Doctora María Luisa Insuasti, jefa del Departamento de Protección Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), por impartirme sus conocimientos, consejos y brindarme el apoyo necesario para realizar mi proyecto de titulación.

Al Doctor José Ochoa e Ingeniera Judith Zapata, por su colaboración y orientación en la parte agronómica. Al Ingeniero Pablo Llumiquinga e Ingeniera Yolanda Leiton, por su cordialidad, tiempo y ayuda en el desarrollo del proyecto en la parte molecular y estadística. A la señora Elizabeth por cooperar en el mantenimiento de los invernaderos y ayuda en el laboratorio.

Al Doctor Petronio Gavilanes, director de mi tesis, por su tiempo y colaboración, para que el proyecto de titulación culmine de manera satisfactoria.

A mis amigas, Katherine, Gabriela, Andrea, Abigail, Elizabeth, Massiel y Karen; por ser incondicionales, brindarme su amistad, conocimientos y formar parte de esta aventura.

A mi familia por hacer parte de este camino. Muchas gracias.

Índice de contenidos

Índice de Tablas	11
Índice de Figuras	12
Resumen	13
Abstract	14
Capítulo I: Introducción	15
Planteamiento del Problema	15
Justificación e Importancia	16
Área de Influencia	17
Objetivos	18
<i>Objetivo General</i>	18
<i>Objetivos Específicos</i>	18
Hipótesis	18
Capítulo II: Marco Teórico.....	19
Papa	19
<i>Taxonomía y origen</i>	19
<i>Características Botánicas</i>	20
<i>Importancia del Cultivo en el Ecuador</i>	20
Tomate de Árbol	21
<i>Características Taxonómicas</i>	21
<i>Características Botánicas</i>	22
<i>Importancia del Cultivo en el Ecuador</i>	23
Naranjilla.....	23
<i>Características Taxonómicas</i>	23
<i>Características Botánicas</i>	24
<i>Importancia del Cultivo en el Ecuador</i>	25
Bacterias Fitopatógenas.....	26
Bacterias Pectolíticas	26
<i>Mecanismo de Patogenicidad</i>	27
<i>Dyckeya</i>	28
<i>Erwinia</i>	29
<i>Pectobacterium</i>	29
<i>Pseudomonas</i>	30

<i>Clostridium</i>	30
<i>Pantoea</i>	30
Métodos para la Identificación de Bacterias	31
<i>Pruebas Bioquímicas</i>	31
<i>Técnicas Moleculares</i>	31
Región de Interés para la Identificación de Bacterias.....	32
Pruebas de Patogenicidad	33
Capítulo III: Materiales y Métodos.....	34
Ubicación	34
Materiales	34
<i>Material Vegetal</i>	34
<i>Material Biológico</i>	35
Métodos.....	36
<i>Procesamiento de Muestras</i>	36
Prueba de Patogenicidad	36
<i>Aislamiento de Bacterias</i>	37
<i>Inoculación bacteriana</i>	38
<i>Reaislamiento Bacteriano</i>	39
Pruebas Bioquímicas	39
Identificación Molecular de los Aislamientos	42
<i>Extracción de ADN Bacteriano</i>	42
<i>Integridad del ADN</i>	43
<i>Cuantificación del ADN</i>	43
<i>Amplificación</i>	43
<i>Secuenciación</i>	45
<i>Análisis de las Secuencias</i>	45
Análisis Estadístico	45
<i>Unidad Experimental</i>	45
<i>Tratamientos</i>	45
<i>Diseño Experimental</i>	47
<i>Análisis de Datos</i>	47
Capítulo IV: Resultados	48
Pruebas de Patogenicidad	48

<i>Aislamiento Bacteriano</i>	48
<i>Inoculación Bacteriana</i>	48
<i>Análisis Estadístico</i>	50
<i>Re-aislamiento Bacteriano</i>	53
Pruebas Bioquímicas	53
Identificación Molecular	54
Capítulo V: Discusión	57
Capítulo VI: Conclusiones	62
Capítulo VII: Recomendaciones	63
Capítulo VIII: Referencias	64
Capítulo IX: Anexos	77

Índice de Tablas

Tabla 1 Taxonomía de la papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	19
Tabla 2 Taxonomía del tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> Cav.)	22
Tabla 3 Taxonomía de la naranjilla (<i>Solanum quitoense</i> Lam.)	24
Tabla 4 Enzimas pectolíticas encargadas de ocasionar la pudrición blanda	28
Tabla 5 Características del sitio experimental	34
Tabla 6 Aislados de bacterias causantes de pudriciones blandas en papa, tomate de árbol y naranjilla	35
Tabla 7 Componentes de medio cristal violeta pectato (CVP)	37
Tabla 8 Pruebas bioquímicas aplicadas a los aislamientos bacterianos	40
Tabla 9 Buffer de Lisis	42
Tabla 10 Componentes para la amplificación del gen ARNr 16S.	44
Tabla 11 Condiciones de PCR para la amplificación del gen ARNr 16S.	44
Tabla 12 Tratamientos para la evaluación de patogenicidad de bacterias pectolíticas	46
Tabla 13 ANOVA de la variable longitud de pudrición (cm)	51
Tabla 14 Pruebas Bioquímicas para caracterización de aislados bacterianos	54
Tabla 15 Identificación molecular de los productos PCR provenientes de bacterias pectolíticas	56

Índice de Figuras

Figura 1 Desarrollo de la podredumbre blanda en papa	27
Figura 2 Procesamiento de muestra de naranjilla con síntoma de pudrición blanda	36
Figura 3 Protocolo de inoculación bacteriana	38
Figura 4 Simulación de cámara húmeda	39
Figura 5 Presencia de hoyos en medio CVP, ocasionado por bacterias pectolíticas	48
Figura 6 Síntomas de pudrición en los tallos de plantas inoculadas, con los nueve aislados bacterianos	49
Figura 7 Subgrupos obtenidos en la variable longitud de pudrición de acuerdo con la interacción de los factores planta: aislado bacteriano	52
Figura 8 Caracterización fenotípica de bacterias pectolíticas	53
Figura 9 Amplificación de la sección del gen ARNr 16S para la identificación bacteriana	55

Resumen

Las bacterias pectolíticas ocasionan pudriciones blandas en varios cultivos alrededor del mundo. La infección de estas bacterias en el campo, se puede presentar desde la siembra hasta la cosecha, y los síntomas pueden desarrollarse incluso durante el almacenamiento, transporte y comercialización. En este estudio se evaluó la patogenicidad de nueve aislados de bacterias pectolíticas, obtenidas de tejido enfermo de papa, tomate de árbol y naranjilla. Estos aislados se inocularon en variedades susceptibles de los tres cultivos. La identificación taxonómica de los aislados se realizó utilizando pruebas bioquímicas y técnicas moleculares. Tres aislados de papa, dos de tomate de árbol y dos de naranjilla infectaron las tres especies de los cultivos estudiados, causando necrosis de los tejidos, produciendo exudados y olor fétido. Aunque los niveles de patogenicidad fueron similares, estos aislados pertenecieron taxonómicamente a especies diferentes: un aislado de papa fue *Pectobacterium polaris*; mientras que los dos aislados restantes pertenecieron a *P. atrosepticum*, un aislado de tomate de árbol fue *P. atrosepticum* mientras que el otro aislado fue *P. punjabense* y un aislado de naranjilla fue *P. punjabense* y el otro *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Los dos aislados restantes tuvieron patogenicidad diferencial; así, un aislado de tomate de árbol infectó papa y tomate de árbol, y se clasificó como *P. atrosepticum*; mientras que el aislado de naranjilla infectó papa y se clasificó como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Palabras clave: pectolíticas, pudrición, patogenicidad.

Abstract

Pectolytic bacteria cause soft rots in various crops around the world. Infection of these bacteria in the field can occur from planting to harvest, and symptoms can develop even during storage, transport, and marketing. In this study, the pathogenicity of nine isolates of pectolytic bacteria obtained from diseased tissue of potato, tamarillo and naranjilla was evaluated. These isolates were inoculated on susceptible varieties of the three crops. Taxonomic identification of the isolates was performed using biochemical tests and molecular techniques. Three isolates from potato, two from tamarillo and two from naranjilla infected the three crop species studied, causing tissue necrosis, producing exudates and foul odor. Although the levels of pathogenicity were similar, these isolates belonged taxonomically to different species: one potato isolate was *Pectobacterium polaris*; while the remaining two isolates belonged to *P. atrosepticum*, one tamarillo isolate was *P. atrosepticum* while the other isolate was *P. punjabense* and one naranjilla isolate was *P. punjabense* and the other *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. The remaining two isolates had differential pathogenicity; thus, one isolate from tamarillo infected potato and tamarillo, and was classified as *P. atrosepticum*; while the isolate from naranjilla infected potato and was classified as *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Key words: pectolitics, pudrification, pathogenicity.

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del Problema

La pudrición blanda de varios cultivos es una enfermedad que ocurre alrededor del mundo y está asociada a bacterias pectolíticas, las cuales ocasionan la maceración de los tejidos por medio de un complejo de enzimas que van degradando la pared celular de las plantas infectadas (Charkowski, 2014; Pérombelon & Van der Wolf, 2002). El ingreso de estos patógenos a sus huéspedes ocurre por heridas facilitando la infección y colonización, ocasionando daños en la calidad, rendimiento y vida útil de los productos; lo que genera pérdidas económicas para la agricultura (Aguilar et al., 2020; Aremu & Babalola, 2015; Muturi et al., 2018).

Los patógenos que causan pudrición blanda en diferentes cultivos frutícolas, hortícolas y ornamentales; infectan ya sea en campo o durante su almacenamiento y las pérdidas post- cosecha se estiman entre un 15 y 30% (Bhat et al., 2010, 2012; Charkowski, 2014). La papa está entre los cultivos que mayormente se ven afectados por esta enfermedad y al ser de gran importancia alimenticia a nivel mundial, existen varias investigaciones referentes a la afección (Chang et al., 2017).

Los principales géneros que se han reportado asociados a la pudrición blanda son: *Dickeya*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Pectobacterium* y *Pantoea*, de los cuales *Pectobacterium* y *Dickeya* son los que ocasionan mayores daños, debido a que producen altos niveles de enzimas pectolíticas en comparación a los otros géneros (Charkowski, 2014; Elbanna et al., 2014). En el Ecuador, se ha reportado un 40% de pérdidas en cultivos de papa por la podredumbre blanda y a finales de los años 90 se evidenció un aumento de la enfermedad, encontrando como responsable de la afección en tallos a *Erwinia carotovora* subespecie *atroseptica* (actual *Pectobacterium atrosepticum*) (Gardan et al., 2003; Oyarzún et al., 2002; Torres et al., 2009).

En el país se han realizado estudios acerca de la pudrición blanda en tallo, follaje o fruto de maíz, tomate riñón y pitahaya; mientras que de cultivos como tomate de árbol y naranjilla donde también se presentan síntomas asociados a la afección, la información es exigua (Caiza, 2019; Lasluisa, 2021; Trujillo, 2014).

Justificación e Importancia

Las *Pectobacterias* ingresan a los cultivos regularmente por medio de una herida previa y su propagación ocurre si las condiciones de temperatura y humedad son las adecuadas, desintegran el tejido vegetal producto del efecto pectolítico bacteriano, por lo que las plantas con la enfermedad difícilmente se recuperan, reportándolas como pérdidas; mientras que si se tratan de tubérculos de papa en almacenamiento, uno de ellos es capaz de infectar a 100 afectando a la producción, razón por la cual no pueden ser comercializados y esto repercute en la economía de los pequeños y grandes productores (Bhat et al., 2010; Oyarzún et al., 2002).

En Ecuador se ha reportado pérdidas de un 38% en la producción de papa y 55% en naranjilla debido a plagas y enfermedades que afectan a los cultivos lo cual reduce los ingresos de los agricultores (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2019b). Sin embargo, cifras por pérdidas de producción ocasionadas por bacterias que causan pudrición blanda en tomate y naranjilla, es escasa o casi nula. Mientras que para papa al ser uno de los cultivos con predominancia en la serranía ecuatoriana, existen datos de incidencia de podredumbre del 25% en Carchi, 46% en Cañar y 36% en Chimborazo (Oyarzún et al., 2002).

Por medio de las herramientas moleculares como lo es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de ADN se puede identificar la identidad taxonómica de los microorganismos causantes de enfermedades en plantas a través de la amplificación de una región específica de ADN con el uso de cebadores previamente diseñados. La PCR puede ser complementada con métodos

bioquímicos para una mejor caracterización de los patógenos, lo que permitirá realizar la detección, cuantificación e identificación de los agentes patógenos que ocasionan enfermedades en los sistemas agrícolas (Aguilar et al., 2020).

En el país se conoce que especies del género *Pectobacterium* spp. (antes *Erwinia*) son responsables de podredumbre blanda en tallos y tubérculos de papa, pero la enfermedad se registra también en otros cultivos solanáceos como tomate de árbol y naranjilla, de los cuales no se conoce las especies bacterianas que ocasionan los síntomas (Montesdeoca et al., 2013; Oyarzún et al., 2002). Por esta razón el objetivo del presente proyecto de investigación es caracterizar los agentes causales de pudrición blanda en solanáceas por métodos bioquímicos y moleculares.

Área de Influencia

El presente proyecto beneficiará al área de producción vegetal, ya que, al conocer la identidad de las bacterias fitopatógenas causantes de pudriciones blandas, se contribuirá con soluciones a estos problemas fitosanitarios, lo que a su vez permitirá la producción de alimentos de calidad y como consecuencia evitar pérdidas económicas en la agricultura. La pudrición blanda en solanáceas se encuentra bien documentada alrededor del mundo, pero existe información limitada de las cepas bacterianas, que causan la enfermedad en solanáceas cultivadas en el Ecuador. Al ser cultivos alimenticios de importancia, la identidad precisa de los patógenos causantes de la podredumbre blanda va a contribuir con el manejo integral de la misma.

Objetivos

Objetivo General

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

Objetivos Específicos

- Evaluar la patogenicidad de las bacterias pectolíticas aisladas, en papa (*Solanum tuberosum* L), tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav) y naranjilla (*Solanum quitoense* Lam).
- Determinar de forma bioquímica el grupo de bacterias al que pertenecen los aislamientos obtenidos de papa (*Solanum tuberosum* L), tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav) y naranjilla (*Solanum quitoense* Lam).
- Identificar molecularmente a los aislamientos de bacterias pectolíticas asociadas con pudriciones blandas de papa (*Solanum tuberosum* L), tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav) y naranjilla (*Solanum quitoense* Lam).

