

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de 00211041**

**Caracterización molecular y patogénica de aislados bacterianos  
de papa (*Solanum tuberosum*) que presentaron síntomas de  
pudrición blanda**

**Madeleine Anahí Miranda Guerrero**

**Biología**

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniería en Biología

Quito, 20 de diciembre de 2023

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

## **HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Caracterización molecular y patogénica de aislados bacterianos de papa  
(*Solanum tuberosum*) que presentaron síntomas de pudrición blanda**

**Madeleine Anahí Miranda Guerrero**

**Nombre del profesor, Título académico**

**Antonio León Reyes, Ph. D.**

Quito, 20 de diciembre de 2023

## © DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Madeleine Anahí Miranda Guerrero

Código: 00211041

Cédula de identidad: 172736135-2

Lugar y fecha: Quito, 20 de diciembre de 2023

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

**Note:** The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

## RESUMEN

La papa es un alimento de gran valor nutritivo y es clave en la seguridad alimentaria mundial. Además, la papa es el tercer cultivo alimentario más importante del mundo en términos de consumo humano, después del arroz y del trigo, y la producción total mundial del cultivo sobrepasa los 300 millones de toneladas métricas. Existen factores abióticos como: temperatura, luz, suelo y nutrientes y factores bióticos que son las plagas y enfermedades que afectan al desarrollo de las plantas de papa. Este estudio se centra en la identificación patogénica y molecular del agente causal de la podredumbre blanda en tallos y tubérculos de muestras de papa recolectadas en Cañar, Ecuador. Se realizaron diluciones en serie, las cuales se sembraron en medio LB (Luria Bertani) y AN (Agar Nutriente) +fungicida; se aislaron 14 distintas morfologías de bacterias. Se hicieron ensayos de patogenicidad en tubérculos y tallos de papa de la variedad super chola. Con las bacterias que fueron patógenas se realizaron bioensayos confirmatorios en plantas enteras con y sin herida.

Los aislados bacterianos M3 y M14 generaron síntomas de pudrición blanda en tallos y en tubérculos. Las bacterias M3 y M14, se identificaron molecularmente por PCR del gen 16s rRNA con los primers universales 27f y 1492r. Los fragmentos de PCR se secuenciaron; las dos bacterias fueron identificadas como *Pseudomonas spp.* Para determinar la especie a la que pertenecen estos aislados bacterianos es necesario utilizar más marcadores moleculares como la subunidad beta de la ARN polimerasa rpoB o la gyrB ADN girasa subunidad B.

**Palabras clave:** Pseudomonas, podredumbre blanda, bioensayos de patogenicidad

## ABSTRACT

Potato is a food of high nutritional value and is key to global food security. Moreover, potato is the third most important food crop in the world in terms of human consumption, after rice and wheat, and the total world production of the crop exceeds 300 million metric tons. There are abiotic factors such as: temperature, light, soil and nutrients and biotic factors which are pests and diseases that affect the development of potato plants. This study focuses on the pathogenic and molecular identification of the causal agent of soft rot in stems and tubers of potato samples collected in Cañar, Ecuador. Serial dilutions were performed, which were sown on LB (Luria Bertani) and AN (Nutrient Agar) + fungicide medium; 14 different bacterial morphologies were isolated. Pathogenicity tests were carried out on potato tubers and stems of the super chola variety. Confirmatory bioassays were performed on whole plants with and without wound with the bacteria that were pathogenic. Bacterial isolates M3 and M14 generated soft rot symptoms in stems and tubers. Bacteria M3 and M14 were molecularly identified by PCR of the 16s rRNA gene with the universal primers 27f and 1492r. The PCR fragments were sequenced; the two bacteria were identified as *Pseudomonas* spp. To determine the species to which these bacterial isolates belong, it is necessary to use more molecular markers such as the beta subunit of RNA polymerase rpoB or the gyrB DNA gyrase B subunit.

**Key words:** Pseudomonas, soft rot, pathogenicity bioassays.

**TABLA DE CONTENIDO**

1. INTRODUCCIÓN .....	11
2. MÉTODOS .....	15
2.1 Material vegetal y aislamiento bacteriano .....	15
2.2 Bioensayos de patogenicidad en tubérculo con herida .....	15
2.3 Bioensayos de patogenicidad en porciones de tallo con herida y en tallo de papa entera con y sin herida .....	16
2.4 Extracción de ADN y detección PCR .....	17
2.5 Tinciones de Gram, pruebas bioquímicas preliminares y reasilamiento .....	17
3. RESULTADOS.....	18
3.1 Aislamiento bacteriano .....	18
3.2 Bioensayos in vivo en tubérculo con herida .....	18
3.3 Bioensayos in vivo en tallo con herida y en tallo de papa entera con y sin herida.....	18
3.4 Extracción de ADN y detección PCR.....	20
3.5 Tinción Gram, pruebas bioquímicas preliminares y reasilamiento .....	21
4. DISCUSIÓN .....	22
5. CONCLUSIONES .....	26
6. TABLAS .....	27
7. FIGURAS .....	29
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
9. ANEXOS .....	38

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Bacterias aisladas y su actividad pectinolítica en tubérculo y maceración del tejido en tallo.....	24
<b>Tabla 2.</b> Resultados de maceración del tejido en tallo con y sin herida .....	24
<b>Tabla 3.</b> Alineamiento en BLASTn de las secuencias consenso del gen 16s rRNA de las bacterias M3 y M14.....	25
<b>Tabla 4.</b> Resultados de Tinción Gram y pruebas bioquímicas de las bacterias M3 y M14 comparadas con <i>Pseudomona marginalis</i> .....	25



## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Aislamiento de bacterias:** a. Sintomatología observada de las muestras empleadas para el aislamiento bacteriano que fueron recogidas en la provincia del Cañar, Ecuador, b. Morfologías bacterianas aisladas de muestras que presentaron sintomatología de pudrición blanda. Las morfologías de las bacterias se clasificaron según su forma, color, tamaño, elevación.....25
- Figura 2. Bioensayos de patogenicidad en tubérculo:** a. Resultados de bioensayos de las 14 morfologías en tubérculo con herida 48 horas después de su infección, b. Resultados de bioensayos confirmatorios de 7 morfologías en tubérculo con herida 120 horas después de su infección.....26
- Figura 3.** Bioensayos de patogenicidad en porciones de tallo con herida 48 horas después de su infección.....27
- Figura 4.** Área de pudrición blanda en tubérculo.....27
- Figura 5.** Áreas de afectación en planta de papa entera variedad súper chola de 5 semanas: a. Resultados de bioensayos de patogenicidad con herida en tallos de papa entera, b. Resultados bioensayos de patogenicidad sin herida en tallos de papa entera.....28
- Figura 6.** Electroforesis: a. Extracción de ADN de las morfologías M3 y M14, b. PCR del gen16srRNA de las morfologías M3 y M14.....28

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Gráfica de caja y análisis de Tukey del área de afectación del tallo de papa de las morfologías M3 y M13.....	32
<b>Anexo 2.</b> Secuencias consenso de las bacterias M3 y M14 obtenidas con los programas Pregap4 versión 1.6-r y gap v4.....	32
<b>Anexo 3.</b> Marcadores moleculares para Pseudomonas.....	34
<b>Anexo 4.</b> Protocolo empleado para la PCR del gen 16srna .....	35

## 1. INTRODUCCIÓN

*Solanum tuberosum*, conocida como papa, es una especie de planta herbácea de la familia de las solanáceas, originaria de la sierra sur de Perú. La papa se domesticó hace unos 8000 años (Hardigan, et al., 2017). Las papas tardan hasta 3 meses en alcanzar la madurez normal, lo que las convierte en una opción económica y viable en comparación con el maíz y el trigo, que requieren al menos 4 meses para crecer en condiciones óptimas de temperatura y humedad. (Naeem, M, et al, 2021).

