



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS
FITOPATÓGENAS ASOCIADAS AL CULTIVO DE
PAPAYO (*Carica papaya* L).**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADO EN BIOQUÍMICA
DIAGNÓSTICA**

P R E S E N T A:

SALAZAR HINOJOSA ANGELICA

**ASESOR DE TESIS:
BIÓLOGA BÁRBARA HERNÁNDEZ MACÍAS**

**CO-ASESOR DE TESIS:
M. en C. SOCORRO SANDRA ROBLES MARTÍNEZ**

Cuautitlán Izcalli, Estado De México 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS ASOCIADAS AL
CULTIVO DE PAPAYO (*Carica papaya* L).**

Tesis elaborada en el laboratorio de bacteriología del Servicio
Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
(SENASICA).

DEDICATORIA

A mis padres Aurelio Salazar Velázquez y Catalina Hinojosa Cuellar por apoyarme en todo momento, porque sin ellos esto no podría haber sido posible.

Ni mi vida entera bastaría para pagarles la entrega de la suya.

A mis hermanos Roberto y Aurelio por ser como son, en momentos en los que sentía que asfixiaba, me regalaron siempre el aire fresco de una carcajada.

A mis abuelitos que siempre estuvieron al pendiente de mi vida escolar sobre todo a mi abuelita “Tibu” que ya no está aquí.

A mi “primo” Ángel con quien he compartido en estos últimos años muchos momentos juntos y con quien he encontrado el verdadero significado de la amistad.

A mis amigas de la facultad Lupita Martínez, Yathzú y Lizbeth, pero sobre todo a mi amiga Lupita Ortega con quien compartí muchas grandes y buenas experiencias.

A mis amigos de la preparatoria Jair y Xavier con quienes me divertí y pase muy buenos momentos.

A Viridiana, Alice, Itzel, y Ángela amigas que conocí a lo largo de este camino.

Y a la Guadalupana a quién me encomiendo en todo momento.

Muchas Gracias por Apoyarme siempre.

AGRADECIMIENTOS

A la Bióloga Bárbara Hernández Macías por darme la oportunidad de realizar esta tesis y por ser la asesora de este proyecto.

A la M. en C. Socorro Sandra Robles Martínez que accedió a ser mi co-asesora y por quien tomé este gran amor que tengo hacia la microbiología; así como por regalarme un poco de su tiempo.

A el M. en C. Andrés Aguilar Granados quien fue de gran ayuda con sus constantes sugerencias y regaños para la realización de este trabajo; también por compartirme un poco de su gran experiencia y conocimiento, pero sobre todo por tener la suficiente paciencia para explicarme aquellas cosas que me resultaban complicadas.

Al Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) por brindarme el espacio y materiales necesarios para la realización de este proyecto; en especial al Laboratorio de Bacteriología de Sanidad Fitosanitaria y a todos los que lo conforman: Sandy, Mari y Héctor.

Y a mi segundo hogar la UNAM quien ha sido la creadora de grandes personajes y a quien debo mi formación profesional.

Índice General

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
Índice de abreviaturas	v
Índice de figuras	vi
Índice de Tablas	vii
I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	3
III. Marco teórico	6
3.1 Características generales del papayo	6
3.2 Producción de papaya en México	7
3.3 Características generales de las bacterias fitopatógenas.....	8
3.3.1 Pared celular	9
3.3.2 Membrana citoplasmática	10
3.3.3 Apéndices	10
3.3.4 Material genético	11
3.3.5 Ribosomas.....	11
3.3.6 Metabolismo	12
3.3.7 Multiplicación.....	13
3.4 Forma de penetración y diseminación de la bacteria en la planta.....	14
3.5 Principales géneros de bacterias fitopatógenas	15
3.6 Lesiones características producidas por bacterias fitopatógenas.....	15
3.7 Aislamiento e identificación de la bacteria fitopatógena.....	16
3.8 Pudrición blanda	17
3.8 <i>Pectobacterium aroidearum</i>	18
3.9 Pruebas de rápidas fitopatogenicidad	20
3.9.1 Reacción de hipersensibilidad.....	21
3.9.2 Pudrición del tubérculo de papa.....	22
3.10 Pruebas bioquímicas (Biolog Microbial ID System ^{MR})	22
3.11 Extracción de DNA y PCR	25
3.11 Gen DNAr 16s.....	27
3.12 Postulados de Koch	29

IV. Objetivos	32
4.1 Objetivo general	32
4.2 Objetivos específicos.....	32
V. Hipótesis.....	32
VI. Metodología	33
6.1 Muestreo.....	33
6.2 Aislamiento y purificación	33
6.3 Pruebas rápidas de fitopatogenicidad	34
6.4 Identificación bioquímica de microorganismos (Biolog Microbial ID System®)	35
6.5 Extracción del DNA	36
6.6 Amplificación y secuenciación del gen DNAr 16s	37
6.7 Secuenciación y análisis de la secuencia.....	38
6.8 Patogenicidad en fruto y plantulas de papayo	39
VII. Resultados	40
7.1 Muestreo	40
7.2 Aislamiento y selección	40
7.3 Identificación bioquímica de microorganismos (Biolog Microbial ID System®)	41
7.5 Patogenicidad en fruto y plántulas de papayo	43
7.6 Amplificación del gen ribosómico DNA 16s.....	46
7.7 Secuenciación	46
7.8 Análisis filogenético.....	47
VIII. Análisis de resultados.....	48
IX. Conclusiones	50
X. Referencias	52
XI. Anexos.....	58

Índice de abreviaturas

SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
NCBI	National Center for Biotechnology Information
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
RDP	Ribosomal Database Project
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
TAE	Tris, acetato y EDTA
DNTP	dinucleótidos trifosforilados
CNRF	Centro Nacional de Referencia
LPSN	List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature

Índice de figuras

Figura 1. Estados productores de papaya de la República Mexicana.....	8
Figura 2. Árbol filogenético donde muestra a <i>Pectobacterium aroidearum</i> como un taxón único.	20
Figura 3. Diagrama de la distribución de las pruebas evaluadas en el sistema de inoculación Gen III Biolog ^R	24
Figura 4. A. y B. Prueba de pudrición en papa y D. Prueba de hipersensibilidad en tabaco positivas. C Planta de Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	41
Figura 5. A. Papaya testigo y B. papaya inoculada con la suspensión bacteriana indicando lesiones producidas	44
Figura 6 A y B. Cortes longitudinales del fruto del papayo lesionado evidente pudrición y desorganización del tejido.	45
Figura 7 Plántula testigo sin ninguna lesión y plántulas con evidentes lesiones	45
Figura 8. Amplificación del gen 16s.....	46
Figura 9. Árbol filogenético generado a partir de las secuencias del gen 16s de las principales especies de <i>Pectobacterium</i> (<i>atrosepticum</i> , <i>betavascularum</i> , <i>wasabie</i> , <i>carotovorum</i> subsp <i>carotovorum</i> y <i>carotovorum</i> sub <i>odoriferum</i>) y las secuencias problema por el método Maximum Likelihood se observa el conjunto de cepas como un clado separado.	47

Índice de Tablas

Tabla 1. Secuencias de los primers utilizados en la amplificación y secuenciación del gen 16s ribosómico.....	37
Tabla 2. Cantidades de los componentes de reacción utilizados en la amplificación del gen 16s ribosómico.....	37
Tabla 3. Programa del termociclador para llevar a cabo la amplificación del gen 16s ribosómico.	38
Tabla 4. Resultados obtenidos de las pruebas de fitopatogenicidad rápida, del sistema de identificación Biolog®, así como estado de la República de procedencia de la muestra.....	42
Tabla 5. Diferenciación fenotípica de las cepas problema con las especies <i>P. aroidearum</i> y <i>carotovorum</i>	43

I. Resumen

Para conocer el estatus fitosanitario del cultivo de papayo, se realizó un muestreo nacional a petición de los principales estados productores de la República Mexicana; en el cual fueron obtenidas poco más de 409 muestras que fueron remitidas al SENASICA órgano desconcentrado de la SAGARPA en donde las muestras de papayo fueron seleccionadas tomando en cuenta las lesiones características producidas por algún microorganismo o parásito.

Por tal motivo, a partir de muestras de papayo (*Carica papaya* L.); se seleccionaron porciones de la planta que presentaban lesiones características producidas por bacterias fitopatógenas las cuales fueron desinfestadas y sembradas en medios sólidos de cultivo. Se obtuvieron las colonias bacterianas, se purificaron y se realizaron pruebas rápidas de fitopatogenicidad en tabaco y papa; además de realizar pruebas bioquímicas mediante el Biolog Microbial ID System® para su identificación por medio de su metabolismo, y por análisis filogenético; para lo cual se extrajeron los ácidos nucleicos. Se procedió a la amplificación del gen DNA 16S ribosómico ampliamente utilizado para la identificación de organismos procariontes por medio de la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los productos amplificados se enviaron a secuenciar dentro del SENASICA; una vez obtenida la secuencia fue editada mediante el programa BioEdit® para su posterior análisis *in silico*. La comparación de las secuencias obtenidas de la amplificación, con las

secuencias de especies bacterianas contenidas en la base de datos del GenBank del NCBI, EMBL y RDP se realizó mediante alineamientos de secuencias utilizando el algoritmo BLAST. Finalmente se establecieron las relaciones filogenéticas correspondientes por medio del programa MEGA 6.0®.

Dentro de las bacterias de importancia fitopatógica se logró aislar e identificar con éxito al género de *Pectobacterium*; este de gran valor debido a que se identificó como la especie *aroidearum* nunca antes reportada a las autoridades fitosanitarias como un organismo causante de pudriciones blandas en México.

Para confirmar que las lesiones características fueron producidas por la bacteria aislada; en la planta de papayo y en el fruto se inoculó suspensión bacteriana observándose a las 72 horas lesiones producidas por el género *Pectobacterium* la particular pudrición blanda.

II. Introducción

La papaya se produce en más de 60 países y su producción se concentra en naciones en vías de desarrollo. En 2010 la producción de papaya se estimó en 11.22 millones de toneladas y la tasa decrecimiento anual de su producción a nivel mundial fue del 4.35%. Entre 2009 y 2010 el crecimiento fue del 7.26% y si se comparan los años 2002 y 2010 el incremento fue del 34.82%. En el 2012 la producción de papaya en México fue de 712,917 toneladas y hoy en día es la tercera fruta tropical más producida con 11.22 millones de toneladas, equivalente al 15.36% del total de producción de frutas tropicales¹.

Para el periodo 2006–2010 la producción de papaya en México cayó hasta en 29.59% y el área sembrada disminuyó en 5211 hectáreas. Las causas de esta caída se atribuyen al incremento en los costos de producción, dificultades de acceso a crédito y plagas y enfermedades (Evans y Ballen, 2012). Las plagas y las enfermedades de las plantas tienen serias repercusiones en la producción de alimentos, todos los años la producción agrícola mundial se reduce del 20 al 40 por ciento a causa de estas plagas y enfermedades, según estimaciones de la Secretaría de la CIPF con sede en la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)².

Estas enfermedades son producidas por organismos fitopatógenos denominados así, por causar disturbios en el metabolismo celular de la planta mediante la secreción de enzimas, toxinas y otras sustancias; además, por la absorción de nutrientes de la planta para su propio beneficio (Agrios, 2005).

¹ <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/FE/FE91700.pdf>

² <http://www.fao.org/news/story/es/item/131978/icode/>

Las bacterias fitopatógenas provocan anualmente pérdidas cuantiosas que ocurren cuando el avance del proceso de descomposición hace que el producto no sea apto para el consumo; además de pérdidas de calidad en el producto final, que son las que afectan sólo a la superficie del producto y estas pueden causar imperfecciones que rebajan el valor de un producto comercial. Las consecuencias económicas son considerables y el riesgo de nuevas introducciones aumenta proporcionalmente al crecimiento del comercio global y de los nuevos patrones de distribución. La identificación oportuna sirve a el SENASICA, que a través de la Dirección General de Sanidad Vegetal instrumenta programas y campañas fitosanitarias para prevenir la introducción o dispersión de plagas que puedan afectar a los vegetales, sus productos y subproductos de la agricultura nacional, así como para mejorar o conservar los estatus fitosanitarios en la producción agrícola y mediante las campañas fitosanitarias se confina, controla y previene la dispersión de plagas en el territorio nacional. La vigilancia epidemiológica se realiza para detectar, determinar y actualizar, en forma permanente, el estatus fitosanitario de las plagas que han sido reguladas y las que representan una amenaza para la agricultura nacional.