Hipótesis

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

Capítulo II: Marco Teórico

Papa

Taxonomía y origen

El nombre científico de la papa es *Solanum tuberosum* L. Esta especie es originaria de la zona interandina de América del Sur, específicamente de los alrededores del lago Titicaca (L. E. R. Rodríguez, 2010). Desde donde hace unos 7000 años inicia su domesticación, siendo uno de los alimentos principales de la cultura Inca (Bradshaw, 2021; Cuesta et al., 2014). En la Tabla 1, se detalla la clasificación taxonómica.

Tabla 1

Taxonomía de la papa (Solanum tuberosum L.)

Reino	Plantae
Subreino	Viridiplantae
Infrareino	Streptophyta
Superdivisión	Embryophyta
División	Tracheophyta
Subdivisión	Spermatophytina
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteranae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Solanum</i> L.
Especie	<i>Solanum tuberosum</i> L.

Nota. Tomado de ITIS (*Integrated Taxonomic Information System*).

Características Botánicas

La papa es una dicotiledónea herbácea conformada por tallos gruesos, huecos de color verde, alcanzan una altura de hasta 1,50 metros (m) donde las hojas se encuentran de forma alternada haciendo frondoso todo el follaje. De las flores se obtiene el fruto que es una baya donde se encuentran las semillas sexuales las cuales son empleadas para mejoramiento genético, mientras que los tubérculos (tallos carnosos) se forman de la proliferación del parénquima de reserva y se usa como semilla para la obtención de cultivos comerciales (Araujo et al., 2021; INIAP, 2002).

Importancia del Cultivo en el Ecuador

La papa es uno de los cultivos con importancia social, económica y cultural, debido a la biodiversidad de la especie, que en su mayoría se concentra en la región de Los Andes a una altitud de 2600 metros sobre el nivel del mar (msnm) a 3600 msnm, con una temperatura que va desde los 15°C a 20°C (INIAP, 2014a; Ortiz & Mares, 2017). También contribuye a la soberanía alimentaria de los pueblos y naciones que producen sus alimentos, respetando la naturaleza y seres humanos; a través de sus políticas agrarias (Patel, 2009).

En el Ecuador las provincias con mayor producción de papa son: Chimborazo, Tungurahua, Cotopaxi, Azuay y Carchi, pero también se producen en Imbabura, Pichincha, Bolívar, Cañar y Loja; de donde se distribuye dentro y fuera del país. Así para el año 2019 se exportaron 427 toneladas (t) ya sea como papa fresca, congelada o en conserva; siendo Estados Unidos el destino a donde se exporta el mayor volumen del producto (INIAP, 2014a; Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2019b). Para el año 2020, fueron sembradas un total de 24 882 hectáreas (ha) con papa, obteniéndose una producción de 408 313 t, de las cuales el 81% es consumido en fresco, mientras que el porcentaje restante es empleado por la industria (Velásquez et al., 2021).

Existen años en los que la producción de papa aumenta, pero otros en los que desciende, esto se debe a que los agricultores: rotan los cultivos para evitar la pérdida de fertilidad de los suelos, temen invertir por la aparición de plagas, inclemencias en el clima o porque en ocasiones el precio de venta se reduce drásticamente (INIAP, 2014a).

Del total de costo de producción a nivel tecnificado, el 49% se invierte en insumos esto con el fin de prevenir o eliminar plagas. Sin embargo, existen otras razones por las que la producción se ve afectada, por ejemplo: heladas, sequías, prácticas inadecuadas (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2019b).

Tomate de Árbol

Características Taxonómicas

El nombre científico del tomate es *Solanum betaceum* Cav. Pertenece a la familia de las solanáceas, con origen en Bolivia y su domesticación inicial en el norte de Perú y Sur de Ecuador (Revelo et al., 2004). En la Tabla 2 se detalla la clasificación taxonómica.

Tabla 2

Taxonomía del tomate de árbol (Solanum betaceum Cav.)

Reino	Plantae
Subreino	Viridiplantae
Infrareino	Streptophyta
Superdivisión	Embryophyta
División	Tracheophyta
Subdivisión	Spermatophytina
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteranae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Solanum</i> L.
Especie	<i>Solanum betaceum</i> Cav.

Nota. Tomado de ITIS (*Integrated Taxonomic Information System*).

Características Botánicas

El tomate de árbol es una planta arbustiva, con tallo suculento en sus inicios tornándose semileñoso durante su desarrollo, se ramifica a una altura entre 1,5 a 2 m pudiendo llegar hasta los 3 m (León et al., 2004). Las hojas son grandes de hasta 30 cm, con forma ovalada y de color verde. Sus flores de color rosa hermafroditas dan lugar a una baya de forma ovoide, con una cutícula resistente y pulpa de colores como: amarillo, anaranjado y morado; dependiendo de la variedad cultivada. El sabor es ácido y contiene alrededor de 200 semillas, por medio de las cuales se puede propagar a la especie o mediante técnicas como estacas (Buono et al., 2018; Calvo, 2009).

Importancia del Cultivo en el Ecuador

El tomate de árbol es un fruto fresco, cultivado en los valles de la serranía a una altitud de 1500 a 2600 msnm, con temperaturas que oscilen entre los 15°C a 19°C, con un óptimo de 17°C y humedad relativa del 75 % al 87 %. Su mayor producción se encuentra en las provincias de Imbabura, Tungurahua, Carchi y Chimborazo; aunque también es cultivado en Pichincha, Cotopaxi, Napo y Azuay (INIAP, 2014c; Revelo et al., 2004; Tamba, 2012). Se lo comercializa dentro del país a minoristas y mayoristas, entre las empresas nacionales registradas en el MIPRO se distribuye al fruto como: deshidratado, zumo, pulpa y en estado fresco (Moreno et al., 2020).

Es un producto que desde el año 2000 hasta el 2016, ha aumentado las toneladas de exportación hasta 256 t; debido a que existe una mayor superficie cultivada y un mejor rendimiento por hectárea. Sin embargo, los cultivos se ven afectados por patógenos como: hongos y bacterias, distribuyendo el 47 % del costo total de producción, al control fitosanitario (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2016).

Naranjilla

Características Taxonómicas

El nombre científico de la naranjilla es *Solanum quitoense* Lam. Originaria de Ecuador, específicamente de los bosques subtropicales húmedos del Oriente y del Occidente de la cordillera de los Andes. Su nombre quitoense se debe a que, en el tiempo de la colonia se denominó naranjilla de Quito como referencia a la Real Audiencia de Quito (INIAP, 2014b; Revelo et al., 2010). En la Tabla 3, se detalla la clasificación taxonómica.

Tabla 3

Taxonomía de la naranjilla (Solanum quitoense Lam.)

Reino	Plantae
Subreino	Viridiplantae
Infrareino	Streptophyta
Superdivisión	Embryophyta
División	Tracheophyta
Subdivisión	Spermatophytina
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteranae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Solanum</i> L.
Especie	<i>Solanum quitoense</i> Lam.

Nota. Tomado de ITIS (*Integrated Taxonomic Information System*).

Características Botánicas

La naranjilla es una planta herbácea, semi- perenne, con una raíz principal que se extiende hasta 50 centímetros (cm) y varias raíces secundarias leñosas, esto se diferencia de las variedades híbridas que carecen de raíz principal. La variedad común presenta un tallo espinoso, con ramificaciones que pueden alcanzar los 2 m de altura, mientras que los híbridos presentan un tallo sin espinos y alcanzan una altura de hasta 1,30 m; todas las variedades tienen un tallo vellosa, robusto y leñoso. Las hojas ovaladas, alternadas, con un color que varía en el envés verde claro y el haz un verde oscuro, cubiertas de

vellosidades; alcanzan un tamaño de 30 a 40 cm de largo, siendo más pequeñas en los híbridos (Revelo et al., 2010).

Presentan flores hembra y machos, con una polinización por insectos o manual, dando paso a frutos de color amarillo intenso o anaranjado cuando alcanzan su madurez, con la pulpa verdosa clara (Híbrido Puyo) o amarillenta (Palora). Las semillas de la variedad común pueden servir para reproducción, mientras que de los cultivos híbridos no son viables, estos se propagan por otras técnicas (Castro & Herrera, 2019; Revelo et al., 2010).

Importancia del Cultivo en el Ecuador

La naranjilla es considerada una fruta exótica, originaria de los Andes de Ecuador (occidente) a una altitud de 850 a 1500 msnm, temperatura que oscila entre los 17° C a 29°C y humedad relativa entre 78 % a 92 % (INIAP, 2014b). La producción nacional principalmente es originaria de Napo, Pastaza, Morona Santiago y de las estribaciones orientales de la sierra (Carchi, Imbabura, Pichincha, Tungurahua). Satisfaciendo con el consumo a nivel del país, por lo cual no se registran importaciones, pero se exporta a los países de Estados Unidos y España, lo que representa un rubro económico importante para los agricultores de la zona oriental (Castro & Herrera, 2019; Revelo et al., 2010). Las variedades con mayor predominancia de cultivo en orden son: híbrido Puyo producto del cruzamiento entre la variedad común con naranjilla jíbara del Oriente (*Solanum sessiliflorum*), INIAP Palora obtenida del cruce de la variedad común Baeza roja (*Solanum quitoense* var. *quitoense*) con variedad Yantzaza (*Solanum sessiliflorum*) y la variedad común (*Solanum quitoense* Lam) (Revelo et al., 2010).

Dentro de los factores que afectan a los cultivos, el 55 % se debe a plagas y enfermedades (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2019a). Las infecciones ocasionadas por microorganismos fitopatógenos en su mayoría hongos, pero también por bacterias como la pudrición bacteriana

ocasionada por *Pectobacterium* (antes *Erwinia* sp) que se propaga con facilidad en las zonas húmedas, son las que ocasionan pérdidas en la producción (INIAP, 2014b).

Bacterias Fitopatógenas

Las bacterias fitopatógenas son responsables de ocasionar una diversidad de enfermedades en plantas, como resultado de la colonización de sus tejidos, en condiciones propicias. Los síntomas que se pueden presentar son: marchitez, clorosis, atrofia, crecimiento excesivo, pudriciones, agallas. Lo que genera una amenaza para los cultivos alimenticios, generando pérdidas de millones de dólares y un déficit en la cadena de suministros alimenticios (Aguilar et al., 2020; Kannan & Bastas, 2015; Martins et al., 2018; Strange & Scott, 2005).

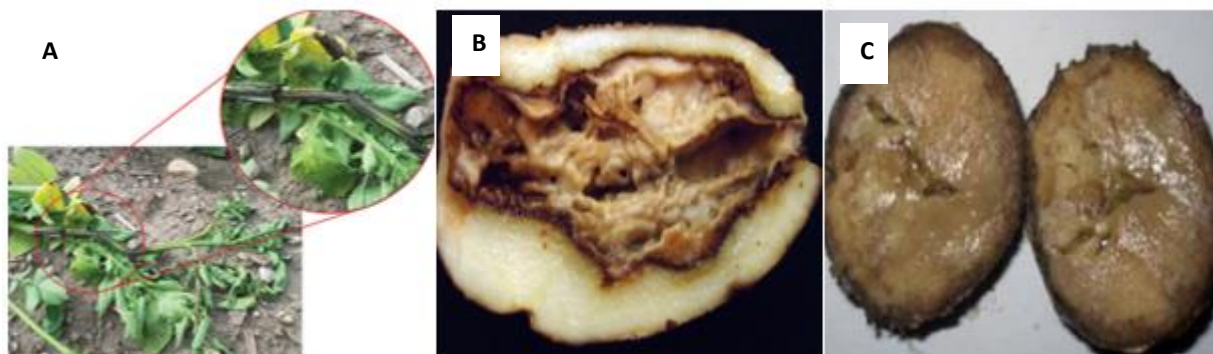
Bacterias Pectolíticas

Las bacterias pectolíticas pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, Gram negativas, causantes de la pudrición blanda, de un sin número de cultivos. Estas bacterias se encuentran distribuidas en todo el mundo, especialmente en lugares de alta humedad y temperatura; ya sea en el campo, almacenamiento o en el transcurso de su comercialización (Aremu & Babalola, 2015; Bhat et al., 2010).

Las bacterias pectolíticas se caracterizan por macerar el tejido vegetal, dando una apariencia acuosa, debido a la actividad de las enzimas que lisan la pared celular, como se puede visualizar en la Figura 1 (Bhat et al., 2012; Van der Wolf & de Boer, 2015).

Figura 1

Desarrollo de la podredumbre blanda en papa



Nota. Evolución de la podredumbre blanda en papa A) Pudrición del tallo (aspecto blando). B) Tubérculo de papa con signos de tejido macerado y viscoso. C) Tubérculo de papa con la mayoría del tejido acuoso.

Adaptado de *Tuber soft rot, blackleg, and aerial stem rot* [3], por N. Rosenzweig, 2016, Michigan State University (https://www.canr.msu.edu/resources/tuber_soft_rot_blackleg_and_aerial_stem_rot_e3335).

Principales enfermedades que afectan al cultivo de papa (p.8), por P. Méndez & N. Gaete, 2009 “The changing face of bacterial soft- diseases” (p.272), por A. Charkowski, 2018, *Annual Review of Phytopathology*, 56.

Mecanismo de Patogenicidad

Las bacterias ingresan a las plantas por aberturas naturales como: lenticelas o estomas; por pequeñas heridas ocasionadas durante la cosecha, transporte o almacenamiento y por vectores como insectos, que ocasionan lesiones al momento de alimentarse. Una vez que los patógenos ingresan pueden permanecer en los espacios intercelulares, así como en los tejidos vasculares, hasta que las condiciones sean adecuadas, para el desarrollo de la enfermedad. La temperatura debe estar en un rango dependiendo de la especie desde los 20 a 35°C, y la humedad relativamente alta (Amaya et al., 2021; Aremu & Babalola, 2015; Lee et al., 2013; Reverchon et al., 2016).

Los tejidos se vuelven blandos, con una apariencia acuosa y olor desagradable, debido a que las bacterias producen enzimas pectolíticas descritas en la Tabla 4, las cuales degradan las estructuras de la pared celular que contienen celulosa, hemicelulosa y pectina. La pectina forma parte de la lámina media, encargada de proporcionar la rigidez, ya que cementa las paredes celulares adyacentes (Abbott & Boraston, 2008; Amaya et al., 2021; Bhat et al., 2012; Lee et al., 2013; Matsumoto et al., 2003).