La papa es un producto muy nutritivo que desempeña un papel clave en la seguridad alimentaria mundial debido a su alto valor nutritivo, su amplia producción en todo el mundo y su contribución a la dieta de diferentes regiones, especialmente allí donde se cultiva a pequeña escala. Los tubérculos de papa son un producto nutritivo; por ejemplo, 100 gramos de papa hervida contienen aproximadamente 86 calorías, 0,1% de grasa, 20,10 gramos de hidratos de carbono y 1,71 gramos de proteínas. Las papas también contienen hierro, vitaminas B1, B3 y B6, potasio, fósforo, magnesio, folato, ácido pantoténico, riboflavina, antioxidantes y fibra, lo que las hace saludables. (INIAP, s/f). La papa es el tercer cultivo alimentario más importante del mundo después del arroz y el trigo, con una producción mundial total de más de 300 millones de toneladas (Naeem, et al.) La papa alimenta a una de cada siete personas en todo el mundo y es una fuente de ingresos para 10 millones de pequeños agricultores y empresarios en África, Asia y América del Sur (Dolničar 2021). A nivel nacional, la mayor producción de papa se encuentra en el norte del país, en la provincia de Carchi, que representa el 43,56% de la producción total; en 2019, se estima que se cultivaron 20 626 hectáreas de papa en Ecuador. La papa es el segundo cultivo más importante en Ecuador después del maíz. (Espac, 2019).

En el cultivo de la papa influyen una serie de factores abióticos y bióticos que pueden afectar al rendimiento y la calidad. Los factores abióticos que pueden afectar al rendimiento son la temperatura, la luz, el suelo y los nutrientes. Estos factores abióticos pueden afectar a la planta de la papa directa o indirectamente. Por ejemplo, las bajas temperaturas pueden dañar los tubérculos y la falta de luz puede atrofiar el crecimiento de la planta (Naeem et al., 2021).

Los factores biológicos que afectan a las papas incluyen plagas, hongos como *Phytophthora infestans*, oomicetes como *Alternaria solani* y bacterias (Van Der Waals, et al., 2016).

El cultivo de la papa en Ecuador se ve amenazado constantemente por plagas y enfermedades, lo que ha llevado a una reducción del área sembrada de papa en un 40% en los últimos dos años (ABBA, 2021). Además, los precios de la papa se incrementaron en más del 40% en 2019, lo que ha generado preocupación entre los agricultores. Por ejemplo, el tizón tardío es considerado como la enfermedad más devastadora en el cultivo de la papa. Se estima que las pérdidas globales por tizón tardío ascienden a 3 mil millones de dólares anuales, afectando a productores de todo el mundo (Ortiz, et al, 2017). De igual forma, los cultivos también se ven afectados por enfermedades causadas por bacterias donde las principales son *Ralstonia solanaraceum*, la cual provoca una marchitez bacteriana, *Streptomyces scabies* que genera sarna común en el tubérculo de la papa, *Pectobacterium spp*, *Dickeya spp* y *Pseudomonas marginalis* que provocan la pudrición blanda. En la sintomatología de la pudrición blanda se observan manchas necróticas blandas de aspecto húmedo en el tallo. Se presenta una pudrición acuosa que en etapas avanzadas, se observa de coloración marrón oscuro con olor fétido y una infección de la capa externa donde la enfermedad avanza hacia la parte basal, llegando a infectar entre el 50% y el 70% de la capa externa del pseudotallo. La sintomatología de pie negro se observa en el tallo de la papa que incluye necrosis y reabsorción del tallo

subterráneo, presentando una podredumbre de color negro y húmeda muy típica en el cuello. (Hardigan, et al, 2017). La enfermedad se origina en el tubérculo-semilla del que crece la planta y se manifiesta en tallos con una pudrición de color negro, que generalmente empieza con la pudrición del tubérculo- semilla y se extiende hacia arriba en el tallo, estos son causadas por *Pectobacterium spp*, *Dickeya spp* y ciertas especies de *Pseudomona spp*. (Majeed, et al, 2019).

Las enfermedades bacterianas causan afectaciones económicas relevantes como es el caso de *Pectobacterium spp*. la cual es capaz de ocasionar pérdidas que alcanzan más del 80% en campo y pérdidas totales en condiciones que son de almacenaje en el Ecuador (INIAP, s/f). *Pectobacterium carotovorum* genera pérdidas entre 50 y 100 millones de dólares anuales a nivel mundial, esta enfermedad se la conoce como la más severa la cual ataca a tubérculos a nivel postcosecha específicamente cuando se los almacena (Alzomor et al., 2013).

*Pseudomona solanacearum*, también conocida como *Ralstonia solanacearum*, es la bacteria responsable de la marchitez bacteriana en la papa. El ciclo de infección de esta bacteria comienza con su supervivencia en el suelo, donde puede permanecer durante varios años sin un huésped. Cuando las condiciones son favorables, la bacteria infecta las plantas a través de las raíces, penetrando a través de aperturas naturales, grietas y cortes. Una vez dentro de la planta, se propaga a través del sistema vascular, provocando la obstrucción de los vasos y, como resultado, la marchitez de la planta. Esta enfermedad puede limitar la producción de papa en diversas regiones, especialmente en climas cálidos, y ocasionar graves pérdidas en los cultivos (Kheirandish, et al, 2015).

*Pseudomona marginalis* es una especie de bacteria que puede afectar a los cultivos de papa, causando enfermedades como el desorden del peridermo también conocida como "pink eye"

la cual es una alteración que produce un deterioro en el tubérculo en su estadio de precosecha. La enfermedad se caracteriza por la aparición de manchas rosadas o rojas en la superficie del tubérculo, que pueden extenderse y afectar a toda la papa (Viterí, 2020).

*Pseudomonas marginalis* afecta a diversas especies vegetales, incluyendo el repollo, pepino, cebolla, papa y judías verdes. Las lechugas se han descrito como una de las plantas más afectadas por *Pseudomonas marginalis* (Li, et al, 2007).

El control de enfermedades bacterianas en cultivos de papa puede ser difícil debido a la falta de variedades resistentes y a la falta de productos químicos efectivos para el control de estas enfermedades. Para el control de enfermedades producidas por bacterias se usan prácticas culturales como la rotación de cultivos, la eliminación de restos de cultivos y la selección de semillas sanas para prevenir la propagación de enfermedades bacterianas (Baştaş, 2023).

El objetivo de esta investigación es caracterizar al agente causal de podredumbre blanda de muestras de papa recolectadas en Cañar mediante el aislamiento de bacterias, bioensayos de patogenicidad en tubérculo, tallo y planta e identificación molecular del gen 16s rRNA, reinfección y re-aislamiento para cumplir con los postulados de Koch.

