

**Diversidad de bacterias fitopatógenas, agentes causales de  
pudrición blanda en hortalizas de las zonas de Cartago y  
Alajuela, Costa Rica.**

**Diego Cubero Agüero**

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO AGRÓNOMO CON EL GRADO DE  
LICENCIADO EN AGRONOMÍA**

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS  
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**2019**

## **DEDICATORIA**

*La presente tesis la dedico a toda mi familia, principalmente a mis padres Miriam Agüero y Ronald cubero, que con sus consejos, apoyo y recursos han sido un pilar fundamental para forjar la persona que soy en la actualidad.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi directora de tesis M.Sc. Lorena Uribe Lorío por toda la confianza, apoyo, paciencia y conocimiento brindado durante el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Lidieth Uribe Lorío por el apoyo, recursos, conocimiento y confianza brindada en todos mis años de universitario.

A la M.Sc. Amy Wang Wong por todo el conocimiento y apoyo que me brindó para desarrollar este proyecto.

A el M.Sc. Mario Saborio Mora por los consejos y apoyo brindado

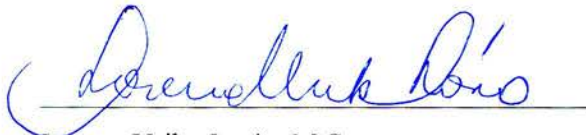
Un especial agradecimiento a las M.Sc. Daniela Vidaurre y Laura Brenes por toda la paciencia, conocimiento, apoyo, consejos y, sobre todo, a la amistad que me brindaron en este proceso.

A el personal del Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular y el Centro de Investigaciones Agronómicas que de una y otra forma me ayudaron en la ejecución de la tesis.

Diversidad de bacterias fitopatógenas, agentes causales de pudrición blanda en hortalizas de las zonas de Cartago y Alajuela, Costa Rica.

Diego Cubero Agüero

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO  
AGRÓNOMO CON EL GRADO DE LICENCIADO EN AGRONOMÍA



Lorena Uribe Lorío, M.Sc.

DIRECTOR DE TESIS



Amy Wang Wong, M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



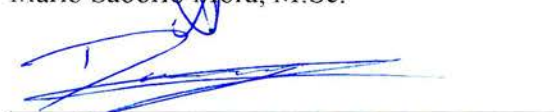
Lidieth Uribe Lorío, Dra.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Mario Saborio Mora, M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Danny Humphreys Pereira, Ph.D.

PRESIDENTE



Diego Cubero Agüero, Ing.

SUSTENTANTE

2019

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	7
LISTA DE CUADROS .....	10
LISTA DE ANEXOS .....	11
ABREVIATURAS Y CONCEPTOS.....	12
RESUMEN .....	13
INTRODUCCIÓN .....	15
ANTECEDENTES.....	18
OBJETIVOS: .....	28
General .....	28
Específicos.....	28
METODOLOGÍA .....	29
1. Material experimental .....	29
1.1. Recolección de las muestras .....	29
1.2. Aislamiento bacteriano.....	30
2. Selección de los aislamientos .....	31
2.1. Prueba de reacción de hipersensibilidad (RH).....	31
2.2. Actividad pectinolítica en medio cristal violeta y pectato (CVP) .....	34
3. Postulados de Koch para aislamientos seleccionados .....	34
3.1. Frutos de chile dulce.....	35
3.2. Plantas de papa .....	36
3.3. Cebolla .....	37
4. Identificación molecular de los aislamientos .....	37
4.1. Extracción de ADN .....	37
4.2. Amplificación y secuenciación del gen 16S ribosomal .....	37
4.3. Edición de secuencias y análisis filogenéticos .....	38
5. Análisis enzimas pectinolíticas .....	39

5.1. Caldo enzimático .....	39
5.2. Purificación de las enzimas .....	39
5.3. Visualización de las enzimas mediante SDS-Page .....	39
5.4. Análisis complementario de enzimas pectinolíticas basado en el estudio del genoma de la cepa Ech2A. ....	40
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
1. Aislamiento bacteriano .....	42
2. Reacción hipersensible (RH):.....	44
3. Capacidad pectinolítica en medio cristal violeta y pectato (CVP).....	47
4. Postulados de Koch.....	50
5. Identificación molecular.....	56
6. Análisis enzimático .....	58
<b>DISCUSION.....</b>	<b>65</b>
1. Reacción hipersensible.....	65
2. Capacidad pectinolítica en medio de cristal violeta y pectato (CVP). .....	66
3. Postulados de Koch.....	67
4. Identificación molecular.....	69
5. Análisis enzimático .....	72
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>76</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>77</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>97</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructura de la pared celular de una bacteria gram negativa (modificado de Kayser et al. 2005)..... 22
- Figura 2.** Sintomatología de las plantas hospederas de los aislamientos bacterianos. A) tallo de zucchini (*C. pepo*), B) frutos de tomate (*S. lycopersicum*), C) tallo de papa (*S. tuberosum*) D) hojas de cebolla (*A. cepa*), E) frutos de chile dulce (*C. annuum*), ¡Error! **Marcador no definido.**
- Figura 3.** Distribución de los puntos inoculados para la reacción hipersensible. Región gris corresponde a el punto inoculado con agua estéril. Regiones blancas corresponden a los puntos inoculados con bacteria. .... 33
- Figura 4.** Reacción hipersensible en hojas de chile dulce (*Capsicum annuum*) inoculadas con diferentes cepas bacterianas. La imagen muestra los diferentes grados en los que se presentó la reacción hipersensible en los puntos inoculados de las hojas, para las diferentes cepas. A) Grado 0 no hubo efecto, B) Grado 1, clorosis baja, C) Grado 2, clorosis alta y D) Grado 3, necrosis. Flechas celestes corresponden a punto inoculado con agua estéril, flechas negras son puntos inoculados con la cepa bacteriana. .... 44
- Figura 5.** Crecimiento de los aislamientos en medio de Cristal violeta y pectato (CVP). Cavidad en el medio representa la metabolización de la pectina por parte de la bacteria. A) Ech2A, B) 6M2, C) CfspA, D) Cfsab y E) Pt1-A..... 49
- Figura 6.** Inoculación de frutos de chile (*Capsicum annuum*) con la cepa Ech2A. Cepa aislada de frutos de chile dulce de la zona de Cartago. Incubación a 30°C. 6 (A) y 10 (B) días después de la inoculación. Orificios izquierdo inoculados con agua estéril y derechos con la cepa. . 50
- Figura 7.** Inoculación de frutos de chile (*Capsicum annuum*) con la cepa CfspA. Cepa aislada de frutos de chile dulce de la zona de Alajuela. Incubación a 30°C. Imagen tomada a los 4 días después de la inoculación. Tres puntos inoculados con la cepa y uno con agua estéril. 51
- Figura 8.** Inoculación de frutos de chile (*Capsicum annuum*) con la cepa Cfsab. Cepa aislada de frutos de chile dulce de la zona de Alajuela. Incubación a 30°C. Imagen tomada a los 4 días después de la inoculación. Tres puntos inoculados con la cepa y uno con agua estéril. 52

<b>Figura 9.</b> Inoculación de plantas de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> ) con la cepa PtA. Cepa aislada de plantas de papa de la zona de Tierra Blanca en Cartago. Condiciones variables de invernadero. Imagen tomada a los 22 días después de la inoculación. ....	53
<b>Figura 10.</b> Inoculación de plantas de cebolla ( <i>Allium cepa</i> ) con la cepa 6m2. Cepa aislada de plantas de cebolla de la zona de Cartago. Control negativo izquierda (agua estéril) y cepa 6-M2 derecha. Condiciones variables de invernadero. Imagen tomada a los 15 días después de la inoculación. ....	54
<b>Figura 11.</b> Comparación mediante ITS de cepas que fueron inoculadas y posteriormente reaisladas en la prueba de los postulados de Koch. Amplificación de la región intergénica 16S-23S de rARN. Primer G1 y L1. Esc) marcador de peso molecular de 100pb. 1) CfspA, 2) Cfsab, 3) Ech2A, 4) control positivo ( <i>P. carotovorum</i> ATCC 495), 5) control negativo. O: cepa original o inoculada, R: cepa recuperada o reaislada.....	55
<b>Figura 12.</b> Comparación mediante ITS de cepas que fueron inoculadas y posteriormente reaisladas en la prueba de los postulados de Koch. Amplificación de la región intergénica 16S-23S de rARN. Primer G1 y L1. 1) CfspA, 2) Cfsab, 3) Ech2A, 4) control positivo ( <i>P. carotovorum</i> ATCC 495). O: cepa original o inoculada, R: cepa recuperada o reaislada. ...	56
<b>Figura 13.</b> Árbol filogenético bayesiano basado en secuencias del 16S ribosomal para las cepas pectinolíticas. Se utilizó como outgroup la cepa tipo <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> JMC 1465.....	58
<b>Figura 14.</b> Análisis enzimático. Visualización de enzimas en un gel de poliacrilamida. Enzimas liberadas por bacterias fitopatógenas en un medio líquido enriquecido con polipectado de sodio. Esc: Escalera (marcador estándar de 10 proteínas, 10-250 kDa).....	59
<b>Figura 15.</b> Número de secuencias obtenidas según las categorías funcionales obtenidas para los ensamblajes del genoma de la cepa Ech2A, a partir de los ensambladores escogidos, Spades scaffolds 33 y 55 y velvet 55. ....	62
<b>Figura 16.</b> Vía metabólica de degradación del ácido poligalacturónico. En color rosa se pueden observar las enzimas encontradas en la cepa Ech2A. Tomada de KEGG. ....	63



**Figura 17.** Visualización circular del genoma para la cepa Ech2A mediante Geneious Prime.

..... 64

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Escala utilizada para la evaluación de la reacción hipersensible en las plantas de chile dulce ( <i>Capsicum annuum</i> ).....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Cuadro 2.</b> Aislamientos bacterianos utilizados, aislados de hortalizas con distintos síntomas, provenientes de las zonas hortícolas de Cartago y Alajuela. ....	43
<b>Cuadro 3.</b> Resultados para la prueba de reacción hipersensible en plantas de chile dulce. .	46
<b>Cuadro 4.</b> Resultados de la prueba para determinar la capacidad pectinolítica de las cepas en medio cristal violeta y pectato (CVP). ....	48
<b>Cuadro 5.</b> Cantidad de secuencias antes y después del análisis de calidad de las secuencias forward y reverse de la secuenciación del genoma de la cepa Ech2A. ....	60
<b>Cuadro 6.</b> Estadísticas del análisis de calidad obtenidas con la herramienta Quast para el ensamblaje del genoma de la cepa Ech2A utilizando los ensambladores Velvet, contigs de k-mer de 55 y spades scaffolds k-mer 55 y 33. ....	61

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Características morfológicas y bioquímicas de las cepas aisladas de plantas con síntomas de pudrición blanda.....	97
<b>Anexo 2.</b> Estadísticas obtenidas para los ensambladores Velvet y Spades, en los cuales se utilizó contigs y scaffolds de k-mer de 33, 55 y 127.....	99
<b>Anexo 3.</b> Comparación de los genomas de la cepa <i>Raoultella terrigena</i> NCTC 13098 y la cepa Ech2A mediante la herramienta ANI calculator.....	99
<b>Anexo 4.</b> Precipitados o pellet resultantes de la purificación de enzimas mediante la saturación del sobrenadante con sulfato de amonio. ....	100

## ABREVIATURAS Y CONCEPTOS

**BSR:** Podredumbre blanda bacterial (Bacterial soft rot)

**COG:** Base de datos de Clusters de grupos ortólogos de proteínas (Clusters of Orthologous Groups of proteins)

**Contings:** Pequeños fragmentos de ADN superpuestos que juntos representan una región consenso, son el producto de la unión de los reads.

**CVP:** Medio semi-selectivo de cristal violeta y pectato

**Diamond:** Alineador de secuencias de proteínas contra bases de datos

**ETI:** Inmunidad activada por efectores (effector-triggered immunity)

**Forward:** Secuencia de ADN que corre de derecha a izquierda

**KEGG:** base de datos que vincula información genómica con información funcional de orden superior (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

**K-mer:** Secuencias de cierta longitud o cantidad de bases. Ejemplo: K-mer 55 es una secuencia de 55 bases.

**N50:** Medida estadística en análisis genómico que dice el tamaño promedio que tienen el 50% de las secuencias

**PAMP:** Patrones moleculares asociados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns)

**Phred score:** Medida de calidad de las secuencias

**PTI:** Inmunidad activada por el patrón (PAMP-triggered immunity)

**Reverse:** Secuencia de ADN que corre de izquierda a derecha

**RH:** Reacción hipersensible

**Scaffolds:** Secuencias creadas a partir de la superposición de contigs.

**Spades:** Ensamblador de secuencias

**SRE:** Enterobacterias de la podredumbre blanda (The soft rot Enterobacteriaceae)

**Reads:** Pequeñas secuencias de nucleótidos obtenidas de la secuenciación.

**UFC:** Unidades formadoras de colonias

**Velvet:** Ensamblador de secuencias.

## RESUMEN

La pudrición blanda bacteriana en los cultivos es causada por un grupo de bacterias capaces de secretar enzimas pectinolíticas que degradan la pectina presente en la pared celular de las plantas. Se evaluó un grupo de bacterias provenientes de hortalizas con pudrición blanda de zonas hortícolas de Cartago y Alajuela. Las muestras correspondían a frutos de chile dulce, plantas de papa, plantas de cebolla, plantas zucchini, y tallos y frutos de tomate. Los aislamientos fueron evaluados por su capacidad de crecimiento en el medio semi-selectivo cristal violeta y pectato, a la prueba de reacción hipersensible, a pruebas de patogenicidad (postulados de Koch) y a la presencia de enzimas pectinolíticas para identificar cuáles de ellos corresponden a los agentes causales. Además, se realizaron análisis moleculares con el fin de identificar dichas bacterias. Las bacterias fueron inoculadas en hojas de chile dulce para analizar la capacidad de causar reacción hipersensible (RH), y a los aislamientos positivos para dicha prueba se les evaluó la capacidad de degradar la pectina mediante la inoculación en placas de medio cristal violeta y pectato (CVP), donde se encontró que algunos aislamientos provenientes de papa (Pt1-A), cebolla (6-M2) y chile dulce (Ech2A, CfspA y Cfsab) tenían actividad pectinolítica. A las bacterias identificadas como pectinolíticas (CVP) se les evaluó su patogenicidad siguiendo los postulados de Koch, dando como resultado tres aislamientos bacterianos causantes de pudrición blanda en chile, identificadas posteriormente por amplificación del gen 16s ribosomal como pertenecientes al género *Pectobacterium* para las cepas CfspA y Cfsab y la cepa Ech2A como perteneciente al género *Raoultella*. Los aislamientos provenientes de papa y cebolla no causaron la enfermedad cuando fueron inoculadas en las plantas correspondientes. El análisis enzimático en SDS-PAGE mostró que la cepa CfspA proveniente de chile producen enzimas correspondientes a los grupos de esterases, galacturonasas y pectato liasas. Además, se realizó un análisis *in silico* de la presencia de enzimas pectinolíticas en el genoma de la cepa Ech2A (aislada de chile) que mostró que la bacteria presenta genes que están vinculados en la producción de esterases y

galacturonasas, enzimas importantes para el proceso de degradación de la pectina presente en plantas.

## INTRODUCCIÓN

En Costa Rica, la horticultura es una de las actividades agrícolas más importantes y la mayor parte de la producción se lleva a cabo en la región central del país, principalmente en las faldas de los volcanes Irazú, Turrialba y Poás, pertenecientes a las provincias de Cartago y Alajuela. Esta actividad también se desarrolla en algunas zonas bajas del país, encontrándose plantaciones desde los 700 hasta los 3000 msnm (Wei-Salas y Durán-Quirós 2015).

La producción se lleva a cabo principalmente en campo abierto, bajo condiciones ambientales como alta humedad relativa, precipitación y temperatura, lo cual podría resultar adverso para los cultivos y favorable para organismos fitopatógenos como bacterias, hongos, virus y nematodos (Agrios 2005). Estos organismos interactúan con las plantas y pueden causar enfermedades en los cultivos de estas zonas hortícolas (Arauz 2011).

Una de las principales enfermedades en la producción hortícola es la podredumbre blanda, la cual puede ser provocada por hongos, algunos nematodos, y principalmente por bacterias pectinolíticas (Czajkowski et al. 2015), Dentro de este grupo de bacterias, se encuentran los géneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Xanthomonas*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Pectobacterium* y *Dickeya* (Nguyen-the y Carlin 1994, Charkowski et al. 2014), siendo éstos dos últimos los que se encuentran con mayor como causantes de la sintomatología (Charkowski 2018).

*Pectobacterium* y *Dickeya* son conocidos actualmente como Enterobacterias de la podredumbre blanda (SRE, por sus siglas en inglés, Soft rot Enterobacteriaceae). A diferencia de otros géneros mencionados anteriormente, se considera que éstos poseen mayor agresividad y efectividad para causar la enfermedad, esto, debido a que son

capaces de sintetizar un complejo enzimático más amplio, que les permite degradar la pectina presente en los tejidos vegetales, afectando directamente la firmeza tisular de las plantas (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 2014).

La podredumbre blanda bacteriana (BSR por sus siglas en inglés, Bacterial soft rot) provocada por las SRE es considerada una de las causas de mayores pérdidas económicas en la agricultura alrededor del mundo (Charkowski et al. 2014). Se ha diagnosticado en muchas regiones agrícolas, afectando frutales, cereales, vegetales y ornamentales (Ma et al. 2007, Bhat et al. 2010, Wright et al. 2005, Kim et al. 2007, Zhang et al. 2014, Pu et al. 2012). Esta enfermedad se puede observar desde la siembra de los cultivos hasta la etapa de almacenamiento donde se registran las pérdidas económicas más importantes debido a que la descomposición de algunos vegetales puede propagar las bacterias rápidamente por todo el lugar de almacenaje (Bhat et al. 2010).

La mayoría de investigaciones sobre la BSR se han centrado en papa (*Solanum tuberosum*) (Charkowski et al. 2014), por ser uno de los cultivos más importantes a nivel mundial (Singh y Kaur 2016). Diferentes especies de *Pectobacterium* y *Dickeya* se han mencionado como causantes de la pudrición blanda o pata negra como es llamada popularmente a esta enfermedad (Pitman et al. 2008, Ngadze et al. 2010, van der Merwe et al. 2010, Waleron et al. 2015). La sintomatología se ha reportado también en diversas familias como *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Brassicaceae*, *Alliaceae* y *Araceae* causando daños (Ma et al. 2007).

En Costa Rica, Herrera y Gonzalez (1977) analizaron el desarrollo y combate de *E. carotovorum* subsp. *atroseptica* (hoy *Pectobacterium atrosepticum* (Gardan et al. 2003)) en tubérculos de papa, mientras que, en el año 1979, se identificó *E. chrysanthemi* en el cultivo de piña como causante de BSR (Chinchilla et al. 1979). Sin embargo, existe muy poca o nula información actualizada en cuanto a la



distribución, hospederos y diversidad genética de las bacterias que causan la podredumbre blanda en Costa Rica. El objetivo de este estudio fue determinar cuáles bacterias de la colección de bacterias del CIBCM aisladas de lesiones en hortalizas de las zonas de Cartago y Alajuela en Costa Rica son, las causantes de pudrición blanda mediante pruebas bioquímicas, de patogenicidad y análisis moleculares.

## ANTECEDENTES

La podredumbre blanda bacteriana en plantas es un daño provocado por bacterias fitopatógenas pectinólíticas (Charkowski 2018). Dentro de los géneros reportados causantes de esta enfermedad se encuentran *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Xanthomonas*, *Clostridium* y *Erwinia*, (Nguyen-the y Carlin 1994). Sin embargo, en el caso de *Bacillus*, *Clostridium* y *Xanthomonas*, Liao (2005) menciona que son considerados como patógenos secundarios que invaden las plantas tras el ataque de microorganismos como *Pseudomonas* o *Erwinia*.

Inicialmente, al igual que muchos géneros bacterianos, las enterobacterias que causaban podredumbre blanda se describieron como *Bacillus* (Jones 1900), pero poco tiempo después se reclasificaron dentro del género de *Erwinia* donde se mantuvieron por varias décadas (Winslow et al. 1917). Años más tarde, (Waldee 1945) propuso trasladar a *E. carotovorum* y otras especies causantes de pudrición blanda, al género *Pectobacterium*, el cual permitía reflejar diferencias en la fisiología de las especies.

*Pectobacterium* fue un género poco aceptado por la comunidad científica y no fue hasta 52 años después de ser propuesto, cuando extensos trabajos filogenéticos basados en el gen 16S rRNA, comprobaron que muchas de las especies anteriormente incluidas en *Erwinia* formaban grupos monofiléticos distintos, incluido *Pectobacterium* (Hauben et al. 1998, Kwon et al. 1997), dentro del cual se ubicaba *P. chrysanthemi*, la cual posteriormente fue reclasificada en un nuevo género llamado *Dickeya* (Gardan 2005).

Géneros como *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea* entre otros, también pueden causar pudrición blanda en algunos cultivos (Liao 2005, Schroeder et al. 2009, Coutinho y Venter 2009, Fan et al. 2016). La especie *Klebsiella variicola*, se ha

encontrado en cultivos como banano, zanahoria y papaya (Hossain et al. 2018, Fan et al. 2016, Chandrashekar et al. 2018). En el caso de *Pseudomonas*, las especies *P. marginalis*, *P. viridiflava* y *P. gladioli* pv. *alliicola* se han descrito como causantes de la enfermedad en el cultivo de cebolla (Wright et al. 1993, Wright y Grant 1998), *P. marginalis* en papa (Li et al. 2007) y *Pseudomonas fluorescens* en tomate (Malathrakis y Goumas 1987). El género *Enterobacter*, específicamente la especie *Enterobacter cloacae*, se describió como un agente causal de la pudrición blanda en fruta del dragón (Masyahit et al. 2009) y en bulbos de cebolla (Schroeder et al. 2009). Por otro lado, la especie *Pantoea ananatis* se encontró en melocotón causando este tipo de enfermedad (Liao et al. 2015). Sin embargo, debido a una menor agresividad de infección o sintomatología con respecto a *Pectobacterium* y *Dickeya*, estos géneros no han sido objeto de estudio de investigaciones relacionadas a esta enfermedad (Toth y Birch 2005, Charkowski et al. 2012).