Tabla 4

Enzimas pectolíticas encargadas de ocasionar la pudrición blanda

Nombre	Denominación
Pectinesterasa	Pe
Pectina metilesterasa	Pem
Poligalacturonasa	Peh
Pectato liasa	Pel
Pectato hidrolasa	Peh
Celulasa	Cel
Proteasa	Prt

Se han identificado diferentes géneros de bacterias que ocasionan la pudrición blanda, entre los que destacan:

Dyckeya

Es un género característico de la podredumbre blanda de papa, donde las especies representativas que provocan la enfermedad son: *D. dianthicola* y *D. solani*. Hasta la actualidad se siguen encontrando brotes de *Dyckeya*, lo que indica que aún no se puede tener un buen manejo de la enfermedad (Charkowski, 2018).

En cuanto a las características bioquímicas que comparte con *Pectobacterium*, es que tienen actividad catalasa, pero no actividad oxidasa, emplean los carbohidratos por fermentación y oxidación (OF). *Dickeya* forma cavidades en medio CVP, muestra crecimiento en Agar nutriente (AN) a 37°C y es sensible a eritromicina (Czajkowski et al., 2011).

Erwinia

Al género *Erwinia* se lo conoce como las bacterias invasoras primarias, debido a que ocasionan la desintegración de los tejidos de la planta, sin necesidad de una previa infección o la existencia de condiciones extremas, para que se desarrolle la enfermedad. Mientras que a los otros géneros bacterianos, se los conoce como invasores secundarios, ya que provocan la podredumbre de los tejidos parenquimatosos, una vez que *Erwinia* u otros agentes bacterianos hayan infectado previamente la planta (Aremu & Babalola, 2015).

Este género se caracteriza por ser gramnegativos, anaerobios facultativos (OF), en forma de bastón, crecen a 37°C, no presentan colonias anaranjadas o amarillas en extracto de levadura dextrosa (YDC) y afectan los cultivos de zonas templadas a tropicales. Las especies más relevantes que causan pudrición blanda son: *Erwinia chrysanthemi* y *Erwinia carotovora*, los cuales son los principales patógenos bacterianos de los tubérculos de papa (Toth et al., 2003). Existen especies y sub especies como *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia cypripedii* y *Erwinia cacticida* a las cuales se las ha reclasificado dentro del género *Pectobacterium* (Aremu & Babalola, 2015; Gardan et al., 2003).

Pectobacterium

Alrededor del mundo *Pectobacterium* causa varias enfermedades asociadas con la maceración de los tejidos. Las especies *P. wasabiae*, *P. atrosepticum*, *P. brasiliensi*, *P. carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. parmentieri* ocasionan podredumbre blanda en papa, provocando graves

pérdidas económicas (Aremu & Babalola, 2015; Panda et al., 2016; Pasanen et al., 2013; Voronina et al., 2021).

Las pruebas bioquímicas del género son oxidasa (-) , catalasa (+), reducción de nitratos (+), β -galactosidasa (+), ureasa (-), crecimiento anaerobio Hugh and Leifson (+), sensibilidad a eritromicina (-), degradación de pectato (+), crecimiento en agar nutriente a 37°C (+) para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y (-) para *Pectobacterium atrosepticum*, el género emplea como fuentes de carbono al glicerol, glucosa y sacarosa (Rafiei et al., 2015; M. Rodríguez et al., 2009).

Pseudomonas

Pseudomonas marginalis y *P. fluorescens* son bacterias pectinolíticas, responsables de la pudrición blanda de col, papas, entre otros. Estos patógenos al ser denominados oportunistas, solo causan la enfermedad si las condiciones son las apropiadas o una vez que otro patógeno haya infectado a la planta (Aremu & Babalola, 2015; Baylis, 2006). Por lo general son catalasa, oxidasa y citrato positivos, mientras que la producción de indol es negativa (Viteri et al., 2020).

Clostridium

Clostridium puniceum es la única especie descrita que ocasiona pudrición blanda de los tubérculos de papa, infectando a través de las lenticelas las cuales proliferan e ingresan al tubérculo, si las condiciones lo permiten (W. L. da Silva et al., 2019).

Pantoea

Pantoea agglomerans es considerado un invasor secundario, ya que requiere de temperatura y humedad, para infectar hortalizas como la col china, mientras que *Pantoea ananatis* ocasiona la enfermedad en el melocotón (Aremu & Babalola, 2015; Guo et al., 2020; Liao et al., 2016). El género *Pantoea* es positivo para las pruebas bioquímicas: catalasa, citrato, oxidativa-fermentativa. Forma

colonias de color anaranjadas o amarillas en YDC y en ocasiones blancas para *Pantoea agglomerans* así como *Pantoea citrea* (Lopardo et al., 2016).

Métodos para la Identificación de Bacterias

Pruebas Bioquímicas

Las pruebas bioquímicas son métodos para la identificación taxonómica de microorganismos, que no precisa de altos costos, pero solo se puede conocer a breves rasgos la identidad de una muestra desconocida, como desventajas adicionales se puede mencionar el tiempo y el requerimiento de personal especializado. Este método puede generar identificaciones no específicas, y va a depender de la subjetividad del operador (Mergaert et al., 1984; Zhou & Li, 2015). Dentro de las enterobacterias se encuentran algunas especies que ocasionan pudrición blanda en los cultivos, las cuales responden de diferente manera a las pruebas bioquímicas (Rodríguez et al., 2009).

Las bacterias pectolíticas se caracterizan por ser Gram negativas y formar agujeros en el medio pectato de cristal violeta (CVP); el cristal violeta inhibe en su mayoría el crecimiento de bacterias Gram positivas y la pectina actúa como fuente de carbono. La formación de cavidades se aprecia debido a la capacidad que tienen las bacterias de degradar la pectina, lo que permite establecer la característica pectolítica (Cuppels & Kelman, 1973; Hélias et al., 2012).

Técnicas Moleculares

Los patógenos benéficos o perjudiciales para los cultivos vegetales, pueden ser identificados por medio de herramientas moleculares, basadas en la amplificación de ácidos nucleicos (Aguilar et al., 2020). Entre las técnicas más empleadas para este objetivo se encuentra la PCR y secuenciación.

La PCR es una técnica útil para la identificación de microorganismos, por medio de la amplificación de una secuencia de ADN con el uso de cebadores (Aguilar et al., 2020; Czajkowski et al., 2011). Los cebadores universales para bacterias son: 27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3') y 1492R

(5'- GGTTACCTTGTTACGACTT -3'), los cuales son complementarios a las regiones conservadas del inicio y fin del gen; mientras que las regiones variables que se encuentran entre las regiones conservadas son las empleadas para conocer la taxonomía bacteriana mediante comparación de secuencias en bases de datos (Aguilar et al., 2020; Bou et al., 2011; Ludwig, 2007).

Otra técnica conocida es la secuenciación de la región de un gen o genes específicos, por el método Sanger que se emplea desde 1977, hasta la actualidad (Sanger et al., 1977; Vernet, 2017). Los elementos que se requieren para la reacción son: cadena de ADN monocatenaria, cebador necesario para empezar la síntesis, la ADN polimerasa para la elongación de la secuencia, los desoxinucleótidos trifosfato (dCTPs, dGTPs, dTTPs, dATPs) y un didesoxinucleótido trifosfato fluorescente (ddCTPs, ddGTPs, ddTTPs, dACTPs); que son terminadores de la cadena de ADN sintetizada in vitro (Murusegan & Procop, 2009; Zhang et al., 2014). Por medio de la electroforesis capilar se separa el ADN dependiendo, del tamaño y la fluorescencia que emiten los nucleótidos terminales (cuatro colores específicos); obteniendo la secuencia del segmento de ADN (Ishige et al., 2018).

La secuenciación del gen del ARNr 16S ha sido empleado durante varios años para establecer relaciones filogenéticas entre procariontes; mediante la comparación de las secuencias con las que se encuentran en la base de datos como GenBank NCBI, se puede identificar género - especie y a su vez elaborar árboles filogenéticos que reflejan el parentesco genético existente con las bacterias que se compare (Stackebrandt, 1999; Woo et al., 2008).

Región de Interés para la Identificación de Bacterias

Para la identificación de bacterias, una región muy empleada es el ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) con un tamaño aproximado de 1500 pb, codificado por el gen ARNr 16S o también denominado ADNr 16S (Clarridge, 2004; Stackebrandt, 2014). El ARNr 16S procede de la subunidad pequeña (30S) del ribosoma bacteriano, al cual se lo considera como marcador genético, debido a que se encuentra

presente en casi todas las bacterias y tanto la estructura como función no han cambiado drásticamente a lo largo del tiempo. Algunos cambios producidos en la secuencia pueden ser aleatorios, producto de la evolución, sin embargo, los ARNr de subunidad pequeña (SSU) poseen suficiente variabilidad siendo posible identificar a las bacterias a nivel de especie y el tamaño es adecuado para fines informáticos (Aguilar et al., 2020; Janda & Abbott, 2007).

Pruebas de Patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad son empleadas para corroborar si los aislamientos bacterianos son los agentes causales de la enfermedad. Para el cumplimiento de esta premisa se aplica los postulados de Koch, que tiene como objetivo principal garantizar la aplicación del rigor científico de un organismo como causa de una enfermedad (Cohen, 2017).

Los postulados establecen que: el microorganismo sospechoso debe encontrarse en cada organismo enfermo (animal, planta), ser aislado del mismo, cultivarlo; para luego ser inoculado en un huésped sano y se presente la enfermedad para extraer el agente causal demostrando así que es el mismo que se aisló en el organismo enfermo (Agrios, 2005a).

Capítulo III: Materiales y Métodos

Ubicación

El trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Fitopatología e invernadero del Departamento de Protección Vegetal de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del INIAP, ubicada en la Panamericana Sur, km 1 – Vía a Tambillo, Cantón Mejía, Provincia de Pichincha. La producción y esterilización del sustrato, se llevó a cabo en la Granja Experimental Tumbaco (GET) del INIAP, ubicada en la Av. Interoceánica km 15 y Eloy Alfaro, cantón Quito, Pichincha. Las características del sitio experimental se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Características del sitio experimental

	Laboratorio DNPV	Laboratorio GET
Provincia	Pichincha	Pichincha
Cantón	Mejía	Quito
Parroquia	Cutuglagua	Tumbaco
Sitio	E.E.S.C	G.E.T
Altitud	3.058 m.s.n.m.	2.348 m.s.n.m.
Latitud	0° 22' S	0° 13' S
Longitud	78° 33' O	78° 24' O

Materiales

Material Vegetal

El material vegetal empleado consistió en semillas botánicas de: tomate de árbol cultivar amarillo puntón, naranjilla cultivar común y tubérculo semilla de papa variedad leona blanca, obtenidas de las colecciones del DNPV y la GET.

Las semillas de naranjilla y tomate de árbol fueron desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 2 minutos, seguido de tres lavados con agua estéril; posteriormente fueron colocadas en cajas Petri con papel absorbente humedecido e incubadas a 25°C.

Las plantas de naranjilla y tomate de árbol fueron trasplantadas a fundas negras de 6 x 10 cm con sustrato esterilizado, compuesto por tierra de sanja y pomina, en una proporción 3:1. La tierra de zanja es una tierra con niveles altos de materia orgánica y la pomina es cascajo cernido. Las semillas de papa fueron sembradas en fundas negras de 8 x 12 cm, con el sustrato mencionado. Las plantas se mantuvieron dentro del invernadero y con riego moderado; hasta que alcanzaron un mínimo de 20 cm (alrededor de tres meses).

Material Biológico

Se evaluaron nueve aislamientos bacterianos de los cuales tres se encontraban conservados en el DNPV de la Estación Experimental Santa Catalina (INIAP) y los seis restantes fueron procesados de muestras provenientes de plantas de papa, tomate de árbol y naranjilla con síntomas de pudrición blanda, los cuales se especifican en la Tabla 6.

Tabla 6

Aislados de bacterias causantes de pudriciones blandas en papa, tomate de árbol y naranjilla

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

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

Métodos

Procesamiento de Muestras

Las plantas con síntomas de pudrición en el tubérculo, tallo u hojas; fueron lavadas en agua corriente para eliminar tierra e impurezas. Se procedió a realizar cortes pequeños del borde del material vegetal sintomático (transición entre tejido sano y enfermo), posteriormente se colocó en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 1 min, seguido de tres lavados con agua estéril (AE). La muestra fue pesada y finalmente extraída con AE en una dilución 1:10 con ayuda de un pistilo, como se puede observar en la Figura 2.

Figura 2

Procesamiento de muestra de naranjilla con síntoma de pudrición blanda



Nota. A) Síntoma de maceración del tejido en naranjilla. B) Muestra procesada y diluida en AE.

Prueba de Patogenicidad

En este estudio se determinó la patogenicidad de los aislamientos bacterianos, mostrados en la Tabla 6. Los cuales se inocularon en las variedades de los tres cultivos, lo que permitió estudiar la potencial especificidad de cada uno de ellos.

Aislamiento de Bacterias

La solución que se extrajo al procesar la muestra se sembró con un asa bacteriana por estriado en cajas Petri con medio CVP e incubadas a 25° C por 48h, los componentes del medio se describen en la Tabla 7.

Tabla 7

Componentes de medio cristal violeta pectato (CVP)

Reactivos	Cantidad (500 mL)
Cristal violeta (0,075%)	1,0 mL
CaCl ₂ . 2H ₂ O 10%	6,8 mL
NaNO ₃	1 g
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ . 2H ₂ O	2,5 g
Tryptona	0,5 g
Agar	2,5 g
Polipectato de sodio	9,0 g
Lauril sulfato de sodio 10%	0,5 mL

Se procedió a seleccionar las colonias que formaron agujeros en el medio de cultivo, esto debido a que las bacterias pectolíticas degradan el pectato del CVP y la formación de hoyos es una característica distintiva de la patogenicidad de este tipo de bacterias.