## 2. MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal y aislamiento bacteriano

En agosto de 2022, cinco muestras de papa con síntomas de pudrición blanda, con un color oscuro en los tallos, fueron recolectadas de plantaciones de papa en la provincia de Cañar fueron trasladadas al Laboratorio de Agrobiotecnología de la USFQ. La superficie del tejido vegetal se desinfectó con una solución de NaOCl al 3%, agua destilada estéril y una solución de etanol al 70%. Los tejidos sintomáticos se machacaron en un mortero con solución salina (0,9%) hasta llegar a la dilución de  $1 \times 10^{-6}$  UFC. Todas las diluciones se sembraron en medios Luria Bertani (Miller), Tryptic soy agar (TSA) y Agar nutriente + Fungicida (Becton Dickinson and Company) y se las incubó a  $20^{\circ}\text{C} \pm 2$  por 24 horas. Las distintas morfologías se separaron mediante la técnica de siembra hasta obtener cultivos puros para su estudio posterior. Las bacterias fueron criopreservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2 Bioensayos de patogenicidad en tubérculo con herida

Se usó el protocolo de (Mae, et al, 2022) con ciertas modificaciones, para ello se emplearon nueve tubérculos de *Solanum tuberosum* L. variedad super chola sanos. Se desinfectaron los tubérculos con NaOCl al 2,5%, agua destilada estéril y una solución de etanol al 70%. Los cultivos puros fueron sembrados en el medio de cultivo  $\frac{1}{2}$  TSA y se usaron para este ensayo. Se recogió una colonia aislada la cual fue sembrada en caldo  $\frac{1}{2}$  TSB, cultivada por 24 horas y se ajustó a  $OD_{600}, 1$  UFC en el espectrofotómetro 7305 Spectrophotometer de la marca JENWAY, modelo 7305. En cada tubérculo inocularon 10ul de caldo. Se evaluó a las 120 horas y se hizo análisis estadísticos (Han, et al, 2023)

### 2.3 Bioensayos de patogenicidad en porciones de tallo con herida y en tallo de papa entera con y sin herida

En porciones de tallo de 5cm de plantas de papa de 5 semanas de la variedad super chola. Se realizó el mismo protocolo de desinfección empleado para los tubérculos, se emplearon las 14 morfologías bacterianas cultivadas en el medio de cultivo ½ TSA por 24 horas. Se realizó una punción de 5mm en los fragmentos de tallo con palillos estériles y se inoculó en la herida realizada previamente. Esto se lo realizó por triplicado y se tuvo controles que tenían únicamente herida. Se evaluaron los resultados a las 48 horas después de la inoculación. (Majeed, et al, 2019). Para los bioensayos en tallo de papa de planta entera con herida se sembraron 25 minitubérculos de la variedad super chola obtenidos de aeroponía en un sustrato autoclavado compuesto de 50% Perlita y 50% Turba rubia de la marca Kkekkilä. Las plantas se mantuvieron en invernadero a  $23^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ , 12 horas luz y 12 oscuridad. Cuando las plantas tuvieron 5 semanas se infectaron empleando caldos de cultivo de las bacterias a un **OD600**, se hicieron heridas de 3mm en cada tallo. Un palillo estéril se sumergió en el caldo bacteriano y se inoculó en la herida del tallo y selló con vaselina estéril. Cada morfología se inoculó por quintuplicado y se tuvo controles que tenían únicamente herida, se evaluaron los resultados a los 15 días post inoculación. Para los bioensayos en tallo de papa de planta entera sin herida se repitió el mismo protocolo de germinación de minitubérculos, cuando la planta alcanzó una edad de cinco semanas se hizo una inmersión por 10 minutos en una solución Ringer (NaCl, KCl y CaCl<sub>2</sub>), donde se sembraron las bacterias y posteriormente se las hizo crecer a las condiciones anteriormente mencionadas, cada morfología se inoculó por quintuplicado y se tuvo controles negativos. Se evaluaron los resultados a los 15 días post inoculación. (Hadizadeh, et al, 2018).



## 2.4 Extracción de ADN y detección PCR

Se extrajo el ADN con el kit DNeasy Power soil (Quiagen). Se hizo una electroforesis en Agarosa grado analítico al 2%. Para la electroforesis se usó el equipo ENDURO GEL XL de la marca Labnet, la electroforesis se fue realizó a 100 V durante 45 minutos y los amplicones se visualizaron y fotografiaron bajo luz ultravioleta UV en el transiluminador ENDURO-Labnet. Se realizó una amplificación del gen de ARNr 16S empleando el par de cebadores universales 27F y 1492R. En el termociclador MultiGene- Labnet. Los fragmentos amplificados por PCR se visualizaron con electroforesis y se utilizó Invitrogen TrackIt 100 bp DNA Ladder como marcador de ADN molecular. Los amplicones se liofilizaron y enviaron a secuenciar en Macrogen Korea. De los resultados se generaron secuencias consenso con los programas Pregap4 versión 1.6-r y gap v4. Las y se analizaron usando BLASTn (Basic Local Alignment Searching tool) y Genebank.

## 2.5 Tinciones de Gram, pruebas bioquímicas preliminares y reasilamiento

Los aislados bacterianos se sometieron a pruebas microbiológicas que incluyeron la prueba catalasa con peróxido de hidrógeno al 30% y una tinción Gram. También se realizaron las pruebas bioquímicas CIT, URE y MAN. Para el reasilamiento se repitió la misma metodología empleado en el aislamiento, la diferencia radica en que se usaron muestras de los bioensayos de patogenicidad realizados en tallos de papa entera que presentaron maceración del tejido. A las bacterias aisladas se les realizó una Tinción Gram y una prueba catalasa.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Aislamiento bacteriano

De las diluciones en serie se observaron colonias aisladas a partir de la dilución  $1 \times 10^{-4}$  se lograron recuperar 14. Las morfologías bacterianas se estriaron en el medio de cultivo  $\frac{1}{2}$  TSA y se obtuvieron 14 cultivos puros, como se indica en la Figura 1. Las morfologías de las bacterias se clasificaron según su forma, color, tamaño, elevación.

#### 3.2 Bioensayos in vivo en tubérculo con herida

Los tubérculos infectados con las 14 morfologías bacterianas se evaluaron a los 2 días post-inoculación. Siete morfologías presentaron sintomatología de pudrición blanda en tubérculos de papa, donde se observó que el tejido era blando, húmedo y de color blanco cremoso, y que la podredumbre comenzaba en la parte superior del tubérculo y avanzaba hacia el interior, con un margen marrón bien definido entre el tejido infectado y el sano. El control no presentó ningún tipo de maceración. Los resultados son consistentes en todos los casos al evaluar por triplicado.

#### 3.3 Bioensayos in vivo en tallo con herida y en tallo de papa entera con y sin herida

En las porciones de tallo de papa con herida en la Figura 3. se observan siete de las catorce morfologías que se encuentran señaladas fueron las que presentaron la maceración del tallo el cual se tornó blando y se lo observó al realizar cortes transversales al tallo donde se manifestó necrosis, presentando una podredumbre de color negro y húmeda, estos datos

fueron obtenidos a las 48 horas de realizada la infección. En la Tabla 1. se observa un resumen de los datos obtenidos de la actividad pectinolítica del tejido en tubérculos y la maceración tallo de 14 morfologías de bacterias donde se destaca de color naranja que fueron siete bacterias que fueron capaces de causar esta pudrición blanda tanto en tejido en tubérculo como en tallo. Con estas siete bacterias se realizaron bioensayos confirmatorios en tubérculo con herida y medir el área de afectación con Image J, la Figura 2, literal B se visualizan los resultados de los bioensayos con herida s los 5 días después de su infección. En la Figura 4. se presenta en análisis estadístico de las áreas afectación donde se realizó una gráfica de caja y un análisis de Tukey con  $\alpha= 0.05$ ,  $pvalue = 0.002$  y  $n= 3$ , obteniendo que las morfologías M3 y M14 poseen áreas de afectación significativamente distintas al control. El que tuvo mayor área de afectación fue la morfología M3 con un área de  $72.73 \text{ mm}^2$ , las lesiones que se observaron tuvieron la sintomatología de pudrición blanda en la papa que se manifestó con tejidos blandos, húmedos y de color crema en los tubérculos . Con las bacterias M3 y M14 que presentaron un área de afectación significativamente diferente al control en ensayos de patogenicidad en tubérculo de papa con herida se realizaron bioensayos en tallos de plantas de papa entera con herida. En la Figura 5. literal A se observa los resultados del área infectada con herida en tallo de papa entera a las 360 horas. En el Anexo 1. se presenta el análisis estadístico de Tukey y una gráfica de caja del área de infección en los tallos de papa de planta entera con herida con  $\alpha= 0.05$ ,  $pvalue = 0.002$  y  $n= 5$ , obteniendo que el área de afectación de la bacteria M3 es significativamente distinta al control. En los tallos que fueron infectados con las bacterias lo que se pudo observar fue una necrosis, lesión acuosa y pudrición de los tejidos internos del tallo alrededor del sitio en donde se realizó la punción con la bacteria M3, mientras que en el control sólo se pudo observar la punción realizada.