Actualmente *Pectobacterium* y *Dickeya* son los géneros mayormente estudiados en cuanto a la BSR en los cultivos y se consideran como los principales causantes de la enfermedad (Charkowski 2018). Debido a esto es, que en conjunto, se les conoce como Enterobacteriaceas de podredumbre blanda (SRE por sus siglas en inglés) (Czajkowski et al. 2015). Ambos géneros son bacilos gram-negativos, anaerobios facultativos, catalasa positivos, oxidasa negativos, poseen flagelos peritricos, no forman esporas y pueden ser cultivables. Tienen estrategias de virulencia similares, algunas de sus especies comparten hospederos y es posible realizar aislamientos de éstas a partir de muestras ambientales (Ma et al. 2007, Charkowski et al. 2012).

La mayor parte de las investigaciones sobre las SRE se han centrado en papa (*Solanum tuberosum*), donde la pudrición blanda, llamada comúnmente como pata negra, se puede observar en tubérculos y en la base del tallo como una degradación del tejido de color marrón oscuro. En este cultivo, (Pitman et al. 2008, 2010), van der Merwe et al. (2010) y Moleleki et al. (2013) determinaron que *P. carotovorum* subsp.

*carotovorum*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* y *P. wasabiae*, podían causar BSR, y Ngadze et al. (2010) encontraron que *Dickeya dadantii* podía provocar la misma enfermedad. Charkowski et al. (2014) elaboraron una revisión bibliográfica sobre la detección, caracterización y diferenciación de especies de *Pectobacterium* y *Dickeya* causantes de pudrición blanda en plantas y tubérculos de papa. Estos autores mencionan que *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *rasiliense*, *P. wasabiae* y varias especies de *Dickeya*, incluyendo *D. dianthicola*, *D. dadantii*, *D. zea* y *D. solani* son responsables de causar la pata negra de la planta de papa así como la pudrición blanda de los tubérculos en el campo y la postcosecha en todo el mundo.

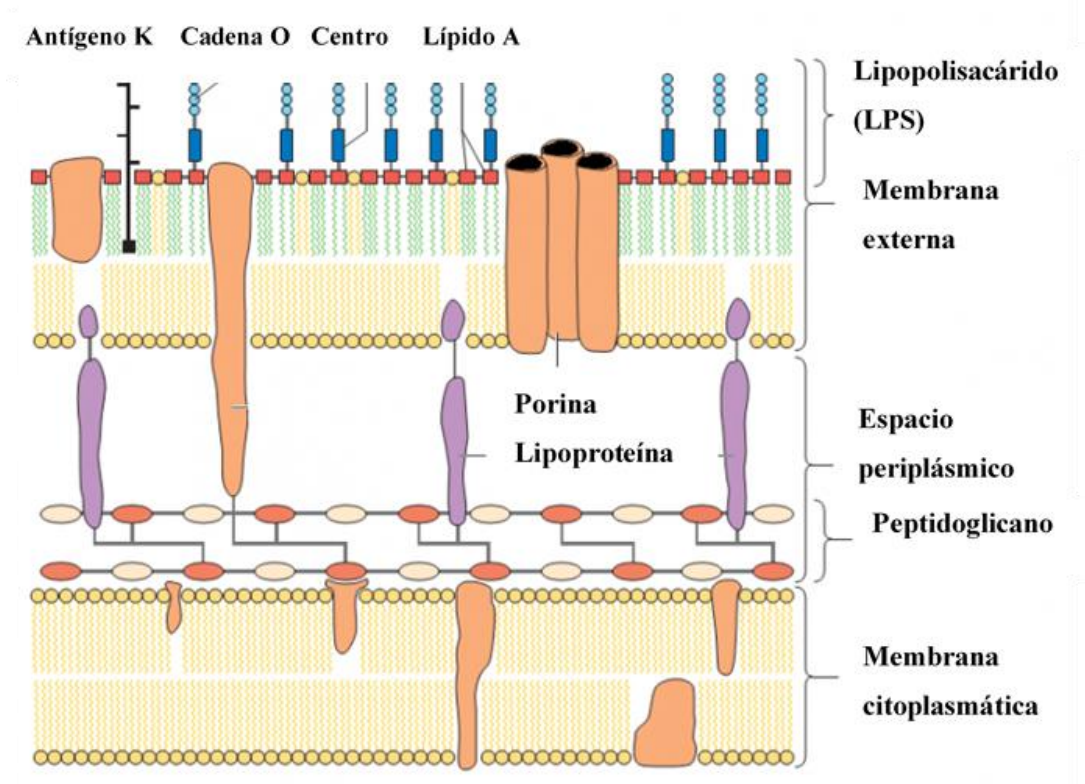
A nivel mundial, en otros cultivos se han encontrado casos de BSR con especies como *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* en remolacha azucarera, la col y el calabacín (Waleron et al. 2015), *P. betavasculorum* en pepino, la calabaza, el maíz, los frijoles y la berenjena (Nedaienia y Fassihiani 2011), *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* se ha asociado principalmente a la achicoria, pero puede causar enfermedad en apio, puerro, remolacha azucarera, alcachofas y repollo chino (Waleron et al. 2014), *D. dadantii* en pastoras (*Euphorbia pulcherrima* var. Wonderful) (Wei et al. 2018) y *D. zea* en banano y arroz (Zhang et al. 2014, Pu et al. 2012).

El factor principal de patogenicidad de las SRE corresponde a la diversidad de enzimas pectinolíticas (pectinasas) que pueden sintetizar (Charkowski et al. 2014). Como su nombre lo indica, estas enzimas metabolizan la pectina presente en la pared de las células vegetales, la cual confiere rigidez a las plantas, es por esta razón que los tejidos afectados por SRE se tornan blandos (Sharma et al. 2013).

Las pectinasas se clasifican según su modo de secreción en extracelulares e intracelulares. Las enzimas extracelulares convierten las moléculas grandes de los sustratos en moléculas más pequeñas que luego pueden ingresar a las células

bacterianas. Por otro lado una enzima intracelular opera en la membrana celular (Shet et al. 2018). También las pectinasas pueden ser clasificadas según el sitio de escisión o modo de acción en 3 grandes grupos: hidrolasas, liasas y pectina esterasa. La pectina esterasa cataliza la desesterificación del grupo metoxilo de la pectina, por lo que se forma ácido péctico, las hidrolasas (poligalacturonasas y polimetilgalacturonasas) catalizan la escisión hidrolítica del enlace  $\alpha$ -1,4-glicosídico en ácido péctico y pectina, mientras que el grupo de liasas cataliza la escisión del enlace  $\alpha$ -1,4-glicosídico en ácido péctico y pectina, por reacción de eliminación trans, y forma galacturonatos insaturados y galacturonatos de metilo, respectivamente (Sharma et al. 2013, Garg et al. 2016). Por otro lado, Ruiz et al. (2017) en una clasificación más reciente menciona que las pectinasas se pueden dividir según criterios de lugar de escisión de los enlaces glucósidos en enzimas despolimerizantes y desesterificantes, por el mecanismo de reacción endo y exo y por el grado de esterificación en hidrolasas, estererasas, glucosidasas, liasas y oxidasas.

La ruta metabólica de la degradación de la pectina por parte de las bacterias pectinolíticas inicia con la despolimerización y desesterificación del ácido galacturónico (componente principal de lamela media en las plantas), por enzimas extracelulares secretadas por las bacterias como estererasas, poligalacturonasas y pectato liasas (Payasi et al. 2009). Lo anterior da como resultado cadenas de oligosacáridos que son transportados de forma pasiva al espacio periplásmico (figura 1) a través de porinas de oligosacáridos específicos de aniones de la familia KdgM y KdgN (Blot et al. 2002), donde corriente abajo, la acción de pectinasas digiere aún más los sustratos en di y trigalacturónidos. Estos oligogalacturonidos son llevados posteriormente al citoplasma a través de los sistemas transportadores TogMNAB y TogT (Hugouvieux-Cotte-Pattat y Reverchon 2001). Dentro de la célula bacteriana, los oligogalacturonidos se degradan finalmente en piruvato y 3-fosfofliceraldehído que entran al ciclo del ácido cítrico y son convertidos en energía (Abbott y Boraston 2008).



**Figura 1.** Estructura de la pared celular de una bacteria gram negativa (modificado de Kayser et al. 2005).

La sintomatología provocada por las SRE es muy similar en todos los hospederos. Inicialmente, la BSR se presenta como una lesión acuosa pequeña, que aumenta de tamaño rápidamente, la superficie se observa blanda y decolorada, mientras que el interior se torna suave, viscoso y poco pálido, con presencia de un fuerte olor (Bhat et al. 2010). Además, se percibe marchitamiento y decaimiento en la parte aérea de las plantas (Ma et al. 2007). En el caso de tomate, las plantas se atrofan y las hojas inferiores se tornan pálidas y amarillentas, lo cual progresa hacia las hojas superiores, y finalmente las plantas se marchitan y mueren. Por otro lado, en el interior de las plantas es posible observar lesiones marrones longitudinales, pudrición blanda del tallo, descomposición de la médula, tallos huecos y decoloración del tejido vascular (Fiori et al. 2005). En papa, las plantas presentan marchitamiento y la lesión en el tallo

se observa como pudrición blanda de color negro. En el caso de los tubérculos, en su interior se observa descomposición acuosa del tejido, con fuerte olor y coloración marrón, la región superficial del tejido se torna suave de color marrón y con presencia de exudados (Laurila et al. 2010, van der Merwe et al. 2010, Czajkowski et al. 2015).

A pesar de que la podredumbre blanda se manifiesta de forma similar en la mayoría de los cultivos, en plantas donde aún no se ha descrito la enfermedad, no se puede asociar exclusivamente a las SRE, ya que otras especies son capaces de causar la misma sintomatología (Wakil y Oyinlola 2011). El aislamiento de determinado organismo a partir de las lesiones no es un indicativo específico de que éste sea el agente causal de la enfermedad, ya que es posible que en lesiones de las plantas habiten microorganismos saprófitos oportunistas que hayan invadido secundariamente el tejido dañado (Arauz 2011).

Para determinar la capacidad fitopatogénica de una bacteria se utiliza comúnmente la técnica de reacción hipersensible (RH) en plantas indicadoras, especialmente *Nicotiana tabacum* (Bauer et al. 1994, Zurbriggen et al. 2010) y en algunos casos se ha implementado en hojas chile dulce (*Capsicum annuum*) (Ritchie 2000). La RH fue empleada por primera vez por Klement en 1963 como una técnica para identificar especies de *Pseudomonas* fitopatógenas y consiste en la inoculación del microorganismo en el envés de las hojas de plantas no hospederas. Esta inoculación permite el ingreso directo de las bacterias en los tejidos internos de la planta, provocando un reconocimiento por parte de esta, lo que desencadena una serie de interacciones entre la planta y el patógeno con el objetivo de restringir el avance de aquellos potencialmente peligrosos (Jones y Dangl 2006, Camagna y Takemoto 2018).

La interacción entre una planta y un organismo infeccioso está regulada a nivel molecular. La primera interacción se da en el apoplasto y esta mediada por el

reconocimiento de moléculas estructurales conservadas de los patógenos llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP por sus siglas en inglés), este reconocimiento se da por receptores de reconocimiento de patrones (PPR, por sus siglas en inglés) que están ubicados en la membrana de las plantas (Janeway 1989, Zipfel 2009, Dodds y Rathjen 2010). Algunos ejemplos de PAMPs son la flagelina bacteriana, el factor de elongación y péptidos sustitutos, entre otros (Gupta et al. 2015), los cuales al ser reconocidos por los PPR activan la primera línea de defensa en las plantas conocida como inmunidad activada por PAMPs (PTI, por sus siglas en inglés). Para evadir la PTI, los patógenos pueden liberar proteínas efectoras a través de sistemas de secreción, como genes de avirulencia, dentro de la célula vegetal para suprimir las defensas PTI e invadir otras células (Boyd et al. 2013). Sin embargo, cuando esto ocurre, las plantas pueden reconocer estas proteínas efectoras mediante proteínas de resistencia y desencadenar una segunda línea de defensa llamada inmunidad activada por el efector (ETI, por sus siglas en inglés) (Jones y Dangl 2006). La ETI es una respuesta más rápida y fuerte que la PTI, y se puede manifestar como una reacción hipersensible (RH), la cual consiste en la muerte o colapso de las células vegetales cercanas al punto donde se dio el reconocimiento de los patógenos, con el fin de restringir el avance de estos. Esta RH se aprecia en las hojas de la planta como una clorosis y necrosis delimitada por los haces vasculares o nervaduras (Bellincampi et al. 2014).

Para determinar que un individuo específico corresponde al agente causal de una enfermedad, es necesario establecer una relación de causa y efecto entre ambos, para lo cual se utiliza un procedimiento denominado “Comprobación de patogenicidad” o “Comprobación de los postulados de Koch”. Estas pruebas consisten en cuatro pasos: 1) primero determinar que existe una asociación constante entre el microorganismo, del cual se desea constatar la patogenicidad, 2) aislarlo en un cultivo puro y estudiar sus características fenotípicas y moleculares, 3) realizar una inoculación en un



hospedero sano con el propósito de comprobar la reproducibilidad de los síntomas y 4) reaislar el mismo individuo que fue inoculado (Volcy 2008, Byrd y Segre 2016).

Las técnicas de identificación, detección y diferenciación más antiguas dependían del aislamiento en medios de cultivo semi-selectivos seguidos de análisis serológicos y bioquímicos, bioensayos y observaciones microscópicas, incluida la tinción de Gram, lo cual requería de células bacterianas viables (Paulin 2000, Bereswill et al. 1998, Lányi 1988). Los medios selectivos para bacterias pectinolíticas por lo general se basan en cristal violeta para suprimir el crecimiento de bacterias gram-positivas y uso de polipectato como fuente de carbono.

El medio de cultivo a base de cristal violeta y pectato (CVP) (Cuppels y Kelman 1974) es el medio semiselectivo más utilizado en el aislamiento *Pectobacterium* y *Dickeya*, sin embargo, se ha visto que otras bacterias con la capacidad de producir enzimas pectinolíticas como *Pseudomonas* y *Flavobacterium* pueden crecer en el CVP (Charkowski 2007). Este medio contiene  $\text{NaNO}_3$ , polipectato de sodio y cristal violeta, también es posible agregar  $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  para suprimir el crecimiento de bacterias no deseadas presentes en el suelo o las muestras. En el CVP, la presencia de bacterias pectinolíticas se puede apreciar como una cavidad en la superficie del medio debido a la metabolización de la pectina por parte de las bacterias (Hélias et al. 2012). Este mismo autor menciona que también es posible utilizar un medio líquido enriquecido con pectina para el aislamiento de SRE como paso previo a el medio CVP. Este medio se compone de  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaO}_5$  y una fuente de pectina como polipectato de sodio.

Con la aparición de nuevas tecnologías se introdujeron técnicas moleculares basadas en la detección de ácidos nucleicos lo cual presentaban una alta especificidad y reproducibilidad, además de que no requerían de células vivas para llevarse a cabo (Fessehaie et al. 2002, Hyman et al. 2000, Pritchard et al. 2013, Humphris et al. 2015).

Dentro de las técnicas moleculares existentes se encuentran la amplificación de secuencias de ADN mediante reacciones de PCR ya sea multiplex, con imprimadores específicos, en tiempo real, entre otras (Czajkowski et al. 2015).

Una de las técnicas más utilizadas en la identificación y estudios taxonómicos de especies bacterianas es el análisis de la secuencia del gen 16S ARN ribosomal (Brosius et al. 1978, Weisburg et al. 1991, Kwon et al. 1997, Nabhan et al. 2012, Zhang et al. 2016). Dentro de las razones por las que este gen es ampliamente utilizado en análisis filogenéticos incluye que está presente en todas las bacterias, incluso pueden existir múltiples secuencias de este gen en el genoma de una bacteria, es una región muy conservada, ya que a lo largo del tiempo el gen 16s ribosomal no ha cambiado, su tamaño es relativamente grande lo que lo hace apto para análisis bioinformáticos (Patel 2001, Janda y Abbott 2007).

En cuanto a la distribución de las SRE, existen informes en diferentes partes del mundo (Czajkowski et al. 2015). En Sudáfrica y Zimbabwe, (Ngadze et al. 2012), en Nueva Zelanda, (Pitman et al. 2008, 2010, Panda et al. 2012), Polonia (Waleron et al. 2015, Sławiak et al. 2009), al sur de África en Zimbabwe (Ngadze et al. 2012), Sudáfrica (Moleleki et al. 2013), Países Bajos (Nunes Leite et al. 2014), Israel (Ma et al. 2007), Canadá (De Boer et al. 2012), Estados Unidos (Ma et al. 2018, McNally et al. 2017, Ma et al. 2007) existen gran cantidad de informes de BSR en el cultivo de papa. En ornamentales, se han realizado reportes de BSR en Taiwan afectando Cala de flor blanca, (Lee et al. 2002), orquídeas en Estados Unidos (Cating y Palmateer 2010, Cating et al. 2009). También en banano en China (Zhang et al. 2014, Lin et al. 2010), col en Malasia (Nazerian et al. 2011), sábila en la India (Mandal y Maiti 2005).

En América Latina, existen informes en Argentina (Alippi y López 2009), Brasil (Alvarado et al. 2011), México (Valenzuela-Soto et al. 2015, Luna-Rodríguez et al.

2009) y en Costa Rica (Herrera y Gonzalez 1977, Chinchilla et al. 1979, Rivera-Coto y Corrales-Moreira 2007, Salazar-Casasa et al. 2007), sin embargo, en nuestro país existe poca información actualizada en cuanto a pudrición blanda bacteriana en hortalizas. Los casos de pudrición blanda en general han sido asociados a bacterias como *Pseudomonas* y *Erwinia* y hongos como *Sclerotinia*, *Phytophthora* y los diagnósticos en el casos de la BSR se han realizado mediante análisis morfológicos (Aguilar-Ulloa et al. 2016, Bolaños-Herrera 2001, Granados Montero et al. 2013). Es por esta razón que existe la necesidad de realizar una búsqueda de bacterias pectinolíticas causantes de pudrición blanda en hortalizas en Costa Rica, específicamente en las zonas hortícolas de Cartago y Alajuela, basado en análisis moleculares, enzimáticos y pruebas de patogenicidad que permitan conocer con exactitud cuáles son los agentes causales de la BSR.

## **OBJETIVOS:**

### **General**

Identificar mediante análisis moleculares, enzimáticos y técnicas de patogenicidad la presencia de bacterias fitopatógenas agentes causales de pudrición blanda en hortalizas de la zona de Cartago y Alajuela.

### **Específicos**

1. Determinar la patogenicidad de cepas bacterianas aisladas de hortalizas con síntomas de pudrición blanda realizando la prueba de reacción hipersensible y los postulados de Koch.
2. Identificar mediante PCR y secuenciación de gen 16S ribosomal las bacterias pectinolíticas que correspondan a los agentes causales de las lesiones, para su respectiva clasificación taxonómica.
3. Visualizar en geles de acrilamida las enzimas producidas por bacterias pectinolíticas que están involucradas en los procesos de degradación de la pectina en las plantas, para aquellas bacterias que correspondan a los agentes causales de las lesiones.

## METODOLOGÍA

El aislamiento y cultivo bacteriano, pruebas moleculares, patogenicidad y proteicas se desarrollaron en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM). Se utilizó el invernadero del laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) para el cultivo de las plantas empleadas en este estudio.

### 1. Material experimental

#### 1.1. Recolección de las muestras

Se visitaron diferentes fincas hortícolas de Cartago y Alajuela con el objetivo de coleccionar plantas o cultivos con síntomas de pudrición blanda. En la provincia de Cartago, en la zona de Oreamuno se tomaron muestras de frutos de chile dulce (*Capcicum annum*), hojas y bulbos de cebolla (*Allium cepa*), plantas de zucchini (*Cucurbita pepo*) y frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*). En la zona de Juan Viñas se coleccionaron plantas de tomate y en Tierra Blanca de papa (*Solanum tuberosum*). En la Garita de Alajuela, se tomaron muestras de frutos de chile dulce (figura 2). Una vez coleccionadas las muestras, se almacenaron en bolsas plásticas dentro de hieleras y se trasladaron al laboratorio del Área de Microbiología Ambiental del Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular para realizar los aislamientos bacterianos.



**Figura 2.** Sintomatología de las plantas hospederas de los aislamientos bacterianos. A) tallo de zucchini (*C. pepo*), B) frutos de tomate (*S. lycopersicum*), C) tallo de papa (*S. tuberosum*) D) hojas de cebolla (*A. cepa*), E) frutos de chile dulce (*C. annuum*).