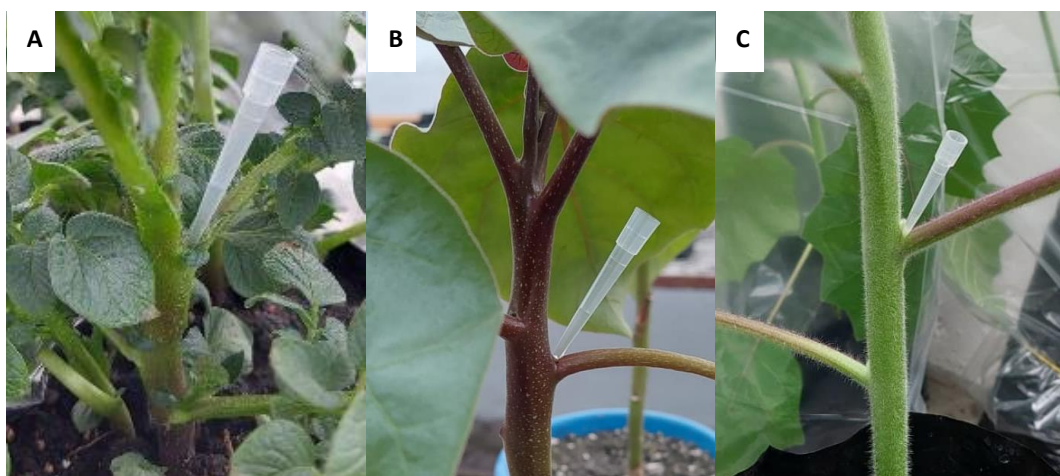
Con la ayuda de un asa microbiológica estéril, se tomó una colonia con la cualidad mencionada, se disolvió en 1000 microlitros (µL) de agua estéril contenida en un tubo eppendorf y para la obtención de colonias puras, se sembró por estriado en medio CVP, por 48 horas (h) a 25°C. Se tomó una colonia bien diferenciada, la cual se transfirió a un tubo eppendorf con 2000 µL de medio Luria Bertani (LB) líquido y se incubó a 28°C por 24 h; obteniendo la suspensión bacteriana (X. Ma et al., 2018). Este proceso se repitió para los ocho aislamientos restantes.

Inoculación bacteriana

La inoculación de bacterias fitopatógenas se realizó en los tallos de las plantas de papa, tomate de árbol y naranjilla, entre los 20 a 46 cm. Se realizó una herida de 5 mm de profundidad, entre el tallo (parte más robusta) y la yema axilar, con la ayuda de puntas de pipeta estériles. Posteriormente con una micropipeta, se inoculó 50 μ L de cada suspensión bacteriana (nueve) en cada uno de los tallos, como se puede visualizar en la Figura 3 (X. Ma et al., 2018; Waleron et al., 2014). Se incluyeron cinco replicas (plantas) por cada aislamiento, así como un control negativo (cinco plantas con inoculación de 50 μ L de agua estéril).

Figura 3

Protocolo de inoculación bacteriana

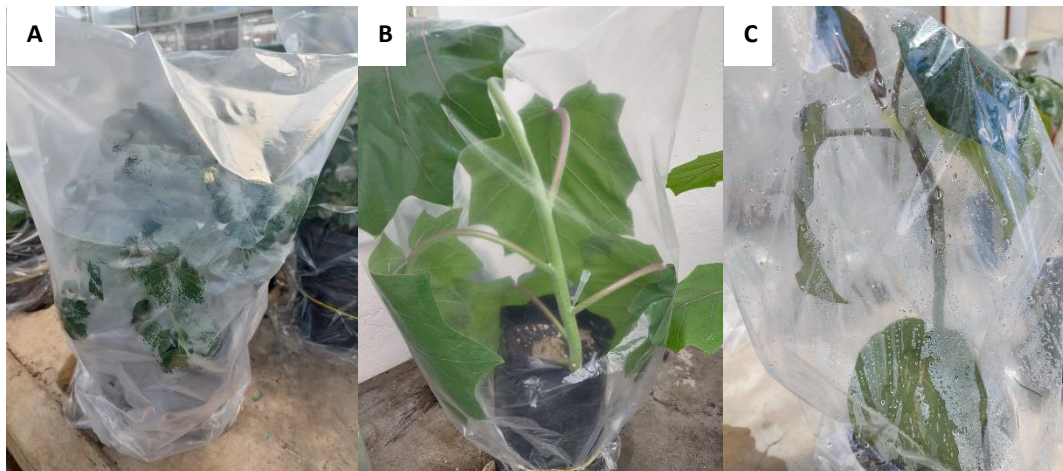


Nota. Infección de la suspensión bacteriana en: A) Papa. B) Tomate de árbol. C) Naranjilla.

Las plantas fueron regadas y cada una dispuesta dentro de una funda plástica, para simular a una cámara húmeda, la cual se puede visualizar en la Figura 4 (Caiza, 2019). Se las dejó por un lapso de tres a siete días dentro del invernadero en condiciones de temperatura no controladas (temperatura promedio por la mañana 18 a 21°C y por las noches 9 a 12°C; hasta que aparecieron los síntomas de podredumbre blanda.

Figura 4

Simulación de cámara húmeda



Nota. A) Papa. B) Naranja. C) Tomate de árbol

Reaislamiento Bacteriano

El re-aislamiento de las bacterias se realizó a partir de las plantas de papa, tomate de árbol y naranja que fueron infectadas. Las muestras con el síntoma de pudrición fueron procesadas, sembradas en medio CVP e incubadas a 25°C por 48 h.

Pruebas Bioquímicas

Se realizó la caracterización fenotípica de los aislados sembrados en CVP, para lo cual se observó las características macroscópicas como forma y color de la colonia; además de una tinción Gram. Para la caracterización bioquímica se aplicó a cada uno de los aislados bacterianos, las pruebas planteadas en la Tabla 8.

Tabla 8

Pruebas bioquímicas aplicadas a los aislamientos bacterianos

Prueba	Protocolo	Reacción
Tinción Gram	1. En la mitad de un portaobjetos se colocó una gota de agua destilada tipo II junto con una colonia bacteriana de 48 h de crecimiento en medio CVP.	Gram positiva: células de color azul violáceo Gram negativa: células de color rojo o rosa.
	2. Con una asa bacteriana estéril se homogenizó y arrastró la muestra en el portaobjetos	
	3. Se fijó la muestra, flameandola tres veces por la llama del mechero y se esperó hasta que se evapore el agua.	
	4. Para la tinción se colocó cristal violeta sobre la placa por 1minuto y se lavó con agua destilada.	
	5. Se cubrió la placa con yodo por 1minuto y se lavó con agua destilada	
	6. Se lavó la placa con alcohol cetona (~30 s) e inmediatamente se enjuagó con agua destilada.	
	7. Se colocó safranina por 1 minuto y se lavó con agua destilda	
	8. Se observó la placa en el microscopio óptico con el lente 100x junto con una gota de aceite de inmersión.	
Degradación de pectato (CVP)	1. La solución extraída posterior al procesamiento de la muestra fue tomada con un asa bacteriológica y sembrada en medio CVP. 2. Se incubó a 25°C por 48 h.	Formación de hoyos en el medio.

Prueba	Protocolo	Reacción
Oxido-fermentativa (Hugh and Leifson)	1. En dos tubos de ensayo con el medio Hugh and Leifson, se inoculó por picadura una colonia bacteriana de 48 h de crecimiento.	Metabolismo oxidativo
	2. Al primer tubo se cubrió la superficie del agar con 5 mm de parafina y una tapa mientras que el segundo tubo quedó descubierto.	Metabolismo fermentativo
	3. Se incubó los tubos por 48 h a 35°C, a las primeras 24 h se observó el cambio de la coloración y a las 48 h se confirmó.	No oxidativo ni fermentativo
Catalasa	1. En el centro de un portaobjetos se colocó una colonia bacteriana de 48 h de crecimiento. 2. Con una pipeta pasteur se depositó una gota de peróxido de hidrógeno al 3% sobre la muestra.	Desprendimiento de burbujas
Oxidasa	1. En una lámina de oxidasa se colocó una colonia bacteriana de 48 h de crecimiento. 2. Se observó el cambio de coloración, en un lapso de 20 a 60 s.	Reacción positiva: rosa violáceo Reacción negativa: amarillo tenue
Crecimiento en agar nutriente a 37°C	1. Se tomó una colonia bacteriana proveniente de CVP e incubada durante 48 h, la cual fue diluida en 1000 µL de agua destilada. 2. Con una asa bacteriológica flameada se tomó la muestra y se sembró por estriado en medio agar nutriente. 3. Se incubó a 37°C por 24 h.	Formación de colonias
Crecimiento en YDC	1. Se tomó una colonia bacteriana de 48 h de crecimiento en medio CVP y se diluyó en 1000 µL de agua destilada. 2. Se tomó la muestra con un asa bacteriológica y se sembró en por estriado en medio YDC. 3. Se incubó a 25°C por 24 h.	Colonias de color amarillo o anaranjado

Nota. Se aplicó cada uno de los procedimientos para los 9 aislamientos bacterianos.

Identificación Molecular de los Aislamientos

Extracción de ADN Bacteriano

A partir de las colonias que formaron cavidades en el medio CVP, se subcultivó una de ellas en 2 mL de medio LB líquido, contenido en tubos de microcentrifuga y se incubó por 72 h a 25°C. Las muestras fueron colocadas en la centrifuga a 13 000 revoluciones por minuto (rpm), por 3 min. Se desechó el sobrenadante y se conservó el pellet, posteriormente se añadió 1000 µL del buffer de lisis, el cual se indica en la Tabla 9.

Tabla 9

Buffer de Lisis

Reactivos	Cantidad (500 mL)	Concentración
Tris HCl (pH 8.0)	5 mL	10 mM
CTAB	10 g	2%
PVP	10 g	2%
NaCl	140 mL	1,4 M
EDTA (pH 8.0)	20 mL	20 mM

Nota. Componentes del buffer de extracción de DNA, modificado de Castillo & Llumiquinga (2021). CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio), PVP (Polivinilpirrolidona), NaCl (Cloruro de sodio), EDTA (Ácido etildiaminotetraacético); unidades: M (molar), mM (millimolar).

A cada uno de los tubos se los mezcló en un vórtex, luego pasaron por 1 hora en baño María a 65°C. Se centrifugó a 13 000 rpm por 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a nuevos tubos. Se añadió 600 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), seguido de una centrifugación a 13 000 rpm por 10 min. Se tomó la fase acuosa que fue transferida a nuevos tubos, donde se colocó 500 µL de isopropanol con 250 µL de NaCl.

Las muestras fueron colocadas a -20°C durante 1 h. Se centrifugó a 13 000 rpm por 10 min, obteniendo así la pastilla de ADN, la cual fue lavada con 1000 μL de etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente a 13 000 rpm por 10 min, posteriormente se eliminó el sobrenadante. Se colocó las muestras en el Speed Vac por 20 min. El ADN se diluyó en 100 μL de TE (Tris HCl-EDTA) y se preservó a -20°C .

Integridad del ADN

Para conocer la calidad del ADN extraído se preparó un gel de agarosa al 1,5% v/v; el cual fue cargado con 4 μL del marcador molecular 1Kb Plus DNA Ladder, seguido de 4 μL de cada una de las muestras. Se realizó una corrida electroforética por 35 minutos a 100 voltios (V).

Cuantificación del ADN

Para cuantificar el ADN extraído se empleó el espectofotómetro Epoch (Biotek Instruments), en donde se colocó como blanco 2 μL de buffer TE y 2 μL de cada una de las muestras. Con los datos obtenidos en la tabla de concentración, se procedió a diluir el ADN a 30 ng/ μL en 50 μL de agua ultra pura. En el Anexo 1 se puede observar la concentración de ADN para cada muestra.

Amplificación

Se realizó la amplificación de una región de ~1500 pb del gen ARNr 16S, por medio de una PCR, para lo cual se empleó los cebadores universales 27F (5'- AGTTTGATCCTGGCTCAG -3') y 1492R (5'- GGTACCTTGTTACGACTT -3') (Lane, 1991). La mezcla para la reacción PCR se especifica en la Tabla 10 (Morillo & Miño, 2011).

Tabla 10

Componentes para la amplificación del gen ARNr 16S.

Reactivos	Concentración final	1X (μL)
Agua ultra pura		12,4
Tampón	1X	5
MgCl ₂ (mM)	1,8	1,8
dNTPs (mM)	0,2	0,5
Primer F (pM)	0,8	2
Primer R (pM)	0,8	2
Taq - polimerasa (U/μL)	0,06	0,3
ADN (ng/μL)	1,6	1,0
V _f	-	25

Nota. MgCl₂ (Cloruro de Magnesio), F (Forward), R (Reverse); unidades: pM (picomolar), ng

(nanogramos), μL (microlitros).

La amplificación de la sección del gen ARNr 16S se realizó en un termociclador, bajo las condiciones de PCR descritas en la Tabla 11; donde se especifica los ciclos de amplificación y temperaturas (Morillo & Miño, 2011).

Tabla 11

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

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

Los productos amplificados se visualizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa, al 1,5% cargado con 4 μ L del marcador molecular 1Kb Plus DNA Ladder, seguido del control negativo y con 4 μ L de cada uno de los productos PCR. La corrida electroforética se realizó por 35 minutos a 100 V. Finalmente el gel se visualizó por medio de luz UV en un fotodocumentador.

Secuenciación

La secuenciación de los nueve productos PCR se realizó por el método Sanger (Murusegan & Procop, 2009). La empresa IDgen fue la encargada del proceso de envío hacia Macrogen y ensamblaje de las secuencias.

Análisis de las Secuencias

Las secuencias ensambladas proporcionadas por la empresa IDgen fueron comparadas con la base de datos existente en GenBank NCBI, mediante el programa bioinformático BLAST (basic local alignment search tool). El género y especie de cada aislamiento bacteriano, se identificó por medio del porcentaje de identidad y cobertura superior al 98%.

Análisis Estadístico

Unidad Experimental

Una planta de cada especie (tomate de árbol, naranjilla, papa) sembrada en una funda de vivero con 2kg de sustrato estéril.

Tratamientos

Se estudió la interacción entre los aislamientos con los hospederos, lo que resultó en 27 tratamientos mostrados en la Tabla 12, más un testigo sin inoculación (por cada especie).

Tabla 12*Tratamientos para la evaluación de patogenicidad de bacterias pectolíticas*

Tratamiento	Descripción
T1	Papa + P1
T2	Papa + P2
T3	Papa + P3
T4	Papa + Ta1
T5	Papa + Ta2
T6	Papa + Ta3
T7	Papa + N1
T8	Papa + N2
T9	Papa + N3
T10	Tomate de árbol + P1
T11	Tomate de árbol + P2
T12	Tomate de árbol + P3
T13	Tomate de árbol + Ta1
T14	Tomate de árbol + Ta2
T15	Tomate de árbol + Ta3
T16	Tomate de árbol + N1
T17	Tomate de árbol + N2
T18	Tomate de árbol + N3
T19	Naranjilla + P1
T20	Naranjilla + P2
T21	Naranjilla + P3
T22	Naranjilla + Ta1
T23	Naranjilla + Ta2

Tratamiento	Descripción
T24	Naranjilla + Ta3
T25	Naranjilla + N1
T26	Naranjilla + N2
T27	Naranjilla + N3

Diseño Experimental

Se aplicó un diseño factorial 3 x 9 dispuesto en DCA. Para el análisis estadístico se realizó cinco repeticiones por tratamiento y por cada testigo, con un total de 150 plantas más nueve aislados bacterianos.