En los bioensayos de patogenicidad en tallo de planta entera de papa sin herida en la Figura 5, literal B se observan los resultados obtenidos del área infectada a los 15 días post-inoculación, en donde la morfología M3 fue la única que presentó una maceración del tallo de la papa mientras que la bacteria M14 y el control no presentaron ningún daño. El área de afectación obtenida de M3 fue de 1196 mm<sup>2</sup> donde la maceración del tallo se propagó desde la punción hacia la corona de la planta. En la Tabla 2. se puede observar una tabla resumen de los datos obtenido del daño de tejido en tallo de planta de papa entera con y sin herida en la cual las que están destacadas de color naranja fueron las que presentaron daño del tejido del tallo indicando que la bacteria M14 no fue capaz de causar daño si no existe una herida en el tallo de la papa.

#### 3.4 Extracción de ADN y detección PCR

En la Figura 6, literal A. se visualiza la electroforesis de la extracción de ADN, donde se puede observar que existe una buena extracción que se observa por la claridad de las bandas en la electroforesis, mientras que en la Figura 6, literal B. se presenta la electroforesis del producto PCR del gen 16s rRNA de las bacterias M3, M14, un control positivo (ADN de bacteria), un control negativo (ADN de *Fusarium spp.*) y un blanco (agua). M3 y M14 se amplificaron y las bandas tuvieron un tamaño de 1500bp. Posteriormente los resultados de secuenciamiento obtenidos de MACROGEN se procesaron en el programa Pregap4 versión 1.6-r y gap v4. 11.2-r obteniendo las secuencias consenso (Anexo 2). Se realizó un alineamiento de las secuencias consenso con la base de datos de BLASTn en la Tabla 3. se visualizan los resultados tanto para la morfología M3 como M14 resultando que ambas bacterias pertenecen al género *Pseudomonas spp.* En el Anexo 3. se presentan más marcadores moleculares para el género *Pseudomonas*.

### 3.5 Tinción Gram, pruebas bioquímicas preliminares y reasilamiento

En la Tabla 4. se presenta la prueba bioquímica de la catalasa y la Tinción Gram para ambas bacterias M3 y M14 en comparación con la especie *Pseudomona marginalis* la cual es capaz de presentar una sintomatología igual a la observada en los bioensayos realizados. En cuanto al reasilamiento se realizó nuevamente la Tinción Gram y la prueba bioquímica catalasa donde se obtuvieron los mismos resultados que cuando se aisló las bacterias inicialmente.

#### 4. DISCUSIÓN

Se realizó una búsqueda en la literatura sobre enfermedades de *Solanum tuberosum* causadas por *Pseudomonas* y cuya sintomatología sea la misma que la descrita por nosotros, se encontró que una de las especies que es capaz de producir una podredumbre en los cultivos de papa es la *Pseudomona marginalis* la cual es una bacteria gramnegativa, móvil, proteobacteria bacilar, flagelada polar, no esporulante, estrictamente aerobia, quimioorgano heterótrofa, no esporulante. En la Tabla 4. se obtiene los resultados esperados para *Pseudomona marginalis* tanto en Tinción Gram al todas ser Bacilos gramnegativos pero también en cuanto a la catalasa, utilización del citrato (CIT), ureasa (URE) y fermentación del manitol (MAN) ya que todas resultan ser positiva (Al- Zomor, et al, 2013). Esta bacteria produce un pigmento fluorescente en medio de cultivo que son apropiados y enzimas las cuales son pectinolíticas, sus huéspedes no sólo son los cultivos de papa sino también la alcachofa, apio, lechuga, tabaco, entre otras plantas hortícolas, la sintomatología que produce es una podredumbre blanda en tubérculos. (Soch, 2020), resultados similares a los nuestros de ensayos de patogenicidad. La actividad pectinolítica se refiere a la capacidad de un microorganismo para producir enzimas pectinolíticas, las cuales son capaces de degradar la pectina, un componente de la pared celular de las plantas. En el caso de los cultivos de papa, la actividad pectinolítica puede estar asociada a la pudrición de los tubérculos, ya que la degradación de la pectina en la pared celular de la papa puede contribuir a su descomposición y deterioro. La presencia de microorganismos con actividad pectinolítica en el suelo o en los propios tubérculos de papa puede ser un factor que contribuya a la aparición de enfermedades y a la disminución de la calidad de los cultivos. (Ngadze, et al, 2012). Los postulados de Koch son los criterios definidos por el médico alemán Robert Koch para establecer una relación causal entre los microorganismos en este caso las bacterias y las enfermedades: una

bacteria debe estar presente en todos los organismos que padecen una enfermedad, pero no en los organismos sanos. La bacteria debe aislarse del organismo enfermo y cultivarse en estado puro. La bacteria cultivada debe causar la enfermedad cuando se introduce en un organismo sano. La bacteria debe volver a aislarse del huésped de prueba enfermo inoculado y confirmarse que es el mismo que el patógeno específico original. (Castillo, et al, 2020). Por lo tanto se ha cumplido con todos los postulados puesto a que se aisló las bacterias de plantas de papa que presentaron sintomatología de pie negro, por otro lado con los bioensayos de patogenicidad se corroboró que siete bacterias fueron capaces de causar enfermedad, es decir una actividad pectinolítica en tubérculo y una maceración del tejido en porciones de tallo donde dos bacterias que fueron M3 y M14 fueron capaces de generar áreas de afectación significativamente distintas al control en tubérculo por lo que se realizó bioensayos de patogenicidad en tallos de plantas de papa entera observando que cuando existe una punción o no M3 es capaz de causar maceración del tejido en tallo mientras que si no existe una herida M14 no es capaz de generar daño al tejido en tallo de planta de papa entera, y una maceración de tejido en el tallo. También es importante mencionar que los patógenos verdaderos en plantas son aquellos que causan enfermedades de manera consistente y predecible en un amplio rango de condiciones ambientales. Por otro lado, los patógenos oportunistas son microorganismos que causan enfermedades solo cuando las plantas están debilitadas por factores como estrés, lesiones o condiciones ambientales desfavorables. En el contexto de los cultivos de papa los patógenos oportunistas tienden a atacar cuando las plantas están en situaciones de vulnerabilidad, como estrés hídrico o daño mecánico. (Charkowski, 2016). Por lo tanto por los bioensayos de patogenicidad realizados en tallos de planta de papa entera M3 se lo puede considerar como un patógeno verdadero mientras que M14 sólo fue capaz de afectar el tejido cuando existió dicho daño mecánico. En la Tabla 2. Se describe la sintomatología que presentaron los tubérculos como tejidos blandos. La

podrición comienza en la superficie del tubérculo y progresa hacia adentro. Los tejidos infectados están claramente delimitados del tejido sano por márgenes de color marrón oscuro o negro. Los factores que favorecen la podrición blanda incluyen tubérculos inmaduros, temperaturas adversas durante la cosecha, daño mecánico y agua libre en la superficie de los tubérculos. (Nova, 2013). *Pseudomona marginalis* además de producir la podredumbre blanda en tubérculos también afecta a nivel de bulbos y tallos, en cuanto a las hojas es capaz de producir lesiones iniciales en los márgenes de estas que llegan a evolucionar hasta lesiones oscuras con gran tamaño, cuando existe una alta humedad y temperatura, la podredumbre se logra extender hasta toda la planta por lo que también se considera como una bacteria que es oportunista (Scoch, 2020).