### 1.2. Aislamiento bacteriano

Las muestras se lavaron superficialmente con agua para remover restos de suelo, se cortaron trozos de tejido de las zonas de avances de las lesiones y se desinfectaron superficialmente mediante la inmersión en hipoclorito de sodio al 1% por 2 min, seguido de tres lavados con agua destilada estéril. Se prepararon tubos de ensayo con agua estéril, caldo nutritivo y medio líquido de pectina (polipectato de sodio 75%, de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10%,  $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5%, y de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10%), y para propiciar condiciones de anaerobiosis y favorecer el crecimiento de Enterobacterias, a los tubos con caldo nutritivo y medio líquido de pectina se les adicionó una capa de aceite mineral. Cada muestra se inoculó en cada uno de los tubos (agua estéril, caldo nutritivo y medio líquido de pectina). Los tubos con agua, se agitaron durante 5 min a 50 rpm para extraer las células bacterianas de los tejidos vegetales, posteriormente, utilizando un asa bacteriológica, se cultivó la suspensión bacteriana obtenida en placas con agar MacConkey (OXOID) y se incubaron 24 horas a 28 °C. Por otro lado, los trozos de tejido colocados en tubos con caldo nutritivo y medio líquido de pectina, se incubaron por 24 horas a 28 °C, posterior a este periodo, se cultivaron en placas con agar Macconkey.

Los morfotipos observados después del periodo de crecimiento se sembraron en placas de agar nutritivo (OXOID) hasta obtener cultivos axénicos. Posteriormente cada cepa obtenida se congeló a -70 °C en crioviales con una mezcla de 750 ul de caldo nutritivo y 250 ul glicerol al 80%.

## **2. Selección de los aislamientos**

Se realizó una selección de los aislamientos basado en dos características, reacción de hipersensibilidad en una planta de chile dulce (*C. annuum*) la cual diferencia entre bacterias fitopatógenas de no fitopatógenas y la capacidad pectinolítica mediante el crecimiento en el medio de cristal violeta y pectato (CVP).

### **2.1. Prueba de reacción de hipersensibilidad (RH)**

La metodología empleada en esta prueba se basó en los protocolos utilizados por Klement (1963), Bonas et al. (1991) y Umesha et al. (2008). Para pruebas de RH se utiliza como planta indicadora una planta no hospedera de las bacterias, que por lo general es tabaco (*Nicotiana tabacum*), sin embargo, en el momento del ensayo no fue posible encontrar estas plantas, por lo que se utilizó como planta indicadora chile dulce (*Capsicum annuum*) utilizada por Ritchie (2000) en sus ensayos de patogenicidad.

Se trasplantaron plántulas de chile dulce de almácigo a potes de dos litros de capacidad, las mismas se mantuvieron en invernadero hasta que alcanzaran un porte adecuado para la prueba de RH, esto, aproximadamente cuando la planta tenía entre 6 a 8 hojas verdaderas completamente expandidas.

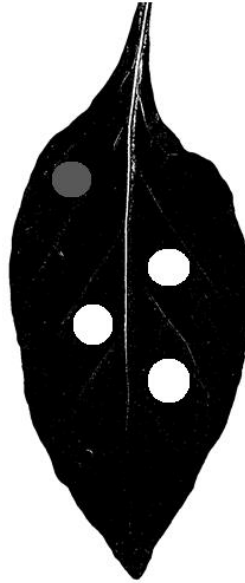
Para el proceso de preparación de la suspensión bacteriana para inocular las plantas, las cepas se cultivaron en medio de Agar nutritivo (OXOID) y se incubaron a 30° C

por 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se prepararon suspensiones bacterianas en agua estéril a una concentración de  $9 \times 10^8$  UFC (unidades formadoras de colonias), comparada con un patrón de turbidez Macfarland número 3.

La evaluación de la RH se dio de forma individual para cada cepa. Cada cepa fue inoculada en un total de 5 hojas de chile, en cada una de estas hojas se realizaron 4 puntos de inoculación, 3 correspondían a la cepa bacteriana y el restante a agua estéril como control negativo (figura 3). Se inoculó aproximadamente 50 uL por punto por medio de presión en el envés de las hojas, utilizando una jeringa sin aguja.

Las plantas inoculadas se mantuvieron en el invernadero donde la luz y temperatura eran variables según las condiciones ambientales exteriores. Se realizaron evaluaciones durante 7 días consecutivos, la primera evaluación se realizó 24 horas después de la inoculación y se observó posible desarrollo de clorosis o necrosis alrededor del punto inoculado, lo cual es un indicativo de un resultado positivo para la reacción hipersensible. En el caso de presentarse la RH en la hoja después de la inoculación la bacteria, se consideró como fitopatógena, de lo contrario se descartó para las pruebas posteriores. Se utilizó una escala según el grado en que se presentó la RH como se muestra en el cuadro 1.





**Figura 3.** Distribución de los puntos inoculados para la reacción hipersensible. Región gris corresponde a el punto inoculado con agua estéril. Regiones blancas corresponden a los puntos inoculados con bacteria.

**Cuadro 1.** Escala utilizada para la evaluación de la reacción hipersensible en las plantas de chile dulce (*Capsicum annuum*).

<b>Grado</b>	<b>Efecto en la hoja</b>	<b>RH</b>
0	No hubo efecto	-
1	Clorosis baja	+
2	Clorosis alta	+
3	Necrosis	+

## **2.2. Actividad pectinolítica en medio cristal violeta y pectato (CVP)**

La preparación del medio de cristal violeta y pectato se realizó mediante la metodología descrita por Schaad et al. (2001), se utilizó como fuente de pectina ácido polianhidrogalacturónico, polipectato de sodio 75% (Sigma-Aldrich Ref. P3850), la preparación del medio se realizó en dos etapas, la primera etapa consistió en agregar a 100 mL de agua destilada 1,35 mL de NaOH 1M y 3 g de pectina, el agua se precalentó previo a agregar los reactivos para disolver la pectina. La segunda etapa consistió en una disolución en agua con un volumen final de 50 mL, a la cual se agregó 0,9 mL de CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 10%, 0,15 mL de SDS 10%, 0,3 g de NaNO<sub>3</sub> y 0,45 g de agar bacteriológico. Los reactivos se adicionaron según el orden mencionado anteriormente con agitación continua, una vez disueltas ambas soluciones, se mezclaron, y se esterilizaron en un autoclave a 120 °C, y una presión de 103 kPa por 20 min. Posteriormente el contenido se vertió en placas de Petri plásticas de 5 cm de diámetro agregando de la mezcla hasta completar un grosor de aproximadamente de 0,5 cm. Las placas se dejaron solidificar en una cámara de flujo laminar por 24 horas y se almacenaron a 4 °C.

Para esta prueba solo se utilizaron las bacterias que mostraron resultado positivo en la reacción hipersensible. Las bacterias seleccionadas se cultivaron en agar nutritivo (OXOID) y se incubaron a 30 °C por 24 horas. Se prepararon suspensiones bacterianas en agua estéril, se inoculó 1 µL de la suspensión bacteriana en las placas con CVP y se incubaron a 30 °C. Se evaluó la presencia o ausencia de cavidades en los puntos donde fueron inoculados los aislamientos, lo cual corresponde a la capacidad de las bacterias de metabolizar la pectina presente en el medio.

## **3. Postulados de Koch para aislamientos seleccionados**

La verificación de los postulados de Koch se realizó para aquellos aislamientos que causaron la reacción hipersensible en las plantas de chile dulce y provocaron cavidad

en el medio de CVP. Este análisis consistió en la inoculación de las bacterias en hospederos sanos con el objetivo de verificar si existe una relación entre los diferentes aislamientos con la pudrición blanda en las plantas.

Para la verificación de los postulados de Koch se realizaron aislamientos bacterianos de las nuevas lesiones de los frutos inoculados según el protocolo desarrollado por French y Hebert (1980). En este caso, el aislamiento se realizó tomando un trozo de la zona de avance de la lesión que se colocó en un tubo de ensayo con agua estéril. Los tubos de ensayo fueron colocados en agitación por 5 minutos y posteriormente se cultivó con ayuda de un asa bacteriológica en los medios de agar nutritivo y agar MacConkey. Para comprobar que el organismo inoculado correspondiera con el recuperado se realizó la comparación molecular y morfológica de los aislamientos, para lo cual se realizó una tinción de Gram y visualización de los cultivos en placas de Petri con agar nutritivo. Además, las cepas inoculadas y las recuperadas se compararon mediante la amplificación de la región intergénica 16S-23S del gen rARN (ITS) utilizando los primers G1 (5'-GAAGTCGTAACAAAGG-3') L1 (5'-CAAGGCATCCACCGT-3') (Jensen et al. 1993), esta amplificación permite diferenciar entre especies de bacterias mediante el patrón de bandeo resultante. Además, se realizó un análisis UPGMA (Método de agrupamiento de pares no ponderados con media aritmética) para comparar la similitud entre las cepas inoculadas y reaisladas.

### **3.1. Frutos de chile dulce**

Para la inoculación, las cepas se cultivaron en medio de agar nutritivo (OXOID) y se incubaron a 30° C por 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se prepararon suspensiones bacterianas a una concentración de  $9 \times 10^8$  UFC, comparada con el patrón de turbidez Macfarland número 3. Se utilizaron frutos sanos, los cuales fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 3 minutos

dentro de la cámara de flujo laminar y posteriormente se removió el exceso con 3 lavados con agua destilada estéril y se dejaron secar. Se realizaron 4 hoyos en el pericarpio del fruto a una profundidad aproximada de 5 mm y se inocularon 30 uL de suspensión bacteriana en dos o tres de los hoyos creados en el fruto y los hoyos restantes se inocularon con el mismo volumen de agua estéril. Los frutos inoculados se colocaron en cámaras de alta humedad (cajas plásticas con toallas humedecidas con agua estéril), se incubaron a 30 °C realizando evaluaciones diarias.

### **3.2. Plantas de papa**

Se sembró semilla de papa (tubérculos con brotación) en bandejas de 72 celdas con suelo estéril. A los 15 días de emergidas las plantas (brotes con 10 cm de altura aproximadamente), se trasladaron al invernadero del Centro de Investigaciones Agronómicas. Se trasplantaron a potes de 2 litros a media capacidad de suelo y se realizó una inoculación de 5 mL de una suspensión bacteriana a una concentración de  $9 \times 10^8$  UFC, comparada con un patrón de turbidez Macfarland número 3. La inoculación fue realizada en el adobe formado por la celda de la bandeja. Después de la inoculación se rellenó con suelo los potes hasta máxima capacidad. Los potes con las plantas se colocaron dentro de una caja plástica con el fin de aumentar la humedad relativa. Para esta prueba se utilizó en total 3 plantas sembradas en 3 potes distintos. Dos de los potes se inocularon con la bacteria y un pote con agua estéril como control negativo. Después de la inoculación las plantas se mantuvieron en invernadero bajo condiciones de temperatura no controladas, además las plantas fueron colocadas dentro de una caja plástica transparente para aumentar la humedad relativa, esto con el objetivo de mejorar las condiciones requeridas para la infección por parte de las bacterias.

### **3.3. Cebolla**

Se utilizaron bulbos maduros, los cuales se indujeron bajo condiciones de alta humedad y temperatura para el desarrollo de hojas y raíces, ocurrido esto, fueron plantados en potes de 200 mL con suelo. Cuando las nuevas plantas presentaron entre 4 a 5 hojas, se inocularon con una suspensión bacteriana a una concentración de  $10 \times 10^8$  UFC la cual fue comparada con el patrón Macfarland número 3. Se utilizaron dos métodos de inoculación, el primer método consistió en agregar en el suelo donde fue sembrado el bulbo, 5 mL de la suspensión bacteriana. El segundo método consistió en inocular 5 mL de la suspensión bacteriana entre la base de las hojas y el bulbo. Después de la inoculación, las plantas se llevaron a el invernadero (condiciones de temperatura no controladas), las mismas se colocaron dentro de bolsas plásticas transparentes para aumentar la humedad relativa.

## **4. Identificación molecular de los aislamientos**

La identificación molecular se realizó solo para aquellas cepas consideradas agentes causales de las lesiones (postulados de Koch positivos)

### **4.1. Extracción de ADN**

Las cepas se cultivaron en agar nutritivo (OXOID) a  $30^\circ\text{C}$  durante 24 horas. De este cultivo se tomó una colonia y se realizó extracción de ADN mediante un Kit comercial (Instagen de Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **4.2. Amplificación y secuenciación del gen 16S ribosomal**

Se amplificó el gen 16S ribosomal mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Se realizaron reacciones de 50  $\mu\text{L}$  compuestas por: 5  $\mu\text{L}$  de Dream taq buffer 10X con  $\text{MgCl}_2$  25mM, 5  $\mu\text{L}$  de DNTPs mix 2 mM (Thermo Fisher Scientific), 2.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM (Thermo Fisher Scientific), 0.2  $\mu\text{L}$  Taq polimerasa 5 U/ $\mu\text{L}$  (Thermo Fisher Scientific), 2  $\mu\text{L}$  de Primer 1 27F 2mM (5'-

AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 2  $\mu$ L de Primer 2 907R 2mM (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3') (Lane 1991), 2 uL de ADN y agua estéril. Se utilizó un termociclador Veriti 95 de Applied Biosystems. Las muestras se amplificaron mediante un ciclo con un paso inicial de desnaturalización de 4 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización 94°C por 30 segundos, amplificación a 55 °C por 30 segundos y elongación a 72°C por 1,5 minutos. Al finalizar se realizó un periodo de elongación por 7 minutos más. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1% visualizado en un trasiluminador (Uvitec Cambridge). Las muestras se enviaron a la compañía Macrogen, Inc. en Korea para su respectiva secuenciación, en la cual se utilizó la metodología Sanger.

#### **4.3. Edición de secuencias y análisis filogenéticos**

Las secuencias obtenidas se analizaron y editaron con el software Bioedit versión 7.0.5.3 (Hall 1999). Para identificar las cepas, se utilizó la herramienta BLAST del Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI) con el propósito de comparar los datos con las secuencias de referencias disponibles en la plataforma del NCBI.

Se realizó un alineamiento de las secuencias obtenidas con secuencias de referencia de cepas tipo obtenidas del GenBank (NCBI) utilizando el programa Mega 7 v7.0.26 (Kumar et al. 2016). Se utilizó Mr Bayes v3.2.5 (Ronquist et al. 2012) para generar el árbol filogenético basado en probabilidades Bayesianas. El árbol fue obtenido por la adición de 1000 réplicas. Para la visualización del árbol filogenético se utilizó Fig Tree v1.4.3. Los intervalos de confianza se calcularon en porcentaje.

## **5. Análisis enzimas pectinolíticas**

### **5.1. Caldo enzimático**

Se preparó medio líquido enriquecido con pectina el cual contenía 1.5 g de polipectato de sodio 75%, 10 ml de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10%, 5 ml de  $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5%, y 10 ml de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10%, con volumen final de 1 litro aforado con agua (Hélias et al. 2012). Se autoclavó a 120 °C bajo una presión de 103 kPa durante 20 min. El medio se transfirió a tubos cónicos estériles de 50 mL hasta su máxima capacidad los cuales se inocularon con las cepas bacterianas. Se incubaron a 30 °C hasta observar una turbidez equivalente a  $10^9$  UFC lo cual fue evaluado mediante la comparación con el estándar número 3 de Mcfarland. Una vez que el crecimiento bacteriano alcanzó esta turbidez, los tubos se centrifugaron 5000 rpm por 10 minutos para precipitar las células bacterianas y separar el sobrenadante.

### **5.2. Purificación de las enzimas**

El sobrenadante obtenido a partir del crecimiento bacteriano en caldo enzimático, se saturó con sulfato de amonio al 90 % agregando 31.77 g del reactivo (concentración del reactivo utilizado superior a 99%, solubilidad de 70.6 g/100mL) y agitando hasta no observar cristales del sulfato de amonio y posteriormente se centrifugó a 7500 rpm por 15 minutos o hasta observar la formación de un precipitado el cual, después de descartar el sobrenadante, se resuspendió en una solución de sulfato de amonio al 40% (Kashyap et al. 2000).

### **5.3. Visualización de las enzimas mediante SDS-Page**

Las proteínas presentes en el sobrenadante se visualizaron mediante el método SDS-PAGE (Laemmli 1970) en el cual las proteínas migrarán de acuerdo a su peso molecular. Para ello, se colocaron las muestras en el gel de poliacrilamida compuesto por acrilamida, TEMED, persulfato y buffer de corrida; se colocó en la cámara de electroforesis durante 1 hora a 100 voltios. Posteriormente, el gel se tiñó con azul de

Comassie durante 3 horas en agitación constante. Se comparó el perfil de proteínas según su peso molecular (kDa) entre las diferentes bacterias.

#### **5.4. Análisis complementario de enzimas pectinolíticas basado en el estudio del genoma de la cepa Ech2A.**

La secuenciación del genoma para la cepa Ech2A fue realizada como una herramienta complementaria al análisis de enzima pectinolíticas. Con esta técnica, se pretendió verificar si existen genes dentro del genoma relacionados con la metabolización de la pectina. Los resultados de secuenciación fueron generados mediante la técnica de secuenciación por síntesis en el equipo MiSeq Illumina del CIBCM.

Todos los análisis bioinformáticos se realizaron utilizando el cluster Kabre (CENAT, CONARE). Para el análisis de calidad de las secuencias se utilizó el módulo FastQC (v 0.11.7). Este análisis permitió obtener datos relacionados con la calidad de la secuencia, cantidad de secuencias (reads) y visualizar los “quality scores” de estos. Se utilizó el programa Trimmomatic v0.32 (USADELLAB.org) con los parámetros SLIDINGWINDOW:4:20 para eliminar las secuencias con baja calidad (phred score 20).

Para el ensamblaje del genoma se utilizaron los ensambladores Velvet (Zerbino 2010) y Spades (Bankevich et al. 2012). La evaluación de las estadísticas que se generaron en cada ensamblaje se llevó a cabo con el programa QUAST (Gurevich et al. 2013) y se escogió el ensamblaje que se consideró tenía la mejor solución al problema basado en el N50 (el “contig” más pequeño por encima del cual se representa el 50% del total), el promedio de la longitud de los contigs y scaffolds ensamblados.

La predicción de genes se realizó utilizando el programa PRODIGAL (Hyatt et al. 2010) y la herramienta HMMER (Finn et al. 2015) se utilizó para mapear los



resultados de las anotaciones proteicas obtenidas entre las bases de datos GO (Gene Ontology) y Pfam 31.0 (<https://pfam.xfam.org>). Para la identificación de proteínas relacionadas con la degradación de pectina ya reportadas en la literatura se utilizó el programa DIAMOND (Buchfink et al. 2015) y se comparó con las bases de datos COG y KEGG (Tatusov et al. 2000, Kanehisa y Goto 2000).

Se utilizó el programa Geneious prime (Kearse et al. 2012) para la visualización circular del genoma. Posteriormente, utilizando la herramienta en línea ANI calculator (Yoon et al. 2017), se comparó el porcentaje de identidad de los nucleótidos del genoma de la cepa Ech2A con genomas de referencia.

## **RESULTADOS**

### **1. Aislamiento bacteriano**

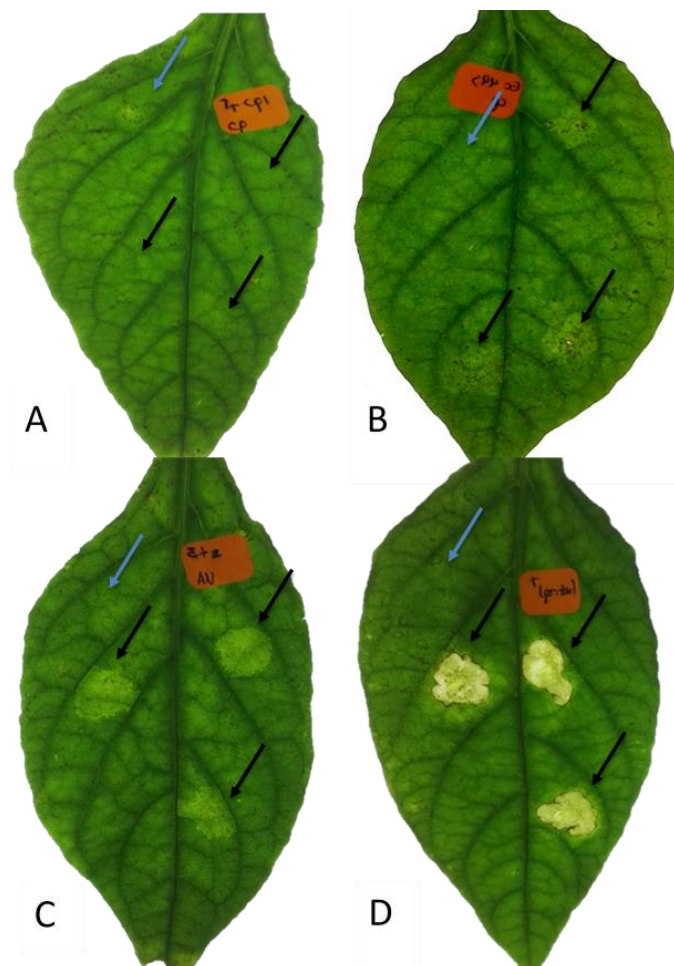
De los aislamientos bacterianos realizados con las plantas con síntomas de pudrición blanda (figura 2), se obtuvieron nueve cepas de frutos de chile dulce, uno de cebolla, seis de zucchini, seis de tomate (frutos y planta) y nueve provenientes de plantas de papa (cuadro 2).

**Cuadro 2.** Aislamientos bacterianos utilizados, aislados de hortalizas con distintos síntomas, provenientes de las zonas hortícolas de Cartago y Alajuela.