De igual modo se implementan programas fitosanitarios que apoyan a mejorar la competitividad de los cultivos a través de garantizar la calidad fitosanitaria de los productos vegetales, atendiendo las plagas reglamentadas que amenazan los cultivos de los Sistema-Producto y poder así dar solución a la problemática presente en el cultivo y evitar problemas económicos y de abastecimiento.

Los principales géneros de bacterias fitopatógenas que pudieran afectar el fruto, raíz y tallo del papayo son *Erwinia* sp., *Pseudomonas* sp., y *Pectobacterium* sp. *Pectobacterium* es una bacteria de la familia *Enterobacteriaceae*, que antiguamente era un miembro del género *Erwinia* (Waldee, 1945). Es la bacteria causal de las llamadas podredumbres blandas debido a que produce enzimas pectolíticas que hidrolizan la pectina entre las células individuales de la planta. Esto hace que las células se separen convirtiendo a las plantas en una “papilla” con el fin de que las bacterias consuman los nutrientes de la célula. Esta bacteria es un patógeno con un amplio rango de hospederos (zanahoria, papa, tomate, verduras de hoja verde, la calabaza y otras cucurbitáceas, cebolla, pimientos verdes, violetas africanas, etc.), capaz de causar la enfermedad en casi cualquier tejido vegetal que invade. Se trata de un patógeno muy importante económicamente en términos de pérdidas de postcosecha, y una causa común de las podredumbres en frutas y verduras almacenadas (García, 2000).

III. Marco teórico

3.1 Características generales del papayo

El papayo (*Carica papaya* L.), es una planta de rápido crecimiento y tiempo de vida relativamente corto en términos comerciales; perteneciente al género *Carica* (dentro de la familia Caricaceae), el cual incluye 14 especies; de las cuales destaca la papaya por su importancia económica. Esta importancia radica en el uso de la papaína que es una enzima extraída de la papaya y tiene la función de ser ablandador natural de carnes y en la industria cervecera es usado como clarificador; así como por ser una de las frutas tropicales más consumidas a nivel mundial y el ser una planta de fácil crecimiento y producción temprana de frutos, con una tasa interna de retorno rápida y en algunos casos con tecnología adecuada alta, han hecho que la papaya este cobrando gran importancia en los últimos años³.

La planta de papayo es una hierba arborescente de crecimiento rápido, de corta vida, de tallo sencillo o algunas veces ramificado, de 2-10 metros de altura, con el tronco recto³.

Las hojas se encuentran alternadas y aglomeradas en el ápice del tronco y las ramas, de pecíolo largo (25-75 cm de diámetro); lisas más o menos palmeadas con venas medias robustas, irradiantes, la base profundamente cordada con lóbulos sobrepuestos; el haz de la hoja es de color verde oscuro, marcado

³ <http://www.cabi.org/cpc/>

visiblemente por las nerviaduras hundidas de color amarillento y las venas reticuladas, por debajo es de color verde amarillento pálido³.

El fruto es una baya carnosa, de forma ovoide - oblonga a casi esférica o piriforme , cilíndrica o acanalada, 7-30 cm de largo, con un peso de hasta 10 kg, la piel es suave y delgada, amarillenta o anaranjada, pulpa de color amarillento a rojo -naranja, dulce, con sabor suave y agradable comestible; cavidad central de cinco rectángulos. Las semillas son globosas con 5 mm de diámetro, de color negro o gris, que se adjunta en cinco filas a la pared interior del ovario, encerrado en un sarcotesta gelatinosa³.

3.2 Producción de papaya en México

México es el líder en las exportaciones de papaya y el sexto productor a nivel mundial. Las principales variedades que se cultivan en México son Maradol y Red. Otras variedades de menor importancia son la Yellow Hawaiian y la Criolla. Las principales plantaciones de papaya están ubicadas al sureste del país en los estados de Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Colima, Guerrero y Michoacán, allí se concentra el 79% del total de producción de papaya en México⁴ (Figura 1). Para el periodo 2006–2010 la producción de papaya sufrió altibajos aunque es importante destacar que a pesar de que la producción mexicana de esta fruta cayó durante el periodo en cuestión, las exportaciones de la misma incrementaron de 93,396 toneladas en 2006 a 122,773 toneladas en 2010, a una tasa anual de 7.86%. En 2010 cerca del 20% del total de la

⁴ FAO, 2012

papaya producida en México tuvo como destino el mercado externo, fundamentalmente los Estados Unidos y Canadá⁵.

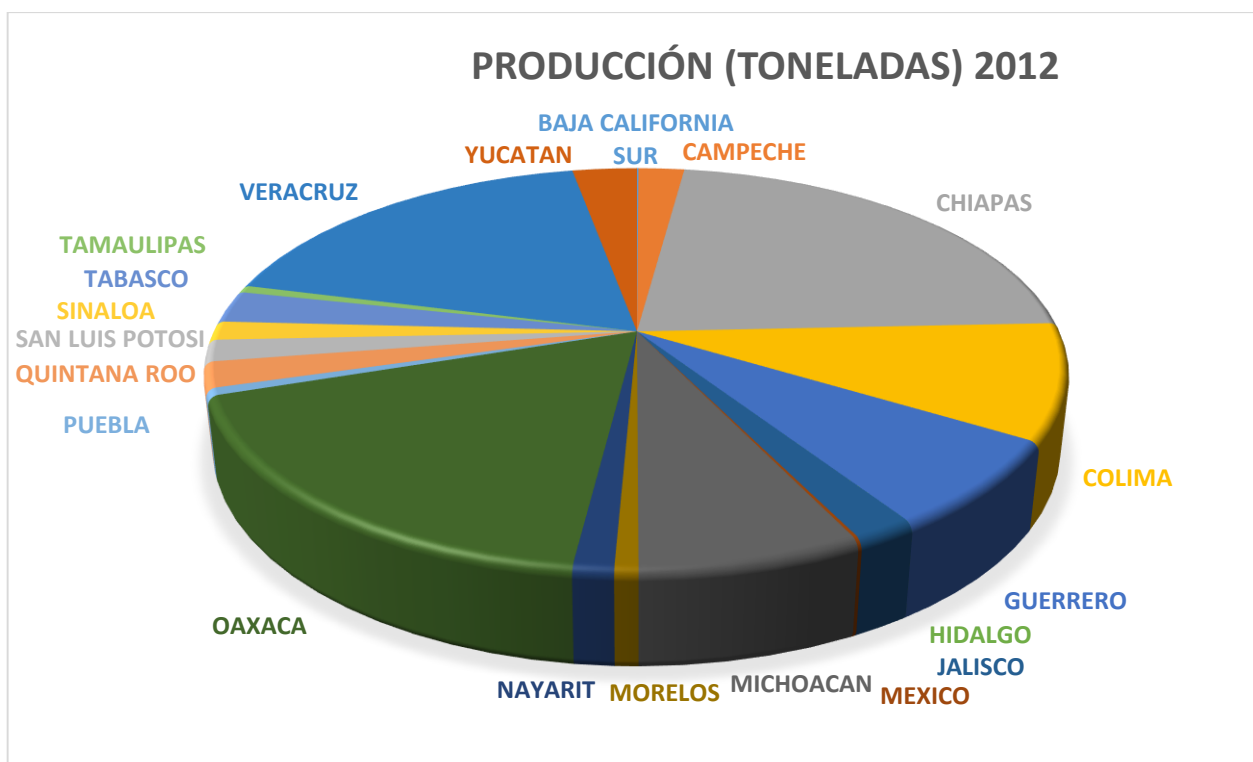


Figura 1. . Estados productores de papaya de la República Mexicana. (Realizada a partir de datos obtenidos de la página del SIAP, 2012)

3.3 Características generales de las bacterias fitopatógenas

Las bacterias son organismos unicelulares cuyo tamaño oscila entre los 0.3 y 1.0µm de ancho y 0.6 y 4.5 µm de largo. Se reproducen rápidamente por fisión binaria, no tienen material genético definido, sino que el material genético está regado en el citoplasma; no tienen nucléolo⁶.

Muchas bacterias fitopatógenas están rodeadas por una capa o cápsula compuesta de diferentes sustancias, predominando los polisacáridos. Se

⁵ https://edis.ifas.ufl.edu/fe917#FOOTNOTE_2

⁶ <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/docs/cursos/fitopato/Materiales/Teoricos2007-08/lecturaBac07.pdf>

conoce que estos exopolisacáridos protegen a las bacterias de la desecación, contribuyen en la adherencia a la superficie de las plantas y modifican el ambiente alrededor de la bacteria para favorecer la multiplicación y sobrevivencia en condiciones adversas⁷.

3.3.1 Pared Celular

En los procariontes, la pared celular que rodea a la membrana plasmática impide un aumento de volumen. El ingreso de agua produce un aumento en la presión interna, conocido como presión de turgencia. La pared celular proporciona contención externa a la membrana plasmática y le da forma y rigidez a la célula (Curtis *et al.* 2008).

En el dominio Bacteria, la pared está constituida por peptidoglicano y mureína, una sustancia exclusiva de los procariontes. La estructura y el grosor de la pared definen dos grupos de microorganismos que se diferencian por su respuesta a la coloración de Gram. La envoltura celular de las bacterias Gram-positivas comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano, que rodea a la anterior. La pared celular se une a la membrana citoplasmática mediante moléculas de ácido lipoteicoico. La capa de peptidoglicano confiere una gran resistencia a estas bacterias.

Las gramnegativas tienen una pared más delgada y por fuera presentan una segunda capa lipídica, formada por lipopolisacáridos, que cumple varias

⁷ <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/docs/cursos/fitopato/Materiales/Teoricos2007-08/lecturaBac07.pdf>

funciones. El espacio entre ambas membranas, que contiene a la pared, se llama periplasma y allí se cumplen algunas funciones enzimáticas de hidrólisis y de digestión (Curtis *et al.* 2008).

3.3.2 Membrana citoplasmática

Esta fina capa que se encuentra por debajo de la pared celular es la responsable de controlar la entrada y salida de nutrientes y sustancias de excreción. Los daños en esta membrana producen la muerte celular por que la célula bacteriana pierde la capacidad de seleccionar que y cuantas sustancias entran y salen⁸.

Tiene capa lipídica, compuesta por fosfolípidos de ácidos grasos lineales unidos al glicerol por uniones de tipo éster (Curtis *et al.* 2008).

3.3.3 Apéndices

Los flagelos son estructuras filamentosas proteicas de 20nm de diámetro, que le dan movilidad. Muchas especies tienen flagelos que les permiten moverse en agua; la posición y el número de flagelos se utilizan en la caracterización de los diferentes géneros (Curtis *et al.* 2008).

Los flagelos que aparecen en los extremos de la célula se denominan “polares”, y los que están distribuidos alrededor de la célula “peritricos”⁸. La célula se desplaza en una dirección u otra, según el sentido de la rotación del flagelo cuando este es polar. Cuando los flagelos son peritricos, al rotar en un sentido,

⁸ <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/docs/cursos/fitopato/Materiales/Teoricos2007-08/lecturaBac07.pdf>

forman un penacho que impulsa a la célula en dirección de su eje (Curtis *et al.* 2008).

Las fimbrias son estructuras proteicas similares a los flagelos, pero mucho más numerosas, más cortas y de menor diámetro. Su función no es la movilidad, sino la adherencia de la célula a superficies inertes y a otras células. Son comunes en bacterias gramnegativas, pero también están presentes en las bacterias grampositivas (Curtis *et al.* 2008).

Los pili son estructuras similares a las fimbrias, pero más largos y menos numerosos. Su función se relaciona con la conducción del material genético de una célula a otra durante el proceso de conjugación (Curtis *et al.* 2008).