En los bioensayos de patogenicidad en planta se observaron lesiones acuosas en la base del tallo, que posteriormente se fusionan, se oscurecen y progresan hacia arriba a lo largo del tallo. Los tejidos internos del tallo se pudren y se vuelven negros, lo que dificulta el suministro adecuado de agua y nutrientes a las partes aéreas de las plantas, esto es lo que se puede observar en la Figura 3 y es igual a lo descrito por (Mae, et al, 2022). Las hojas en los tallos afectados pueden marchitarse, volverse cloróticas y, posteriormente, colapsarse. Además, las plantas afectadas pueden ser fácilmente extraídas del suelo, y los tubérculos pueden ennegrecerse y pudrirse en el sitio de fijación del estolón (Osei, et al, 2022). En la Figura 5. Literal B se puede visualizar que M14 no presentó daño en el tejido de papa cuando no existía una abertura, esto puede ser debido a que las plantas de papa tienen varios mecanismos de defensa contra patógenos, incluyendo la producción de metabolitos secundarios, compuestos antimicrobianos, enzimas y proteínas antimicrobianas (Baştaş, 2023). Razón por la cual la planta se pudo haber defendido y la bacteria M14 no fue capaz de causar daño. Por lo tanto se recomienda en el caso de M14 controlar mejor las condiciones



del bioensayo de patogenicidad y realizar ensayos confirmatorios. La electroforesis es una técnica que permite separar las moléculas de ADN en función de su tamaño y carga.

(González, 2022). En cuanto a la electroforesis del producto de PCR, en la Figura 6, literal B se observa que se amplificaron las bandas de ambas bacterias, la región que amplifica la PCR de 16S rRNA con los cebadores 27f y 1492r se refiere a la amplificación de la región V3 del gen 16S rRNA utilizando los cebadores universales 27f y 1492r. (Schloss, et al, 2016). La PCR de 16S La región V3 del gen 16S rRNA es una sección conservada y variable de la molécula de 16S rRNA, que codifica para una proteína de 55 kDa. (Zambrano, 2018) se obtuvo el tamaño de bandas esperadas que fue de 1500 pares de base. La identificación bacteriana mediante el 16S rRNA es una técnica molecular que se utiliza para identificar bacterias a nivel de género y especie. El 16S rRNA es una molécula de ARN ribosomal que se encuentra en todas las bacterias y presenta regiones altamente conservadas y regiones variables. La técnica implica la amplificación de la región variable del 16S rRNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación de la región amplificada. La secuencia obtenida se compara con bases de datos de secuencias de 16S rRNA para identificar la bacteria a nivel de género y especie. (Zambrano, 2018).

En el Anexo 2. se plantea a el marcador molecular *gyrB* girasa subunidad B la cual es capaz de codificar para la subunidad beta de la girasa y se ha utilizado como marcador para el análisis filogenético (Guevara, 2012), otro marcador molecular que se puede emplear es la subunidad beta de la ARN polimerasa dirigida por ADN de *rpoB* (Fernández, 2019).

## 5. CONCLUSIONES

Se lograron identificar dos aislados que produjeron sintomatología de pudrición blanda en papa variedad super chola, se aislaron dos morfologías que tenían la capacidad de causar daño en tejido de tubérculo y tallo de papa. En cuanto a los bioensayos de patogenicidad se obtuvo que la bacteria M3 presentó daño de tejido de tubérculo con herida y tallo de papa cuando hubo y no una herida, en cuanto a la bacteria M14 presentó daño en tejido de tubérculo de papa con herida y maceración del tejido del tallo únicamente cuando existió una herida presente.

En la identificación molecular con el gen marcador 16s rRNA de las bacterias M3 y M14 se identificaron como perteneciente al género *Pseudomona spp.* sin embargo, se requieren de más marcadores moleculares con el fin de identificar cual es la especie.

## 6. TABLAS

**Tabla 1.** Bacterias aisladas y su actividad pectinolítica en tubérculo y maceración del tejido en tallo

Código	Actividad pectinolítica tubérculo	Maceración del tallo
M1	No	No
M2	No	No
M3	Si	Si
M4	Si	Si
M5	Si	No
M6	Si	Si
M7	Si	Si
M8	No	No
M9	No	No
M10	No	No
M11	Si	Si

**Tabla 2.** Resultados de maceración del tejido en tallo con y sin herida

Código	Maceración del tejido de tallo de planta de papa entera con herida	Maceración del tejido de tallo de planta de papa entera sin herida
M3	No	No
M14	Si	No

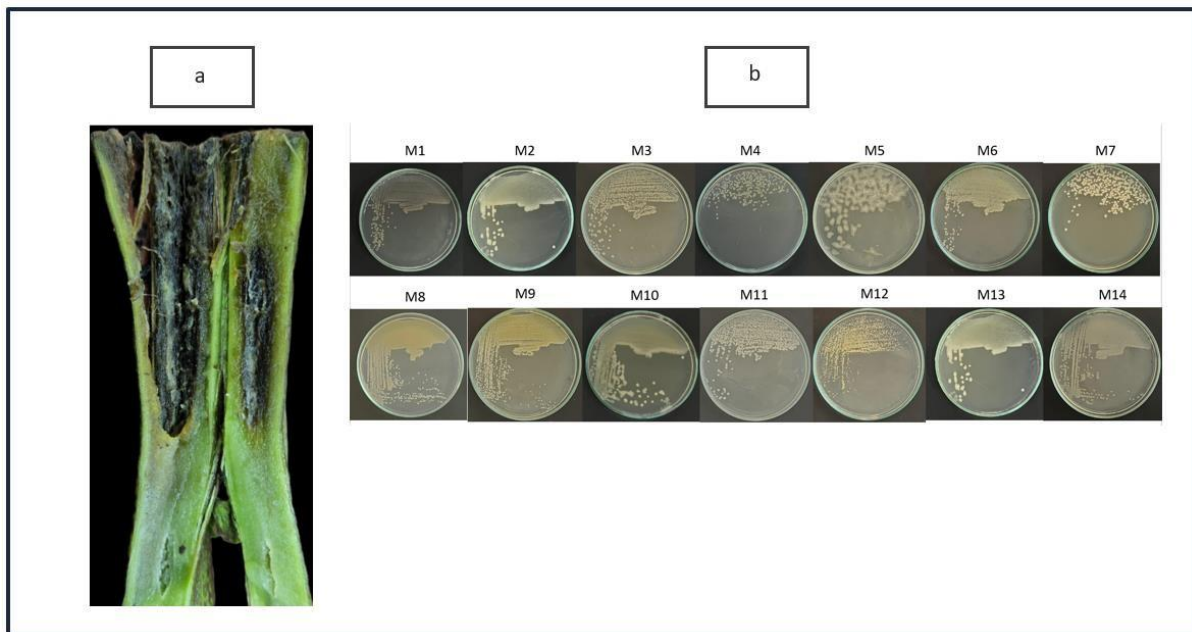
**Tabla 3.** Alineamiento en BLASTn de las secuencias consenso del gen 16s rRNA de las bacterias M3 y M14

Código	Scientific Name	Max score	Total score	Query cover	E value	Per. Ident
M3	<i>Pseudomona spp.</i>	1735	1735	100%	0.0	99.89%
M14	<i>Pseudomona spp.</i>	2484	2484	100%	0.0	100%