<b>Cepas</b>	<b>Hospedero</b>	<b>Órgano</b>	<b>Procedencia</b>
Ech2A	Chile dulce	Fruto	Cartago
6-M2	Cebolla	Seudotallo	Cartago
Zt_CP_1	Zucchini	Tallo	Cartago
Zt_CP_2	Zucchini	Tallo	Cartago
Tf_CP_1	Tomate	Fruto	Cartago
Tf_CP_2	Tomate	Fruto	Cartago
Tt_CP-1	Tomate	Tallo	Juan Viñas
Tt_CP-2	Tomate	Tallo	Juan Viñas
Tt_CP-3	Tomate	Tallo	Juan Viñas
Tt_CP-4	Tomate	Tallo	Juan Viñas
CF1	Chile	Fruto	Cartago
CF2	Chile	Fruto	Cartago
CF3	Chile	Fruto	Cartago
CF4	Chile	Fruto	Cartago
CF5	Chile	Fruto	Cartago
Zt1	Zucchini	Tallo	Cartago
Zt2	Zucchini	Tallo	Cartago
Zt3	Zucchini	Tallo	Cartago
Zt4	Zucchini	Tallo	Cartago
Pt1-A	Papa	Tallo	Tierra Blanca
Pt1-B	Papa	Tallo	Tierra Blanca
Pt4-1	Papa	Tallo	Tierra Blanca
Pt4-2	Papa	Tallo	Tierra Blanca
Pt4-3	Papa	Tallo	Tierra Blanca
Pt4-4	Papa	Tallo	Tierra Blanca
Pt4-5	Papa	Tallo	Tierra Blanca
Pt4-6	Papa	Tallo	Tierra Blanca
Pt4-7	Papa	Tallo	Tierra Blanca
CfspA	Chile	Fruto	Alajuela
Cfsaa	Chile	Fruto	Alajuela
Csfab	Chile	Fruto	Alajuela

## 2. Reacción hipersensible (RH):

La figura 4, es una representación de los 4 grados en que se presentó la RH en las hojas de chile dulce (*Capsicum annuum*). Se seleccionaron 4 imágenes para representar los grados en que se manifestó la reacción hipersensible en los puntos de la hoja inoculados con las cepas. Cada una de las imágenes muestra el efecto de una cepa distinta.



**Figura 4.** Reacción hipersensible en hojas de chile dulce (*Capsicum annuum*) inoculadas con diferentes cepas bacterianas. La imagen muestra los diferentes grados en los que se presentó la reacción hipersensible en los puntos inoculados de las hojas,

para las diferentes cepas. A) Grado 0 no hubo efecto, B) Grado 1, clorosis baja, C) Grado 2, clorosis alta y D) Grado 3, necrosis. Fechas celestes corresponden a punto inoculado con agua estéril, flechas negras son puntos inoculados con la cepa bacteriana.

El cuadro 3 muestra los resultados de la prueba de reacción hipersensible para cada cepa estudiada. Las cepas aisladas de zucchini (Zt\_CP\_1 y Zt3), tomate (Tf\_CP\_2, Tt\_CP\_1, Tt\_CP\_3, Tt\_CP\_4) y papa (Pt4-3, Pt4-4 y Pt4-5) no provocaron RH en las hojas de chile dulce.

De los aislamientos de zucchini que causaron RH positiva, Zt\_CP\_1 y Zt2 provocó clorosis alta en el punto donde fue inoculado, mientras que Zt1 y Zt4 provocaron clorosis baja. En el caso de los aislamientos de papa con RH positiva, Pt1-A, Pt1-B, Pt4-2, Pt4-6 y Pt4-7 provocaron clorosis alta, mientras que Pt4-1 provocó clorosis baja. Las cepas Tt\_CP\_2 y Tf\_CP\_1 provenientes de tomate provocaron clorosis alta y baja respectivamente

En el caso de los aislamientos de frutos de chile dulce, se observó que las cepas CF1, 2, 3, 4 y 5 provocaron una clorosis baja, las cepas Cfsaa y Ech2A clorosis alta y las cepas CfspA, Cfsab provocaron necrosis del punto inoculado.

**Cuadro 1.** Resultados para la prueba de reacción hipersensible en plantas de chile dulce.

<b>Cepas</b>	<b>Hospedero</b>	<b>Órgano</b>	<b>Grado RH</b>	<b>RH</b>
6-M2	Cebolla	Seudotallo	2	+
Zt_CP_1	Zucchini	Tallo	2	+
Zt_CP_2	Zucchini	Tallo	0	-
Tf_CP_1	Tomate	Fruto	1	+
Tf_CP_2	Tomate	Fruto	0	-
Tt_CP-1	Tomate	Tallo	0	-
Tt_CP-2	Tomate	Tallo	2	+
Tt_CP-3	Tomate	Tallo	0	-
Tt_CP-4	Tomate	Tallo	0	-
CF1	Chile	Fruto	1	+
CF2	Chile	Fruto	1	+
CF3	Chile	Fruto	1	+
CF4	Chile	Fruto	1	+
CF5	Chile	Fruto	1	+
Zt1	Zucchini	Tallo	1	+
Zt2	Zucchini	Tallo	2	+
Zt3	Zucchini	Tallo	0	-
Zt4	Zucchini	Tallo	1	+
Pt1-A	Papa	Tallo	2	+
Pt1-B	Papa	Tallo	2	+
Pt4-1	Papa	Tallo	1	+
Pt4-2	Papa	Tallo	2	+
Pt4-3	Papa	Tallo	0	-
Pt4-4	Papa	Tallo	0	-
Pt4-5	Papa	Tallo	0	-
Pt4-6	Papa	Tallo	2	+
Pt4-7	Papa	Tallo	2	+
CfspA	Chile	Fruto	3	+
Cfsaa	Chile	Fruto	2	+
Csfab	Chile	Fruto	3	+
Ech2A	Chile	Fruto	2	+

\* + reacción positiva en la planta  
 - no hubo reacción en la planta

\*\*0: no hubo efecto  
 1: clorosis baja  
 2: clorosis alta  
 3: Necrosis

### **3. Capacidad pectinolítica en medio cristal violeta y pectato (CVP).**

Esta prueba solo fue realizada con los aislamientos que mostraron RH positiva (Cuadro 3). Solo se tomó como pectinolíticas aquellas cepas que lograron causar la cavidad en el medio.

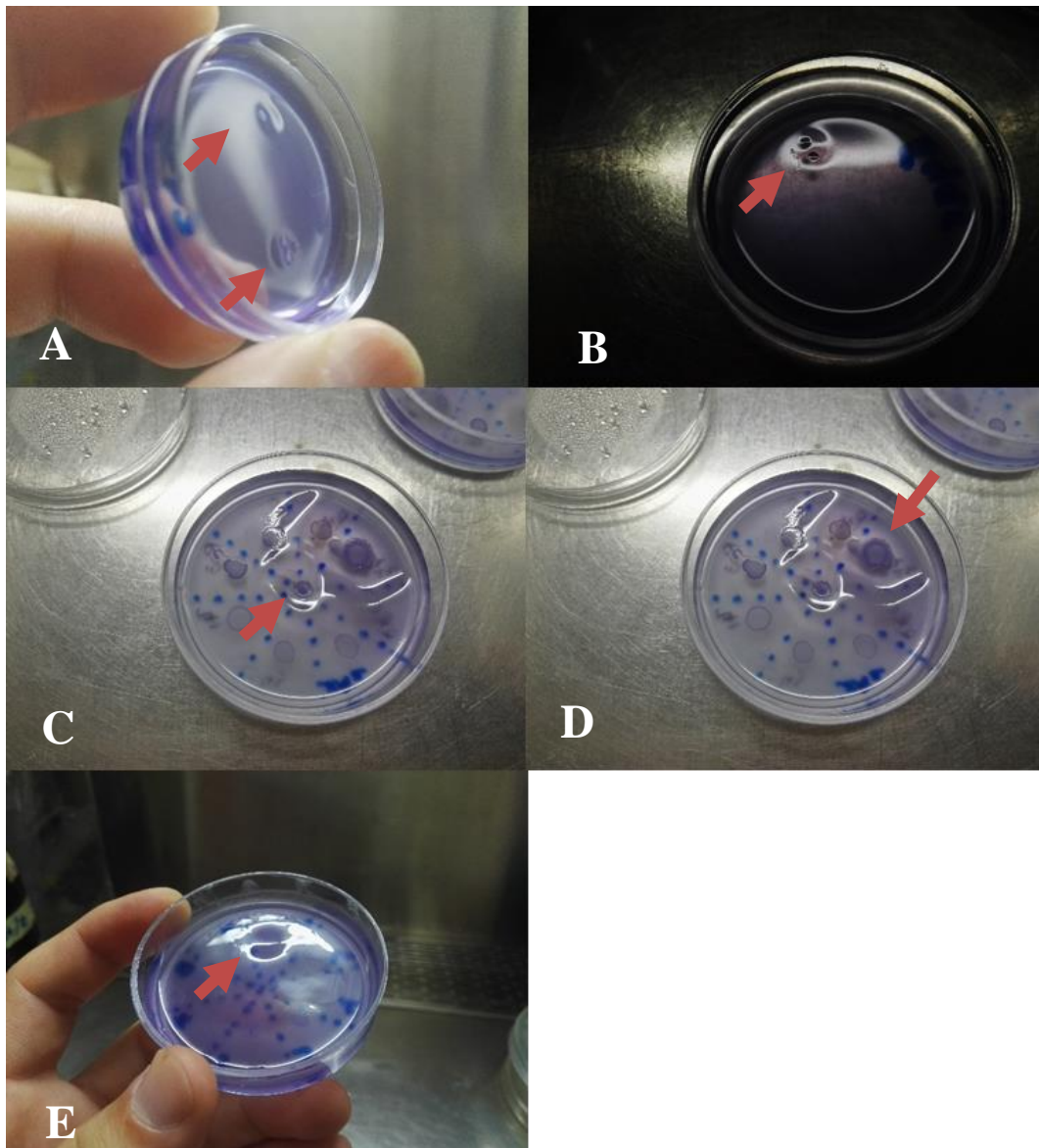
El cuadro 4 muestra los resultados para la prueba en CVP. Se puede observar que solo los aislamientos 6-M2, Ech2A, CfspA, Cfsab y Pt1-A provocaron la cavidad en el medio. En el caso de las cepas Ech2A, Pt1-A y 6-M2 la profundidad de la cavidad fue menor que la causada por las cepas CfspA y Cfsab (figura 5).

También se observó que otras cepas lograron crecer en el medio de CVP pero sin causar la cavidad en el medio. Específicamente las cepas Tt\_CP\_2, Cf1, Cf2, Cf3, Cf4, Cf5, Pt1-B, Pt4-1, Pt4-2 y Cfsaa

**Cuadro 2.** Resultados de la prueba para determinar la capacidad pectinolítica de las cepas en medio cristal violeta y pectato (CVP).

<b>Cepas</b>	<b>Hospedero</b>	<b>Órgano</b>	<b>Crecimiento en CVP</b>	<b>Cavidad en CVP</b>
6-M2	Cebolla	Seudotallo	+	+
Zt_CP_1	Zucchini	Tallo	-	-
Tf_CP_1	Tomate	Fruto	-	-
Tt_CP-2	Tomate	Tallo	+	-
CF1	Chile	Fruto	+	-
CF2	Chile	Fruto	+	-
CF3	Chile	Fruto	+	-
CF4	Chile	Fruto	+	-
CF5	Chile	Fruto	+	-
Zt1	Zucchini	Tallo	-	-
Zt2	Zucchini	Tallo	-	-
Zt4	Zucchini	Tallo	-	-
Pt1-A	Papa	Tallo	+	+
Pt1-B	Papa	Tallo	+	-
Pt4-1	Papa	Tallo	+	-
Pt4-2	Papa	Tallo	+	-
Pt4-6	Papa	Tallo	-	-
Pt4-7	Papa	Tallo	-	-
CfspA	Chile	Fruto	+	+
Cfsaa	Chile	Fruto	+	-
Csfab	Chile	Fruto	+	+
ECH2A	Chile	Fruto	+	+





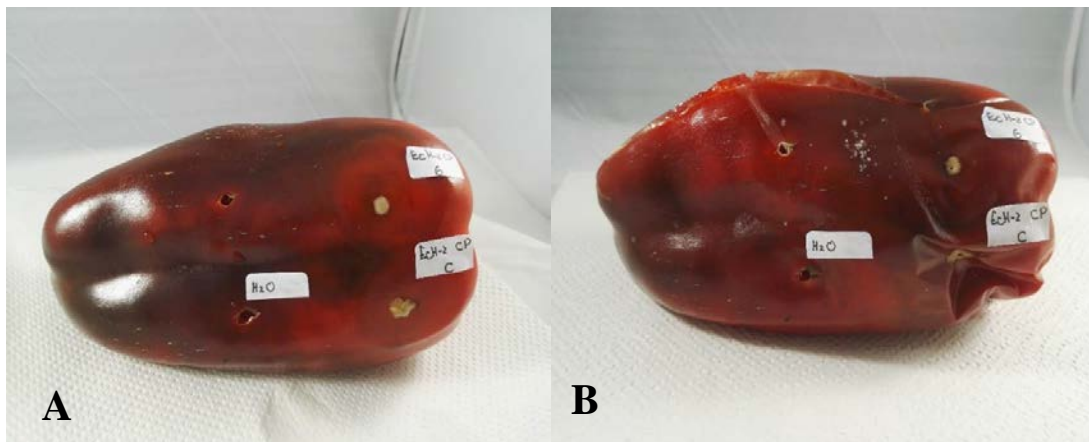
**Figura 5.** Crecimiento de los aislamientos en medio de Cristal violeta y pectato (CVP). Cavidad en el medio representa la metabolización de la pectina por parte de la bacteria. A) Ech2A, B) 6M2, C) CfspA, D) Cfsab y E) Pt1-A.

#### 4. Postulados de Koch

Los postulados de Koch solo fueron desarrollados con los aislamientos que provocaron cavidad en CVP (Cuadro 5).

##### Chile dulce

En el caso de la cepa Ech2A, los postulados de Koch fueron positivos. La figura 6 muestra un fruto de chile dulce inoculado con la cepa. Se puede observar que 6 días después de la inoculación, se forma un halo de tejido degradado alrededor del punto inoculado con la bacteria, con presencia de exudados. No así para el punto inoculado con agua. A los 10 días después de la inoculación se observa una completa degradación en los puntos inoculados con la bacteria, además de laceraciones en la superficie del fruto.



**Figura 6.** Inoculación de frutos de chile (*Capsicum annuum*) con la cepa Ech2A. Cepa aislada de frutos de chile dulce de la zona de Cartago. Incubación a 30°C. 6 (A) y 10 (B) días después de la inoculación. Orificio izquierdo inoculado con agua estéril y derecho con la cepa evaluada.

Para la cepa CfspA los postulados de Koch también fueron positivos. En la figura 7 se puede observar que los puntos donde se inoculó la bacteria se encuentran completamente degradados y el punto inoculado con agua no. En este caso, los

síntomas se observaron a las 24 horas después de la inoculación con una pequeña área decolorada y suave alrededor del punto inoculado y la degradación completa fue observada a los 4 días después de la inoculación.



**Figura 7.** Inoculación de frutos de chile (*Capsicum annuum*) con la cepa Cfspa. Cepa aislada de frutos de chile dulce de la zona de Alajuela. Incubación a 30°C. Imagen tomada a los 4 días después de la inoculación. Tres puntos inoculados con la cepa y uno con agua estéril.

De forma similar a Cfspa, Cfsab causó una lesión en el fruto de chile. Los síntomas iniciales se registraron a las 24 horas después de la inoculación y a los 4 días se observó degradación completa en los puntos inoculados con la bacteria y el punto inoculado con agua se observa completamente sano (figura 8).



**Figura 8.** Inoculación de frutos de chile (*Capsicum annuum*) con la cepa Cfsab. Cepa aislada de frutos de chile dulce de la zona de Alajuela. Incubación a 30°C. Imagen tomada a los 4 días después de la inoculación. Tres puntos inoculados con la cepa y uno con agua estéril.

### **Papa**

Para la cepa PtA aislada de plantas de papa proveniente de Tierra Blanca en Cartago, no se logró reproducir el síntoma en las plantas inoculadas. Las plantas fueron evaluadas por veintidós días consecutivos después de la inoculación sin embargo, no se observó el inicio de alguna sintomatología de pudrición blanda (figura 9).





**Figura 9.** Inoculación de plantas de papa (*Solanum tuberosum*) con la cepa PtA. Cepa aislada de plantas de papa de la zona de Tierra Blanca en Cartago. Condiciones variables de invernadero. Imagen tomada a los 22 días después de la inoculación.

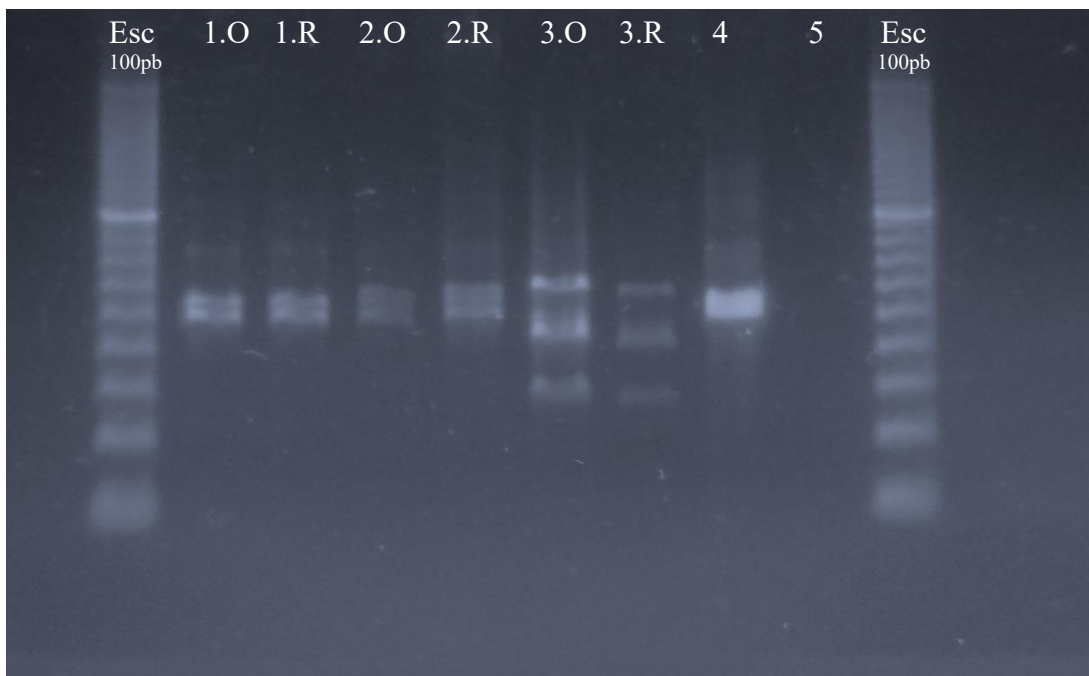
### **Cebolla**

Para el caso de las plantas de cebolla que fueron inoculadas con la cepa 6-M2, después de quince días de evaluación, no se logró observar síntomas de podredumbre en los bulbos ni hojas de cebolla (figura 10).



**Figura 10.** Inoculación de plantas de cebolla (*Allium cepa*) con la cepa 6m2. Cepa aislada de plantas de cebolla de la zona de Cartago. Control negativo izquierda (agua estéril) y cepa 6-M2 derecha. Condiciones variables de invernadero. Imagen tomada a los 15 días después de la inoculación.

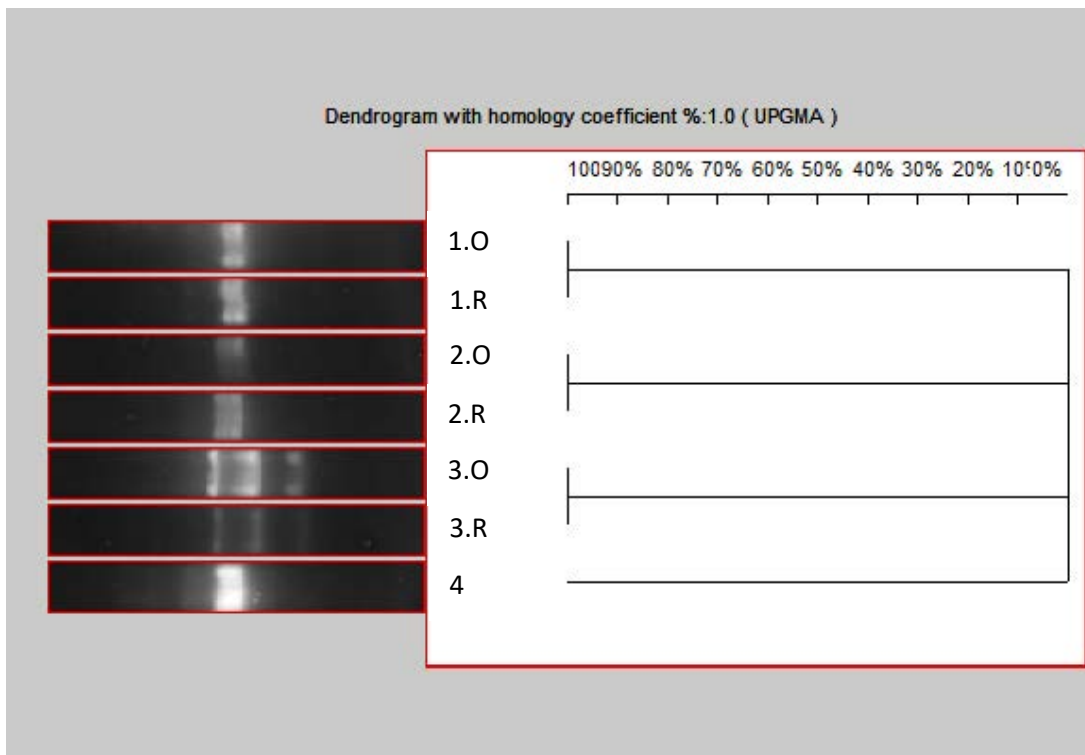
Para comprobar que el agente causal inoculado es el mismo que causa la infección (como parte de los Postulados de Koch) se realizó el análisis de tipificación usando la amplificación de la región intergénica 16S-23S de rARN. En la figura 11 se observa el resultado para las cepas CfspA, Cfsab y Ech2A que dieron positivas para los postulados de Koch en los frutos de chile dulce. Esta técnica permite diferenciar entre diferentes especies mediante la comparación en el patrón de bandeo resultante de la amplificación. Se puede observar que para las tres cepas que lograron causar pudrición blanda en los frutos de chile (CfspA, Cfsab y Ech2A), la cepa inoculada presenta el mismo patrón de bandeo que la cepa que fue reaislada de la nueva lesión, por lo que la cepa inoculada y la recuperada corresponden a la misma.