3.3.4 Material genético

El material genético (ADN) se encuentra disperso en el citoplasma. El genoma procarionte está formado por una única molécula circular de DNA de doble cadena, libre en el citoplasma, que constituye un cromosoma único. Además del cromosoma puede haber una o más moléculas pequeñas de DNA circular, los plásmidos (Curtis *et al.* 2008).

3.3.5 Ribosomas

Son las estructuras responsables de la síntesis de proteínas. Una célula bacteriana puede tener 10 000 ribosomas que se agrupan en polirribosomas a

lo largo de moléculas de mRNA y le dan al citoplasma un aspecto granular. Cada ribosoma pesa 70S (S por unidades Svedberg de sedimentación en la ultracentrífuga) y está formado por dos partículas, una de 30S y otra de 50S. La menor contiene una fracción de RNA de 16S y 21 proteínas, mientras que la mayor tiene dos fracciones de rRNA, una de 23S y otra de 5S y 34 proteínas (Curtis *et al.* 2008).

3.3.6 Metabolismo

Las bacterias fitopatógenas son quimioheterotrófas, obtienen la energía y fuente de carbono de la degradación de la materia orgánica. De acuerdo a su relación con el oxígeno las clasificamos en aerobias por que utilizan oxígeno como aceptor final de electrones en su cadena respiratoria o en anaerobias facultativas, que son aquellas que en ausencia de oxígeno, recurren a otra vía metabólica utilizando como aceptor de electrones a compuestos orgánicos endógenos producidos en la misma ruta de fermentación. Pocas bacterias fitopatógenas tienen esta capacidad⁹.

Otra característica importante que merece ser mencionada dentro del metabolismo de las bacterias fitopatógenas, es la producción de toxinas que tienen un rol importante en la virulencia y de los metabolitos secundarios (compuestos formados al final de la fase de crecimiento o estacionaria) como antibióticos y bacteriocinas que juegan un papel fundamental en la defensa de las bacterias contra otros organismos vivos⁹.

⁹ <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/docs/cursos/fitopato/Materiales/Teoricos2007-08/lecturaBac07.pdf>

3.3.7 Multiplicación

Los procariontes se reproducen por división celular simple o fisión binaria. Por este mecanismo, una célula duplica su material genético y celular que se reparte de forma equitativa para dar lugar a dos células hijas genéticamente idénticas a la original. Se trata de una reproducción asexual. En este caso, los genes se transfieren verticalmente, de generación en generación, de la célula madre a las células hijas (Curtis *et al.* 2008).

Durante este proceso se reproducen mutaciones espontaneas inducidas por radiaciones naturales o como resultado de errores de copiado, que constituyen la mayor fuente de variabilidad genética de los procariontes.

Otras fuentes adicionales de variabilidad genética en los procariontes son la conjugación, la transformación, y la transducción. Los tres mecanismos mencionados implican una transferencia horizontal (también llamada lateral) de genes que habitualmente se produce entre organismos de una misma especie. Aunque en los procariontes existen barreras (como enzimas de restricción, receptores y otras estructuras específicas de membrana) para la entrada de DNA exógeno y su recombinación con el DNA propio, en algunos casos se producen fallas que permiten intercambios genéticos interespecíficos. Estas combinaciones pueden acarrear serias dificultades y confusiones cuando se trata de establecer el origen filogenético de algún taxón (Curtis *et al.* 2008).

3.4 Forma de penetración y diseminación de la bacteria en la planta

Muchas bacterias penetran en la planta por los estomas, o aperturas similares; para esto necesitan desplazarse a través de una gota o película de agua para llegar a la cavidad subestomática. El salpicar de la lluvia puede regar la bacteria entre las plantas individuales y el riego la lleva al campo en general. Casi todas las bacterias que causan necrosis foliares penetran de esta forma. Las bacterias que causan marchitez, podredumbre suave o agallas necesitan heridas para penetrar. Ninguna bacteria es capaz de penetrar directamente en el hospedante, porque no son capaces de atravesar la cutícula y las capas de corcho (González, 1985).

En general el medio de diseminación depende del tipo de hospedante y del órgano del mismo donde ocurra la infección. Los frutos pueden contraer la infección a través de lesiones causadas por manipulación poco cuidadosa, por insectos o por otros animales o a través de los poros naturales de las partes aéreas y subterráneas de las plantas, que permiten el paso de aire, dióxido de carbono y vapor de agua entre el interior de la planta y el exterior o por penetración directa de la piel intacta de la planta. El momento de la infección varía según el producto y la severidad esta es muy variable; una misma bacteriosis en determinada localidad puede ser muy severa o muy leve; en un mismo plantío, puede desarrollarse rápidamente, detenerse en forma súbita y luego volver a avanzar (González, 1985).

3.5 Principales géneros de bacterias fitopatógenas

Existen más de 200 bacterias fitopatógenas y algunos de los más comunes son los siguientes: *Erwinia* sp, *Pseudomonas* sp, *Xanthomonas* sp, *Pectobacterium* sp, *Agrobacterium* sp, y *Clavibacter* sp¹⁰.

Algunas de estas especies de bacterias fitopatógenas producen enormes pérdidas debido al gran número de plantas que afectan, más que a la gravedad de sus ataques en cada caso particular. Es el caso de podredumbres blandas en numerosas plantas hortícolas y ornamentales causadas por bacterias de los géneros *Pectobacterium* spp, *Dickeya* sp, o *Agrobacterium* spp., que es capaz de producir tumores en más de 600 especies vegetales¹⁰.

3.6 Lesiones características producidas por bacterias fitopatógenas

La sintomatología de las enfermedades bacterianas es extremadamente variada, pero generalmente característica para un patógeno en particular. Los síntomas pueden variar desde mosaicos, pareciendo infecciones virales, a grandes anormalidades tales como las agallas o partes de plantas distorsionadas. La alteración hormonal puede producir crecimientos anormales característicos en raíces, tallos y estructuras florales (filodia) y a veces color anormal de las flores (virescencia). Los síntomas más comunes son las

¹⁰http://diversidadagroambiental.aragon.es/index.php/mod.documentos/mem.descargar/fichero.documentos_Documento_1-_Generalidades_de_bacterias_fitopatogenas_0851766f%232E%23pdf/chk.11a0e6c9a8936a33c1122667ca3ed38b

manchas en hojas o frutos, tizones o muerte de tejidos en hojas, tallos o troncos de árboles, y podredumbres de raíces o tubérculos o cualquier otra parte de la planta. También pueden ocurrir marchitamientos debido al taponamiento del tejido vascular. Los síntomas pueden variar con el fotoperíodo, variedad vegetal, temperatura y humedad, y la dosis de infección. En algunos casos, los síntomas pueden desaparecer o volverse poco importantes al continuar el crecimiento de la planta (Vidaver, 2006).

3.7 Aislamiento e identificación de la bacteria fitopatógena

Cuando se va a aislar una bacteria fitopatógena es una buena práctica usar diferentes medios comunes de agar. La mayoría de las *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Acidovorax*, *Burkholdera*, *Ralstonia* y *Agrobacterium* spp. crecen adecuadamente produciendo colonias características en medio caldo nutritivo de levadura (NBY) o en agar extracto de levadura, dextrosa y carbonato de calcio (YDC). La mayoría de la *Pseudomonas* y *Clavibacter* spp. crecen adecuadamente en medio King B y NBY respectivamente (Shaad, 2001).

La identificación de bacterias fitopatógenas aisladas requiere de toda una serie de pruebas y bastante criterio. Por lo general debe estudiarse la morfología de las células, la forma y el color de las colonias formadas en medios sólidos, así como diversas reacciones fisiológicas y de patogenicidad en varios hospedantes. La información obtenida en estas pruebas generalmente permite

decidir a cual especie previamente descrita corresponde el aislamiento en estudio (González, 1985).

Uno de los requisitos para considerar a una bacteria como el agente inductor de una enfermedad es aislarla y purificarla a partir del tejido enfermo. Para llevar a cabo en esta etapa existen diferentes metodologías y la elección de cualquiera de ellas dependerá del tipo de síntoma, grado de avance de la enfermedad y del material y equipo disponibles (González, 1985).

3.8 Pudrición Blanda

La pudrición blanda bacteriana es causada por varios tipos de bacterias, pero más comúnmente por especies de gram-negativas como *Erwinia*, *Pectobacterium*, y *Pseudomonas* sp. Es una enfermedad destructiva de las frutas, hortalizas y plantas ornamentales que se encuentran en todo el mundo, y los efectos de casi todos los géneros de las familias de plantas (Agrios, 2005).

Inicialmente la enfermedad se presenta con manchas amarillentas de aspecto acuoso y traslúcido, que se localizan en cualquier parte del pseudotallo. Luego estas coloraciones se tornan castaño rojizo y se extienden en todos los sentidos, cubriendo las vainas de las hojas parcial o totalmente. Finalmente las zonas afectadas toman un color oscuro y de los tejidos circundantes, al ser presionados, se desprende un líquido fétido (Martínez, 2006).

La pudrición blanda se produce debido a la secreción de enzimas bacterianas conocidas como pectinasas las cuales actúan sobre las sustancias pécticas que son el componente principal de la lámela media, es decir, el cemento intercelular que mantiene en su sitio a las células de los tejidos vegetales. Las sustancias pécticas son polisacáridos que consisten principalmente en cadenas de ácido galacturónico entre mezcladas con un número menor de ramnosa y pequeñas cadenas laterales de ácido galacturónico y otros azúcares; estos representan también una parte de la pared celular primaria, a nivel de la cual forman un gel amorfo que llena los espacios que hay entre las microfibrillas de la celulosa. Con la ayuda de estas enzimas especiales, la planta se convierte en una papilla líquida a fin de que las bacterias puedan consumir los nutrientes de la célula vegetal (Agrios, 2005).

3.8 *Pectobacterium aroidearum*

El género *Pectobacterium* anteriormente era considerado dentro del género *Erwinia*, posteriormente fueron consideradas especies muy divergentes como para encontrarse dentro de un mismo clado, por lo tanto se dividió en tres géneros diferentes: *Erwinia*, *Pectobacterium* y *Brenneria* (Woese, 1985).

Miembros del género *Pectobacterium* (anteriormente *Erwinia*) causan la enfermedad de pudriciones blandas en plantas de la familia de las angiospermas en al menos 16 dicotiledóneas y 11 monocotiledóneas (Naghan *et al.* 2013).

El género tiene cinco especies de las cuales *Pectobacterium atrosepticum* y *Pectobacterium carotovorum* han sido estudiadas extensivamente debido a su importancia económica en cultivos básicos de la alimentación. Las otras tres especies reconocidas son *Pectobacterium betavasculorum*, *Pectobacterium cacticida* y *Pectobacterium wasabie*, principales patógenos que se encuentran en la remolacha azucarera, cactus y rábano respectivamente (Naghan *et al.* 2013).

Pectobacterium aroidearum son bacilos gram negativos, forman colonias blancas pequeñas y lisas; anaerobios facultativos, no forman esporas, utiliza pectina, es tolerante a la eritromicina; no produce gas a partir de la utilización de D-glucosa y reduce la sucrosa; crece sobre caldo Luria a 37°C y 39°C. Se distingue de otras especies del género *Pectobacterium* por la habilidad de utilizar glucógeno, D-serina, D- alanina, L-alaninamida, L- alanina, glucoronamida y L- alanilglicina. También utiliza maltosa, melobiosa, rafinosa, xilitol, DL – ácido láctico α - ácido cetoglutárico D- lactona del ácido galactónico Tweens 40 y 80, Glicil L- ácido aspártico, celobiosa y ácido D-glucosamínico pero no D-arabitol o glucosa-1-fosfato. Además de que tiene menos del 65% de similitud genómica con las otras especies de *Pectobacterium* (Figura 2) (Naghan *et al.* 2013).