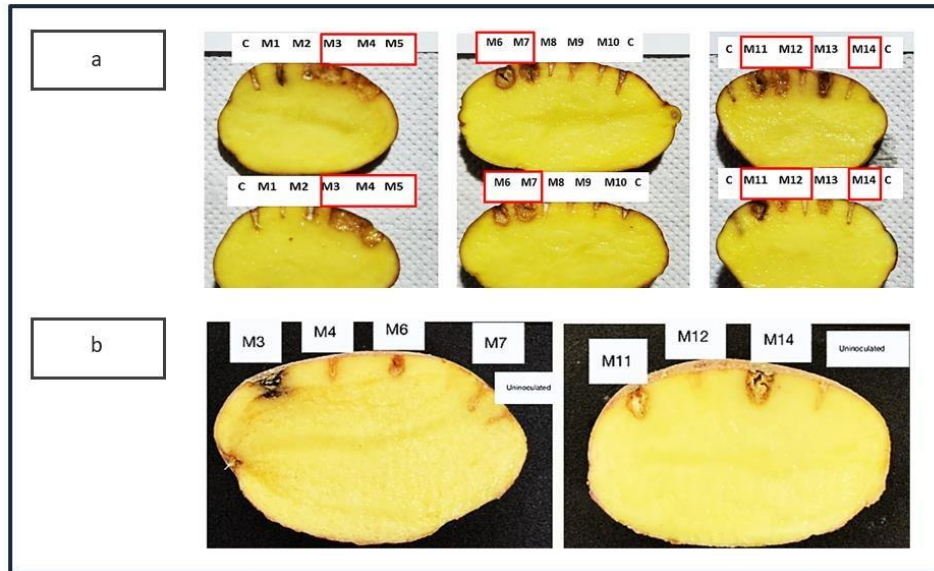
**Tabla 4.** Resultados de Tinción Gram y pruebas bioquímicas de las bacterias M3 y M14 comparadas con *Pseudomona marginalis*

	<i>Pseudomona marginalis</i>	M3	M14
<b>Tinción Gram</b>	-	-	-
<b>Prueba Catalasa</b>	+	+	+
<b>CIT</b>	+	+	+
<b>URE</b>	-	-	-
<b>MAN</b>	+	+	+

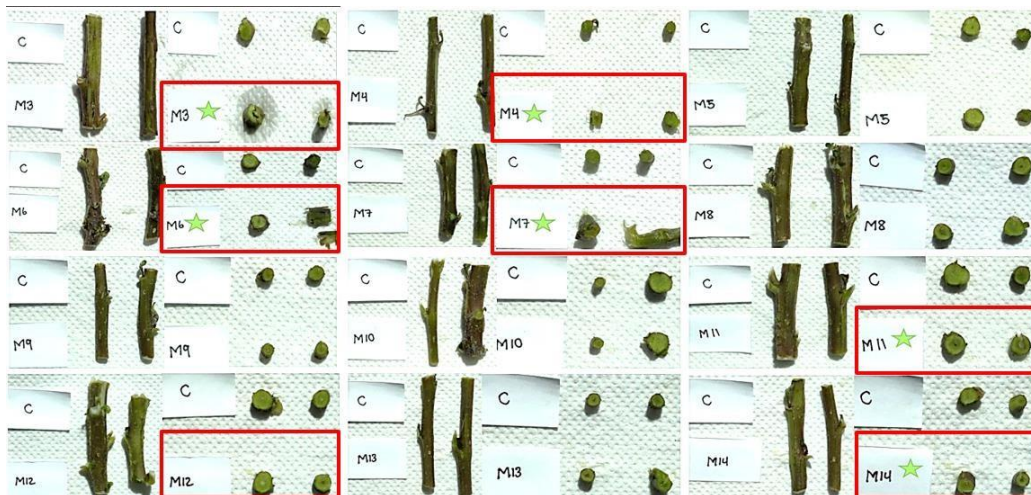
## 7. FIGURAS



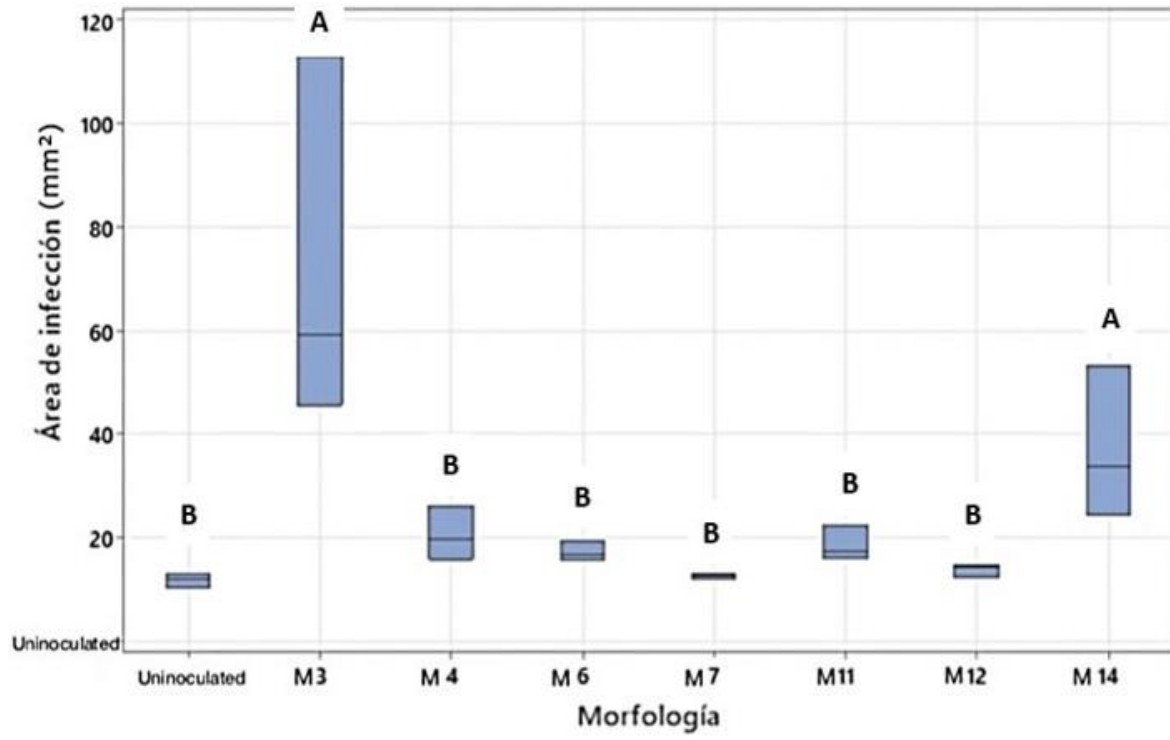
**Figura 1. Aislamiento de bacterias:** a. Sintomatología observada de las muestras empleadas para el aislamiento bacteriano que fueron recogidas en la provincia del Cañar, Ecuador, b. Morfologías bacterianas aisladas de muestras que presentaron sintomatología de pudrición blanda. Las morfologías de las bacterias se clasificaron según su forma, color, tamaño, elevación.



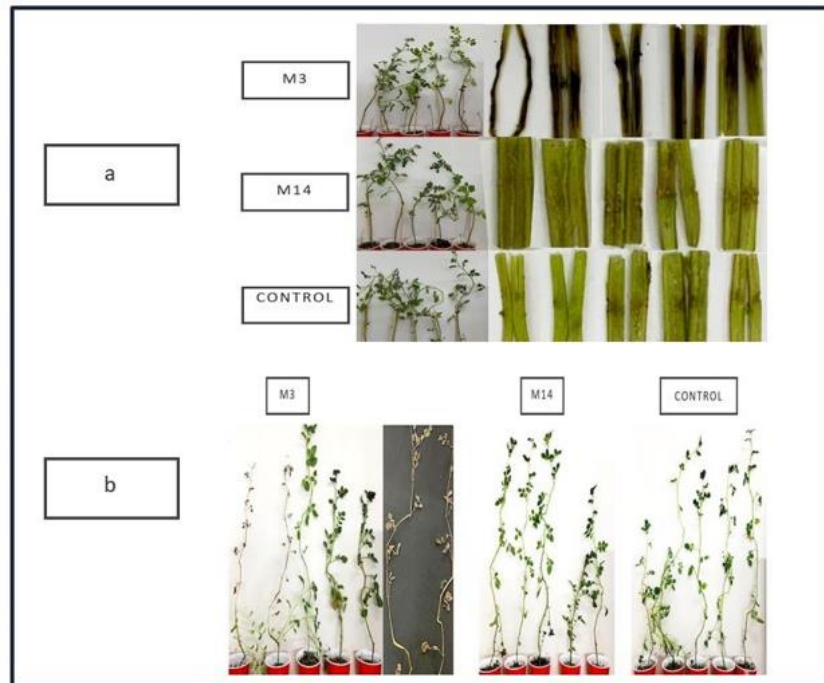
**Figura 2. Bioensayos de patogenicidad en tubérculo:** a. Resultados de bioensayos de las 14 morfologías en tubérculo con herida 48 horas después de su infección, b. Resultados de bioensayos confirmatorios de 7 morfologías en tubérculo con herida 120 horas después de su infección.