**Figura 11.** Comparación mediante ITS de cepas que fueron inoculadas y posteriormente reaisladas en la prueba de los postulados de Koch. Amplificación de la región intergénica 16S-23S de rARN. Primer G1 y L1. Esc) marcador de peso molecular de 100pb. 1) CfspA, 2) Cfsab, 3) Ech2A, 4) control positivo (*P.*

*carotovorum* ATCC 495), 5) control negativo. O: cepa original o inoculada, R: cepa recuperada o reaislada.

La figura 12 muestra el dendrograma obtenido del análisis UPGMA, se puede observar que las tres cepas evaluadas (CfspA, Cfsab y Ech2A) presentan un 100% de similitud entre la cepa que fue inoculada y la que fue reaislada.



**Figura 12.** Análisis de UPGMA mediante la comparación de la región ITS de cepas reaisladas para la comprobación de los postulados de Koch con las cepas 1.O) CfspA inoculada, 1.R) CfspA reaislada, 2.O) Cfsab inoculada, 2.R) Cfsab reaislada, 3.O) Ech2A, 3.I) Ech2A reaislada 4) control positivo (*P. carotovorum* ATCC 495).

## 5. Identificación molecular

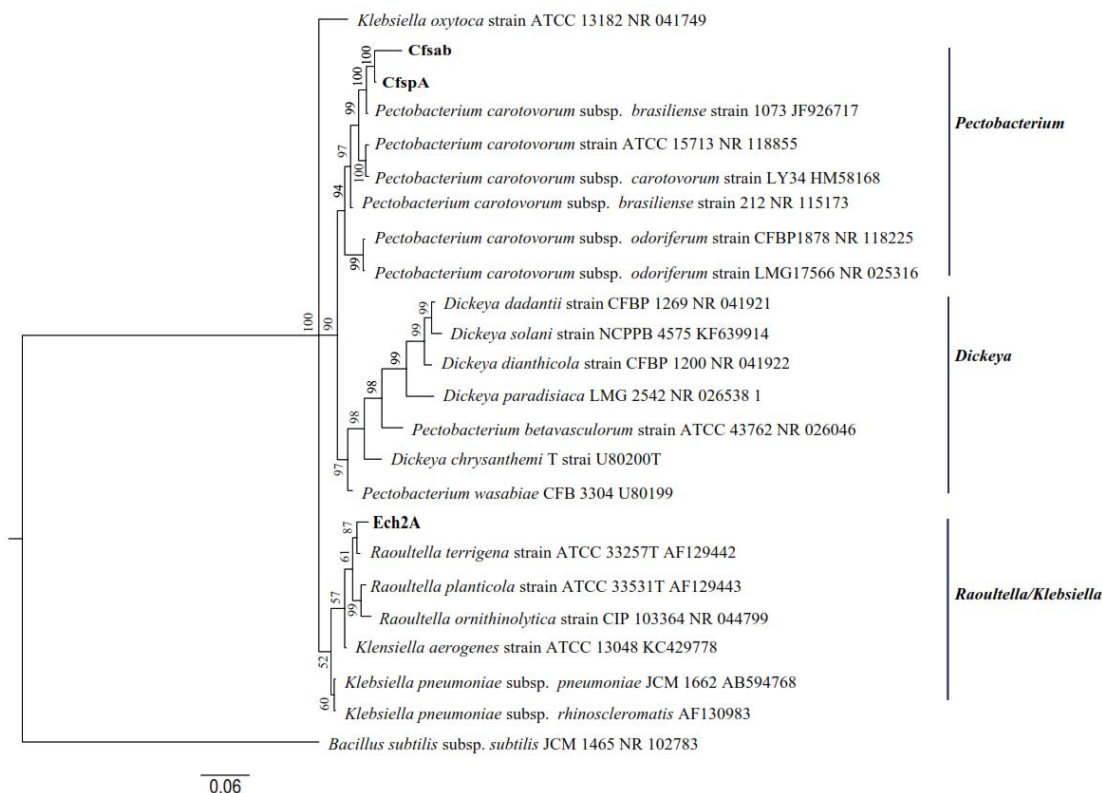
Al utilizar la herramienta Blast (Johnson et al. 2008) para comparar taxonómicamente las secuencias obtenidas con secuencias de referencia, se encontró que en el caso de



la cepa Ech2A presentaba similitud con secuencias de bacterias del género *Raoultella* con 98.2% de similitud y 99% de cobertura. Para las cepas CfspA y Cfsab el Blast mostró que había similitud con secuencias de bacterias del género *Pectobacterium* (99.3% y 97,6% de similitud respectivamente y 99% de cobertura en ambos casos. A pesar que ambas cepas fueron aisladas de la misma muestra, los morfotipos de estas dos cepas son distintos. En el caso de CfspA en agar nutritivo forma colonia blancas pequeñas y traslúcidas, mientras que Cfsab forma colonia más grandes, blancas y opacas, por lo que fueron tomadas inicialmente como dos cepas distintas (Anexo1).

Para el análisis bayesiano del marcador 16S ARNr, se utilizaron secuencias de referencia de cepas tipo de los géneros *Dickeya*, *Pectobacterium*, *Klebsiella* y *Raoultella*. Del género *Dickeya* se utilizaron como referencia, secuencias de las especies *D. dadantii*, *D. solani*, *D. dianthicola*, *D. paradisiaca*, y *D. chrysanthemi*. Para el género *Pectobacterium*, se utilizaron secuencias de las especies *P. carotovorum* subsp. *brasiliense*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*, *P. wasabie* y *P. betavaculorum*. Para *Klebsiella* se utilizaron las especies *K. oxytoca*, *K. aerogenes*, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* y *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*. Por último, para el género *Raoultella* se utilizaron las especies *R. terrigena*, *R. planticola* y *R. ornithinolytica*. Además, como la especie más lejana o grupo exterior se utilizó *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*.

En la figura 13 se muestra el árbol filogenético con los aislamientos que mostraron resultado positivo en los postulados de Koch. Se observa la separación de tres grupos o clados, *Pectobacterium*, *Dickeya* y *Raoultella-Klebsiella*. En el caso de las cepas Cfsab y CfspA se encuentran incluidas dentro del clado *Pectobacterium* y que dentro de este grupo se relacionan con la cepa tipo de *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* cepa 1073 (JF926717), con un valor de remuestreo de 100%. Por otro lado, la cepa Ech2A, se encuentra dentro del clado *Raoultella-Klebsiella*, mostrando relación con la cepa *R. terrigena* cepa ATCC 33257 (AF129442), con un valor bootstrap de 87%.

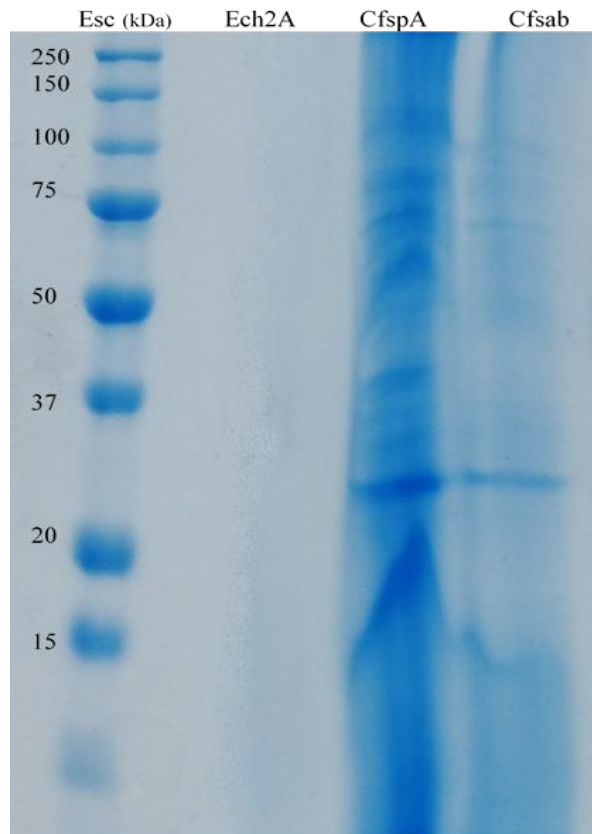


**Figura 13.** Árbol filogenético bayesiano basado en secuencias del 16S ribosomal para las cepas pectinolíticas. Se utilizó como outgrup la cepa tipo *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* JMC 1465. Modelo de sustitución TN93+G+I

## 6. Análisis enzimático

Durante el proceso de extracción de las enzimas, se observó que para el caso de la cepa Ech2A, se formaba un pellet de gran tamaño con apariencia mucilaginosa, al correr esa sustancia en el gel de poliacrilamida no se observó bandas (figura 14). En el caso de las cepas CfspA y Cfsab, se observó la formación de un pellet cremoso, de un tamaño menor para el caso de Cfsab.

En cuanto a la visualización en el gel, se puede observar que hay una mayor cantidad de bandas para la cepa CfspA que para la cepa Cfsab (figura 14). Para la cepa CfspA se puede observar bandas alrededor de los 250, 75, 50-30 y 25-20 kDa. Y para Cfsab, se pueden distinguir bandas alrededor de los 250, 50-30, y 20 kDa.



**Figura 14.** Análisis enzimático. Visualización de enzimas en un gel de poliacrilamida. Enzimas liberadas por bacterias fitopatógenas en un medio líquido enriquecido con polipectado de sodio. Esc: Escalera (marcador estándar de 10 proteínas, 10-250 kDa).

### **Análisis complementario de enzimas pectinolíticas basado en el estudio del Genoma de la cepa Ech2A.**

Debido a que no se obtuvieron bandas en el gel de SDS-PAGE para la cepa Ech2A, se decidió realizar un análisis complementario utilizando el genoma completo de la cepa Ech2A, cuya secuenciación fue realizada previamente en el equipo MiSeq del CIBCM. Este estudio permitió ensamblar, anotar, analizar y obtener las secuencias de dos enzimas relacionadas con la degradación de la pectina de dicho genoma. El cuadro 5 muestra la cantidad de secuencias o reads resultantes de la secuenciación mediante la plataforma Illumina Miseq. El análisis de calidad de las secuencias forward y reverse se muestran en el cuadro 6. Posteriormente, se utilizaron las secuencias para realizar el ensamblaje de novo mediante los ensambladores Velvet (Zerbino, 2010) y Spades (Bankevich et al., 2012).

**Cuadro 3.** Cantidad de secuencias antes y después del análisis de calidad de las secuencias forward y reverse de la secuenciación del genoma de la cepa Ech2A.

<b>Cepa</b>	<b>Secuencias totales</b>	<b>Secuencias después de eliminar por calidad (Phred score 20)</b>
Ech2A forward	371602	323993
Ech2A reverse	371602	283730

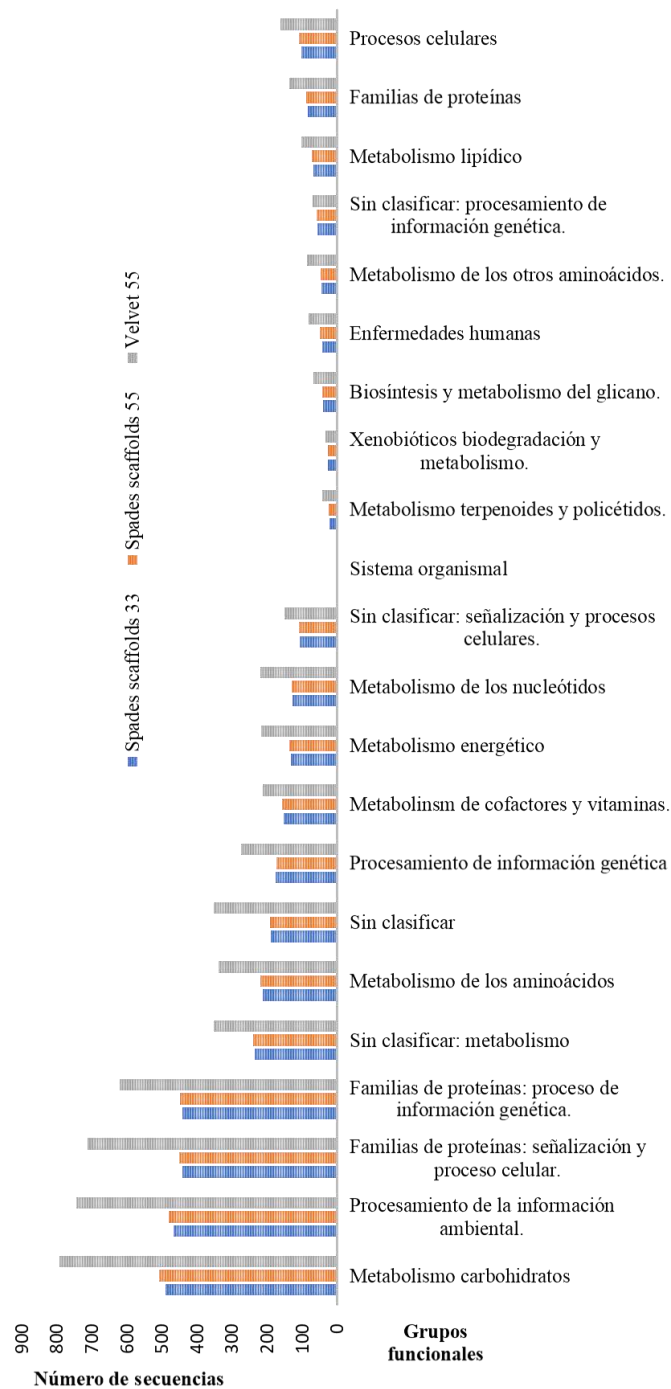
El análisis de la calidad de los ensamblajes para los cuales se obtuvo un mayor número de contigs y un N50 (medida que corresponde al tamaño promedio del 50% de las secuencias) mayor se muestra en el cuadro 6, estos se obtuvieron con la herramienta Quast. Las estadísticas para los demás k-mer y ensambladores se muestran en el anexo 3.

Posteriormente se realizó la anotación de los tres ensamblajes seleccionados utilizando la herramienta Prodigal y Diamond. Las secuencias de proteínas obtenidas fueron comparadas con las bases de datos COG (explicar). Posteriormente, se realizó

el análisis de categorías funcionales para cada ensamblaje utilizando la base de datos KEGG (Figura 15). Se encontró que al utilizar el ensamblador velvet k-mer 55 se obtiene un mayor número de secuencias para cada categoría funcional.

**Cuadro 4.** Estadísticas del análisis de calidad obtenidas con la herramienta Quast para el ensamblaje del genoma de la cepa Ech2A utilizando los ensambladores Velvet, contigs de k-mer de 55 y spades scaffolds k-mer 55 y 33.

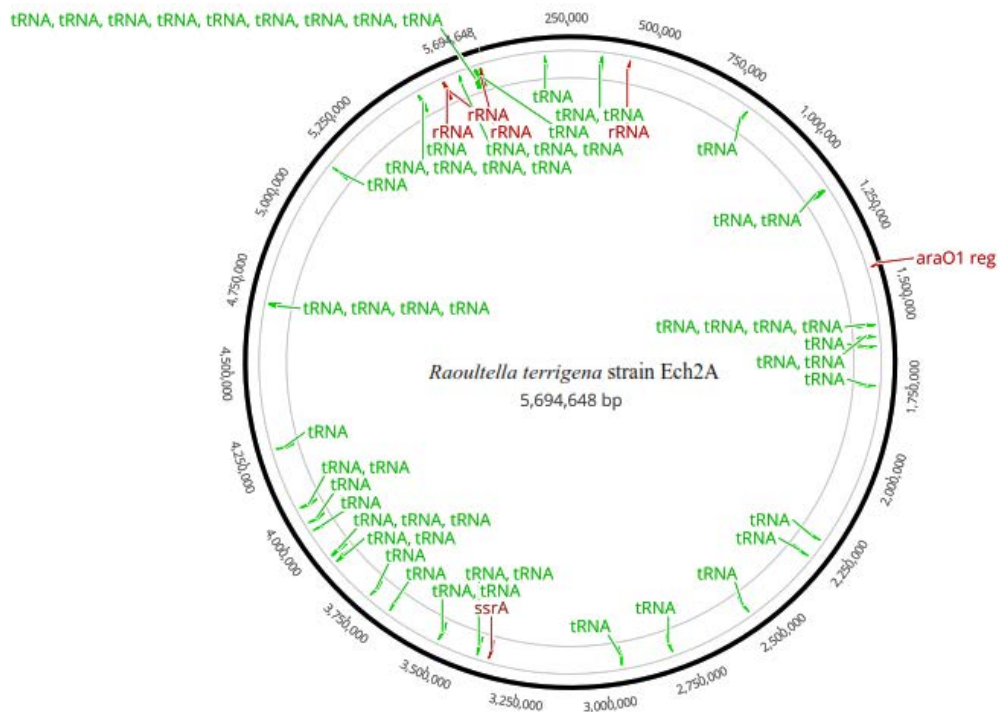
<b>Estadísticas genómicas</b>	<b>Velvet_k55</b>	<b>Spades k-mer 33</b>	<b>Spades k-mer 55</b>
# contigs	3230	239	319
# contigs (> = 0 pb)	4812	1178	661
# contigs (> = 1000 bp)	1752	191	237
# contigs (> = 5000 pb)	54	153	172
# contigs (> = 10000 bp)	3	117	123
# contigs (> = 25000 pb)	0	71	72
# contigs (> = 50000 bp)	0	33	32
Mayor contig	12660	157000	242806
Largo total	4685279	5600819	5663738
Longitud total (> = 0 pb)	5255238	5647904	5694648
Longitud total (> = 1000 pb)	3630567	5575996	5624209
Longitud total (> = 5000 pb)	359289	5475071	5464111
Longitud total (> = 10000 pb)	33929	5195204	5090493
Longitud total (> = 25000 pb)	0	4411391	4252018
Longitud total (> = 50000 pb)	0	2983164	2845068
N50	1791	56317	50043
N75	1065	30557	25201
L50	785	30	32
L75	1640	64	72
GC (%)	58.06	58.02	58.15



**Figura 15.** Número de secuencias obtenidas según las categorías funcionales obtenidas para los ensamblajes del genoma de la cepa Ech2A, a partir de los ensambladores escogidos, Spades scaffolds 33 y 55 y velvet 55.



Se utilizó la herramienta Geneious Prime para la visualización del genoma de forma circular (figura 17). El tamaño del genoma es de 5,69 Mbp.



**Figura 17.** Visualización circular del genoma para la cepa Ech2A mediante Geneious Prime.

El análisis con la herramienta Anii calculator, la cual permite comparar el porcentaje de identidad de los nucleótidos en los genomas, mostró un 99% de similitud entre el genoma de la cepa Ech2A y el genoma de la cepa NCTC13098 *Raoultella terrigena*.



## DISCUSION

### 1. Reacción hipersensible

La inducción de la RH por los aislamientos sugiere que existe una relación de incompatibilidad planta-patógeno, donde la RH desencadena la muerte celular programada como una primera línea de defensa ante la detección de organismos patógenos (Kushalappa et al. 2016, Klement y Goodman 1967).

Se observó que la RH en las plantas de chile dulce se presentó en diferentes grados o agresividad dependiendo de la cepa inoculada, por lo que se pudo observar reacciones desde una clorosis baja o débil hasta una necrosis del tejido. De forma similar, Pitman et al. (2010) encontraron que algunas cepas de *Pectobacterium* causaban un RH leve cuando eran inoculadas en hojas de tabaco y atribuía esto a la presencia de un efector único y divergente. Por otro lado, Barny (1995) y Huang et al. (2004) informan que la cantidad de proteínas efectoras producidas por las bacterias juegan un papel en la variabilidad fenotípica de la RH, por lo que se podría pensar que las bacterias que causaron una RH leve en las plantas de chile producen una menor cantidad de proteínas efectoras que las que causan una RH alta, y que esta menor cantidad de proteínas efectoras producidas por las bacterias le permite a la planta contener el avance del patógeno de forma más simple, sin la necesidad de liberar gran cantidad de proteínas de resistencia y sin tener que desencadenar una muerte celular tan drástica en el punto de reconocimiento.

La necrosis provocada por las cepas CfspA y Cfsab en el punto de inoculación, puede ser explicada porque estas bacterias fueron aisladas a partir de lesiones en frutos de chile dulce por lo que estos aislamientos corresponden a patógenos de este cultivo y al ser inoculados en las hojas de chile, pueden liberar sustancias que interactúan con las defensas de la planta inhibiéndolas, lo que permite su avance por los tejidos (Etalo et al. 2013). Estas sustancias liberadas por los patógenos son conocidas como

efectores y dentro de sus acciones para modular las respuestas de las plantas están la degradación y supresión de fitohormonas como el ácido jasmónico y ácido salicílico, supresión de la actividad del proteasoma, modulación de canales de calcio, inactividad de quinasas, entre otras (Feng y Zhou 2012, Asai y Shirasu 2015). Además, se ha visto que patógenos liberan efectores que inducen la muerte celular en las plantas, y en el caso de organismos necrotróficos, como las SRB, esta muerte del tejido puede contribuir al avance del patógeno (Govrin y Levine 2000, Staats et al. 2005, Kim et al. 2011, Williams et al. 2011, Charkowski et al. 2012, Gupta et al. 2015).

## **2. Capacidad pectinolítica en medio de cristal violeta y pectato (CVP).**

La capacidad de degradar la pectina de los diferentes aislamientos fue comprobada mediante la utilización de placas Petri con medio de cristal violeta y pectato. De los aislamientos sometidos a esta prueba, solo se observó degradación de pectina en los aislamientos Ech2A, 6M2, CfspA, Cfsab y Pt1-A, los cuales lograron causar cavidad en el medio CVP, observándose cavidades más profundas en las cepas CfspA y Cfsab. Además, se observó el crecimiento superficial de otras cepas, pero sin la formación de cavidades.