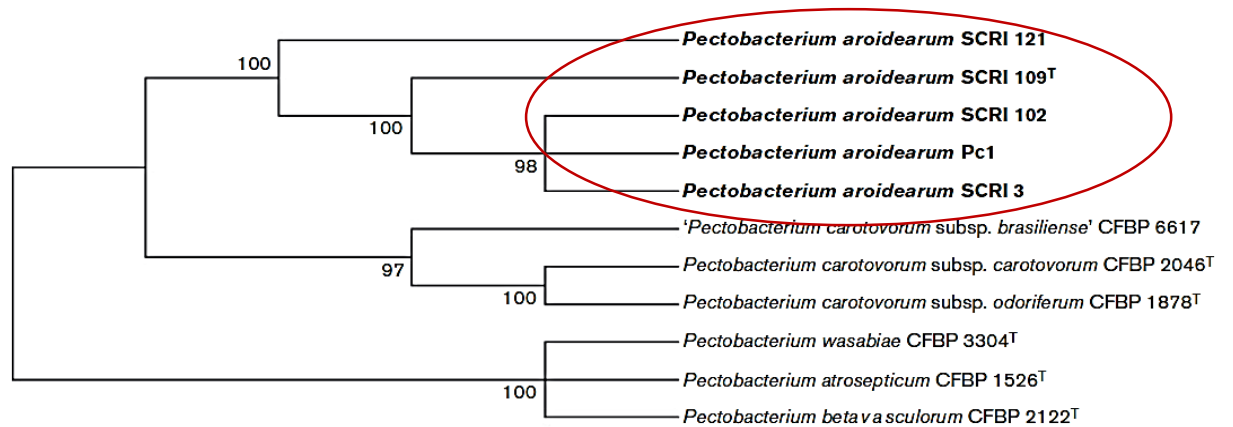


Figura 2. Árbol filogenético donde muestra a *Pectobacterium aroidearum* como un taxón único.
Fuente: (Nabhan *et al.* 2013)

3.9 Pruebas de rápidas fitopatogenicidad

La demostración de la patogenicidad de una cepa bacteriana es un procedimiento complicado pues requiere mucho tiempo para que aparezcan los síntomas típicos de las enfermedad en la planta homóloga. En la mayoría de las ocasiones no siempre se dispone tiempo o aún más difícil, cuando se trata de árboles o plantas que no se encuentran en la región (Loredo & Vega, 2009).

Debido a estos problemas, se ha venido buscando la forma de determinar en un tiempo corto la patogenicidad de una aislamiento bacteriano. Es preciso señalar que para estas pruebas es necesario que los cultivos bacterianos estén puros, y no tengan mucho tiempo de haberse sembrado en medios de cultivo (no mayor a 48 horas) ya que podría correr el riesgo de que pierdan su virulencia (Loredo & Vega, 2009).

3.9.1 Reacción de hipersensibilidad

La mayoría de los patógenos vegetales puede inducir una reacción de hipersensibilidad (HR) en especies vegetales no hospedantes o en plantas indicadoras (Klement *et al.* 1964). La HR es un mecanismo de defensa de plantas no hospedantes en respuesta a la presencia de un patógeno. El tejido es sensible al patógeno, resultando en una muerte rápida de las células vegetales locales, atrapando al patógeno. Esto limita efectivamente la dispersión de la infección. Se puede usar la prueba de hipersensibilidad para determinar si una colonia aislada de un tejido vegetal infectado es un patógeno. Para ello se lo introduce, en una suspensión acuosa del cultivo en una hoja de una planta no hospedante. El tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Figura 4.C) se usa con frecuencia en pruebas de hipersensibilidad porque tiene hojas con espacios internervales grandes que se infiltran fácilmente, pero para algunas bacterias Gram positivas se puede usar *Mirabilis jalapa* (maravilla ó Don Diego de noche). El colapso dentro de las 48 horas del tejido vegetal en la zona infiltrada indica que la bacteria posiblemente sea un patógeno de otro hospedante (Vidaver, 2006). La reacción de hipersensibilidad es una prueba muy útil dentro de la fitobacteriología, porque con ella se puede determinar fácil y rápidamente si una bacteria es o no fitopatogena, sobre todo para aquellas bacterias aisladas de muestras con manchas foliares y tizones, aunque también algunas que causan pudriciones pueden dar la reacción positiva. Las bacterias fitopatogenas ocasionan necrosis del tejido en plantas susceptibles e inducen una clara

reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco después de 24 horas de la inoculación (Rodríguez, 2006).

3.9.2 Pudrición del tubérculo de papa

La mayoría de los fitopatógenos secretan enzimas al estar en contacto con algún sustrato. Algunos secretan enzimas celulolíticas y/o pectolíticas que provocan el ablandamiento y la desintegración de las sustancias de la pared celular y además permiten que el patógeno al penetrar y propagarse en los tejidos, ocasione el colapso y la desintegración de su estructura celular. Para bacterias aisladas de órganos con pudrición, la patogenicidad se puede valorar con la prueba de pudrición en papa y los resultados se pueden observar desde las primeras 24 horas de haberse realizado (siempre y cuando se inocula una buena cantidad de cultivo bacteriano) (Rodríguez, 2006).

3.10 Pruebas bioquímicas (Biolog Microbial ID System^{MR})

Las pruebas bioquímicas se emplean para identificar de forma clara y precisa, la presencia o ausencia de una enzima, de un grupo de enzimas, o de una vía metabólica completa en uno o más microorganismos. Una de las técnicas rápidas más usadas para la identificación de bacterias es el sistema Biolog Microbial ID System[®] que consiste en una placa de microtitulación de 96 pozos que contiene 95 sustratos de carbono y un indicador redox y colorante de tetrazolio (Figura 3). La microplaca una vez inoculada proporciona una “huella

digital fenotípica” del microorganismo que puede ser utilizada para identificarlo a nivel de especie dentro de una base de datos. Todos los nutrientes y sustancias bioquímicas necesarias se encuentran en los 96 pozos de la microplaca. El colorante redox de Tetrazolio se utiliza para indicar colorimetricamente la utilización de la fuente de carbono o de resistencia a los productos químicos inhibitorios¹¹.

Todos los pozos son incoloros antes de la inoculación. Durante la incubación hay un aumento de la respiración en los pozos donde están las bacterias que pueden utilizar cierta fuente de carbono y / o crecer; el aumento de la respiración provoca la reducción de del colorante redox tetrazolio formando un color púrpura. Los pozos negativos se mantienen incoloros, como lo es el caso del control negativo el cual no contiene ninguna fuente de carbono . También hay un pozo de control positivo utilizado como referencia para los ensayos de sensibilidad química. Después de la incubación, se forma la huella digital fenotípica de acuerdo a la secuencia formada por los pozos que viraron a color púrpura esta se compara con una amplia biblioteca de especies de Biolog®¹¹.

¹¹ http://www.biolog.com/products-static/microbial_identification_manual_system.php

GEN III MicroPlate™

A1 Negative Control	A2 Dextrin	A3 D-Maltose	A4 D-Trehalose	A5 D-Cellobiose	A6 Gentiobiose	A7 Sucrose	A8 D-Turanose	A9 Stachyose	A10 Positive Control	A11 pH 6	A12 pH 5
B1 D-Raffinose	B2 α -D-Lactose	B3 D-Melibiose	B4 β -Methyl-D-Glucoside	B5 D-Salicin	B6 N-Acetyl-D-Glucosamine	B7 N-Acetyl- β -D-Mannosamine	B8 N-Acetyl-D-Galactosamine	B9 N-Acetyl Neuraminic Acid	B10 1% NaCl	B11 4% NaCl	B12 8% NaCl
C1 α -D-Glucose	C2 D-Mannose	C3 D-Fructose	C4 D-Galactose	C5 3-Methyl Glucose	C6 D-Fucose	C7 L-Fucose	C8 L-Rhamnose	C9 Inosine	C10 1% Sodium Lactate	C11 Fusidic Acid	C12 D-Serine
D1 D-Sorbitol	D2 D-Mannitol	D3 D-Arabitol	D4 myo-Inositol	D5 Glycerol	D6 D-Glucose-6-PO ₄	D7 D-Fructose-6-PO ₄	D8 D-Aspartic Acid	D9 D-Serine	D10 Troleandomycin	D11 Rifamycin SV	D12 Minocycline
E1 Gelatin	E2 Glycyl-L-Proline	E3 L-Alanine	E4 L-Arginine	E5 L-Aspartic Acid	E6 L-Glutamic Acid	E7 L-Histidine	E8 L-Pyroglutamic Acid	E9 L-Serine	E10 Linecomycin	E11 Guanidine HCl	E12 Niaprof 4
F1 Pectin	F2 D-Galacturonic Acid	F3 L-Galactonic Acid Lactone	F4 D-Gluconic Acid	F5 D-Glucuronic Acid	F6 Glucuronamide	F7 Mucic Acid	F8 Quinic Acid	F9 D-Saccharic Acid	F10 Vancomycin	F11 Tetrazolium Violet	F12 Tetrazolium Blue
G1 p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	G2 Methyl Pyruvate	G3 D-Lactic Acid Methyl Ester	G4 L-Lactic Acid	G5 Citric Acid	G6 α -Keto-Glutaric Acid	G7 D-Malic Acid	G8 L-Malic Acid	G9 Bromo-Succinic Acid	G10 Nalidixic Acid	G11 Lithium Chloride	G12 Potassium Tellurite
H1 Tween 40	H2 γ -Amino-Butyric Acid	H3 α -Hydroxy-Butyric Acid	H4 β -Hydroxy-D,L-Butyric Acid	H5 α -Keto-Butyric Acid	H6 Acetoacetic Acid	H7 Propionic Acid	H8 Acetic Acid	H9 Formic Acid	H10 Aztreonam	H11 Sodium Butyrate	H12 Sodium Bromate

Figura 3. Diagrama de la distribución de las pruebas evaluadas en el sistema de inoculación Gen III Biolog®.

3.11 Extracción de DNA y PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue utilizada por primera vez por Kary Mullis en 1983. El DNA amplificado puede ser clonado directamente o usado en una gran variedad de procedimientos analíticos (ej. southern blot). El PCR es una técnica muy simple: dos oligonucleotidos son sintetizados cada uno como secuencia complementaria de una hebra opuesta (secuencia de un segmento en cada una de las hebras) del DNA blanco en posiciones que estén mas allá de aquellas donde termina el segmento a ser amplificado. Los oligonucleotidos sirven como cebadores con sus extremos 3' orientados en direcciones opuestas (Vázquez, 2003).

El DNA aislado que contiene el segmento a ser amplificado es calentado levemente para ser desnaturalizado (separado en hebras sencillas), después se enfría en presencia de grandes cantidades de los oligonucleotidos sintéticos, lo que permite que por hibridización, se encuentren las secuencias complementarias. En este momento se agregan los cuatro desoxiribonucleotidos trifosfato y el segmento hibridizado sirve como cebador para iniciar la amplificación. El proceso de calentamiento y enfriamiento se lleva a cabo unas 25-30 veces en algunas horas en un aparato que lo hace automáticamente, hasta que el fragmento puede ser analizado o clonado (Vázquez, 2003).

Los segmentos son amplificados utilizando una DNA polimerasa resistente a los cambios de temperatura como la Taq polimerasa (aislada de una bacteria hipertermófila). Si se diseñan con cuidado los cebadores de tal forma que contengan sitios de corte para endonucleasas, se puede facilitar mucho la clonación del DNA amplificado (Vázquez, 2003).

En PCR, el ácido desoxirribonucleico (DNA) es el analito. Por tanto, una buena muestra implica siempre un correcto proceso de obtención de esta molécula a partir de material biológico¹².

La extracción de DNA consta de una etapa de lisis, que consiste en romper las estructuras que confinan el citoplasma y liberar al medio su contenido y otra de purificación, que implica la retirada de la solución final de la mayoría de elementos que pueden interferir en la PCR. De los tres pasos críticos que componen el análisis de patógenos por PCR, la extracción de DNA es quizás el más desconocido y sobre el que más control podemos ejercer¹².

El DNA se puede cuantificar utilizando equipos cuya función específica es la de medir espectrofotométricamente la cantidad de ácidos nucleicos presentes en la muestra así como también conocer la pureza de la misma como lo es el equipo NanoDrop 2000^R; para lo cual se utiliza la relación absorbancia a 260/280 con la que se evalúa la pureza de DNA y RNA. Una proporción de aproximadamente 1.8 es generalmente aceptado como "puro" para el DNA; una proporción de aproximadamente 2.0 es generalmente aceptado como "puro" para el RNA. Si la relación es sensiblemente inferior en cualquiera de los casos,

¹² http://www.bio.davidson.edu/projects/gcat/protocols/NanoDrop_tip.pdf

se puede indicar la presencia de la proteína, fenol o otros contaminantes que absorben fuertemente en o cerca de 280 nm. La relación de absorbancia 260/230 se utiliza como una medida secundaria de pureza del ácido nucleico. Los valores para considerar un ácido nucleico "puro" son a menudo más altos que los valores manejados en la relación 260/280. Los valores comunmente esperados en la relación 260/230 se encuentran dentro del intervalo de 2.0-2.2. Si la proporción es sensiblemente inferior, esto puede indicar la presencia de contaminantes que absorben a 230 nm¹².