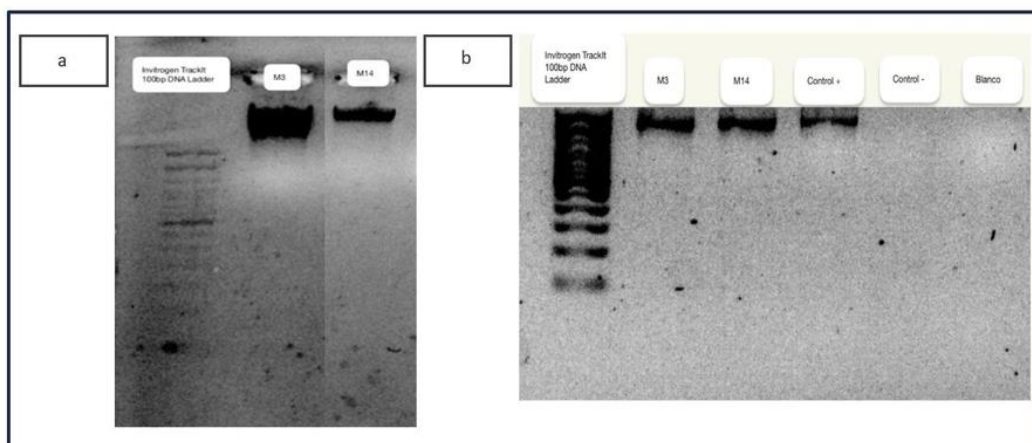
**Figura 3. Bioensayos de patogenicidad en porciones de tallo con herida 48 horas después de su infección.**



**Figura 4.** Área de pudrición blanda en tubérculo



**Figura 5.** Áreas de afectación en planta de papa entera variedad súper chola de 5 semanas: a. Resultados de bioensayos de patogenicidad con herida en tallos de papa entera, b. Resultados bioensayos de patogenicidad sin herida en tallos de papa entera.



**Figura 6. Electroforesis:** a. Extracción de ADN de las morfologías M3 y M14, b. PCR del gen16srRNA de las morfologías M3 y M14



## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBA. (2021). La producción de papa en Ecuador se encuentra amenazada por un problema fitosanitario - ABBA - Associação Brasileira da Batata.

<https://www.abbabatatabrasileira.com.br/materias-das-revistas/la-produccion-de-papa-en-ecuador-se-encuentra-amenazada-por-un-problema-fitosanitario/>

Al-Zomor, R., Khlaif, H., & Akash, M. (2013). Detection and Identification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*(Van Hall , 1902) the causal agent of potato blackleg by RFLP-PCR. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 9(2), 170-183.

<https://doi.org/10.12816/0001100>

Baştaş, K. K. (2023). Bacterial diseases of potato and their control. En Elsevier eBooks (pp. 179-197). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822925-5.00017-7>

Biological control of potato soft rot caused by *Dickeya Solani* and the survival of bacterial antagonists under cold storage conditions. *Plant Pathology*, 68(2), 297-311.

<https://doi.org/10.1111/ppa.12956>

Charkowski, A. O. (2016). Opportunistic pathogens of terrestrial plants. En *Advances in environmental microbiology* (pp. 147-168). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-28170-4\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-28170-4_7)

Dolničar, P. (2021). Importance of potato as a crop and practical approaches to potato breeding. En *Methods in molecular biology* (pp. 3-20). [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1609-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1609-3_1)

Erazo, N. (2020). Effect of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) and *Trichoderma harzianum* (Rifai) on *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill). *Biological Sciences*, 42, e4722 – e47522

Espac, (2019). Encuesta de superficie y producción agropecuaria, INEC. Recuperado de:  
<https://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>

Hadizadeh, I., Peivastegan, B., Hannukkala, A., Van Der Wolf, J., Nissinen, R., & Pirhonen, M. (2018).

Han, W. H., Wang, J., Pirhonen, M., Pan, Y., Qin, J., Zhang, S., Zhu, J., & Yang, Z. (2023). Identification and characterization of opportunistic pathogen *Pectobacterium polonicum* causing potato blackleg in China. *Frontiers in Plant Science*, 14.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1097741>

Hardigan, M. A., Laimbeer, F. P. E., Newton, L., Crisovan, E., Hamilton, J., Vaillancourt, B., Wiegert-Rininger, K., Wood, J. C., Douches, D. S., Farré, E. M., Veilleux, R. E., & Buell, C. R. (2017). Genome diversity

ImageJ. (2023). Softonic. <https://imagej.softonic.com/>

INIAP (s. f.). difunde valor nutritivo de la Papa y su contribución a la salud humana – Ministerio de Agricultura y Ganadería. <https://www.agricultura.gob.ec/iniap-difunde-valor-nutritivo-de-la-papa-y-su-contribucion-a-la-salud-humana/>

- Kheirandish, Z., & Harighi, B. (2015). Evaluation of bacterial antagonists of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of bacterial wilt of potato. *Biological Control*, 86, 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.03.007>
- Li, J., Chai, Z., He-Tong, Y., Li, G., & Di, W. (2007). First report of *Pseudomonas marginalis* PV. *marginalis* as a cause of soft rot of potato in China. *Australasian Plant Disease Notes*, 2(1), 71. <https://doi.org/10.1071/dn07029>
- Mae, X., Brazil, J. A., Rivedal, H. M., Perry, K. L., Frost, K. E., & Swingle, B. (2022). First report of *Pectobacterium versatile* causing potato soft rot in Oregon and Washington. *Plant Disease*, 106(4), 1292. <https://doi.org/10.1094/pdis-08-21-1635-pdn>
- Majeed, A., & Muhammad, Z. (2019). An overview of the common bacterial diseases of potato in Pakistan, associated crop losses and control strategies. *Journal of Plant Pathology*, 102(1), 3-10. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00362-y>
- Naeem, M., Demirel, U., Yousaf, M., Çalışkan, S., & Çalışkan, M. E. (2021). Overview on Domestication, breeding, genetic gain and improvement of tuber quality traits of potato using fast forwarding Technique (GWAS): a review. *Plant Breeding*, 140(4), 519-542. <https://doi.org/10.1111/pbr.12927>
- Ngadze, E., Brady, C., Coutinho, T. A., & Van Der Waals, J. E. (2012). Pectinolytic bacteria associated with potato soft rot and blackleg in South Africa and Zimbabwe. *European Journal of Plant Pathology*, 134(3), 533-549. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0036-z>

of tuber-bearing solanum uncovers complex evolutionary history and targets of domestication in the cultivated potato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(46). <https://doi.org/10.1073/pnas.1714380114>

Ordinola, M. (2014). El rol de la Papa para la seguridad alimentaria y nutricional en la región andina. <https://es.slideshare.net/papaesnutricion/35-conferencia-magistral-alap-2014-finalsincliics>