La variable de respuesta a evaluar fue:

Longitud de la Lesión (cm). Con un calibrador digital se midió la longitud de pudrición en cada planta. Las mediciones se realizaron dependiendo del tiempo en que se presentó la infección: papa (3 días), tomate de árbol (5 a 10 días), naranjilla (3 a 5 días).

Para el análisis estadístico de los datos, se realizó la prueba de normalidad Kolmogórov-Smirnov, seguido de un ANOVA (análisis de varianza); con un nivel de significancia del 5%. Se realizó la comparación múltiple de medias mediante la prueba HSD de Tukey, con un nivel de significancia del 5%.

Análisis de Datos

Los datos fueron analizados con el software RStudio (Rstudio Team, 2020).

Capítulo IV: Resultados

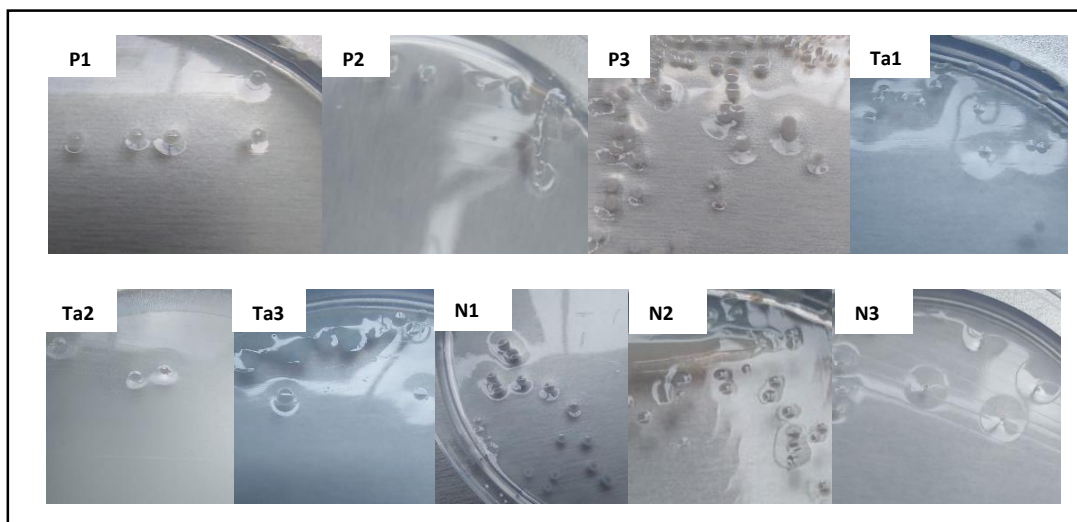
Pruebas de Patogenicidad

Aislamiento Bacteriano

Los nueve aislados bacterianos procedentes de muestras vegetales y conservados, formaron agujeros en medio CVP, como se puede visualizar en la Figura 5.

Figura 5

Presencia de hoyos en medio CVP, ocasionado por bacterias pectolíticas



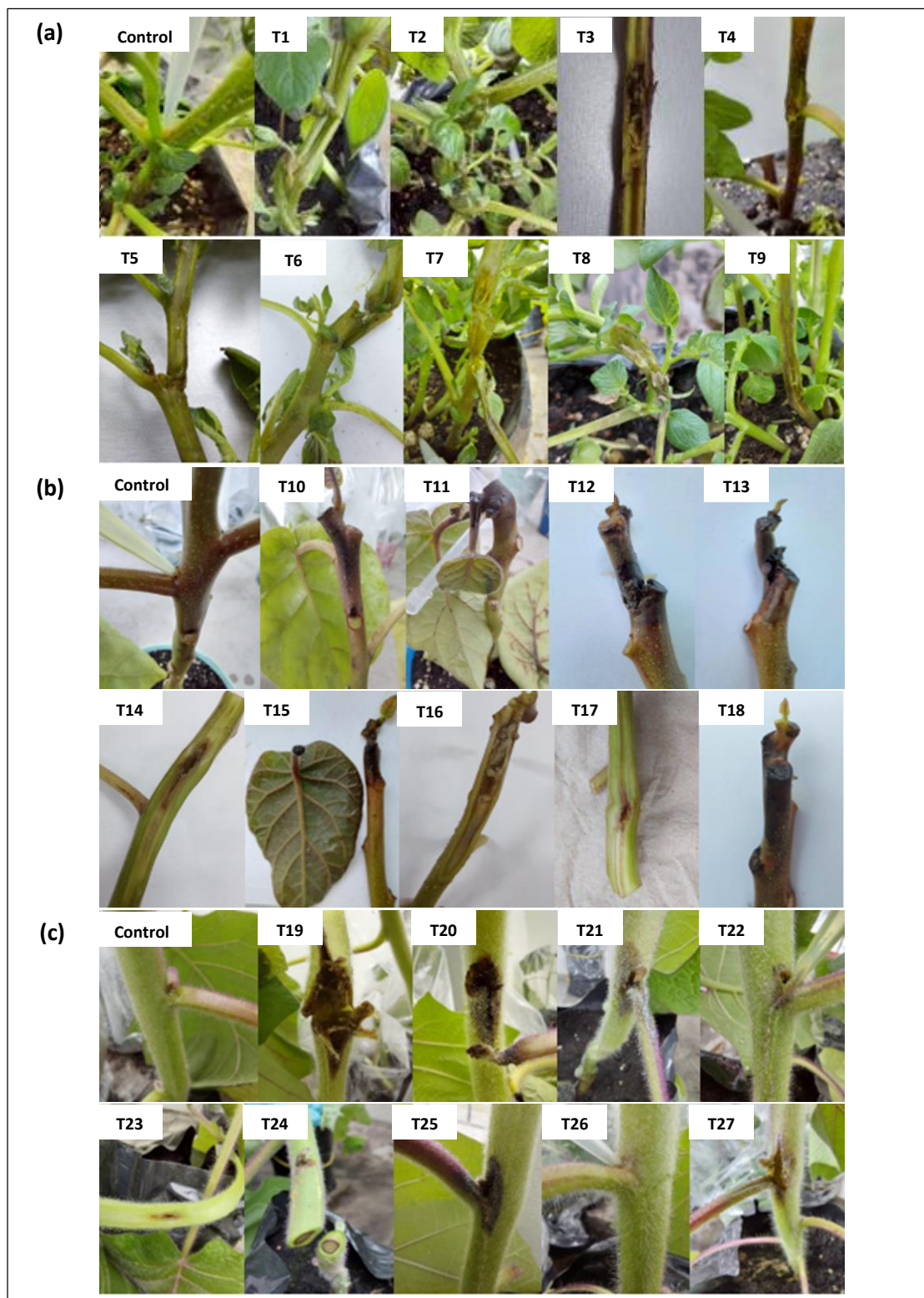
Nota. Colonias bacterianas aisladas en medio CPV con 48 h de crecimiento a 25°C. P1, P3, Ta1, Ta3, N1, N2 y N3, presentan colonias circulares, lisas, con bordes regulares, de color crema tenue y formación de cavidades profundas. P2, Ta2 muestran colonias que forman agujeros poco profundos.

Inoculación Bacteriana

Los tallos de las 3 especies de plantas presentaron síntomas propios de la enfermedad, posterior a la inoculación, a partir de los 3 días en papa, 5 a 10 días en tomate de árbol y 3 a 5 días en naranjilla. En los días mencionados, se tomó la longitud de la pudrición, es decir, ablandamiento o decoloración del tejido vegetal; presentes desde el sitio de la herida, como se puede visualizar en la Figura 6.

Figura 6

Síntomas de pudrición en los tallos de plantas inoculadas, con los nueve aislados bacterianos



Nota. "T" se refiere a tratamiento. Infección de bacterias pectolíticas en tallos de: (a) Papa. T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8 y T9; muestran pudrición, ablandamiento, necrosis y cambio de coloración del tejido vegetal; mientras que en T1, T3, T8 y T9 se observa un tallo hueco en su interior. (b) Tomate de árbol. T10 indica cambio en la coloración de la corteza del tallo. T11, T12, T13, T15 y T18, ilustran necrosis y maceración del tejido. T14 y T16 indican que la pudrición es mayor al interior del tallo y existe necrosis. T17 no muestra pudrición, sino infección en los haces vasculares. *Hubo desprendimiento de las hojas mientras avanzaba la enfermedad. (c) Naranjilla. T19, T20, T21, T22, T25 y T27, indican necrosis desde el sitio de la herida, desprendimiento de hojas así como ablandamiento del tejido y presencia de exudados. T23 no presenta síntoma de pudrición, solo necrosis en la lesión producida. T24 muestra una pequeña necrosis en el sitio de la herida, pero al realizar un corte transversal en el tallo, denota como la infección avanza por el interior. T26 muestra una ligera coloración marrón clara que avanza desde el sitio de la lesión.

Análisis Estadístico

La prueba de normalidad Kolmogórov-Smirnov arrojó un valor p de 0.0643, el cual al ser superior a 0.05 indica que los datos correspondientes a la variable longitud de pudrición siguen una distribución normal. El ANOVA realizado se presenta en la Tabla 13, en donde, los factores planta y aislado bacteriano tienen un valor p de $2e10^{-6}$. Además, la interacción de los factores planta:aislado bacteriano tiene un valor p de $3.74e10^{-15}$. Los cuales al ser menores a 0.05 indican que hay influencia significativa de los factores y la interacción de ambos en la variable longitud de pudrición.

Tabla 13

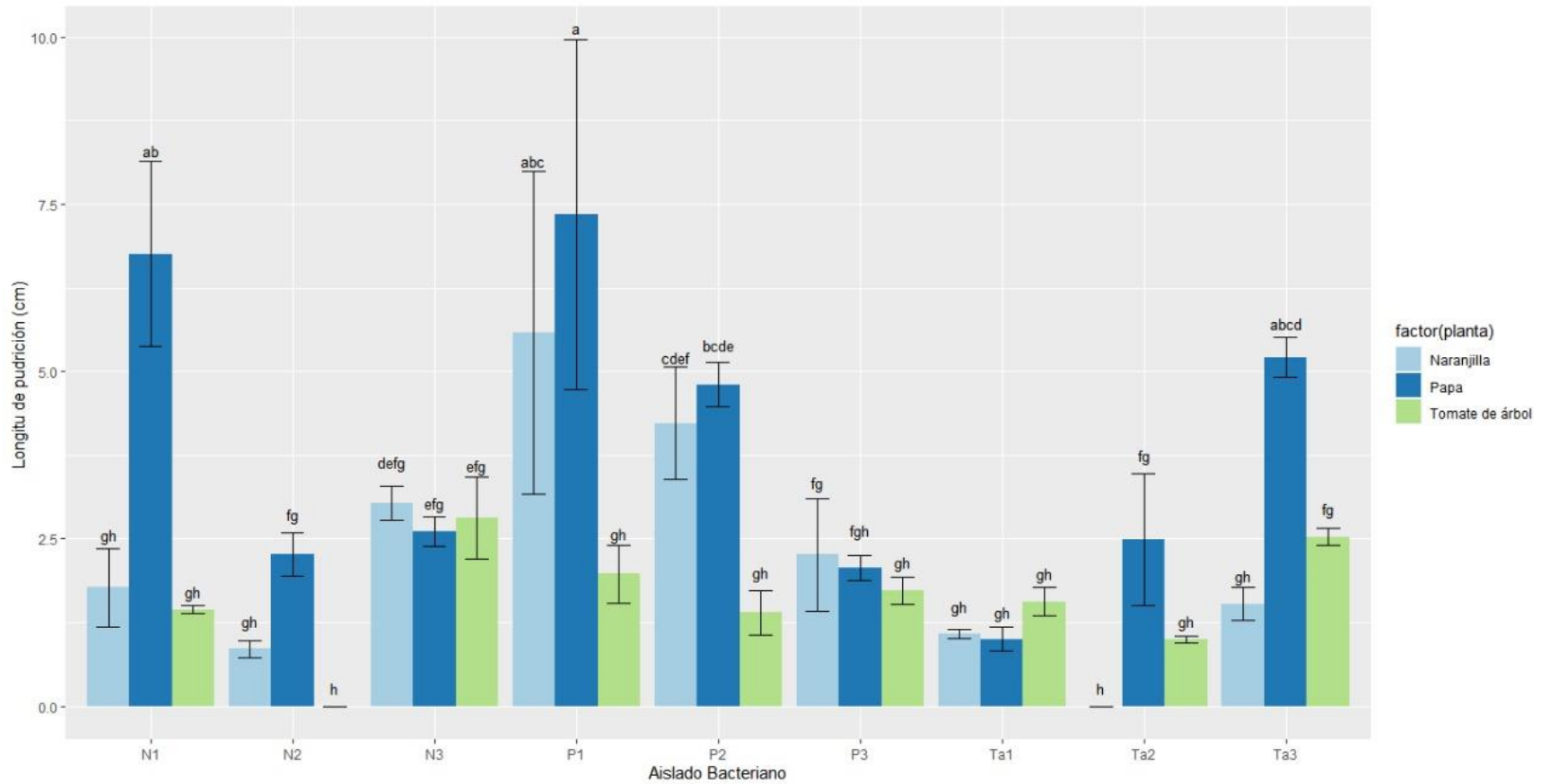
ANOVA de la variable longitud de pudrición (cm)

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

La prueba de comparación múltiple de medias Test HSD de Tukey arrojó doce subgrupos, de los cuales el subgrupo “a” corresponde a papa que presentó una media de longitud de pudrición de 7.34 cm tras ser infectada con el aislado bacteriano P1. Mientras que, el subgrupo “h” corresponde a naranjilla y tomate de árbol que no presentaron pudrición tras la infección con los aislados bacterianos Ta2 y N2, respectivamente. Estos resultados pueden observarse en la Figura 7, donde se presenta un gráfico de barras para cada planta empleada en el estudio, con el aislado bacteriano inoculado y la media de longitud de pudrición.