3.11 Gen DNAr 16s

La comparación de las secuencias del gen 16s ribosómico permiten establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotes. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias. Asumiendo que los cambios ocurren al azar y que aumentan con el tiempo de manera lineal, las diferencias en la secuencia de los nucleótidos que integran las macromoléculas homólogas, presentes en dos formas de vida representan la distancia evolutiva existente entre ellas (Rodicio & Mendoza, 2004).

El gen ribosómico 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese (Universidad de Illinois) a principios de la década de 1970. Desde entonces, el análisis de los RNAr 16S se ha utilizando ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del

mundo procariota, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana (Rodicio & Mendoza, 2004).

El RNAr 16s es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 pb, codificado por el gen DNA ribosomal 16S (DNAr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el RNAr 16S se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla (Rodicio & Mendoza, 2004).

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias de los DNAr 16S de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva. Además, el análisis comparativo de secuencias permite construir árboles filogenéticos, que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados. Hay que tener en cuenta, no obstante, que es la comparación de genomas completos, y no la comparación de los DNAr 16S, la que aporta una indicación exacta de las relaciones evolutivas (Rodicio & Mendoza, 2004). Este gen es utilizado para establecer relaciones filogenéticas debido a las siguientes características (Woese, 1985):

- 1 . Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para su identificación.

2 . Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios .

3 . Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas. Los RNAr SSU contienen, sin embargo, suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos .

4 . El tamaño relativamente largo de los RNAr 16S (1550pb) minimiza las fluctuaciones estadísticas.

5 . La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.

6 . Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los DNAr 16S existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento.

3.12 Postulados de Koch

Actualmente los postulados de Koch constituyen la piedra angular de cualquier estudio sobre la etiología de una enfermedad y son una herramienta de vital importancia para la rápida identificación de nuevos patógenos (enfermedades emergentes y reemergentes) con el fin de aplicar tratamientos preventivos. Además los investigadores han conseguido aplicar estos postulados en campos en los que parecían inaplicables como, como la biogeoquímica, la biorremediación y la industria alimentaria (Fuentes, 2007).

A partir de la observación en diversas investigaciones Koch propuso los siguientes postulados:

1. La bacteria debe aislarse de organismos enfermos y nunca de organismos sanos.
2. Cuando un organismo esta enfermo la bacteria debe aislarse en cultivo puro.
3. Si la bacteria se inocula a otro organismo debe reproducirse la enfermedad.
4. La bacteria debe aislarse nuevamente en cultivo puro.

A pesar de su historia secular, dicha ley ha superado la prueba del tiempo por su esencia filosófica y su estabilidad conceptual y, por otro lado, debido a su relativa independencia, ha permitido la incorporación de nuevos marcadores y protocolos experimentales propios de cada disciplina, sin renunciar a sus principios filosóficos (Volcy, 2008).

Al aplicar los postulados de Koch a microorganismos fitopatógenos se obtienen los siguientes:

1. El agente fitopatógeno debe estar o haber estado asociado siempre con la enfermedad y recíprocamente, esta no debe manifestarse si el microorganismo está ausente.
2. El agente fitopatógeno debe ser aislado al estado puro en medio de cultivo, para estudiar sus características morfológicas, fisiológicas y culturales.

3. La planta hospedante deberá reproducir los síntomas característicos de la enfermedad al ser inoculada con el agente aislado, en condiciones favorables.
4. El agente fitopatógeno debe ser reaislado en cultivo puro e identificado con el aislado primeramente.

IV. Objetivos

4.1 Objetivo general

Identificar bacterias fitopatógenas en muestras de papayo provenientes de la República Mexicana obtenidas durante el periodo Agosto-Octubre 2013 para conocer su estatus fitosanitario.

4.2 Objetivos específicos

- Aislar y purificar las bacterias fitopatógenas de las diferentes muestras de papayo, en base a las lesiones características.
- Evaluar la fitopatogenicidad de la bacteria obtenida mediante pruebas de patogenicidad rápidas.
- Identificar los aislamientos mediante pruebas bioquímicas y el análisis filogenético.

V. Hipótesis

De las lesiones presentadas en la planta de la papaya (*Carica papaya* L.) se aislarán e identificarán diferentes géneros de bacterias fitopatógenas.

VI. Metodología

6.1 Muestreo

Personal del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (SINAVEF) tomó muestras de material vegetal (hojas, tallo, flor y/o fruto) de plantaciones de papayo (*Carica papaya* L). De las cuales se seleccionaron porciones de la planta que presenten lesiones características producidas por organismos fitopatógenos.

6.2 Aislamiento y purificación

Para el aislamiento de las bacterias causantes de las lesiones en la planta de papaya es necesario someter la muestra obtenida a un tratamiento, para lo cual se llevarón a cabo los siguientes pasos basados en metodología propuesta por Rodríguez (2006):

- Se agregó a la muestra (previamente cortada en trozos pequeños) hipoclorito de sodio al 1% reposando aproximadamente durante 3 minutos.
- Posteriormente se decanto el hipoclorito y se lavó tres veces con agua destilada estéril.
- Bajo condiciones asépticas se transfirieron los cortes de tejido a un tubo con agua destilada estéril dejándose reposar durante un día; esto con el fin de aislar las bacterias fitopatógenas. Se tomo una gota de la

suspensión con el asa bacteriológica y se siembra por estría cruzada en medio B de King dejar incubar durante 48 horas a una temperatura de 28° C.

Para su purificación se seleccionaron colonias aisladas y se sembraron nuevamente en medio King B.

6.3 Pruebas rápidas de fitopatogenicidad

Se evaluó la fitopatogenicidad de las bacterias seleccionadas mediante dos pruebas rápidas: Pudrición en papa e Hipersensibilidad en tabaco.

La pudrición en papa se realizó en base a la siguiente metodología propuesta por Rodríguez (2006):

1. Un tubérculo de papa (*Solanum tuberosum* L), se lava se seca y se desinfecta superficialmente, bañándolo con etanol al 70% e hipoclorito de sodio.
2. Los tubérculos se cortaron en rebanadas de aproximadamente 5 mm de grosor, colocandose en cajas Petri con papel filtro (previamente esterilizado), se pueden acomodar dos rebanadas por caja y una de ellas sirvio como testigo.
3. A cada una de las rebanadas se les hizo una incisión superficial y solo en una de ellas se inoculo la bacteria a probar.
4. Finalmente se le adicionaron unos 2-3 mL de agua estéril solo para humedecer el papel y crear un ambiente húmedo, se incuban a 28°C durante 24-72 horas.

5. A partir de las primeras 24 horas, se palpo el tejido de cada una de las rebanadas, presentando un ablandamiento considerandose la prueba positiva.

La hipersensibilidad en tabaco:

1. A partir de una cepa pura, se preparó una suspensión bacteriana en un tubo de ensaye con agua destilada estéril y en condiciones asépticas, a una concentración de 1×10^7 UFC/mL (unidades formadoras de colonias por mililitro).
2. Inoculandose por inyección entre las nervaduras del envés de las hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L). Las plantas inoculadas se mantuvieron a temperatura ambiente, es decir de 20 a 30 °C, nunca a una temperatura mayor de 35 °C.
3. A las 24 horas posteriores a la inoculación, la zona infiltrada presento perdida de turgencia y/o necrosis considerandose la prueba positiva.

6.4 Identificación bioquímica de microorganismos (Biolog Microbial ID System®)

La metodología utilizada es la indicada en las instrucciones de uso del sistema Biolog®:

1. A partir de las cepas purificadas se tomó con hisopo estéril una pequeña cantidad del cultivo y se colocó dentro del fluido de inoculación que se encuentra en el kit del Biolog Microbial ID System® cuidando siempre de mantener una concentración que registre una transmitancia del 85% medida con turbidímetro.

2. Se Colocó en cada uno de los pozos de la placa 100µL de la mezcla obtenida.
3. Posteriormente se incubó a una temperatura de 28°C y se leyó a las 24 horas.

6.5 Extracción del DNA

La extracción del material genético se hizo mediante el protocolo establecido dentro del SENASICA:

1. Se tomó una asada del cultivo bacteriano puro y se coloca dentro de un tubo de microcentrífuga que contiene 250µL de etanol puro absoluto.
2. Se agregó a la mezcla un mililitro de buffer CTAB previamente calentado a 65°C.
3. Se procedió a colocar la muestra a -40°C durante 10 min.
4. Posteriormente se colocó en baño maría a una temperatura de 65°C durante 10 minutos.
5. Se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 12000 rpm.
6. Se decantó el sobrenadante y se agregó a la pastilla cloroformo previamente enfriado a -20°C para subsiguientemente agitar vigorosamente durante 10 minutos.
7. Nuevamente se centrifugó 12000 rpm por 10 minutos.
8. Después se separa la mezcla en 3 fases, para tomar la fase superior tratando de no tocar la fase intermedia.
9. Se colocó dentro de un tubo de microcentrífuga y se agregó isopropanol previamente enfriado -20°C mezclando por inversión.
10. De nuevo se centrifugó la mezcla a 12000 rpm por 10 minutos.
11. Se decantó dejando la pastilla y se lava dos veces con etanol frío al 70%.

12. Finalmente se cuantifica la cantidad de DNA obtenido por medio del equipo Nanodrop 2000® ajustando la cantidad a 20ng/μL.

6.6 Amplificación y secuenciación del gen DNAr 16s

Para la amplificación del gen 16s ribosómico se utilizaron los primers universales 8f y 1492r (Tabla 1). La mezcla de reacción contenía buffer de PCR, MgCl₂, DNTP'S, iniciador 8f e iniciador 1492r así como Taq polimerasa; las cantidades se muestran en la tabla 2.

Las condiciones en las que se llevó a cabo la amplificación se muestran en la tabla 3.

Tabla 1 Secuencias de los primers utilizados en la amplificación y secuenciación del gen 16s ribosómico.

Primer	Secuencia
8f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG Turner et al. (1999)
1492r	GGTTACCTTGTTACGACTT Turner et al. (1999)
515f	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA Turner et al. (1999)
907r	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA Lane et al. (1991)

Tabla 2. Cantidades de los componentes de reacción utilizados en la amplificación del gen 16s ribosómico.

Componentes de reacción	Volumen μL
Buffer de PCR 10X	2.5
MgCl₂ 50mM	0.75
DNTP'S 10mM	0.5
Iniciador 8f	1
Iniciador 1492r	1
Taq polimerasa 5U/μL	0.3
DNA problema	5
Volumen final	25

Tabla 3. Programa del termociclador para llevar a cabo la amplificación del gen 16s ribosómico.

Temperatura °C	Tiempo (minutos:segundos)	Ciclos
95	1:30	1
94	00:40	
59	00:40	35
72	1:00	
72	3:00	1
4	∞	

La comprobación de los productos amplificados obtenidos se hizo mediante electroforesis con un gel de agarosa al 1.5% agregando gel red como colorante para teñir, en buffer TAE 1X a 120 volts por 50 minutos.

6.7 Secuenciación y análisis de la secuencia.

La secuenciación se realizó en SENASICA mediante el método enzimático y utilizando los primers 515f y 907r (Tabla 1); se consiguieron secuencias forward y reverse de 1300 a 1400pb aproximadamente, fueron editados en el programa BioEdit 7.2.3 (Hall, 2013) obteniendo una secuencia consenso la cual se editó en base a los electroferogramas, posteriormente se compararon utilizando el algoritmo BLAST en la base de datos del GenBank, el EMBL y el RDP. Una vez comparadas las secuencias, se realizó un alineamiento múltiple mediante el programa ClustalW. Posteriormente se realizó el árbol filogenético mediante el programa MEGA 6.0 (Tamura, 2013) basados en el método de inferencia filogenética utilizado por Maximum Likelihood, tomando como fuera de grupo a *Pantoea ananatis*; todas las secuencias se descargaron de la LSPN.