Ortiz, O., & Mareš, V. (2017). The historical, social, and economic importance of the potato crop. En *Compendium of plant genomes* (pp. 1-10). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-66135-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-66135-3_1)

Osei, R., Yang, C., Cui, L., Ma, T., Li, Z., & Boamah, S. (2022). Isolation, identification, and pathogenicity of *lelliottia amnigena* causing soft rot of potato tuber in China. *Microbial Pathogenesis*, 164, 105441. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105441>

Van Der Waals, J. E., Steyn, J. M., Franke, A., & Haverkort, A. J. (2016). Grower Perceptions of biotic and abiotic risks of potato production in South Africa. *Crop Protection*, 84, 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.02.008>

Van Zanten, M., et al. (2012). Modulation of ethylene- and heat-controlled hyponastic leaf movement in *Arabidopsis thaliana* by the plant defence hormones jasmonate and salicylate. *Springer – Verlag*. 235, p. 677 - 685

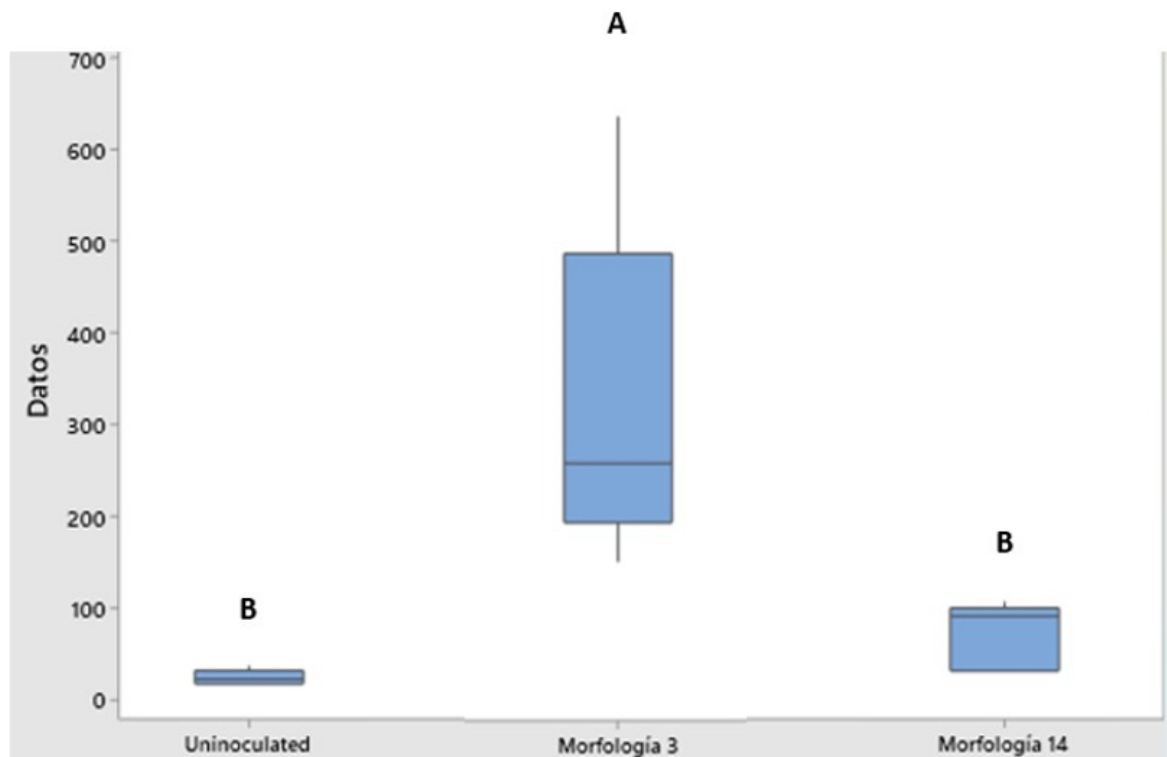
Viteri Jaramillo, A. D. (2020). Identificación de *Pseudomonas* spp., causantes del “desorden del peridermo” (pink eye) en *Solanum tuberosum*, en tres provincias del territorio

ecuatoriano. Universidad de las Américas.

<https://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/12241?mode=simple>

## 9. ANEXOS

**Anexo 1:** Gráfica de caja y análisis de Tukey del área de afectación del tallo de papa de las morfologías M3 y M14



**Anexo 2:** Secuencias consenso de las bacterias M3 y M14 obtenidas con los programas

Pregap4 versión 1.6-r y gap v4.

**M3:**AGCAACGGAATCACCGTGGTAGCGTCCTCCGAGGTCAGACTA  
 GCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTG  
 TACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGACATTCTGATTCACGAT  
 TACTAGCGATTCCGACTTC  
 CGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTAT

GGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTTTGTACCGACCA  
TTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTT  
GACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTT  
AGAGTGCCCACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGATAAAGGGTTGC  
GCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACAACACGAGCTGAC  
GACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCAAT  
CTATCTCTAGAAAGTTCATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCT  
TCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG  
CCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTION  
AGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGTTCAAG  
ACTCCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGG  
GTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAG  
TATCAGTCCAGGTAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATAT  
CTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATCCACTACCCTCTACCA  
TACTCTAGCTTGCCAGTTTTGGATGCAGTTCAGGTTGAGCCCG  
GGGATTTACATTCAACTTAACAGACCACCTACGCGCGCTTTACG  
CCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGC  
TGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTGCGGTAAACGTCA  
AAAACACTAAAGGTATTAAGGTTAATGCCCTTTCCTCCCCAACTT  
AAAAGTGCTTTTACAATCCCGAAAGACCTTCTTTCACACACCCGGG.

**M14:**TGACAAAATACATCTACTGATACGTACATCCCGAAGGTTAG  
ACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGG  
TGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTCG  
CGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGC

GATCCGGACTACGATCGGTTTTCTGGGATTAGCTCCACCTCGCGG  
 CTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCA  
 GGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCC  
 GGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCACCATGACGTGCT  
  
 GGTA ACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCA  
 ACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCT  
 CAATGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCATTGGA  
 TGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCA  
 CATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCATTTGAGTTT  
 TAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAG  
 CTGCGCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCCAACGGCTAGTTGACATC  
 GTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCC  
 ACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTGGTTCGCTT  
 CGCCACTGGTGTTCCTTCCTATATCTACGCATTTACCGCTACAC  
 AGGAAATTCCACCACCCTCTACCATACTCTAGTCAGTCAGTTTTG  
 AATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCA ACTTAA  
 CAAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGC  
 TTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGG  
  
 TGCTTATTCTGTTCGGTAACGTCAAACC.

**Anexo 3:** Marcadores moleculares para *Pseudomonas*

Marcador molecular	Descripción
-----------------------	-------------



<b>gyrB ADN girasa subunidad B</b>	Codifica la subunidad beta de la girasa y se ha utilizado como marcador para el análisis filogenético y la identificación de bacterias
<b>Subunidad beta de la ARN polimerasa dirigida por ADN de rpoB</b>	Codifica para la subunidad beta de la ARN polimerasa y se ha establecido como un buen marcador para el análisis filogenético y la identificación de bacterias

**Anexo 4:** Protocolo empleado para la PCR del gen 16srna

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen para 1x</b>
<b>Buffer 10 X</b>	0,5 ul
<b>MgCl<sub>2</sub> 50mM</b>	2,5 ul
<b>dNTPs (10mM)</b>	0,625 ul
<b>Primer 27f</b>	0,625 ul
<b>Primer 1492r</b>	1,5 ul
<b>Taq polimerasa</b>	0,5 ul
<b>ADN</b>	1 ul
<b>H<sub>2</sub>O</b>	17,75 ul
<b>Volumen total</b>	25ul