El medio de cristal violeta y pectato (CVP) fue desarrollado como un medio semi-selectivo para el aislamiento específico de *Erwinias* de la pudrición blanda, hoy pertenecientes a los géneros *Pectobacterium* y *Dickeya*, las cuales son capaces de producir una gran cantidad de enzimas pectinolíticas que les permite descomponer y metabolizar por completo la pectina presente en el medio CVP, lo cual se aprecia como una cavidad en la superficie del medio (Cuppels y Kelman 1974). Sin embargo, según Charkowski (2007), es posible que especies de *Pseudomonas* y *Flavobacterium* puedan crecer también y formar cavidades, ya que producen enzimas pectinolíticas. Por otro lado, es posible que ciertas bacterias saprofitas puedan crecer como contaminantes en el medio CVP, sin embargo, no producen la cavidad (Hélias et al. 2012).

Esta cavidad en la superficie del medio depende de la cantidad y variedad de enzimas que las bacterias pueden producir. Así, especies de *Pectobacterium* y *Dickeya* provocan cavidades muy profundas y bacterias menos equipadas de enzimas provocan cavidades más pequeñas y menos profundas (Perombelon y Burnett 1991, Hyman et al. 2001, Bdliya y Langerfeld 2005).

### **3. Postulados de Koch**

Para las cepas 6M2 y Pt1-A no se logró reproducir los síntomas originales en las plantas inoculadas. En el caso de las plantas de papa y cebollas inoculadas con las bacterias, las condiciones de temperatura y humedad no pudieron ser controladas, a pesar de que las plantas se colocaron dentro de cajas plásticas en el caso de papa y en bolsas plásticas para la cebolla, puede que las condiciones propiciadas no fueran las idóneas para que se provocara la enfermedad. Según Charkowski (2007) la alta humedad relativa y temperatura son factores claves para que tanto la infección como el desarrollo de la enfermedad se lleven a cabo en los cultivos. En el caso de las papa, Perombelon y Kelman (1980) mencionan que el factor más importante es el nivel del agua en el suelo, favoreciéndose el desarrollo de la enfermedad en los tubérculos con periodos prolongados de excesiva humedad en el suelo, propiciando condiciones anaeróbicas para las bacterias las cuales aumentan su multiplicación e invasión. Estos mismos autores menciona que la enfermedad no se desarrolla en plantas cultivadas en ausencia de tubérculos (vitroplántulas) o en plantas cultivadas a partir de tubérculos libres de inóculo, incluso en suelos altamente infestados. Pérombelon (2002) señala que, a diferencia de la pudrición en el tubérculo, la enfermedad en la parte aérea se desarrolla bajo condiciones aeróbicas y que el inicio de la enfermedad se da cuando gran cantidad de patógenos secundarios invaden el tejido después de haberse dado la pudrición del tubérculo. Lo anterior podría indicar que las cepas aisladas de papa

podrían tratarse de organismos secundarios ya que dichos aislamientos provenían de lesiones en la parte aérea de la plata y no de tubérculos afectados.

A pesar de se comprobó que tanto Pt1-A como 6m2 poseían la capacidad de metabolizar la pectina (CVP), no es un hecho que estos aislamientos puedan causar una pudrición blanda en las plantas al ser inoculadas. Varios organismos poseen enzimas que les permiten degradar la pectina (Charkowski 2007), sin embargo en la interacción planta patógeno existen muchos factores que van a permitir o restringir una enfermedad. Factores como la capacidad de producir proteínas que les permitan interactuar e inhibir las defensas de las plantas, estructuras que les permitan su adherencia a las células huéspedes, la capacidad para inhibir el crecimiento de otros organismos que compiten por los mismos recursos, entre otros, repercuten en el éxito de las bacterias invadiendo las plantas (Toth y Birch 2005, Toth et al. 2003, Davidsson et al. 2013). Además, un factor clave en el desarrollo de enfermedades en las plantas es el estado fisiológico de estas, donde condiciones de estrés puede provocar la susceptibilidad de las plantas, propiciando que estas sean atacadas por organismos fácilmente (Arauz 2011). Por otro lado, Pérombelon (2002) menciona que las SER pueden permanecer dentro de los tejidos de las plantas por varios meses sin causar síntomas, hasta alcanzar altas concentraciones bacterianas, por lo que tal vez el tiempo por el que se mantuvo el ensayo no fue el requerido para alcanzar una concentración de bacterias alta dentro de las plantas. Es necesario continuar estudiando estos aislamientos que provocaron reacción hipersensible en plantas para comprobar su papel como patógenos.

En el caso de las cepas Ech2A, CfspA y Cfsab, provenientes de frutos de chile dulce, si fue posible reproducir los síntomas en los frutos inoculados. Para los tres casos, se observó que en los puntos inoculados con las bacterias el tejido se tornó blando de forma semejante a los síntomas presentados por los frutos de chile de donde fueron aisladas las bacterias (figura 2), más tarde se dio la aparición de exudados

blanquecinos y laceraciones en la superficie de los frutos producto de descomposición del tejido, lo anterior concuerda con los hallazgos realizadas por Gillis et al. (2014) y Estrada et al. (2000) que, al inocular frutos de chile dulce con bacterias de pudrición blanda, observaron lesiones iguales a las descritas anteriormente.

Se observó que para la cepa Ech2A, la aparición de los síntomas fue más lenta que para las cepas CfspA y Cfsab, lo que podría indicar que se tratan de especies distintas, con diferentes capacidades de virulencia y agresividad, también podría estar relacionado con la cantidad de enzimas pectinolíticas que producen o que las condiciones de temperatura y humedad óptimas son diferentes debido a que provienen de dos zonas distintas (Charkowski 2007, Toth et al. 2003, Davidsson et al. 2013, Perombelon y Kelman 1980).

#### **4. Identificación molecular**

El análisis filogenético del gen 16S ribosomal mostró que las cepas CfspA y Cfsab provenientes de frutos de chile de la zona de Alajuela, se encontraban dentro del género *Pectobacterium*, y que, dentro de este, presentaron mayor cercanía con la cepa *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* cepa 1073 (JF926717) (Bootstrap 100%). A pesar que ambas cepas provienen de la misma muestra, su morfología en medio de agar nutritivo y pruebas bioquímicas preliminares fueron distintas por lo que se cree que corresponden a dos cepas.

*P. carotovorum* subsp. *brasiliense* fue descrita oficialmente en el 2012 por Nabhan et al. (2012) sin embargo, el nombre *brasiliense* se utilizó por primera vez en el 2004, cuando Duarte et al. (2004) realizaron un estudio caracterizando cepas atípicas causantes de podredumbre blanda de la papa en Brasil. En su estudio, encontró que la bacteria que causaba esta enfermedad en Brasil difería de *Erwinia carotovora* subsp.

*atroseptica* (hoy *Pectobacterium atrosepticum*), *Erwinia carotovora* (hoy *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) y *Erwinia chrysanthemi* (hoy *Dikeya chrysanthemi*), las cuales eran mencionadas como las causantes del daño en papa alrededor del mundo. Al carecer de un estudio de hibridación ADN-ADN no se describió la especie oficialmente, pero en su estudio Duarte mencionó que, si eventualmente se aceptara una nueva subespecie para las cepas encontradas por él, un nombre apropiado sería *E. carotovora* subsp. *brasiliense*. Desde su aislamiento por primera vez en el cultivo de papa en Brasil, *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* se ha encontrado causando podredumbre blanda en diferentes cultivos, como pepino en China (Meng et al. 2016), remolacha azucarera, la col y el calabacín en Polonia (Waleron et al. 2015), tomate en Colombia (Jaramillo et al. 2016), ornamentales en Israel (Ma et al. 2007) y en Chile en Corea, Venezuela y Israel (Choi y Kim 2013, Gillis et al. 2017, Ma et al. 2007) (Choi y Kim 2013, Gillis et al. 2017).

En cuanto a la cepa Ech2A, aislada de un fruto de Chile dulce de la zona hortícola de Cartago, al realizar el análisis filogenético del gen 16S ribosomal, su secuencia se encontraba dentro del clado de *Klebsiella* y *Raoultella*, mostrando relación con la cepa tipo *Raoultella terrigena* ATCC 3325T (AF129442) con un remuestreo de 87%, la cual fue aislada de una muestra de agua potable (Izard et al. 1981). Además, al comparar la identidad de los nucleótidos con base en los genomas mediante la herramienta ANI calculator, se obtuvo un 99% de similitud con la cepa *Raoultella terrigena*.

El género *Raoultella* fue propuesto por Drancourt et al. (2001) basado en un análisis filogenético de los genes 16S ribosomal y el rpoB (subunidad  $\beta$  del ARN polimerasa) en diferentes especies de *Klebsiella*. Anteriormente, *Klebsiella* estaba compuesto por cinco especies llamadas, *K. planticola*, *K. oxytoca*, *K. terrigena*, *K. ornithinolytica* y *K. pneumoniae*, esta última compuesta por tres subespecies, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* y *K. pneumoniae* subsp.

*rhinoscleromatis* (Orskov 1984). Drancourt et al. (2001) en su estudio, encontró que el género *Klebsiella* no era monofilético, por lo cual propuso separar el género en dos, *Klebsiella* y *Raoultella*, incluyendo en este último las especies *R. ornithinolytica*, *R. planticola* y *R. terrigena*.

El hecho de que el análisis filogenético para la cepa Ech2A colocara a esta dentro del clado *Raoultella* y *Klebsiella* es un resultado inesperado ya que estas bacterias son mayormente asociadas con aislamientos clínicos, muestras ambientales y en plantas como organismos benéficos, pero en el menor de los casos se han mencionado causando daños en planta (Brisse et al. 2006). Resultados similares obtuvieron Gillis et al. (2014), quienes encontraron que el agente causal de pudrición blanda en frutos de chile en invernadero en Caracas, Venezuela era una cepa de *Serratia marcescens*, la cual es un patógeno oportunista importante que causa infecciones en pacientes inmunocomprometidos (Grimont y Grimont 2006). En el caso de *K. pneumoniae* se reporta como un patógeno oportunista importante en humanos (Struve y Krogfelt 2004), siendo que la mayoría de las infecciones se dan en pacientes susceptibles después de su ingreso a hospitales (Munoz-Price et al. 2013). En muestras ambientales, estos dos géneros se han encontrado en muestras de agua y suelo (Izard et al. 1981, Geldreich y Rice 1987, Podschun et al. 2001). Algunas especies tienen la capacidad de fijar nitrógeno por lo que se han encontrado en asociación con plantas como agentes promotores de crecimiento (Luo et al. 2016, Lin et al. 2015, Iniguez et al. 2004). Algunos informes han vinculado estas bacterias causando daños en plantas de importancia agrícola, Chandrashekar et al. (2018) en la India encontró plantas de zanahoria con síntomas de podredumbre blanda, mal olor y marchitamiento, su análisis del gen 16S ribosomal identificaron que el agente causal era una *Klebsiella variicola*. Por su parte, Fan et al. (2016) en China encontraron que en banano esta misma especie de bacteria era la responsable de provocar las manchas húmedas de color marrón amarillento en los peciolo de las hojas inferiores, las cuales se extendían posteriormente a lo largo del peciolo, observándose también pudrición

interna de los haces vasculares. También se ha mencionado que estos géneros de bacterias pueden estar presentes como un contaminante en la superficie de la planta o en las frutas (Brown y Seidler 1973, Knittel et al. 1977), por lo que podrían penetrar en el tejido a través de aberturas naturales (por ejemplo, estomas, lenticelas) o heridas, naturales (es decir, causadas por el agua o el viento) o inducida por los insectos.

A pesar de que el gen 16S ribosomal es utilizado frecuentemente en los análisis taxonómicos en bacterias, es considerado un marcador filogenético insuficiente para la clasificación a nivel de especie. Esto debido a que es un gen extremadamente conservado en los procariontes. Además, existen millones de secuencias de este gen depositadas en bases de datos internacionales, para las cuales no existen cultivos disponibles para realizar comparaciones. También, un problema es que para las cepas de referencia (cepas tipo) existen múltiples secuencias del gen 16S que muestran diferencias entre ellas (De Vos et al. 2017). Debido a lo anterior, para la clasificación de una bacteria a nivel de especie se requiere hacer un estudio filogenético de alta resolución basado en la secuenciación de varios genes de mantenimiento como MLST y MLSA (Multilocus sequence typing y Multilocus sequence analysis respectivamente) (Belén et al. 2009, Glaeser y Kämpfer 2015), o también técnicas como hibridación ADN-ADN (Socransky et al. 1994) o la comparación de genomas (Zhao y Qi 2011).

## **5. Análisis enzimático**

El factor principal de patogenicidad de las SRE es la capacidad de producir gran cantidad de enzimas pectinolíticas. Cuando estas bacterias se encuentran dentro de las plantas, pueden liberar pectinasas al medio para descomponer las grandes moléculas de la pectina en estructuras más simples y pequeñas, que entran al espacio periplásmico de la bacteria donde las otras pectinasas las descomponen en moléculas más pequeñas que posteriormente entran al citoplasma de la bacteria (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 2014, Le Bouguéneq y Schouler 2011).



En el caso específico de *Dickeya dadantii*, una SRE muy estudiada debido a su gran producción de pectinasas, se sabe que la cadena principal de pectina en la planta es cortada por pectinasas extracelulares. Dos esterasas (PemA y PeaY) eliminan la esterificación con metilo y la acetilación de las regiones lineales. Posterior a esto, diferentes pectato liasas y poligalacturonasas dividen aún más la cadena de pectina en oligogalacturónidos que luego son transportados de forma pasiva a espacio periplásmico (Abbott y Boraston 2008, Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 2014).

En este estudio se observó que la cepa CfspA produjo una mayor cantidad de enzimas según lo observado en el SDS-page. Para esta cepa, fue posible observar bandas desde los 20 hasta 250 kDa. En el caso de Cfsab, se observó menor cantidad de bandas a pesar que el análisis filogenético demostró que hay una gran cercanía entre ellas (ambas *Pectobacterium carotovorum* subs *brasiliense*).

*Pectobacterium* y *Dickeya*, principales géneros de SRE, pueden secretar esterasas, pectato liasas y poligalacturonasas extracelulares como principales enzimas para dividir la pectina presente en la pared celular de las plantas (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 2014, Bellincampi et al. 2014). Las esterasas, pecto liasas y poligalacturonasas presentan un peso molecular entre los 30-50 kDa (Sharma et al. 2013), por lo que se podría pensar que las bandas obtenidas en el gel dentro del rango de 30-50 kDa corresponden a este tipo de enzimas.

En el caso de la cepa Ech2A que corresponde a una *Raoultella*, debido a problemas en la precipitación del sobrenadante no se logró detectar ningún tipo de banda en el análisis de SDS-page. Durante la purificación de las enzimas, se observó que el pellet formado después de la saturación con el sulfato de amonio era distinto al pellet formado por las cepas CfspA y Cfsab. En el caso de la cepa Ech2A, se formó un pellet de gran tamaño con apariencia mucilaginosa y transparente (anexo 4). Se cree que esta

sustancia corresponde a la producción de un exopolisacárido, los cuales están vinculados con la resistencia a la desecación, protección contra la inmunidad del huésped y con la adherencia de la bacteria (Domenico et al. 1985, Bazaka et al. 2011). Es posible que las grandes moléculas de este polisacárido extracelular estén interfiriendo con la purificación de las enzimas pectinolíticas y con la posterior visualización en el SDS-PAGE.

Rodionov et al. (2004), mencionan que especies como *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Vibrio* producen pectatoliasas intracelulares y que la sobrevivencia de este tipo de bacterias a base de la pectina depende de la despolimerización inicial de esta por patógenos mejor equipados como *Dickeya* y *Pectobacterium*, los cuales pueden convertir la pectina en moléculas más pequeñas, que pueden ser llevadas al interior de las células de bacterias como *Yersinia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Raoutella*, *Vibrio* y *Escherichia* para su posterior metabolización (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 2014).

Sin embargo, lo anterior significaría que géneros como *Klebsiella* o *Raoutella* no podrían causar por sí solos pudrición blanda en un cultivo debido a que no cuentan con las enzimas necesarias para la despolimerización y esterificación inicial de la pectina, lo cual no coincide con lo encontrado en este estudio, donde se demostró mediante los postulados de Koch, que la cepa Ech2A perteneciente al clado de *Raoutella-Klebsiella*, puede causar pudrición blanda en frutos de chile dulce. En apoyo a estos resultados, Kovtunovych et al. (2003) encontraron mediante la amplificación del gen *PehX* que varias cepas de *Klebsiella oxytoca* poseían dentro de su genoma este gen, el cual codifica para una poligalacturonasa. Por otro lado, Yuan et al. (2011) encontraron que una especie de *Klebsiella* era capaz de producir PelA, una pectato liasa. Se cree que tanto las poligalacturonasas como las pectato liasas son las responsables de actuar en las primeras fases de la descomposición de la pectina (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 2014, Bellincampi et al. 2014).

Además, el análisis del genoma para la cepa Ech2A reveló la presencia de genes relacionados con la degradación de la pectina, específicamente para una poligalacturonasa (COG5434 – EC 3.2.1.15) y una pectina metil-esterasa (COG4677|COG5263 – EC 3.1.1.11), las cuales están directamente relacionadas con la descomposición de la cadena principal de pectina en la pared celular de las plantas (Garg et al. 2016). Esto indica que el aislamiento Ech2a, *Raoultella terrigena* contiene las enzimas necesarias para provocar los síntomas observados en plantas de Chile, y que es un fitopatógeno con efectores como factores de virulencia (RH +), por lo que el presente estudio logró identificar dos tipos de agentes causales de pudrición blanda en Chile dulce, CfspA y Cfsab ambas *Pectobacterium carotovorum* subs. *brasiliense* y Echa2A *Raoultella terrigena*.

## CONCLUSIONES

La prueba de reacción hipersensible permitió delimitar la población de cepas fitopatógenas pectinolíticas.

Los aislamientos CfspA, Cfsab y Ech2A provenientes de frutos de chile dulce son agentes causales de pudrición blanda en este cultivo.

Las cepas Pt1-A y 6m2 provenientes de papa y cebolla son bacterias fitopatógenas pectinolíticas según las pruebas de RH y crecimiento en CVP, sin embargo, que no lograron infectar los hospederos en la prueba de patogenicidad en invernadero.

La secuenciación del gen 16S ribosomal permitió identificar los aislamientos CfspA y Cfsab como pertenecientes al género *Pectobacterium*, mostrando mayor similitud con la especie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* y a la cepa Ech2A como perteneciente al género *Raoultella*, mostrando mayor similitud con la especie *Raoultella terrigena*.

El SDS-Page mostró que la cepa CfspA y Cfsab libera enzimas desde los 20 hasta los 250 kDa, encontrándose posiblemente esterases, poligalacturonasas y pectato liasas en el orden de los 30 a 50 kDa.

Con la metodología empleada no fue posible observar bandas en el SDS-Page para la cepa Ech2A, sin embargo, el análisis del genoma de esta bacteria permitió identificar dos secuencias que corresponden con enzimas vinculadas en la degradación de la pectina, una pectina metil-esterasa y una poligalacturonasa.