Figura 7

Subgrupos obtenidos en la variable longitud de pudrición de acuerdo con la interacción de los factores planta: aislado bacteriano



Nota. Los aislados bacterianos N1, N2 y N3 provienen de plantas de naranja. P1, P2 y P3 proceden de plantas de papa. Ta1, Ta2 y Ta3 provienen de plantas de tomate de árbol.

Re-aislamiento Bacteriano

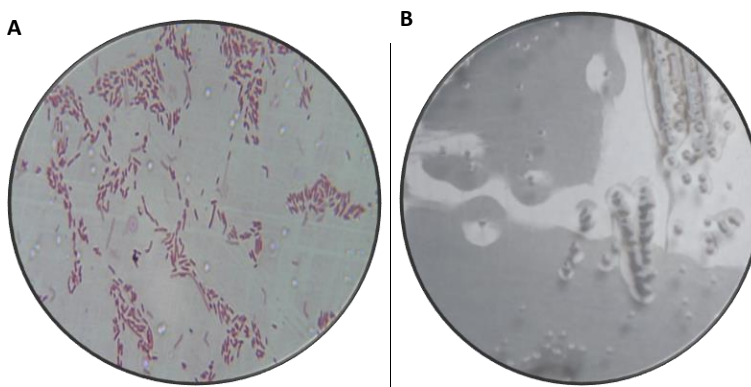
En todos los re-aislamientos bacterianos provenientes de las muestras de plantas infectadas, se obtuvieron colonias formando cavidades en medio CVP, como se puede observar en el Anexo 2. Por lo que se puede asumir que se re-aisló la bacteria pectolítica que se inoculó.

Pruebas Bioquímicas

En la Figura 8 se ilustra como los aislados sembrados en medio CVP formaron colonias redondas, de color crema blanquecino, lisas y crearon agujeros cóncavos; además resultaron ser bacterias Gram negativas (-).

Figura 8

Caracterización fenotípica de bacterias pectolíticas



Nota. A) Vista microscópica con el lente objetivo 100x. B) Agujeros cóncavos en medio CVP.

Dentro de la caracterización bioquímica se verificó que los aislamientos bacterianos fueron: oxido fermentativos (+), catalasa (+), oxidasa (-) y con colonias de color amarillas en medio YDC (-), como se muestra en el Anexo 3. Mientras que el crecimiento en agar nutriente a 37° C (-), menos para dos aislados (P1, N2 y N3) que formaron colonias en esas condiciones, los resultados de las pruebas se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14

Pruebas Bioquímicas para caracterización de aislados bacterianos

Aislado Bacteriano	Tinción Gram	Degradación de pectato (CVP)	Oxido-fermentativa (Hugh and Leifson)	Catalasa	Oxidasa	Crecimiento en agar nutriente a 37°C	Crecimiento en YDC
P1	-	+	FA	+	-	+	C
P2	-	+	FA	+	-	-	C
P3	-	+	FA	+	-	-	C
Ta1	-	+	FA	+	-	-	C
Ta2	-	+	FA	+	-	-	C
Ta3	-	+	FA	+	-	-	C
N1	-	+	FA	+	-	-	C
N2	-	+	FA	+	-	+	C
N3	-	+	FA	+	-	+	C

Nota. “+” indica reacción positiva; “-” indica reacción negativa; “C” indica coloración crema de colonias,

“FA” indica bacterias del tipo facultativa anaeróbica.

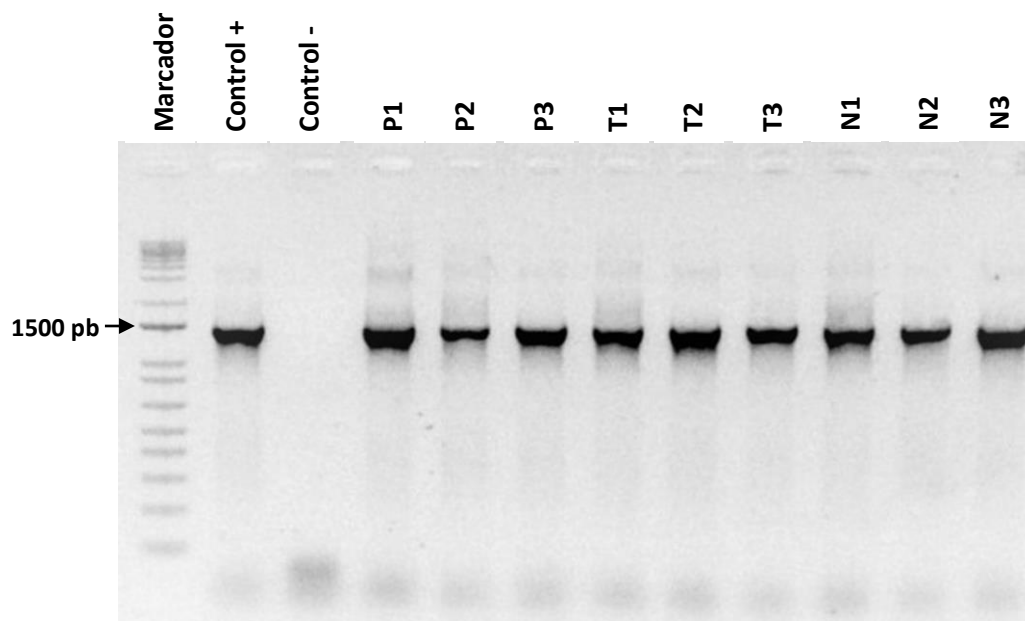
De acuerdo con la identificación fenotípica y bioquímica se puede sugerir que los aislados bacterianos, pertenecen al género *Pectobacterium*. Debido a que este género se caracteriza por ser: catalasa (+), oxidasa (-), oxido fermentativo (+), formar cavidades en CVP y son Gram negativos (Agyemang et al., 2020; Dadaşođlu & Kotan, 2017; Silva et al., 2020)

Identificación Molecular

Los productos PCR que amplificaron la región del gen ARNr 16S, con los cebadores 27F y 1492R, generaron bandas con un tamaño aproximado de 1400 a 1500 pb, como se puede visualizar en la Figura 9.

Figura 9

Amplificación de la sección del gen ARNr 16S para la identificación bacteriana



Nota. Marcador molecular de 1 kb y gel de agarosa al 1,5%.

A partir de las secuencias ensambladas del gen ARNr 16S de cada aislado bacteriano, se pudo determinar la similitud de secuencia, por medio del servidor Blast NCBI; encontrando la especie bacteriana a la que corresponde cada producto PCR, como se puede evidenciar en la Tabla 15.

Tabla 15

Identificación molecular de los productos PCR provenientes de bacterias pectolíticas

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

Capítulo V: Discusión

La enfermedad conocida como pudrición blanda puede estar presente en tubérculos, tallos y raíces que presentan heridas previas (Nuñez & Aegerter, 2019). Chang et al. (2017) asegura que hay factores que predisponen la aparición de la pudrición en los tejidos, como hematomas de cosecha, lesiones por congelación y heridas causadas por insectos. También, se ha demostrado que ciertos insectos son portadores de la enfermedad. Por otro lado, los factores ambientales como la humedad y temperatura pueden favorecer el desarrollo de la pudrición blanda (Agrios, 2005b). Para el ensayo de patogenicidad realizado en el presente estudio, se indujeron heridas en los tallos de papa, tomate de árbol y naranjilla, como se ilustra en la Figura 3. Además, fue necesario situar las plantas en fundas plásticas para la simulación de una cámara húmeda, como se visualiza en la Figura 4. Todo esto con el fin de crear condiciones para el desarrollo de la pudrición blanda en los tejidos.

El desarrollo de los síntomas de la pudrición blanda inicia con una pequeña lesión húmeda, que avanza con rapidez. El tejido afectado se ablanda, la superficie se decolora y la parte interna se vuelve viscosa, generando exudados hacia la parte externa (Bhat et al., 2010). Durante las primeras etapas tras la infección hay ausencia de olor, pero conforme organismos secundarios invaden el tejido infectado, este se torna de color negro en presencia del aire y se desarrolla un olor fétido (Czajkowski et al., 2011). Para que los síntomas de pudrición en tallos se presenten, las bacterias deben multiplicarse para colonizar los vasos del xilema hasta el punto de ocluirlos. Si el número de vasos del xilema ocluidos es mínimo, no se presenta la enfermedad, debido a que el flujo de agua puede no estar tan restringido (Kubheka et al., 2013). En la Figura 6, pueden observarse los síntomas característicos de la enfermedad en plantas de papa, tomate de árbol y naranjilla, todas infectadas con siete de los aislamientos bacterianos, en donde los tallos presentan maceración del tejido, necrosis y liberación de exudados. Mientras que los dos aislamientos restantes correspondientes a los tratamientos T23 no presenta

podrición y T17 muestra una coloración marrón tenue de los haces vasculares, esto puede ocurrir por la nula o mínima oclusión de los vasos del xilema.

Naranjilla INIAP Palora es un híbrido proveniente del cruce de la variedad común con la variedad Yantzaza (Revelo et al., 2010). En la Figura 6 el tratamiento T26 correspondiente al cultivo naranjilla variedad común e inoculado con naranjilla Palora (Naranjilla: N2) no presenta pudrición, solo un ligero cambio de coloración a marrón claro, esto puede ser debido a que el aislado es propio del híbrido y la variedad común no se ve tan afectada por la enfermedad.

Las especies del género *Pectobacterium* pueden ser identificadas mediante pruebas bioquímicas específicas que incluyen actividad catalasa, oxidasa y prueba oxidativa – fermentativa (OF)(Czajkowski et al., 2015). Estas especies presentan actividad catalasa positiva, oxidasa negativa y son anaerobios facultativos capaces de transformar el medio Hugh and Leifson de azul a amarillo, ya que pueden utilizar los carbohidratos (Peralta et al., 2021). De igual manera, Sangeetha et al. (2020) aseguran que *Pectobacterium* spp. forma cavidades profundas en medio CVP. En otros estudios, como el realizado por Dadaşođlu & Kotan (2017) se incluyó el crecimiento de colonias de coloración crema en agar nutriente a 37°C, pertenecientes a la especie *Pectobacterium carotovorum*, mientras que las que no crecieron a dicha temperatura pertenecieron a *P. atrosepticum* o *P. wasabie*. Mientras que en el estudio realizado por (Dees et al., 2017), las bacterias pertenecientes a *P. polaris* crecieron a 37°C. Agyemang et al. (2020) aisló colonias bacterianas del género *Pectobacterium* en medio YDC, las cuales presentaban una coloración blanquecina a crema. Los nueve aislados bacterianos mostraron características similares a las especies del género *Pectobacterium*, con una actividad catalasa (+), oxidasa (-), anaerobios facultativos por medio de la prueba (OF), formaron cavidades en CVP y colonias blanquecinas en medio YDC como se puede observar en el Anexo 3. Tres aislamientos P1, N2 y N3 crecieron en agar nutriente a 37°C mientras que los seis aislamientos restantes no crecieron a dicha temperatura, por lo cual se los puede

identificar hasta nivel de género (*Pectobacterium*) debido a que pudiesen pertenecer a cualquiera de las especies descritas, el resumen de las pruebas bioquímicas mencionadas se muestra en la Tabla 14.

CiNiSli et al. (2019) menciona que las especies del género *Pectobacterium* pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, correspondientes a bacterias Gram Negativas con forma de bacilos cortos. Todos los aislados bacterianos presentaron forma de bacilos con coloración rosa, como se ilustra en la Figura 8.

Uno de los géneros más comunes causantes de la pudrición blanda es *Pectobacterium*, afectando a un amplio rango de especies vegetales como papa, tomate, zanahoria, entre otras, y generando pérdidas económicas. Las especies más conocidas dentro de este género son *Pectobacterium carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum*. Con el pasar de los años, se han descrito otras especies como *Pectobacterium parmentieri* y *Pectobacterium polaris* (Ma et al., 2007). En la Figura 7 se puede visualizar que la papa es el cultivo más susceptible, para los nueve aislamientos.

La Figura 7 muestra que tres aislamientos provenientes de papa (P1, P2, P3) dos de naranjilla (N1, N3) y dos de tomate de árbol (Ta1, Ta3), infectaron a los tres cultivos estudiados. Mientras que el aislamiento Ta2 infectó papa y tomate de árbol; N2 infectó papa y naranjilla. A pesar de que los síntomas ocasionados son similares, estos aislados son diferentes taxonómicamente. En el estudio realizado por Ozturk (2022) las cepas de *Pectobacterium polaris* aisladas, causaron síntomas típicos de pudrición blanda que incluían exudados, oscurecimiento de los haces vasculares y debilitamiento de la integración tisular y necrosis. En el presente estudio, las tres especies de plantas utilizadas fueron infectadas por el aislamiento bacteriano P1. El análisis molecular dio como resultado la correspondencia de este aislamiento bacteriano con la especie *Pectobacterium polaris*. Los síntomas causados por esta bacteria se pueden observar en la Figura 6, donde los tallos presentan ablandamiento del tejido, decoloración y necrosis; mientras que los tallos de papa y naranjilla presentan una abertura longitudinal.

Esta bacteria fue la causante de la mayor longitud de pudrición en papa, con una longitud media de 7.34 cm, como se puede apreciar en la Figura 7.

Pectobacterium atrosepticum causante de pudrición blanda es considerado como uno de los patógenos más peligrosos de la papa y se limita principalmente a este cultivo. Una vez dentro del tejido, esta especie produce grandes cantidades de enzimas pectinolíticas extracelulares, que destruyen la pared celular y lámina media de tubérculos, raíces, tallos y hojas (Hashemi et al., 2020). Los aislados bacterianos P2, P3, Ta1 y Ta2, fueron identificados como *Pectobacterium atrosepticum*, tras los análisis moleculares realizados. Los aislados P2, P3 y Ta1 causaron síntomas de pudrición blanda en papa, tomate de árbol y naranjilla. Se sabe que *Pectobacterium atrosepticum* está limitada únicamente a papa, pero podemos observar que también puede afectar a otras especies vegetales como, naranjilla y tomate de árbol. Dentro de la especie *Pectobacterium atrosepticum* se pueden encontrar diferentes cepas, que afectan a diferentes especies de papa (Ozturk et al., 2018). En el presente estudio, se evidenció que el aislado Ta2, a pesar de ser identificado como *Pectobacterium atrosepticum*, no infectó a naranjilla, como se pudo observar en la figura 6 (T23). Dándonos un indicio de que los dos aislados provinieron de diferentes cepas.