6.8 Patogenicidad en fruto y plantulas de papayo

Para llevar a cabo los postulados de Koch se procedió a lo siguiente:

1. Se hizo una suspensión bacteriana con agua destilada esteril con una absorbancia de 0.05.
2. Se lavaron y desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% papayas de tamaño pequeño sin lesiones visibles y sanas.
3. Posteriormente se le hicieron de cinco a seis inoculaciones con aproximadamente 0.3mL de la solución bacteriana, haciendose por duplicado para cada cepa y para los testigos simplemente se inoculo agua destilada esteril.
4. Se mantuvieron a una temperatura de 28°C y en cámara húmeda hasta observarse las lesiones características provocadas por las bacterias.
5. A partir de las lesiones producidas se tomo una asada y se sembro en medio king B incubandose a 28° C durante 24hrs para su aislamiento.
6. Se prodeció a realizar la identificación bioquímica de los reisolamientos mediante el método Biolog Microbial ID System® anteriormente descrito.

VII. Resultados

7.1 Muestreo

Se analizaron un total de 409 muestras de papayo provenientes de los estados de Michoacán, Oaxaca, Veracruz, Chiapas, Colima, Jalisco y Yucatán.

7.2 Aislamiento y selección

Se lograron aislar algunas bacterias con diferente morfología colonial del medio King B a partir las 409 muestras que eran inicialmente; de las cuales se seleccionaron aquellas bacterias que en alguna de las dos pruebas rápidas de fitopatogenicidad dieron un resultado positivo (Tabla 4).

En la prueba de pudrición en papa se observó el ablandamiento y/o pudrición del tejido mientras que en la prueba de hipersensibilidad en tabaco se observaron manchas y hasta necrosis foliares (Figura 4. A, B y D).

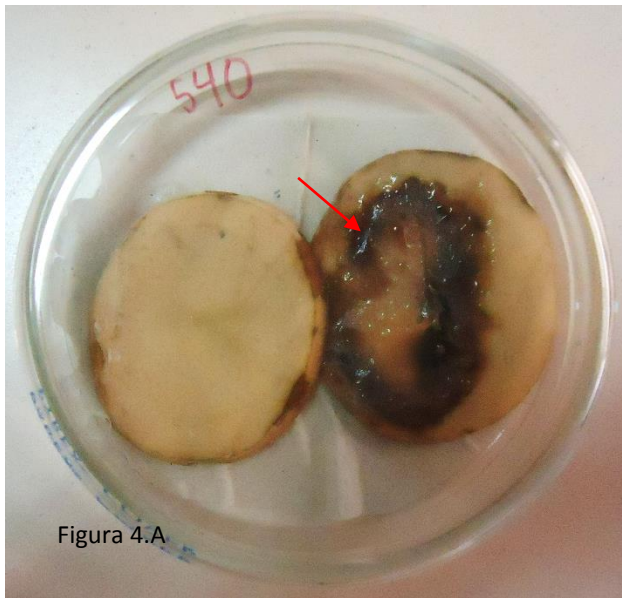


Figura 4.A

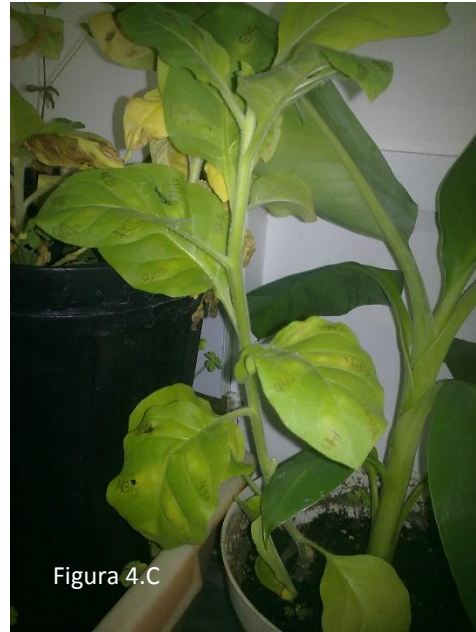


Figura 4.C

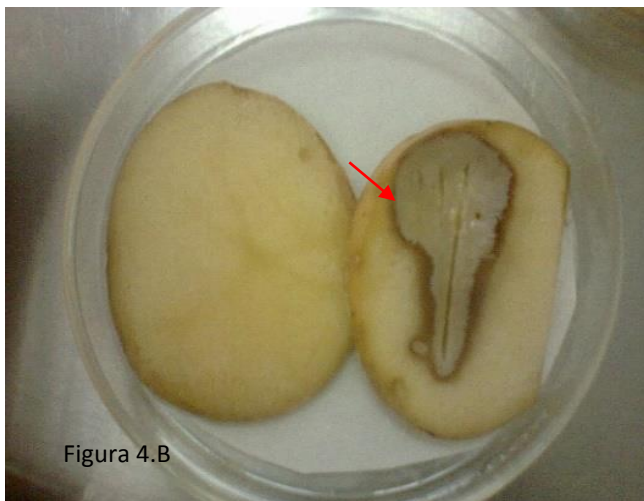


Figura 4.B



Figura 4.D

Figura 4. La flecha roja señala A. y B. Prueba de pudrición en papa y D. Prueba de hipersensibilidad en tabaco positivas. C Planta de Tabaco (*Nicotiana tabacum* L.)

7.3 Identificación bioquímica de microorganismos (Biolog Microbial ID System®)

Una vez evaluadas las placas, se introdujo el patrón metabólico obtenido que es único para cada especie y se compara en la base de datos de Biolog® obteniendo la posible identidad de la bacteria (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados obtenidos de las pruebas de fitopatogenicidad rápida, del sistema de identificación Biolog®, así como estado de la República de procedencia de la muestra.

cepa	tabaco	papa	BIOLOG® (microorganismo identificado)	Lugar de Procedencia
CNRF 18. papayo	+	-	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	Michoacán
CNRF 19. papayo	+	-	<i>E.coli</i>	Michoacán
CNRF 47. papayo	+	-	<i>Achromobacter</i>	Oaxaca
CNRF 70. papayo	V	-	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Oaxaca
CNRF 75. papayo	V	-	<i>Serratia</i> sp.	Oaxaca
CNRF 88. papayo	V	-	<i>Pseudomonas</i> sp	Oaxaca
CNRF 107. papayo	V	-	<i>Salmonela/Serratia</i>	Colima
CNRF 108. papayo	V	-	<i>Serratia</i>	Colima
CNRF 151. papayo	-	+	<i>Mycobacterium</i>	Colima
CNRF 154. papayo	-	+	<i>Paenibacillus tundrae</i>	Colima
CNRF 155. papayo	-	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Colima
CNRF 188. papayo	-	V	<i>Serratia</i> sp.	Veracruz
CNRF 203. papayo	-	V	<i>Acinetobacter baumani</i>	Veracruz
CNRF 205. papayo	-	V	<i>Exiguobacterium</i>	Colima
CNRF 210. papayo	-	V	<i>Paenibacillus/ Streptococcus</i>	Veracruz
CNRF 231. papayo	-	+	<i>Enterococcus munditii</i>	Yucatán
CNRF 264. papayo	+	-	<i>Achromobacter/pseudomonas</i>	Jalisco
CNRF 302. papayo	-	+	<i>lactococcus lactis</i>	Chiapas
CNRF 306. papayo	+	V	<i>Serratia/ Enterobacter</i>	Colima
CNRF 308. papayo	-	+	<i>Serratia/ Enterobacter/ Pantoea</i>	Colima
CNRF 334. papayo	V	-	<i>Achromobacter/pseudomonas</i>	Jalisco
CNRF 336. papayo	V	-	<i>Achromobacter/pseudomonas</i>	Colima
CNRF 337. papayo	V	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	Colima
CNRF 342. papayo	+	-	<i>Pseudomonas sirygae/fluorescens</i>	Colima
CNRF 366. papayo	+	+	<i>Pectobacterium</i> sp.	Colima
CNRF 391. papayo	+	+	<i>Pectobacterium</i> sp.	Chiapas
CNRF 393. papayo	+	+	<i>Pectobacterium</i> sp. atroseptica/Dickeya	Chiapas
CNRF 396. papayo	+	+	<i>Dickeya / Enterobacter</i>	Chiapas
CNRF 450. papayo	-	+	<i>Sphingomonas, mycobacterium</i>	Veracruz
CNRF 494. papayo	-	+	<i>Pectobacterium</i> sp.	Jalisco
CNRF 540. papayo	-	+	<i>Bacillus/mycobacterium)</i>	Yucatán

Positivo +, Negativo -, V variable.

De todas las cepas solo se seleccionaron aquellas bacterias que son de importancia fitopatógica basados en el resultado obtenido por la identificación bioquímica y en los resultados de las pruebas de fitopatogenicidad eligiéndose las cepas 366, 391, 393 y 494 pertenecientes al género *Pectobacterium*.

Una vez identificadas las cepas de interés, se colocaron los resultados de cada una de las pruebas evaluadas en los pocillos, en una tabla que se anexa al final de la presente (Anexo I) y algunas de esas características bioquímicas se compararon con las de las especies de género *Pectobacterium* tanto *P. aroidearum* como *P. carotovorum* reportadas por Nabhan *et al.* 2013.

Tabla 5. Diferenciación fenotípica de las cepas problema con las especies *Pectobacterium aroidearum* y *carotovorum*.

Prueba	1 ^a	2 ^b	366	391	393	494
Crecimiento a 37° C	+	+	+	+	+	+
Utilización de L-alanina,	(+)	-	-	/	-	-
Utilización de glucoronamida	(+)	-	/	/	/	/
D-arabitol	-	(+)	-	-	-	-
celobiosa	+	+	+	+	+	+
Ácido α-cetoglutarico	+	-	+	-	-	-
DL-ácido láctico	+	-	/	+	-	-
maltosa	(+)	(+)	-	-	-	-
D-melobiosa, rafinosa	+	+	+	+	/	+
D-serina	+	-	-	-	-	/
Tweens 40	+	-	/	/	/	/

Pectobacterium aroidearum^a, *Pectobacterium carotovorum*^b, Negativo -, Positivo +, Comúnmente positivo (+), Bordeline /.

7.5 Patogenicidad en fruto y plántulas de papayo

A los tres días posteriores a la inoculación de la suspensión bacteriana en frutos de papayo, se observaron pudriciones superficiales con elevación, bordes

irregulares, húmedas, presentando una coloración más oscura alrededor de la lesión y una clara licuefacción del tejido en comparación al testigo (Figura 5).

Al hacer un corte longitudinal del tejido se observó claramente el avance de la pudrición así como una coloración traslúcida alrededor de la lesión y una desorganización evidente del tejido (Figura 6).



Figura 5. A. Papaya testigo y B. papaya inoculada con la suspensión bacteriana indicando con flechas las claras lesiones producidas

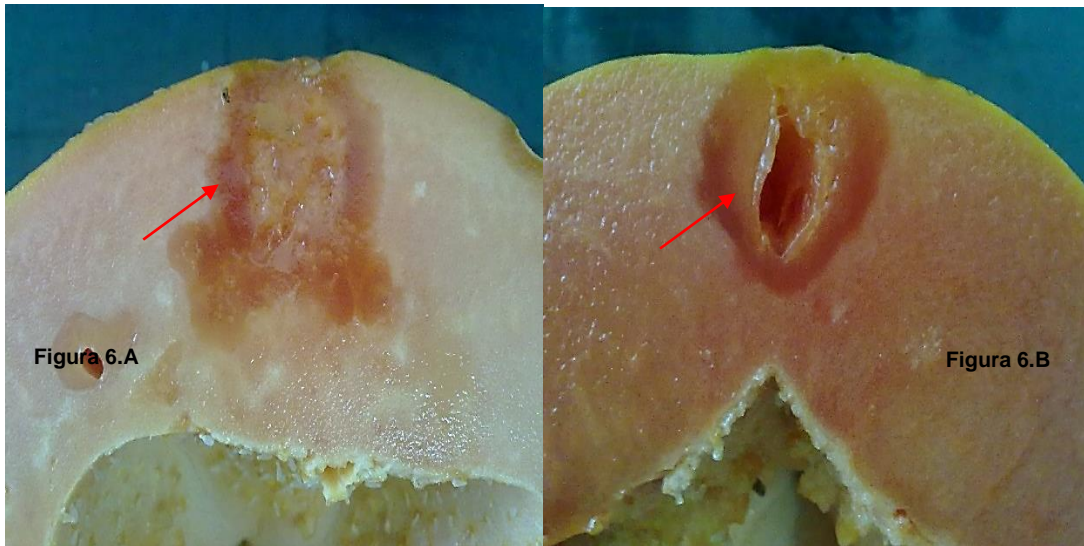


Figura 6 A y B. Cortes longitudinales del fruto del papayo lesionado señalando con flechas la evidente pudrición y desorganización del tejido.