## **RECOMENDACIONES**

- Realizar ensayos de infección en los hospederos para las cepas positivas para RH pero negativas para CVP, ya que estas cepas son fitopatógenas.
- Seguir trabajando con las cepas 6-M2 y Pt1-A realizando nuevamente inoculaciones en los hospederos utilizando diferentes metodologías de inoculación y concentraciones bacterianas, además de diferentes condiciones de humedad y temperatura.
- Realizar pruebas de inoculación en diferentes hospederos para las cepas Ech2A, CfspA y Cfsab para conocer sus rangos de hospederos.
- Realizar un análisis filogenético más detallados para las cepas CfspA y Cfsab, utilizando la secuenciación y comparación de diferentes genes codificantes.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, DW; Boraston, AB. 2008. Structural biology of pectin degradation by Enterobacteriaceae. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 72(2):301-316. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00038-07>.
- Agrios, GN. 2005. *Plant Pathology*. 5th ed. Elsevier. 952 p.
- Aguilar-Ulloa, W; Arce-Acuña, P; Rivera-Méndez, W. 2016. Identificación y caracterización molecular del hongo causante de la pudrición blanca en *Allium cepa*, en Llano Grande de Cartago, Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha* 29(7):51. DOI: <https://doi.org/10.18845/tm.v29i7.2705>.
- Alippi, AM; López, AC. 2009. First Report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* on *Spathiphyllum wallisii* in Argentina. *Plant Disease* 93(8):842-842. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-8-0842C>.
- Alvarado, ICM; Michereff, SJ; Mariano, RLR; Souza, EB; Quezado-Duval, AM; Resende, LV; Cardoso, E; Mizubuti, ESG. 2011. Characterization and variability of soft rot-causing bacteria in chinese cabbage in north eastern Brazil. *Journal of Plant Pathology* 93(1):173-181.
- Arauz, L. 2011. *Fitopatología: un enfoque agroecológico*. 5° Ed. San José, Editorial Universidad de Costa Rica. 514 p.
- Asai, S; Shirasu, K. 2015. Plant cells under siege: plant immune system versus pathogen effectors. *Current Opinion in Plant Biology* 28:1-8.
- Bankevich, A; Nurk, S; Antipov, D; Gurevich, AA; Dvorkin, M; Kulikov, AS; Lesin, VM; Nikolenko, SI; Pham, S; Prjibelski, AD; Pyshkin, AV; Sirotkin, AV; Vyahhi, N; Tesler, G; Alekseyev, MA; Pevzner, PA. 2012. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology* 19(5):455-477. DOI: <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- Barny, M-A. 1995. *Erwinia amylovora* hrpN mutants, blocked in harpin synthesis, express a reduced virulence on host plants and elicit variable hypersensitive reactions on tobacco. *European Journal of Plant Pathology* 101(3):333-340. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01874789>.
- Bauer, DW; Bogdanove, AJ; Beer, SV; Collmer, A. 1994. *Erwinia chrysanthemi* hrp genes and their involvement in soft rot pathogenesis and elicitation of the

- hypersensitive response. MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions 7(5):573-581.
- Bazaka, K; Crawford, RJ; Nazarenko, EL; Ivanova, EP. 2011. Bacterial Extracellular Polysaccharides (en línea). In Linke, D; Goldman, A (eds.). Dordrecht, Springer Netherlands, (Avances en medicina experimental y biología). p. 213-226 DOI: [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9_13).
- Bdliya, BS; Langerfeld, E. 2005. A semi-selective medium for detection, isolation and enumeration of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* from plant materials and soil. Tropical Science 45(2):90-96. DOI: <https://doi.org/10.1002/ts.56>.
- Belén, A; Pavón, I; Maiden, MCJ. 2009. Multilocus Sequence Typing. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 551:129-140. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-999-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-999-4_11).
- Bellincampi, D; Cervone, F; Lionetti, V. 2014. Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions (en línea). Frontiers in Plant Science 5. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00228>.
- Bereswill, S; Jock, S; Bellemann, P; Geider, K. 1998. Identification of *Erwinia amylovora* by Growth Morphology on Agar Containing Copper Sulfate and by Capsule Staining with Lectin. Plant Disease 82(2):158-164. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.2.158>.
- Bhat, K; Masood, S; Bhat, N; Bhat, MA; Razvi, S; Mir, M; Akhtar, S; Wani, N; Habib, M. 2010. Current status of post harvest soft rot in vegetables: a review. Asian Journal of Plant Sciences 9(4):200.
- Blot, N; Berrier, C; Hugouvieux-Cotte-Pattat, N; Ghazi, A; Condemine, G. 2002. The oligogalacturonate-specific porin KdgM of *Erwinia chrysanthemi* belongs to a new porin family. The Journal of Biological Chemistry 277(10):7936-7944. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109193200>.
- Bolaños-Herrera, A. 2001. Introducción a la Olericultura. 1º Edición. Costa Rica, UNED. 380 p.
- Bonas, U; Schulte, R; Fenselau, S; Minsavage, GV; Staskawicz, BJ; Stall, RE. 1991. Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. Mol. Plant-Microbe Interact 4(1):81-88.

- Boyd, LA; Ridout, C; O'Sullivan, DM; Leach, JE; Leung, H. 2013. Plant–pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends in Genetics* 29(4):233-240. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.10.011>.
- Brisse, S; Grimont, F; Grimont, PAD. 2006. The Genus *Klebsiella* (en línea). In *Dworkin, M; Falkow, S; Rosenberg, E; Schleifer, K-H; Stackebrandt, E (eds.)*. New York, NY, Springer New York. p. 159-196 DOI: [https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X\\_8](https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_8).
- Brosius, J; Palmer, ML; Kennedy, PJ; Noller, HF. 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75(10):4801-4805.
- Brown, C; Seidler, RJ. 1973. Potential pathogens in the environment: *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma. *Appl. Environ. Microbiol.* 25(6):900-904.
- Buchfink, B; Xie, C; Huson, DH. 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods* 12(1):59-60. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>.
- Byrd, AL; Segre, JA. 2016. Adapting Koch's postulates. *Science* 351(6270):224-226.
- Camagna, M; Takemoto, D. 2018. Hypersensitive Response in Plants (en línea). *American Cancer Society*. p. 1-7 DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0020103.pub2>.
- Cating, RA; Palmateer, AJ. 2010. Bacterial Soft Rot of *Oncidium* Orchids Caused by a *Dickeya* sp. (*Pectobacterium chrysanthemi*) in Florida. *Plant Disease* 95(1):74-74. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-10-0523>.
- Cating, RA; Palmateer, AJ; McMillan, RT; Dickstein, ER. 2009. First Report of a Bacterial Soft Rot on *Tolumnia* Orchids Caused by a *Dickeya* sp. in the United States. *Plant Disease* 93(12):1354-1354. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-12-1354B>.
- Chandrashekar, BS; Prasannakumar, MK; Puneeth, ME; Teli, K; Priyanka, K; Mahesh, HB; Desai, RU. 2018. First report of bacterial soft rot of carrot caused by *Klebsiella variicola* in India. *New Disease Reports* 37:21-21. DOI: <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2018.037.021>.
- Charkowski, A; Blanco, C; Condemine, G; Expert, D; Franza, T; Hayes, C; Hugouvieux-Cotte-Pattat, N; Solanilla, EL; Low, D; Moleleki, L; Pirhonen, M; Pitman, A; Perna, N; Reverchon, S; Rodríguez Palenzuela, P; San



- Francisco, M; Toth, I; Tsuyumu, S; van der Waals, J; van der Wolf, J; Van Gijsegem, F; Yang, C-H; Yedidia, I. 2012. The Role of Secretion Systems and Small Molecules in Soft-Rot Enterobacteriaceae Pathogenicity. Annual Review of Phytopathology 50(1):425-449. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-173013>.
- Charkowski, AO. 2007. The soft rot *Erwinia* (en línea). Springer, Dordrecht. p. 423-505 DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_13).
- Charkowski, AO. 2018. The Changing Face of Bacterial Soft-Rot Diseases. Annual review of phytopathology 56:269-288.
- Charkowski, AO; Lind, J; Rubio-Salazar, I. 2014. Genomics of Plant-Associated Bacteria: The Soft Rot Enterobacteriaceae (en línea). Springer, Berlin, Heidelberg. p. 37-58 DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-55378-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55378-3_2).
- Chinchilla, C; Gonzales, L; Morales, F. 1979. Pudrición bacteriana del cogollo de la piña en Costa Rica. Agron. Costarric 3:183-185.
- Choi, O; Kim, J. 2013. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* Causing Soft Rot on Paprika in Korea. Journal of Phytopathology 161(2):125-127. DOI: <https://doi.org/10.1111/jph.12022>.
- Coutinho, TA; Venter, SN. 2009. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. Molecular Plant Pathology 10(3):325-335.
- Cuppels, D; Kelman, A. 1974. Evaluation of selective media for isolation of soft-rot bacteria from soil and plant tissue. Phytopathology 64(4):468-475.
- Cuppels, D; Kelman, A. 1974. Evaluation of selective media for isolation of soft-rot bacteria from soil and plant tissue. Phytopathology 64(4):468-475.
- Czajkowski, R; Pérombelon, M c. m.; Jafra, S; Lojkowska, E; Potrykus, M; van der Wolf, J m.; Sledz, W. 2015. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. Annals of Applied Biology 166(1):18-38. DOI: <https://doi.org/10.1111/aab.12166>.
- Davidsson, PR; Kariola, T; Niemi, O; Palva, T. 2013. Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria (en línea). Frontiers in Plant Science 4. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00191>.
- De Boer, S; Li, X; Ward, L. 2012. *Pectobacterium* spp. associated with bacterial stem rot syndrome of potato in Canada. Phytopathology 102(10):937-947.

- De Vos, P; Thompson, F; Thompson, C; Swings, J. 2017. Chapter 2 - A Flavor of Prokaryotic Taxonomy: Systematics Revisited (en línea). In *Kurtböke, I (ed.)*. Academic Press. p. 29-44 DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804765-1.00002-3>.
- Dodds, PN; Rathjen, JP. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* 11(8):539.
- Domenico, P; Diedrich, DL; Straus, DC. 1985. Extracellular polysaccharide production by *Klebsiella pneumoniae* and its relationship to virulence. *Canadian journal of microbiology* 31(5):472-478.
- Drancourt, M; Bollet, C; Carta, A; Rousselier, P. 2001. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51(3):925-932. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-925>.
- Duarte, V; Boer, SHD; Ward, LJ; Oliveira, AMR de. 2004. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology* 96(3):535-545. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02173.x>.
- Estrada, RSG; Reyes, CJ; Fasio, JAC; Molar, RA; Zequera, IM; Rangel, MDM. 2000. Marchitez bacteriana en chile bell causada por *Erwinia carotovora* subsp *carotovora*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18(2):120-124.
- Etalo, DW; Stulemeijer, IJE; Esse, HP van; Vos, RCH de; Bouwmeester, HJ; Joosten, MHAJ. 2013. System-Wide Hypersensitive Response-Associated Transcriptome and Metabolome Reprogramming in Tomato. *Plant Physiology* 162(3):1599-1617. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.113.217471>.
- Fan, H; Zeng, L; Yang, P; Guo, Z; Bai, T. 2016. First report of banana soft rot caused by *Klebsiella variicola* in China. *Plant Disease* 100(2):517-517.
- Feng, F; Zhou, J-M. 2012. Plant–bacterial pathogen interactions mediated by type III effectors. *Current Opinion in Plant Biology (Serie Biotic interactions)* 15(4):469-476. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.03.004>.
- Fessehaie, A; De Boer, S; Lévesque, C. 2002. Molecular characterization of DNA encoding 16S 23S rRNA intergenic spacer regions and 16S rRNA of pectolytic *Erwinia* species. *Canadian journal of microbiology* 48(5):387-398.

- Finn, RD; Clements, J; Arndt, W; Miller, BL; Wheeler, TJ; Schreiber, F; Bateman, A; Eddy, SR. 2015. HMMER web server: 2015 update. *Nucleic Acids Research* 43(W1):W30-W38.
- Fiori, M; Viridis, S; Schiaffino, A. 2005. Phenotypic and genetic characterization of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) Bergey et al. isolates from grafted tomato in Sardinia, Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 44(1):50-57.
- French, ER; Hebert, TT. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. Costa Rica, IICA. 289 p.
- Gardan, L. 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zae* sp. nov. *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and .
- Gardan, L; Gouy, C; Christen, R; Samson, R. 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium brasiliensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53(2):381-391. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02423-0>.
- Garg, G; Singh, A; Kaur, A; Singh, R; Kaur, J; Mahajan, R. 2016. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech* 6(1):47. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0371-4>.
- Geldreich, EE; Rice, EW. 1987. Occurrence, Significance, and Detection of *Klebsiella* in Water Systems. *Journal - American Water Works Association* 79(5):74-80. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1987.tb02846.x>.
- Gillis, A; Rodríguez, M; Santana, MA. 2014. *Serratia marcescens* associated with bell pepper (*Capsicum annuum* L.) soft-rot disease under greenhouse conditions. *European Journal of Plant Pathology* 138(1):1-8. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0300-x>.
- Gillis, A; Santana, MA; Rodríguez, M; Romay, G. 2017. First Report of Bell Pepper Soft-Rot Caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in Venezuela. *Plant Disease* 101(9):1671-1671. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-17-0361-PDN>.

- Glaeser, SP; Kämpfer, P. 2015. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Systematic and Applied Microbiology* 38(4):237-245. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.007>.
- Govrin, EM; Levine, A. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* 10(13):751-757. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00560-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00560-1).
- Granados Montero, M del M; Saborío Mora, M; Arias Reverón, JM; Monge Meza, J; Herrera Murillo, F; Rodríguez Ruiz, AM; Blanco Metzler, H; Aguilar Piedra, HG; Murillo Rojas, P; Wang Wong, A. 2013. Problemas fitosanitarios de la cebolla en Costa Rica. 1° Edición. Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 597 p.
- Grimont, F; Grimont, PA. 2006. The genus *Serratia*. *The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass* :219-244.
- Gupta, R; Lee, SE; Agrawal, GK; Rakwal, R; Park, S; Wang, Y; Kim, ST. 2015. Understanding the plant-pathogen interactions in the context of proteomics-generated apoplastic proteins inventory (en línea). *Frontiers in Plant Science* 6. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00352>.
- Gurevich, A; Saveliev, V; Vyahhi, N; Tesler, G. 2013. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29(8):1072-1075. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>.
- Hall, TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000. p. 95-98.
- Hauben, L; Moore, ERB; Vauterin, L; Steenackers, M; Mergaert, J; Verdonck, L; Swings, J. 1998. Phylogenetic Position of Phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Systematic and Applied Microbiology* 21(3):384-397. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(98\)80048-9](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(98)80048-9).
- Hélias, V; Hamon, P; Huchet, E; Wolf, JVD; Andrivon, D. 2012. Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Plant Pathology* 61(2):339-345. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02508.x>.
- Herrera, J; Gonzalez, L. 1977. Development and control of potato blackleg, caused by *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*, in Costa Rica. *Agronomia Costarricense* 1(2):161-163.

- Hossain, S; Khan, AA; Rahman, MM; Iiyama, K; Furuya, N. 2018. First Report of Soft Rot Disease of Papaya Caused by *Klebsiella variicola* in Bangladesh. 九州大学大学院農学研究院紀要 63(2):201-205.
- Huang, H-E; Ger, M-J; Yip, M-K; Chen, C-Y; Pandey, A-K; Feng, T-Y. 2004. A hypersensitive response was induced by virulent bacteria in transgenic tobacco plants overexpressing a plant ferredoxin-like protein (PFLP). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64(2):103-110. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2004.05.005>.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N; Condemine, G; Shevchik, VE. 2014. Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity. *Environmental Microbiology Reports* 6(5):427-440. DOI: <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12166>.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N; Reverchon, S. 2001. Two transporters, TogT and TogMNAB, are responsible for oligogalacturonide uptake in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Molecular Microbiology* 41(5):1125-1132.
- Humphris, SN; Cahill, G; Elphinstone, JG; Kelly, R; Parkinson, NM; Pritchard, L; Toth, IK; Saddler, GS. 2015. Detection of the bacterial potato pathogens *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. using conventional and real-time PCR. Springer. p. 1-16.
- Hyatt, D; Chen, G-L; LoCascio, PF; Land, ML; Larimer, FW; Hauser, LJ. 2010. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 11(1):119. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119>.
- Hyman, L; Birch, P; Dellagi, A; Avrova, A; Toth, I. 2000. A competitive PCR-based method for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. *Letters in Applied Microbiology* 30(4):330-335.
- Hyman, LJ; Sullivan, L; Toth, IK; Perombelon, MCM. 2001. Modified crystal violet pectate medium (CVP) based on a new polypectate source (Slendid) for the detection and isolation of soft rot *Erwinias*. *Potato Research* 44(3):265-270. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02357904>.
- Iniguez, AL; Dong, Y; Triplett, EW. 2004. Nitrogen Fixation in Wheat Provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(10):1078-1085. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.10.1078>.
- Izard, D; Ferragut, C; Gavini, F; Kersters, K; De Ley, J; Leclerc, H. 1981. *Klebsiella terrigena*, a New Species from Soil and Water. *International Journal of*

Systematic Bacteriology 31(2):116-127. DOI:  
<https://doi.org/10.1099/00207713-31-2-116>.

- Janda, JM; Abbott, SL. 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* 45(9):2761-2764. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>.
- Janeway, CA. 1989. Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 54:1-13. DOI: <https://doi.org/10.1101/SQB.1989.054.01.003>.
- Jaramillo, A; Huertas, CA; Gómez, ED. 2016. First Report of Bacterial Stem Rot of Tomatoes Caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in Colombia. *Plant Disease* 101(5):830. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-16-1184-PDN>.
- Jensen, MA; Webster, JA; Straus, N. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology* 59(4):945-952.
- Johnson, M; Zaretskaya, I; Raytselis, Y; Merezuk, Y; McGinnis, S; Madden, TL. 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research* 36(suppl\_2):W5-W9. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkn201>.
- Jones, JDG; Dangl, JL. 2006. The plant immune system. *Nature* 444(7117):323-329. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature05286>.
- Jones, L. 1900. A soft rot of carrot and other vegetables caused by *Bacillus carotovorus* Jones. *Vt. Agric. Exp. Stn. Rep* 13:299-332.
- Kanehisa, M; Goto, S. 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research* 28(1):27-30.
- Kashyap, D; Chandra, S; Kaul, A; Tewari, R. 2000. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16(3):277-282.
- Kayser, FH; Bienz, KA; Eckert, J. 2005. *Medical Microbiology*. Thieme. 732 p.
- Kearse, M; Moir, R; Wilson, A; Stones-Havas, S; Cheung, M; Sturrock, S; Buxton, S; Cooper, A; Markowitz, S; Duran, C; Thierer, T; Ashton, B; Meintjes, P; Drummond, A. 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data.

- Kim, H-S; Thammarat, P; Lommel, SA; Hogan, CS; Charkowski, AO. 2011. *Pectobacterium carotovorum* Elicits Plant Cell Death with DspE/F but the *P. carotovorum* DspE Does Not Suppress Callose or Induce Expression of Plant Genes Early in Plant-Microbe Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24(7):773-786. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-10-0143>.
- Kim, J-H; Joen, Y-H; Kim, S-G; Kim, Y-H. 2007. First report on bacterial soft rot of graft-cactus *Chamaecereus silvestrii* caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in Korea. *The Plant Pathology Journal* 23(4):314-317.
- Klement, Z. 1963. Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature* 199:299.
- Klement, Z; Goodman, R. 1967. The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 5(1):17-44.
- Knittel, MD; Seidler, RJ; Eby, C; Cabe, LM. 1977. Colonization of the botanical environment by *Klebsiella* isolates of pathogenic origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 34(5):557-563.
- Kovtunovych, G; Lytvynenko, T; Negruțska, V; Lar, O; Brisse, S; Kozyrovska, N. 2003. Identification of *Klebsiella oxytoca* using a specific PCR assay targeting the polygalacturonase *pehX* gene. *Research in Microbiology* 154(8):587-592. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00148-7](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00148-7).
- Kumar, S; Stecher, G; Tamura, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(7):1870-1874.
- Kushalappa, AC; Yogendra, KN; Karre, S. 2016. Plant Innate Immune Response: Qualitative and Quantitative Resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences* 35(1):38-55. DOI: <https://doi.org/10.1080/07352689.2016.1148980>.
- Kwon, S-W; Go, S-J; Kang, H-W; Ryu, J-C; Jo, J-K. 1997. Phylogenetic analysis of *Erwinia* species based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 47(4):1061-1067.
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.

- Lane, D. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley and Sons :115-175.
- Lányi, B. 1988. Classical and Rapid Identification Methods for Medically Important Bacteria (en línea). In Colwell, RR; Grigorova, R (eds.). Academic Press, vol.19, (Current Methods for Classification and Identification of Microorganisms). p. 1-67 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70407-0](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70407-0).
- Laurila, J; Hannukkala, A; Nykyri, J; Pasanen, M; Hélias, V; Garland, L; Pirhonen, M. 2010. Symptoms and yield reduction caused by *Dickeya* spp. strains isolated from potato and river water in Finland. European Journal of Plant Pathology 126(2):249-262. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9537-9>.
- Le Bouguéneq, C; Schouler, C. 2011. Sugar metabolism, an additional virulence factor in enterobacteria. International Journal of Medical Microbiology 301(1):1-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.04.021>.
- Lee, Y-A; Chen, K-P; Chang, Y-C. 2002. First report of bacterial soft rot of white flowered calla lily caused by *Erwinia chrysanthemi* in Taiwan. Plant Disease 86(11):1273-1273.
- Li, J; Chai, Z; Yang, H; Li, G; Wang, D. 2007. First report of *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* as a cause of soft rot of potato in China. Australasian Plant Disease Notes 2(1):71-73. DOI: <https://doi.org/10.1071/DN07029>.
- Liao, C-H. 2005. Bacterial soft rot. CRC Press. p. 133-150.
- Liao, L; Hei, R; Tang, Y; Liu, S; Zhou, J. 2015. First Report of Soft Rot Disease of Peach Caused by *Pantoea ananatis* in China. Plant Disease 100(2):516-516. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-15-0620-PDN>.
- Lin, B; Shen, H; Pu, X; Tian, X; Zhao, W; Zhu, S; Dong, M. 2010. First report of a soft rot of banana in mainland China caused by a *Dickeya* sp. (*Pectobacterium chrysanthemi*). Plant Disease 94(5):640-640.
- Lin, L; Wei, C; Chen, M; Wang, H; Li, Y; Li, Y; Yang, L; An, Q. 2015. Complete genome sequence of endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E. Standards in Genomic Sciences 10:22. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40793-015-0004-2>.