La especie *Pectobacterium punjabense* fue identificada por primera vez en Pakistán y recientemente en Europa, posterior a esto no hay registros de esta especie en otros países. El hospedero principal es la papa, ocasionando síntomas de pudrición blanda, tales como, descomposición de los tejidos vegetales y ennegrecimiento de la base del tallo (Cigna et al., 2021; Sarfraz et al., 2018). Los aislados bacterianos correspondientes a Ta3 y N1, fueron identificados como *Pectobacterium punjabense*. Estos causaron síntomas de pudrición blanda relacionados con necrosis del tejido, en las tres especies de plantas utilizadas en el estudio, papa, tomate de árbol y naranjilla, como se puede visualizar en la Figura 6, tratamientos T6, T7, T15, T16, T24 y T25. Cabe destacar que el tratamiento T24

mostró necrosis alrededor del punto de infección, pero al realizar un corte transversal se observó como la pudrición avanza por los tejidos internos del tallo.

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* causante de la pudrición blanda, provoca la degradación de la pectina, que es un componente principal de la pared celular primaria en varias especies vegetales (Park et al., 2012). De los nueve aislados bacterianos utilizados en el presente estudio, N2 y N3, fueron identificados como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. El aislado N3, provocó los síntomas característicos de pudrición blanda como, maceración del tejido, necrosis y liberación de exudados en papa, tomate de árbol y naranjilla. Mientras que, el aislado N2, únicamente produjo podredumbre en papa; mientras que, en tomate de árbol, las bacterias colonizaron los haces vasculares, provocando un cambio en la coloración a café claro, no existió maceración del tejido y en naranjilla ocasiono un oscurecimiento, alrededor de la herida provocada en el tallo, como se ilustra en la Figura 6, tratamientos T8, T17 y T26, respectivamente. Se sabe que la especie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* está ampliamente expandida por el mundo y provoca pudrición blanda en diferentes especies vegetales como zanahoria, pepino, berenjena, ajo, cebolla, pimiento, papa, rábano, calabaza y tomate (Abd El-kafie et al., 2019). En el presente estudio, se observó que además de papa, esta especie puede afectar, aunque en menor proporción a tomate de árbol y naranjilla, ya que los re-aislados obtenidos de los haces vasculares y del cambio de coloración, formaron agujeros en medio CVP, como se ilustra en el Anexo 2, T17 y T26.

Capítulo VI: Conclusiones

- Los aislamientos bacterianos más patogénicos fueron *Pectobacterium polaris* (P1), *P. atrosepticum* (P2, P3 y Ta1), *P. punjabense* (Ta3, N1) y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (N3); ya que infectaron a los tres cultivos estudiados, ocasionando síntomas como: maceración del tejido, necrosis, liberación de exudados y olor fétido, característico de este tipo de bacterias.
- Los dos aislamientos restantes tuvieron patogenicidad diferencial, es decir que *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (N2) infectó papa y levemente a naranjilla produciendo un cambio tenue en la coloración del tallo; mientras que en tomate de árbol se observó la colonización de los haces vasculares, el aislamiento correspondiente a *P. atrosepticum* (Ta2) infectó a papa, tomate de árbol, pero no naranjilla.
- El cultivo más susceptible a la pudrición blanda fue papa inoculada con *Pectobacterium polaris*, dando una longitud de pudrición de 7,34 cm, seguido de la naranjilla inoculada con *Pectobacterium polaris* con una longitud de pudrición de 5,58 cm, mientras que el tomate de árbol inoculado con *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* arrojó 2,81 cm en la longitud de pudrición.
- Los nueve aislamientos bacterianos presentaron similar respuesta a las pruebas bioquímicas: catalasa (+), oxidasa (-), anaerobias facultativas (cambio de coloración de azul a amarillo), formación de colonias amarillas en medio YDC (-) y formación de cavidades en medio CVP (+). Además, el fenotipo característico fue bacilos Gram negativos, por lo que se determinó que pertenecen al género *Pectobacterium*.
- Las pruebas moleculares sustentaron a lo predicho por las pruebas bioquímicas, ya que el género de todos los aislamientos bacterianos fue *Pectobacterium*.

Capítulo VII: Recomendaciones

- Complementar a las pruebas bioquímicas realizadas con pruebas API, que permiten la identificación rápida de Enterobacterias y otras bacterias Gram negativas, a nivel de género o especie.
- Caracterizar molecularmente a los aislamientos bacterianos por medio del uso de otros cebadores u otras regiones de ADN, para así complementar el análisis molecular obtenido en este estudio.
- Implementar secuenciación de nueva generación (NGS), para obtener resultados más precisos y óptimos; permitiendo un análisis genómico de mejor calidad.
- Aplicar un screening en las diferentes variedades de los cultivos estudiados para así conocer si existe resistencia varietal ante las bacterias pectolíticas.
- Para el manejo de esta enfermedad se recomienda considerar, la rotación de cultivos, donde no deberían constar solanáceas, ya que se encontró como hospedantes de todas las especies estudiadas.

Capítulo VIII: Referencias

- Abbott, D. W., & Boraston, A. B. (2008). Structural Biology of Pectin Degradation by Enterobacteriaceae. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(2), 301–316.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00038-07>
- Abd El-kafie, O. M., El-Saka, M. M., Abd El-Baset, M. M., & Khalil, S. M. M. E. I. (2019). Impact of Explants, Plant Growth Regulators and their Interaction on Micropropagation of Impatiens balsamina, L. *Journal of Plant Production*, 10(7), 495–501.
<https://doi.org/10.21608/jpp.2019.53543>
- Agrios, G. N. (2005b). chapter twelve - PLANT DISEASES CAUSED BY PROKARYOTES: BACTERIA AND MOLLICUTES. En G. N. Agrios (Ed.), *Plant Pathology (Fifth Edition)* (pp. 615–703). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-047378-9.50018-X>
- Agrios, G. N. (Ed.). (2005a). Plant Pathology. En *Plant Pathology (Fifth Edition)* (p. xxiii). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-047378-9.50006-3>
- Aguilar-Marcelino, L., Mendoza-de-Gives, P., Al-Ani, L. K. T., López-Arellano, M. E., Gómez-Rodríguez, O., Villar-Luna, E., & Reyes-Guerrero, D. E. (2020). Chapter 26—Using molecular techniques applied to beneficial microorganisms as biotechnological tools for controlling agricultural plant pathogens and pest. En V. Sharma, R. Salwan, & L. K. T. Al-Ani (Eds.), *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture* (pp. 333–349). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818469-1.00027-4>
- Agyemang, P. A., Kabir, M. N., Kersey, C. M., & Dumenyo, C. K. (2020). The Bacterial Soft Rot Pathogens, *Pectobacterium carotovorum* and *P. atrosepticum*, Respond to Different Classes of Virulence-Inducing Host Chemical Signals. *Horticulturae*, 6(1), Art. 1.
<https://doi.org/10.3390/horticulturae6010013>

- Amaya, A. P. A., Pineda, M. E. B., & Vargas, N. C. A. (2021). *Pectobacterium carotovorum*: Agente fitopatogéno causante de la pudrición blanda en la papa (*Solanum tuberosum*). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 22(2), Art. 2. https://doi.org/10.21930/rcta.vol22_num2_art:1710
- Araujo Jaramillo, M. A., Cartagena Ayala, Y. E., Castillo Carrillo, C. I., Cuesta Subía, H. X., Monteros Jácome, J. C., Paula Caicedo, N. R., Racines Jaramillo, M. R., Rivadeneira Ruales, J. E., Velásquez Carrera, J. S., León Ruíz, J. E., Panchi Umaginga, N. G., & Andrade Piedra, J. L. (2021). *Manual del cultivo de papa para pequeños productores. 3ra. Edición*. Quito, EC: INIAP-EESC, 2021. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5672>
- Aremu, B. R., & Babalola, O. O. (2015). Classification and Taxonomy of Vegetable Macergens. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.01361>
- Baylis, C. L. (2006). 22—Enterobacteriaceae. En C. de W. Blackburn (Ed.), *Food Spoilage Microorganisms* (pp. 624–667). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845691417.5.624>
- Bhat*, K. A., Bhat, N. A., Mohiddin, F. A., Sheikh, P. A., & Wani, A. H. (2012). Studies on pectinase activities of isolates of *Erwinia carotovora* and *Rhizopus sp.* Causing soft rot in cabbage (*Brassica oleracea var capitata* L.). *African Journal of Agricultural Research*, 7(45), 6062–6067. <https://doi.org/10.5897/AJAR12.1215>
- Bhat, K. A., Masood, S. D., Bhat, N. A., Bhat, M. A., Razvi, S. M., Mir, M. R., Akhtar, S., Wani, N., & Habib, M. (2010). Current Status of Post Harvest Soft Rot in Vegetables: A Review. *Asian Journal of Plant Sciences*. <http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/ajps/2010/200-208.pdf>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>

- Bradshaw, J. E. (2021). Domestication to Twenty-First-Century Potato Cultivars. En J. E. Bradshaw (Ed.), *Potato Breeding: Theory and Practice* (pp. 3–51). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-64414-7_1
- Buono, S., Aguirre, C., Perondi, H., & Ansonnaud, G. (2018). *Solanum betaceum* (Cav), Sendt.
https://www.procisur.org.uy/adjuntos/01e8c39fb854_e-arbol-PROCISUR.pdf
- Caiza, R. B. (2019). *Caracterización patogénica, bioquímica y molecular del agente causal de la pudrición de tallo del maíz, Variedad iniap-103 mishqui sara.*
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/18996>
- Calvo, I. (2009). *Proyecto Microcuenca Plantón.* <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/AV-0982.pdf>
- Castillo, C., & Llumiquinga, P. (2021). *Manual para reconocer e identificar al psílido de la papa (Bactericera cockerelli Sulc), en campo y laboratorio.*
- Castro, W., & Herrera, L. (2019). *La naranjilla (Solanum quitoense Lam.) en Ecuador.*
- Chang, Z., Lv, J., Qi, H., Ma, Y., Chen, D., Xie, J., & Sun, Y. (2017). Bacterial Infection Potato Tuber Soft Rot Disease Detection Based on Electronic Nose. *Open Life Sciences*, 12(1), 379–385.
<https://doi.org/10.1515/biol-2017-0044>
- Charkowski, A. O. (2014). The Changing Face of Bacterial Soft-Rot Diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 56(1), 269–288. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045906>
- Charkowski, A. O. (2018). The Changing Face of Bacterial Soft-Rot Diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 56(1), 269–288. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045906>
- Cigna, J., Laurent, A., Waleron, M., Waleron, K., Dewaegeneire, P., van der Wolf, J., Andrivon, D., Faure, D., & Hélias, V. (2021). European Population of *Pectobacterium punjabense*: Genomic Diversity, Tuber Maceration Capacity and a Detection Tool for This Rarely Occurring Potato Pathogen. *Microorganisms*, 9(4), 781. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040781>

- CiNiSlı, K. T., Kiliç, S. M., Uçar, S., Canca, E., & dikbaşı, N. (2019). *Isolation Of Pectobacterium Carotovorum, Identification With 16s Rrna, Phytase Activity And Characterization Of The Bacteria* [Preprint]. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.2.18716/v1>
- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840–862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- Cohen, J. (2017). 1—The Evolution of Koch’s Postulates. En J. Cohen, W. G. Powderly, & S. M. Opal (Eds.), *Infectious Diseases (Fourth Edition)* (pp. 1-3.e1). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00001-0>
- Cuesta Subía, H. X., Rivadeneira Ruales, J. E., Pumisacho, M., Montesdeoca, F., Velásquez, J., Reinoso R., I. A., & Monteros J., C. (2014). *Manual del cultivo de papa para pequeños productores*. Quito, EC: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Programa Nacional de Raíces y Tubérculos Rubro Papa. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/3033>
- Cuppels, D., & Kelman, A. (1973). *Evaluation of Selective Media for Isolation of Soft-Rot Bacteria from Soil and Plant Tissue*. 468–475.
- Czajkowski, R., Pérombelon, M. c. m., Jafra, S., Lojkowska, E., Potrykus, M., van der Wolf, J. m., & Sledz, W. (2015). Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: A review. *Annals of Applied Biology*, 166(1), 18–38. <https://doi.org/10.1111/aab.12166>
- Czajkowski, R., Pérombelon, M. C. M., van Veen, J. A., & van der Wolf, J. M. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: A review. *Plant Pathology*, 60(6), 999–1013. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02470.x>

- da Silva, W. L., Yang, K.-T., Pettis, G. S., Soares, N. R., Giorno, R., & Clark, C. A. (2019). Flooding-Associated Soft Rot of Sweetpotato Storage Roots Caused by Distinct Clostridium Isolates. *Plant Disease*, 103(12), 3050–3056. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0548-RE>
- Dadaşođlu, F., & Kotan, R. (2017). IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM. 27(2), 8.
- Dees, M. W., Lysøe, E., Rossmann, S., Perminow, J., & Brurberg, M. B. (2017). *Pectobacterium polaris* sp. Nov., isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(12), 5222–5229. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002448>
- Elbanna, K., Elnaggar, S., & Bakeer, A. (2014). Characterization of *Bacillus altitudinis* as a New Causative Agent of Bacterial Soft Rot. *Journal of Phytopathology*, 162(11–12), 712–722. <https://doi.org/10.1111/jph.12250>
- Gardan, L., Gouy, C., Christen, R., & Samson, R. 2003. (2003). Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(2), 381–391. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02423-0>
- Guo, M., Liu, Y., Liu, S. N., Qu, Q. Z., Cui, T. F., & Zhang, Y. W. (2020). First Report of Bacterial Soft Rot Caused by *Pantoea agglomerans* on Chinese Cabbage in China. *Plant Disease*, 104(1), 277. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-19-0746-PDN>
- Hashemi Tameh, M., Primiceri, E., Chiriaco, M. S., Poltronieri, P., Bahar, M., & Maruccio, G. (2020). *Pectobacterium atrosepticum* Biosensor for Monitoring Blackleg and Soft Rot Disease of Potato. *Biosensors*, 10(6), 64. <https://doi.org/10.3390/bios10060064>

- Hélias, V., Hamon, P., Huchet, E., Wolf, J. V. D., & Andrivon, D. (2012). Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Plant Pathology*, *61*(2), 339–345. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02508.x>
- INIAP. (2002). *Cultivo de la papa en el Ecuador*.
<https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2804/3/iniapsc190c2.pdf>
- INIAP. (2014b). *Naranjilla*. <http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mfruti/rnaranjilla>
- INIAP. (2014a). *Papa*. Retrieved from <http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mraiz/rpapa>
- INIAP. (2014c). *Tomáte de árbol*. <http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mfruti/rtomatea>
- Ishige, T., Itoga, S., & Matsushita, K. (2018). Chapter Two—Locked Nucleic Acid Technology for Highly Sensitive Detection of Somatic Mutations in Cancer. En G. S. Makowski (Ed.), *Advances in Clinical Chemistry* (Vol. 83, pp. 53–72). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2017.10.002>
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(9), 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- Kannan, V. R., & Bastas, K. K. (Eds.). (2015). Role of Defense Enzymes in the Control of Plant Pathogenic Bacteria. En *Sustainable Approaches to Controlling Plant Pathogenic Bacteria*. CRC Press.
- Kubheka, G. C., Coutinho, T. A., Moleleki, N., & Moleleki, L. N. (2013). Colonization patterns of an mCherry-tagged *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Brasiliense* strain in potato plants. *Phytopathology*, *103*(12), 1268–1279. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-13-0049-R>
- Lasluisa, D. K. (2021). *Detección del agente bacteriano causal de la pudrición vascular de tallo y hojas en cultivos de tomate riñón (Solanum lycopersicum) var. Pietro, en las provincias de Pichincha y Cotopaxi*. <http://repositorio.puce.edu.ec:80/handle/22000/19027>
- Lee, D. H., Lim, J.-A., Lee, J., Roh, E., Jung, K., Choi, M., Oh, C., Ryu, S., Yun, J., & Heu, S. 2013. (2013). Characterization of genes required for the pathogenicity of *Pectobacterium carotovorum* subsp.