En las plántulas de papayo se observó una pudrición y muerte de la planta en relación a la testigo (Figura 7).



Figura 7 A la izquierda se observa plántula testigo sin ninguna lesión, al centro y derecha se observan plántulas con evidentes lesiones señaladas con flechas.

7.6 Amplificación del gen ribosómico DNA 16s.

Se logró la amplificación del gen DNAr 16s observándose una banda con un peso aproximado de 1500pb en el gel de agarosa al final de la corrida electroforética.

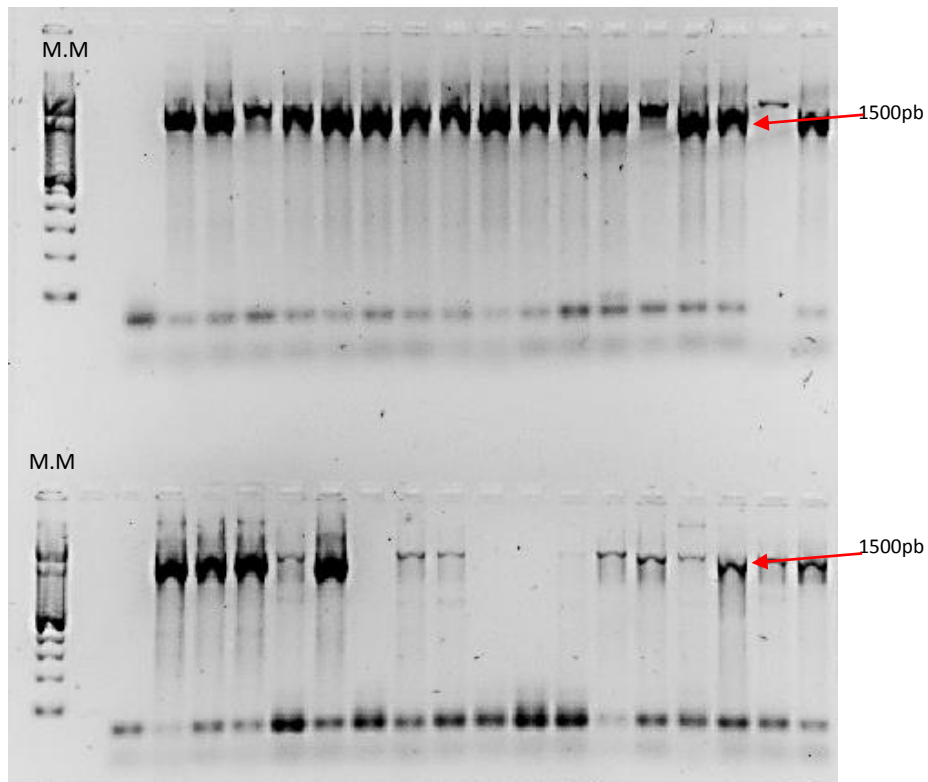


Figura 8. Amplificación del gen 16s obsérvese una banda aproximadamente a los 1500pb (M.M= Marcador Molecular).

7.7 Secuenciación

Una vez amplificado el gen DNAr 16s, se mandó a secuenciar obteniendo dos cadenas (forward y reverse) de 1300 a 1400 nucleótidos aproximadamente; de cada una de las cepas.

Las secuencias obtenidas no cuentan con ambigüedades significativas por lo que cumplen con los requisitos para el análisis filogenético. Las secuencias obtenidas se anexan al final del presente trabajo (Anexo II).

7.8 Análisis filogenético

Realizado el alineamiento múltiple a partir cada una de las secuencias editadas y analizadas; y obtenido el árbol filogenético con el método de inferencia Maximum Likelihood se observó que las secuencias de las cepas problema, con respecto a las secuencias de las diferentes especies tipo del género *Pectobacterium*; se agrupaban en un mismo clado con la especie *aroidearum* teniendo así una mayor coincidencia con la esta especie (Figura 9).

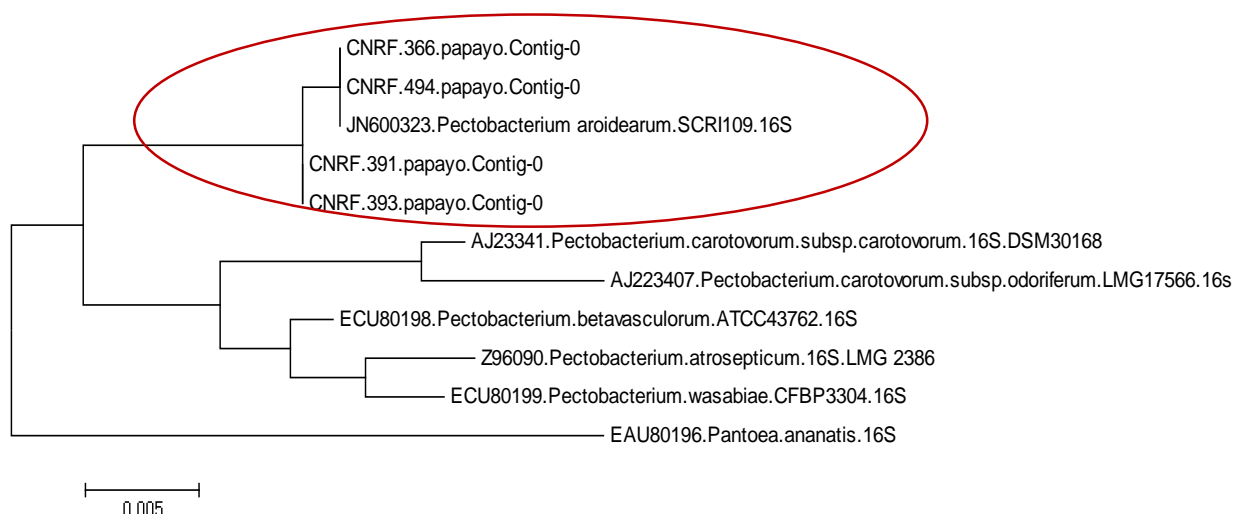


Figura 9. Árbol filogenético generado a partir de las secuencias del gen 16s de las principales especies de *Pectobacterium* (*atrosepticum*, *betavasculatorum*, *wasabiae*, *carotovorum* subsp *carotovorum* y *carotovorum* sub *odoriferum*) y las secuencias problema por el método Maximum Likelihood se observa el conjunto de cepas como un clado separado.

VIII. Análisis de resultados

Las cepas bacterianas 366, 391, 393 y 494 generaron pudrición en papa debido a la producción de enzimas pectolíticas características del género *Pectobacterium*, provocando la licuefacción y ablandamiento del tejido del tubérculo (Rodríguez, 2006). Además de producir la llamada hipersensibilidad en tabaco debido a una exagerada respuesta de la planta frente la presencia del fitopatógeno (Klement *et al.* 1964).

Los resultados obtenidos en la identificación a través del sistema Biolog® en la que todas las cepas coincidieron con el patrón bioquímico generado por *Pectobacterium* género considerado de importancia fitopatógena debido a que produce la llamada pudrición blanda en no menos de 16 plantas monocotiledóneas y 11 dicotiledóneas (Ma *et al.* 2007).

La secuencia consenso se introdujo dentro de la base de datos del NCBI, EMBL y RDP de las cuales se encontraron con un 99% de homología dos especies diferentes de *Pectobacterium* de las cuales *aroidearum* era la especie con la se encontraban más coincidencias. La reciente reclasificación de esta especie es de gran relevancia debido a que sería el primer reporte de su presencia en México como agente causal de pudriciones blandas.

Nabhan (*et al.* 2013) propuso a esta especie como un taxón único por lo tanto se decidió seguir el análisis filogenético que él uso aplicando el método de inferencia filogenética Maximum likelihood el cual intenta estimar la cantidad de cambio real de acuerdo con un modelo establecido.

En el árbol filogenético generado a partir de las secuencias del gen 16s de las especies tipo de *Pectobacterium* y de las cepas problema, se observa la clara agrupación de las cepas en un clado distinto comprobando lo que Nabhan (*et al.* 2013) afirmó al decir que *Pectobacterium aroidearum* es un taxón único; y confirmando así la identidad de nuestras cepas.

Para finalizar se cumplieron los postulados de Koch, determinándose así la patogenicidad de *Pectobacterium aroidearum*.

IX. Conclusiones

La presente tesis tuvo como objetivo la identificación de las bacterias que se encontraran dentro de las muestras de papayo recolectadas a finales del año 2013 a lo largo de la República Mexicana. Para cumplir lo anterior se realizaron pruebas de fitopatogenicidad rápida e identificación bioquímica de las bacterias indicando que las cepas asignadas con el número 366, 391, 393 y 494 del Centro Nacional de Referencia; pertenecen al género *Pectobacterium*.

La amplificación y secuenciación del gen DNAr 16s mostró una homología del 99% con dos especies del género *Pectobacterium* contenidas dentro de las bases de datos del NCBI, EMBL y RDP presentando una evidente agrupación mediante el análisis filogenético con la especie *aroidearum*.

La relevancia de esta especie radica en que anteriormente no había sido reportada a las autoridades fitosanitarias mexicanas como agente causal de pudriciones blandas y la entrada a un país de nuevas plagas y enfermedades causa estragos tanto en su agricultura como en su economía. Sin controles naturales en el nuevo ambiente, las poblaciones de organismos nocivos tienden a expandirse rápidamente. El aumento de estas poblaciones de plagas requiere grandes cantidades de alimentos, causando pérdidas a los cultivos de consumo humano.

Además de esta consecuencia negativa directa en la agricultura, la existencia de nuevas plagas puede ocasionar efectos indirectos en la economía, debido al cierre de mercados de países libres de esta plaga. El cierre de mercados de importación puede ser tan destructivo económicamente como el daño directo ocasionado al cultivo.

Por lo antes mencionado, la inspección fitosanitaria es de suma importancia para el mantenimiento del patrimonio vegetal y las exportaciones agrícolas de un país. Un buen sistema de vigilancia e inspección fitosanitaria es una inversión rentable que demanda una organización adecuada, una capacitación continua y un control de calidad constante (FAO, 2014).

X. Referencias

- Agrios, GN. Fitopatología, 5th USA, New York: Academic Press, 2005.
- Agostino M. Practical Bioinformatics. USA: Garland Science, Taylor y Francis Group, 2013.
- Biolog Incorporation. GEN III MicroPlate™. Instructions for Use. 2008. Recuperado el 09 de Marzo del 2014: <http://www.biolog.com/pdf/milit/00P%20185rA%20GEN%20III%20MicroPlate%20IFU%20Mar2008.pdf>
- Carica papaya (paw paw). Crop Protection Compendium. Recuperado el 29 de enero del 2014 del sitio web del Centre for Agricultural Bioscience International: <http://www.cabi.org/cpc>
- Clarridge, Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and infectious Diseases. Clinical Microbiol Rev. Oct. 2004; 17 (4): 840-862.
- Curtis H, Sue NB, Schnek A, Massarini A. Curtis Biología. Buenos Aires, Argentina: Medica panamericana, 2008.

- Evans AE, Ballen HF. Una mirada a la producción, el comercio y el consumo de papaya a nivel mundial, 2012. Recuperado el 25 de octubre del 2013 del sitio web de la Universidad de Florida: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/FE/FE91700.pdf>

- Fuentes CC, Los postulados de Koch: revisión histórica y perspectiva actual. RCCV; 2007, 1(2).