- Carotovorum* Pcc21 in Chinese cabbage. *Microbiology*, 159(Pt_7), 1487–1496.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.067280-0>
- Liao, L., Hei, R., Tang, Y., Liu, S., & Zhou, J. (2016). First Report of Soft Rot Disease of Peach Caused by *Pantoea ananatis* in China. *Plant Disease*, 100(2), 516–516. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-15-0620-PDN>
- Lopardo, H., Predari, S., & Vay, C. (2016). *Manual de Microbiología clínica de la Asociación de Argentina de Microbiología*.
- Ludwig, W. (2007). Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification. *International Journal of Food Microbiology*, 120(3), 225–236.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.023>
- Ma, B., Hibbing, M. E., Kim, H.-S., Reedy, R. M., Yedidia, I., Breuer, J., Breuer, J., Glasner, J. D., Perna, N. T., Kelman, A., & Charkowski, A. O. (2007). Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *pectobacterium* and *dickeya*. *Phytopathology*, 97(9), 1150–1163.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-9-1150>
- Ma, X., Schloop, A., Swingle, B., & Perry, K. L. (2018). *Pectobacterium* and *Dickeya* Responsible for Potato Blackleg Disease in New York State in 2016. *Plant Disease*, 102(9), 1834–1840.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1595-RE>
- Martins, P. M. M., Merfa, M. V., Takita, M. A., & De Souza, A. A. (2018). Persistence in Phytopathogenic Bacteria: Do We Know Enough? *Frontiers in Microbiology*, 9.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01099>
- Matsumoto, H., Jitareerat, P., Baba, Y., & Tsuyumu, S. (2003). Comparative Study of Regulatory Mechanisms for Pectinase Production by *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 16(3), 226–237.
<https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.3.226>

- Méndez, P., & Gaete, N. (2009). *Principales enfermedades que afectan al cultivo de papa*.
- Mergaert, J., Verdonck, L., Kersters, K., Swings, J., Boeufgras, J.-M., & De Ley, J. Y. 1984. (1984). Numerical Taxonomy of *Erwinia* Species Using API Systems. *Microbiology*, 130(8), 1893–1910.
<https://doi.org/10.1099/00221287-130-8-1893>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2016). *Boletín situacional tomate de árbol*.
http://sipa.agricultura.gob.ec/biblioteca/boletines_situacionales/2016/tomatedearbol/boletin_situacional_tomate_de_arbol_2016.pdf
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2019a). *Boletín Situacional Naranjilla*.
<http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/frutas/naranjilla>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2019b). *Boletín Situacional Papa*.
<http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/papa/boletines-situacionales-papa-ecuador>
- Montesdeoca, F., Panchi, N., Navarrete, I., Pallo, E., Yumisaca, F., Taipe, A., Espinoza, S., & Andrade, J. (2013). *Guía fotográfica de las principales plagas del cultivo de papa en Ecuador*. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Centro Internacional de la Papa (CIP), Consorcio de Productores de Papa (CONPAPA). <https://cipotato.org/wp-content/uploads/2013/04/0060841-1.pdf>
- Moreno-Miranda, C., Molina, J. I., Ortiz, J., Peñafiel, C., & Moreno, R. (2020). Cadena de valor en la red de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en Ecuador. *Agronomy Mesoamerican*, 13–29.
<https://doi.org/10.15517/am.v31i1.36887>
- Morillo, E., & Miño Castro, G. M. (2011). *Marcadores moleculares en biotecnología agrícola: Manual de técnicas y procedimientos en INIAP*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/848>
- Murusegan, G., & Procop, G. (2009). *Direct Genome Sequencing in Diagnostic Pathology*. 56–62.
<https://doi.org/10.1016/B978-044306901-7.50011-0>

- Muturi, P., Yu, J., Li, J., Jiang, M., Maina, A. N., Kariuki, S., Mwaura, F. B., & Wei, H. (2018). Isolation and characterization of pectolytic bacterial pathogens infecting potatoes in Nakuru County, Kenya. *Journal of Applied Microbiology*, 124(6), 1580–1588. <https://doi.org/10.1111/jam.13730>
- Nuñez, J., & Aegerter, B. (2019). *Bacterial Soft Rot and Blackleg / Potato / Agriculture: Pest Management Guidelines / UC Statewide IPM Program (UC IPM)*.
<https://www2.ipm.ucanr.edu/agriculture/potato/Bacterial-Soft-Rot-and-Blackleg/>
- Ortiz, O., & Mares, V. (2017). The Historical, Social, and Economic Importance of the Potato Crop. En S. Kumar Chakrabarti, C. Xie, & J. Kumar Tiwari (Eds.), *The Potato Genome* (pp. 1–10). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-66135-3_1
- Oyarzún, P. J., León, D., Pucha, J., & Forbes, G. (2002). “Pierna Negra” y “Pudrición Blanda” una amenaza difícil de enfrentar en el cultivo de papa en Ecuador.
<http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/1490>
- Ozturk, M. (2022). Determination of the host range of *Pectobacterium polaris* causing bacterial soft rot disease. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 27(2), Art. 2.
<https://doi.org/10.37908/mkutbd.1064147>
- Ozturk, M., Aksoy, H. M., Potrykus, M., & Lojkowska, E. (2018). Genotypic and phenotypic variability of *Pectobacterium* strains causing blackleg and soft rot on potato in Turkey. *European Journal of Plant Pathology*, 152(1), 143–155. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1459-y>
- Panda, P., Vanga, B. R., Lu, A., Fiers, M., Fineran, P. C., Butler, R., Armstrong, K., Ronson, C. W., & Pitman, A. R. (2016). *Pectobacterium atrosepticum* and *Pectobacterium carotovorum* Harbor Distinct, Independently Acquired Integrative and Conjugative Elements Encoding Coronafacic Acid that Enhance Virulence on Potato Stems. *Frontiers in Microbiology*, 7.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00397>

- Park, T.-H., Choi, B.-S., Choi, A.-Y., Choi, I.-Y., Heu, S., & Park, B.-S. (2012). Genome Sequence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* Strain PCC21, a Pathogen Causing Soft Rot in Chinese Cabbage. *Journal of Bacteriology*, *194*(22), 6345–6346.
<https://doi.org/10.1128/JB.01583-12>
- Pasanen, M., Laurila, J., Brader, G., Palva, E. t., Ahola, V., van der Wolf, J., Hannukkala, A., & Pirhonen, M. (2013). Characterisation of *Pectobacterium wasabiae* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* isolates from diseased potato plants in Finland. *Annals of Applied Biology*, *163*(3), 403–419. <https://doi.org/10.1111/aab.12076>
- Patel, R. (2009). Food sovereignty. *The Journal of Peasant Studies*, *36*(3), 663–706.
<https://doi.org/10.1080/03066150903143079>
- Peralta, D., Barragán, D. A., Sandozequi, A. de, Gutiérrez, M. F., Segovia, L., Martínez-Anaya, C., Alcaraz, L. D., & Almaraz, R. de la T. (2021). *Identification of Pectobacterium species isolated from the soft rot of tetecho (Neobuxbaumia tetetzo), a columnar cactus, and associated metagenomics* (p. 2021.02.01.429127). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.02.01.429127>
- Pérombelon, M. C. M., & Van der Wolf, J. (2002). Potato diseases caused by soft rot erwinias: An overview of pathogenesis. *Plant Pathology*, *51*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1046/j.0032-0862.2001.Shorttitle.doc.x>
- Rafiei, S., Khodakaramian, G., & Baghaee-Ravari, S. (2015). Characterization of *Pectobacterium* species isolated from vegetable crops in north-west of Iran. *African Journal of Agricultural Research*, *10*(46), 4258–4267. <https://doi.org/10.5897/AJAR2015.9551>
- Revelo, J., Pérez, E., & Maila, M. (2004). *Ecología del cultivo de tomate de árbol: Sesión 1*.
<http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2751>
- Revelo, J., Viteri D., P., Vásquez C., W., Valverde, F., León F., J., & Gallegos, P. (2010). *Manual del cultivo ecológico de la naranjilla*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/4907>

- Reverchon, S., Muskhelishvili, G., & Nasser, W. (2016). Virulence Program of a Bacterial Plant Pathogen: The *Dickeya* Model. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 142, 51–92.
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.05.005>
- Rodríguez, L. E. R. (2010). Origen y evolución de la papa cultivada. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 28(1), Art. 1.
- Rodríguez, M., González, A., & Iglesias, L. (2009). *Pectobacterium*.
- Rosenzweig, N. (2016). *Tuber soft rot, blackleg and aerial stem rot*.
https://www.canr.msu.edu/resources/tuber_soft_rot_blackleg_and_aerial_stem_rot_e3335
- Rstudio Team. (2020). *RStudio | Open source & professional software for data science teams*.
<https://www.rstudio.com/>
- Sangeetha, V., Harish, S., Thiruvudainambi, S., & Beulah, A. (2020). Phenotypic and Biochemical Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum*, the Incitant of Onion Soft Rot. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(12), 8–15.
<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.912.002>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467.
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Silva, A. S., Luz, J. M. Q., Tebaldi, N. D., & Morais, T. P. de. (2020). Diversity of *Pectobacterium* strains by biochemical, physiological, and molecular characterization. *Bioscience Journal*, 36(2), Art. 2.
<https://doi.org/10.14393/BJ-v36n2a2020-46256>
- Stackebrandt, E. (1999). BACTERIA | Classification of the Bacteria – Phylogenetic Approach. En R. K. Robinson (Ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 178–183). Elsevier.
<https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0145>

- Stackebrandt, E. (2014). BACTERIA | Classification of the Bacteria – Phylogenetic Approach. En C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 174–179). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00028-8>
- Strange, R. N., & Scott, P. R. (2005). Plant Disease: A Threat to Global Food Security. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 83–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839>
- Tamba, M. (2012). *Selección de materiales promisorios de tomate de árbol (Solanum betaceum Cav.) con resistencia a “Antracnosis” (Colletotrichum sp.), productividad y calidad del fruto. Quito: INIAP.* <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/1050/1/iniapscP.T154s2012.pdf>
- Torres, L., Montesdeoca, F., & Andrade, J. (2009). *Manejo del tubérculo semilla de papa en Ecuador. Obtenido de Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones: <Http://www.conpapa.com/raizdevida/ManejoDeSemilla.html>. HugeDomains. https://www.HugeDomains.com/domain_profile.cfm?d=ConPapa.com*
- Toth, I. K., Bell, K. S., Holeva, M. C., & Birch, P. R. J. (2003). Soft rot erwiniae: From genes to genomes. *Molecular Plant Pathology*, 4(1), 17–30. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00149.x>
- Trujillo, D. X. (2014). *Microorganismos asociados a la pudrición blanda del tallo y manchado del fruto en el cultivo de pitahaya amarilla en Ecuador. Tumbaco—Pichincha. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/2494>*
- Van der Wolf, J., & de Boer, S. (2015). *Phytopathogenic Bacteria*. 65–77.
- Velásquez Carrera, J. S., Andrade Estrada, V., Araujo Jaramillo, M. A., Rivadeneira Ruales, J. E., & Tinoco Salazar, K. (2021). *Manual de producción de tubérculo semilla de papa*. Quito, EC: INIAP-EESC, 2021. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5790>
- Vernet, G. (2017). 18—Genomics of Infectious Diseases and Private Industry. En M. Tibayrenc (Ed.), *Genetics and Evolution of Infectious Diseases (Second Edition)* (pp. 421–434). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799942-5.00018-4>

- Viteri, A., Regalado, H., & Toaza, A. (2020). IDENTIFICACIÓN DE *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas marginalis*, CAUSANTES DEL SÍNDROME DE DESORDEN DEL PERIDERMIO “PINK EYE” EN PAPA. *ECUADOR ES CALIDAD*, 7(2), Art. 2. <https://doi.org/10.36331/revista.v7i2.108>
- Voronina, M. V., Lukianova, A. A., Shneider, M. M., Korzhenkov, A. A., Toschakov, S. V., Miroshnikov, K. A., Vasiliev, D. M., & Ignatov, A. N. (2021). First Report of *Pectobacterium polaris* Causing Soft Rot and Blackleg of Potato in Russia. *Plant Disease*, 105(6), 1851. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-20-1864-PDN>
- Waleron, M., Waleron, K., & Lojkowska, E. (2014). Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Odoriferum* causing soft rot of stored vegetables. *European Journal of Plant Pathology*, 139(3), 457–469. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0403-z>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Tse, H., & Yuen, K.-Y. (2008). Then and now: Use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(10), 908–934. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x>
- Zhang, P., Seth, A., & Fernandes, H. (2014). Other Post-PCR Detection Technologies. En L. M. McManus & R. N. Mitchell (Eds.), *Pathobiology of Human Disease* (pp. 4074–4088). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.07707-8>
- Zhou, X., & Li, Y. (Eds.). (2015). Chapter 2—Techniques for Oral Microbiology. En *Atlas of Oral Microbiology* (pp. 15–40). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802234-4.00002-1>

Capítulo IX: Anexos