- García R. Especies y sub especies de Erwinia, causantes de pudrición blanda y pierna negra en la papa cultivada, en el estado de Merida-Venezuela Rev. Forest.Venez. 44(1) 2000, 107-114.

- González LC. Introducción a la fitopatología. 4ta reimpresión Costa Rica: Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura, 1985.

- Hall Tom. BioEdit Sequence Allignment Editor versión 7.2.3 . Universidad del Norte de California, 2013.

- Klement, Z.G., L. Farkas and L. Lovrekovich. 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology*, 54: 474-477.

- Koichiro Tamura, Glen Stecher, Daniel Peterson, Alan Filipski, and Sudhir Kumar Brief MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0: Universidad Metropolitana de Tokio, Universidad del Estado de Arizona, 2013.
- Loredó VJG.; Mena AJD. Manual de prácticas del laboratorio de fitopatología. Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuerte. Universidad Autónoma de Sinaloa. Unidad Regional Norte, 2009.
- Martínez GE.; Barrios SG.; Rovesti L, Santos PR. Manejo Integrado de Plagas. Manual Práctico. Cuba: Centro Nacional de Sanidad Vegetal, 2006.
- Ma B, Hibbing M, Kim HS., Reedy RM, Yedidia I, Breuer J, Breuer J, Glasner JD, Pema NT. *et. al.* Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*, *Phytopathology*; 2007, 97, 1150-1163.
- Nabhan S, De Boer SH, Maiss E, Wydra K. *Pectobacterium aroidearum* sp. nov., a soft rot pathogen with preference for monocotyledonous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2013, 63, 2520-2525.

- Palacio BA. Biodiversidad agroambiental en Aragón. Enfermedades de las plantas causadas por bacterias, recuperado el 2 de Enero del 2014: [http://diversidadagroambiental.aragon.es/index.php/mod.documentos/mem.descargar/fichero.documentos_Documento_1-
_Generalidades_de_bacterias_fitopatogenas_0851766f%232E%23pdf/ch
k.11a0e6c9a8936a33c1122667ca3ed38b](http://diversidadagroambiental.aragon.es/index.php/mod.documentos/mem.descargar/fichero.documentos_Documento_1-
_Generalidades_de_bacterias_fitopatogenas_0851766f%232E%23pdf/ch
k.11a0e6c9a8936a33c1122667ca3ed38b)
- Pérez FE. Universidad de la Republica, Facultad de Agronomía. Aspectos generales de bacterias Fitopatógenas, 2007. Recuperado el 2 de Enero del 2014: [http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/docs/cursos/fitopato/Materiales/Teoric
os2007-08/lecturaBac07.pdf](http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/docs/cursos/fitopato/Materiales/Teoric
os2007-08/lecturaBac07.pdf)
- Pierce AB. Genética. Un enfoque conceptual. 3^{ra} edición. Madrid, España: Panamericana, 2010.
- Rodicio MR; Mendoza MC. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. 2004. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, ISSN 0213 005X 22; 4: 238-245.

- Rodríguez MML. Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas. México: Universidad Autónoma de Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola, 2006.
- Schaad NW, Jones JB y Chun, W. Laboratory Guide for identification of plant pathogenic bacteria. St. Paul, Minnesota, USA: The American phytopathological society press, 2001.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. México DF: SIAP, 2012. Recuperado el 09 de Abril del 2014: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
- Turner, S, Pryer, KM, Miao, VPW, and Palmer, JD. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. Journal of Eukaryotic Microbiology. 1999, 46: 327–338.
- Vázquez CE. Secuencias específicas de ADN pueden ser amplificadas (reacción en cadena de la polimerasa PCR), 2003. Recuperado el 25 de octubre del 2013, del sitio web de la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química: <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/pcr.html>

- Valcárcel V. Manual para análisis filogenéticos moleculares. Universidad Autónoma de Madrid.

- Vidaver, A.K. and P.A. Lambrecht 2004. Las Bacterias como Patógenos Vegetales. Trans. Ana María Romero. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0601-01:
<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/BacteriaEspanol.aspx>

- Volcy C. Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología. Una revisión agronomía colombiana, 2008; 26 (1): 107-115.

- Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. Biología Molecular del gen. 5^{ta} edición. Madrid, España: Medica panamericana: 2006.

- Woese CRE, Stackebrandt TJ, Macke, Fox GE. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. Sys. Appl. Microbiol, 1985 6:143-151.

XI. Anexos

Anexo I

POZO	PRUEBA	CNRF 366	CNRF 391	CNRF 393	CNRF 494
A1	Negative Control	-	-	-	-
A2	Dextrin	/	/	/	/
A3	D-Maltose	-	-	-	-
A4	D-Trehalose	+	+	/	+
A5	D-Cellobiose	+	+	+	+
A6	Gentiobiose	+	+	+	+
A7	Sucrose	+	+	+	+
A8	D-Turanose	-	-	-	-
A9	Stachyose	+	-	-	+
A10	Positiv Control	+	+	+	+
A11	pH 6	+	+	+	+
A12	pH 5	-	+	+	+
B1	D-Raffinose	+	/	/	+
B2	α -D-Lactose	+	+	+	+
B3	D-Melibiose	+	+	/	+
B4	β -Methyl-DGlucoside	+	+	+	+
B5	D-salicin	+	+	+	+
B6	N-Acetyl-DGlucosamine	+	+	+	+
B7	N-Acetyl- β -DMannosamine	-	-	-	-
B8	N-Acetyl-DGalactosamine	-	-	-	-
B9	N-Acetyl Neuraminic Acid	-	-	-	-
B10	NaCl 1%	+	+	+	+
B11	NaCl 4%	/	+	+	+
B12	NaCl 8%	-	+	-	/
C1	α -D-glucose	+	+	+	+
C2	D-mannose	+	+	+	+
C3	D-fructose	+	+	+	+
C4	D-galactose	+	+	+	+
C5	3-Methyl Glucose	-	-	-	-
C6	D-fucose	-	-	-	-
C7	L-fucose	-	-	-	-
C8	L-Rhamnose	+	+	+	+
C9	Inosine	-	-	-	-
C10	1% Sodium Lactate	+	+	+	+
C11	fusidic Ácid	-	+	/	+
C12	D-serine	-	-	-	/
D1	D-sorbitol	-	-	-	-
D2	D-mannitol	+	+	+	+
D3	D-arabitol	-	-	-	-
D4	Myo-inositol	+	+	+	+
D5	Glycerol	+	+	+	+
D6	D-Glucose-6-PO ₄	+	+	+	+
D7	D-Fructose- 6-PO ₄	+	+	+	+
D8	D- aspartic acid	+	+	+	+
D9	D-serine	-	-	-	-

D10	Troleandomycin	+	+	+	+
D11	Rifamycin SV	+	+	+	+
D12	Minocycline	-	-	-	-
E1	Gelatin	-	-	-	-
E2	Glycyl-L-Proline	-	-	-	-
E3	L-alanine	-	/	-	-
E4	L-arginine	-	-	-	-
E5	L- aspartic acid	+	+	+	+
E6	L- glutamic acid	+	+	/	+
E7	L-histidine	-	-	-	-
E8	L-Glutamic Acid	-	-	-	-
E9	L-serine	+	+	+	+
E10	Lyncomycin	/	+	+	+
E11	Guanidine HCl	+	+	+	+
E12	Niaproof 4	+	+	+	+
F1	Pectin	+	+	+	+
F2	D-Galacturonic Acid	+	+	+	+
F3	L-Galactonic Acid Lactone	+	-	-	-
F4	D-Gluconic Acid	/	+	+	+
F5	D-Glucuronic Acid	/	/	+	/
F6	Glucoronamide	/	/	/	/
F7	Mucic Acid	+	+	+	+
F8	Quinic Acid	-	-	-	-
F9	D-Saccharic Acid	+	+	+	+
F10	Vancomycin	+	+	+	+
F11	Tetrazolium Violet	+	+	+	+
F12	Tetrazolium Blue	+	+	+	+
G1	p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	-	-	-	-
G2	Methyl Pyruvate	+	+	/	+
G3	D-Lactic Acid Methyl Ester	-	-	-	-
G4	L-Lactic Acid	/	-	-	-
G5	cítric Ácid	+	+	+	+
G6	α -Keto-Glutaric Acid	+	-	-	-
G7	D-Malic Acid	-	-	-	-
G8	L-Malic Acid	+	+	+	+
G9	Bromo-Succinic Acid	+	+	/	+
G10	Nalidixic Acid	-	-	/	-
G11	Lithium Chloride	/	+	+	+
G12	Potassium Tellurite	-	-	-	-
H1	Tween 40	/	/	/	/
H2	γ -Amino-Butyric Acid	-	-	-	-
H3	α -Hydroxy- Butyric Acid	-	-	-	-
H4	β -Hydroxy-D,LButyric Acid	-	-	-	-
H5	α -Keto-Butyric Acid	-	-	-	-
H6	Acetoacetic Acid	/	/	/	/
H7	Propionic Acid	-	-	-	-
H8	Acetic Acid	+	+	+	+
H9	Formic Acid	+	+	/	+
H10	Aztreonam	-	/	-	/
H11	Sodium Butyrate	/	+	+	+
H12	Sodium Bromate	-	-	-	-

+Positivo, -Negativo, / Bordeline.

Anexo II.

Secuencias Obtenidas en la amplificación del gen 16s rRNA de las cepas problema.

>CNRF.366.papayo2.Contig-0

```
TAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACG
AGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGA
TAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGAG
GGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTrG
TAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAG
GATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCC
GCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGA
AGGCGGTGAGATTAATACTCTCAyCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCA
CCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTT
AATCGGAATGACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGA
TGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTA
GAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
AGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTG
ACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTA
GTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGG
CTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
GTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGT
GGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCACAG
AATTCGGTAGAGATACCTTAGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGC
ATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA
GCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGTTTCGGCCGGGAACTCAAAGGA
GACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCAT
GGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAAAGAG
AAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTTCGTAGTCCGG
ATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAG
ATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT
CACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGA
GGGCGC
```

>CNRF.391.papayo.Contig-0

```
CGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGC
TTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTG
```

CCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACG
TCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCC
CAGATGGGATTAGCTrGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCC
CTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGC
CTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCA
CTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTGAGGTTAATAACCTCATCGATTGACGT
TACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATGACTGGGCGTAAAGCGCACGCAG
GCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAACTGCA
TTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGC
CCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGATTTGGAGGTT
GTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAATCGACCGCCTG
GGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCA
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCT
ACTCTTGACATCCASAGAAYTYRGYAGAGATRCyTTrGTGCCTTCGGGAACT
STGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGG
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCG
CCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGCGTATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAG
TACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAT
CGTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
TACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAG
CTTAACCTTCGGGAGGGCGC

>CNRF.393.papayo.Contig-0

ATGGAGGGGGATAAAcTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTTC
GGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGAT
GGGATTAGCTrGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGC
TGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGAT
GCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTC
AGCGGGGAGGAAGGCGGTGAGGTTAATAACCTCATCGATTGACGTTACCC
GCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA
GGGTGCAAGCGTTAATCGGAATGACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGG
TTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAACTGCATTTGA
AACTGGCAAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCT
GGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGATTTGGAGGTTGTGCC

TTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGT
ACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTT
GACATCCASAGAAYTYRGYAGAGATRCYTTTRGTGCCTTCGGGAACSTGAG
ACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGG
AACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGT
ATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGT
CGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTA
GTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC
ACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAA
CCTTCGGGAGGGCGC

>CNRF.494.papayo.Contig-0

AGAGTTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACAT
GCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCG
GACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACT
GGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACC
TTcGGGCCTCTtGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGA
GGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACC
AGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTG
TGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGT
GAGATTAATACTCTCAyCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTA
ACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA
ATGACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAA
TCCCCGAGCTTAACTTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTT
GTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTG
GAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCA
GGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGG
AGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAA
CTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAG
CAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCT
GTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTG
CCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCC
TTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAgCGA
CCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGA
GTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGA
ATGCTACGG