- Luna-Rodríguez, M; Toledo-González, A; Iglesias-Andreu, LG. 2009. Identificación de Enterobacterias Causantes de Pudriciones Blandas en *Cucurbita pepo* L. en Veracruz, México. *Revista mexicana de fitopatología* 27(1):64-68.
- Luo, T; Ou-Yang, X-Q; Yang, L-T; Li, Y-R; Song, X-P; Zhang, G-M; Gao, Y-J; Duan, W-X; An, Q. 2016. *Raoultella* sp. strain L03 fixes N<sub>2</sub> in association with micropropagated sugarcane plants. *Journal of Basic Microbiology* 56(8):934-940. DOI: <https://doi.org/10.1002/jobm.201500738>.
- Ma, B; Hibbing, ME; Kim, H-S; Reedy, RM; Yedidia, I; Breuer, J; Breuer, J; Glasner, JD; Perna, NT; Kelman, A. 2007. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology* 97(9):1150-1163.
- Ma, X; Schloop, A; Swingle, B; Perry, KL. 2018. *Pectobacterium* and *Dickeya* Responsible for Potato Blackleg Disease in New York State in 2016. *Plant Disease* 102(9):1834-1840. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1595-RE>.
- Malathrakis, NE; Goumas, DE. 1987. Bacterial soft rot of tomato in plastic greenhouses in Crete. *Annals of Applied Biology* 111(1):115-123. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1987.tb01438.x>.
- Mandal, K; Maiti, S. 2005. Bacterial soft rot of aloe caused by *Pectobacterium chrysanthemi*: a new report from India. *Plant Pathology* 54(4):573-573. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01193.x>.
- Masyahit, M; Sijam, K; Awang, Y; Ghazali, M. 2009. First report on bacterial soft rot disease on dragon fruit (*Hylocereus* spp.) caused by *Enterobacter cloacae* in peninsular Malaysia. *Int. J. Agric. Biol* 11:659-666.
- McNally, RR; Curland, RD; Webster, BT; Robinson, AP; Ishimaru, CA. 2017. First Report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* Causing Blackleg and Stem Rot in Commercial and Seed Potato Fields in Minnesota and North Dakota. *Plant Disease* 101(9):1672-1672. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0605-PDN>.
- Meng, X; Chai, A; Shi, Y; Xie, X; Ma, Z; Li, B. 2016. Emergence of Bacterial Soft Rot in Cucumber Caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in China. *Plant Disease* 101(2):279-287. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0763-RE>.
- van der Merwe, JJ; Coutinho, TA; Korsten, L; van der Waals, JE. 2010. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg on

- potatoes in South Africa. *European Journal of Plant Pathology* 126(2):175-185. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9531-2>.
- Moleleki, LN; Onkendi, EM; Mongae, A; Kubheka, GC. 2013. Characterisation of *Pectobacterium brasiliensis* causing blackleg and soft rot diseases in South Africa. *European Journal of Plant Pathology* 135(2):279-288. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0084-4>.
- Munoz-Price, LS; Poirel, L; Bonomo, RA; Schwaber, MJ; Daikos, GL; Cormican, M; Cornaglia, G; Garau, J; Gniadkowski, M; Hayden, MK; Kumarasamy, K; Livermore, DM; Maya, JJ; Nordmann, P; Patel, JB; Paterson, DL; Pitout, J; Villegas, MV; Wang, H; Woodford, N; Quinn, JP. 2013. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae carbapenemases*. *The Lancet Infectious Diseases* 13(9):785-796. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70190-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70190-7).
- Nabhan, S; Boer, SHD; Maiss, E; Wydra, K. 2012. Taxonomic relatedness between *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* subsp. nov. *Journal of Applied Microbiology* 113(4):904-913. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05383.x>.
- Nazerian, E; Sijam, K; Mior Ahmad, ZA; Vadamalai, G. 2011. First Report of Cabbage Soft Rot Caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in Malaysia. *Plant Disease* 95(4):491-491. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-10-0683>.
- Nedaienia, R; Fassihiani, A. 2011. Host range and distribution of *Pectobacterium betavascularum* the causal agent of bacterial vascular necrosis and root rot of sugarbeet in Fars province. *Iran. J. Plant Pathol* 47:47-48.
- Ngadze, E; Brady, CL; Coutinho, TA; Waals, JE van der. 2012. Pectinolytic bacteria associated with potato soft rot and blackleg in South Africa and Zimbabwe. *European Journal of Plant Pathology* 134(3):533-549. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0036-z>.
- Ngadze, E; Coutinho, TA; van der Waals, JE. 2010. First Report of Soft Rot of Potatoes Caused by *Dickeya dadantii* in Zimbabwe. *Plant Disease* 94(10):1263-1263. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-10-0361>.
- Nguyen-the, C; Carlin, F. 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 34(4):371-401.

- Nunes Leite, L; De Haan, E; Krijger, M; Kastelein, P; Van Der Zouwen, P; Van Den Bovenkamp, G; Tebaldi, N; Van Der Wolf, J. 2014. First report of potato blackleg caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in the Netherlands. *New Disease Reports* 29:24-24.
- Orskov, I. 1984. Genus V. *Klebsiella* Trevisan 1885, 105AL. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 1:461-464.
- Panda, P; Fiers, M; Armstrong, K; Pitman, A. 2012. First report of blackleg and soft rot of potato caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in New Zealand. *New Dis. Rep* 26(15):2044-0588.
- Patel, JB. 2001. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Pathogen Identification in the Clinical Laboratory. *Molecular Diagnosis* 6(4):313-321. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF03262067>.
- Paulin, J-P. 2000. *Erwinia amylovora*: general characteristics, biochemistry and serology. Fire blight. CABI Publishing, Wallingfod. :87-116.
- Payasi, A; Mishra, NN; Chaves, ALS; Singh, R. 2009. Biochemistry of fruit softening: an overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 15(2):103-113. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12298-009-0012-z>.
- Perombelon, MC; Kelman, A. 1980. Ecology of the soft rot *Erwinias*. *Annual Review of Phytopathology* 18(1):361-387.
- Pérombelon, MCM. 2002. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology* 51(1):1-12. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.0032-0862.2001.Shorttitle.doc.x>.
- Perombelon, MCM; Burnett, EM. 1991. Two modified crystal violet pectate (CVP) media for the detection, isolation and enumeration of soft rot *Erwinias*. *Potato Research* 34(1):79-85. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02358098>.
- Pitman, AR; Harrow, SA; Visnovsky, SB. 2010. Genetic characterisation of *Pectobacterium brasiliensis* causing soft rot disease of potato in New Zealand. *European Journal of Plant Pathology* 126(3):423-435. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9551-y>.
- Pitman, AR; Wright, PJ; Galbraith, MD; Harrow, SA. 2008. Biochemical and genetic diversity of pectolytic enterobacteria causing soft rot disease of potatoes in New Zealand. *Australasian Plant Pathology* 37(6):559-568. DOI: <https://doi.org/10.1071/AP08056>.

- Podschun, R; Pietsch, S; Höller, C; Ullmann, U. 2001. Incidence of *Klebsiella* Species in Surface Waters and Their Expression of Virulence Factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(7):3325-3327. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3325-3327.2001>.
- Pritchard, L; Humphris, S; Saddler, G; Parkinson, N; Bertrand, V; Elphinstone, J; Toth, I. 2013. Detection of phytopathogens of the genus *Dickeya* using a PCR primer prediction pipeline for draft bacterial genome sequences. *Plant Pathology* 62(3):587-596.
- Pu, XM; Zhou, JN; Lin, BR; Shen, HF. 2012. First Report of Bacterial Foot Rot of Rice Caused by a *Dickeya zeae* in China. *Plant Disease* 96(12):1818-1818. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0315-PDN>.
- Ritchie, D. (2000). Bacterial spot of pepper and tomato. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094. PHI-I-2000-1027-01.
- Rivera-Coto, G; Corrales-Moreira, G. 2007. Problemas fitosanitarios que amenazan la conservación de las orquídeas en Costa Rica. *Lankesteriana International Journal on Orchidology* 7(1-2):347-352.
- Rodionov, DA; Gelfand, MS; Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 2004. Comparative genomics of the KdgR regulon in *Erwinia chrysanthemi* 3937 and other gamma-proteobacteria. *Microbiology* 150(11):3571-3590.
- Ronquist, F; Teslenko, M; van der Mark, P; Ayres, DL; Darling, A; Höhna, S; Larget, B; Liu, L; Suchard, MA; Huelsenbeck, JP. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology* 61(3):539-542. DOI: <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.
- Ruiz, HA; Rodríguez-Jasso, RM; Hernandez-Almanza, A; Contreras-Esquivel, JC; Aguilar, CN. 2017. 3 - Pectinolytic Enzymes (en línea). In *Pandey, A; Negi, S; Socol, CR (eds.)*. Elsevier. p. 47-71 DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00003-8>.
- Salazar-Casasa, W; Rivera-Coto, G; Corrales-Moreira, G. 2007. Comparación de los problemas fitosanitarios en orquídeas de poblaciones silvestres y de cultivo, como evaluación de riesgos de plagas o epidemias (en línea). *Lankesteriana* . DOI: <https://doi.org/10.15517/lank.v7i1-2.19565>.
- Schaad, NW; Jones, JB; Chun, W. 2001. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathological Society (APS Press). 373 p.

- Schroeder, BK; du Toit, LJ; Schwartz, HF. 2009. First Report of *Enterobacter cloacae* Causing Onion Bulb Rot in the Columbia Basin of Washington State. *Plant Disease* 93(3):323-323. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-3-0323A>.
- Sharma, N; Rathore, M; Sharma, M. 2013. Microbial pectinase: sources, characterization and applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 12(1):45-60. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9276-9>.
- Shet, AR; Desai, SV; Achappa, S. 2018. Pectinolytic enzymes: classification, production, purification and applications. *Res J Life Sci Bioinform Pharm Chem Sci* 4:337-348.
- Singh, J; Kaur, L. 2016. *Advances in potato chemistry and technology*. 2 nd Edition. United States, Academic press. 752 p.
- Sławiak, M; Łojkowska, E; Van der Wolf, J. 2009. First report of bacterial soft rot on potato caused by *Dickeya* sp.(syn. *Erwinia chrysanthemi*) in Poland. *Plant Pathology* 58(4):794-794.
- Socransky, S; Smith, C; Martin, L; Paster, B; Dewhirst, F; Levin, A. 1994. «Checkerboard» DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 17(4):788-792.
- Staats, M; van Baarlen, P; van Kan, JAL. 2005. Molecular Phylogeny of the Plant Pathogenic Genus *Botrytis* and the Evolution of Host Specificity. *Molecular Biology and Evolution* 22(2):333-346. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msi020>.
- Struve, C; Krogfelt, KA. 2004. Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Environmental Microbiology* 6(6):584-590. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00590.x>.
- Tatusov, RL; Galperin, MY; Natale, DA; Koonin, EV. 2000. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic acids research* 28(1):33-36.
- Toth, IK; Bell, KS; Holeva, MC; Birch, PRJ. 2003. Soft rot *Erwiniae*: from genes to genomes. *Molecular Plant Pathology* 4(1):17-30. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00149.x>.
- Toth, IK; Birch, PR. 2005. Rotting softly and stealthily. *Current Opinion in Plant Biology (Serie Biotic interactions)* 8(4):424-429. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.04.001>.

- Umesha, S; Richardson, PA; Kong, P; Hong, CX. 2008. A novel indicator plant to test the hypersensitivity of phytopathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 72(1):95-97. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.11.002>.
- Valenzuela-Soto, JH; Maldonado-Bonilla, LD; Hernández-Guzmán, G; Rincón-Enríquez, G; Martínez-Gallardo, NA; Ramírez-Chávez, E; Hernández, IC; Hernández-Flores, JL; Délano-Frier, JP. 2015. Infection by a coronatine-producing strain of *Pectobacterium cacticidum* isolated from sunflower plants in Mexico is characterized by soft rot and chlorosis. *Journal of General Plant Pathology* 81(5):368-381. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10327-015-0606-y>.
- Volcy, C. 2008. Genesis and evolution of Koch postulates and their relationship with phytopathology. A review. *Agronomía Colombiana* 26(1):107-115.
- Wakil, SM; Oyinlola, KA. 2011. Diversity of pectinolytic bacteria causing soft rot disease of vegetables in Ibadan, Nigeria. *Journal of Applied Biosciences* 38:2540-2550.
- Waldee, EL. 1945. Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria. *Iowa State College Journal of Science* 19(4):84.
- Waleron, M; Waleron, K; Lojkowska, E. 2014. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* causing soft rot of stored vegetables. *European Journal of Plant Pathology* 139(3):457-469. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0403-z>.
- Waleron, M; Waleron, K; Lojkowska, E. 2015. First Report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* Causing Soft Rot on Potato and Other Vegetables in Poland. *Plant Disease* 99(9):1271-1271. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-15-0180-PDN>.
- Wei, X-Y; Chiu, Y-H; Deng, W-L; Chu, C-C. 2018. First Report of *Dickeya dadantii* Causing Stem Rot of Poinsettia in Taiwan. *Plant Disease* 103(1):143. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-18-0397-PDN>.
- Wei-Salas, S; Durán-Quirós, A. 2015. Characterization of land use in the main agricultural areas of the Major Metropolitan Area of Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 39(1):151-160.
- Weisburg, WG; Barns, SM; Pelletier, DA; Lane, DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology* 173(2):697-703.

- Williams, B; Kabbage, M; Kim, H-J; Britt, R; Dickman, MB. 2011. Tipping the Balance: *Sclerotinia sclerotiorum* Secreted Oxalic Acid Suppresses Host Defenses by Manipulating the Host Redox Environment. PLOS Pathogens 7(6):e1002107. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002107>.
- Winslow, C-E; Broadhurst, J; Buchanan, R; Krumwiede Jr, C; Rogers, L; Smith, GH. 1917. The families and genera of the bacteria: preliminary report of the committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. Journal of Bacteriology 2(5):505.
- Wright, P; Clark, R; Hale, C. 1993. A storage soft rot of New Zealand onions caused by *Pseudomonas gladioli* pv. *alliicola*. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 21(3):225-227.
- Wright, P; Grant, D. 1998. Evaluation of Allium germplasm for susceptibility to foliage bacterial soft rot caused by *Pseudomonas marginalis* and *Pseudomonas viridiflava*. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 26(1):17-21.
- Wright, P; Triggs, C; Burge, G. 2005. Control of bacterial soft rot of calla (*Zantedeschia* spp.) by pathogen exclusion, elimination and removal. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 33(2):117-123.
- Yoon, S-H; Ha, S-M; Lim, J; Kwon, S; Chun, J. 2017. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. Antonie Van Leeuwenhoek 110(10):1281-1286. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0844-4>.
- Yuan, P; Meng, K; Luo, H; Shi, P; Huang, H; Bai, Y; Yang, P; Yao, B. 2011. A novel low-temperature active alkaline pectate lyase from *Klebsiella* sp. Y1 with potential in textile industry. Process Biochemistry 46(10):1921-1926. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.06.023>.
- Zerbino, DR. 2010. Using the Velvet de novo assembler for short-read sequencing technologies. Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.] CHAPTER:Unit-11.5. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1105s31>.
- Zhang, J; Shen, H; Pu, X; Lin, B; Hu, J. 2014. Identification of *Dickeya zae* as a Causal Agent of Bacterial Soft Rot in Banana in China. Plant Disease 98(4):436-442. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0711-RE>.
- Zhang, Y; Fan, Q; Loria, R. 2016. A re-evaluation of the taxonomy of phytopathogenic genera *Dickeya* and *Pectobacterium* using whole-genome

sequencing data. *Systematic and Applied Microbiology* 39(4):252-259. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.04.001>.

Zhao, Y; Qi, M. 2011. Comparative genomics of *Erwinia amylovora* and related *Erwinia* species—what do we learn? *Genes* 2(3):627-639.

Zipfel, C. 2009. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology (Serie Biotic Interactions)* 12(4):414-420. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.06.003>.

Zurbriggen, MD; Carrillo, N; Hajirezaei, M-R. 2010. ROS signaling in the hypersensitive response: when, where and what for? *Plant Signaling & Behavior* 5(4):393-396.



## ANEXOS

### Anexo 1. Características morfológicas y bioquímicas de las cepas aisladas de plantas con síntomas de pudrición blanda.

Cepas	Hospedero	Órgano	Procedencia	TSI	GRAM	Oxidasa	Descripción
6-M2	Cebolla	Seudotallo	Cartago	k/k	-	+	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas opacas de borde regular de 1-3 mm. En MacConkey coloración rojiza-fuxia (fermenta lactosa), colonias redondas con borde regular.
Zt_CP_1	Zucchini	Tallo	Cartago	K/K	-	+	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias amarillas opacas borde irregular. En MacConkey coloración amarilla (no fermenta lactosa), colonias redondas con borde irregular brillantes, superficie redondeada.
Zt_CP_2	Zucchini	Tallo	Cartago	A/A	-	-	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas opacas borde regular. En MacConkey coloración amarilla (no fermenta lactosa), colonias redondas con borde regular y aplanadas
Tf_CP_1	Tomate	Fruto	Cartago	k/k	-	+	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas opacas borde regular de 2-4 mm. En MacConkey coloración amarillo oscuro (no fermenta lactosa), colonias redondas con borde irregular y aplanadas
Tf_CP_2	Tomate	Fruto	Cartago	0	-	-	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas traslucidas borde regular, 1-2 mm. En MacConkey coloración amarillenta (no fermenta lactosa), colonias redondas con borde irregular y aplanadas
Tt_CP-1	Tomate	Tallo	Juan Viñas	0	-	-	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas traslucidas borde regular. En MacConkey coloración amarillenta (no fermenta lactosa), colonias redondas con borde irregular
Tt_CP-2	Tomate	Tallo	Juan Viñas	K/K	-	-	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias amarillentas de borde regular. En MacConkey coloración amarillenta (no fermenta lactosa), colonias redondas con borde irregular y aplanadas
Tt_CP-3	Tomate	Tallo	Juan Viñas	0	-	-	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas opacas borde regular, . En MacConkey coloración amarillenta (no fermenta lactosa), colonias redondas con borde regular
Tt_CP-4	Tomate	Tallo	Juan Viñas	K/K	-	-	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas traslucidas borde regular, 1-2 mm. En MacConkey coloración amarillenta (no fermenta lactosa), colonias redondas con borde irregular y aplanadas
CF1	Chile	Fruto	Cartago	K/K	-	+	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas poco traslucidas, borde regular. En MacConkey coloración amarillenta (no fermenta lactosa), traslucidas, borde regular
CF2	Chile	Fruto	Cartago	A/A	-	-	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas traslucidas, borde regular, alargadas. En MacConkey coloración amarillenta (no fermenta lactosa), traslucidas, borde irregular
CF3	Chile	Fruto	Cartago	K/K	-	+	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas poco traslucidas, borde regular. En MacConkey coloración amarillo oscuro (no fermenta lactosa), opacas, alargadas
CF4	Chile	Fruto	Cartago	K/K	-	-	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas opacas, borde regular. En MacConkey coloración amarillenta (no fermenta lactosa), traslucidas, borde regular
CF5	Chile	Fruto	Cartago	A/A + G	-	-	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas poco traslucidas, borde irregular, apariencia acuosa. En MacConkey coloración amarilla-cafe (no fermenta lactosa), traslucidas, borde regular,
Zt1	Zucchini	Tallo	Cartago	K/K	-	-	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias amarillas opacas de borde irregular de 1-2 mm. En MacConkey coloración amarillenta (no fermenta lactosa), colonias redondas con borde irregular.
Zt2	Zucchini	Tallo	Cartago	K/K	-	-	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas opacas de borde regular de 1-3 mm. En MacConkey coloración rosado claro (fermenta lactosa), colonias redondas con borde regular y planas.
Zt3	Zucchini	Tallo	Cartago	A/A	-	-	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas traslucidas de 1-2 mm. En MacConkey coloración rosado oscuro (fermenta lactosa), colonias redondas con borde regular.

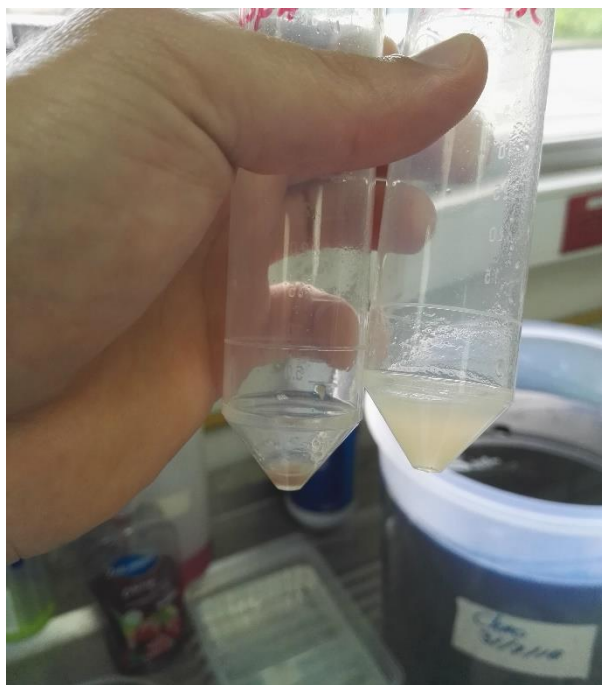
Zt4	Zucchini	Tallo	Cartago	K/K	-	-	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias amarillas traslucidas de borde irregular de 1-2 mm. En MacConkey coloración amarillenta (no fermenta lactosa), colonias redondas con borde regular.
Pt1-A	Papa	Tallo	Tierra Blanca	A/A + G	-	-	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas traslucidas de borde regular de 1-2 mm. En MacConkey coloración fuxia oscuro (fermenta lactosa) colonias redondas con borde regular.
Pt1-B	Papa	Tallo	Tierra Blanca	A/A + G	-	-	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas traslucidas de borde regular. En MacConkey coloración amarillenta (no fermenta lactosa) colonias redondas con borde regular y opacas.
Pt4-1	Papa	Tallo	Tierra Blanca	A/A + G	-	-	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas opacas de borde irregular. En MacConkey coloración fuxia oscuro (fermenta lactosa) colonias redondas con borde regular.
Pt4-2	Papa	Tallo	Tierra Blanca	A/A + G	-	-	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas opacas de borde regular, redondeadas en la superficie y brillantes. En MacConkey coloración rosada (fermenta lactosa) colonias redondas con borde regular.
Pt4-3	Papa	Tallo	Tierra Blanca	K/K	-	-	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas opacas de borde regular de 1-2 mm. En MacConkey coloración amarillenta (no fermenta lactosa) colonias redondas con borde regular y opacas de 1-3 mm.
Pt4-4	Papa	Tallo	Tierra Blanca	K/K	-	+	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas opacas de borde regular. En MacConkey coloración amarillenta (no fermenta lactosa) colonias redondas con borde regular y opacas.
Pt4-5	Papa	Tallo	Tierra Blanca	K/K	-	+	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas opacas de borde irregular alargadas. En MacConkey coloración amarillenta- café (no fermenta lactosa) colonias redondas con borde irregular y opacas.
Pt4-6	Papa	Tallo	Tierra Blanca	K/K	-	+	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas opacas de borde regular redondeadas. En MacConkey coloración amarillenta- café (no fermenta lactosa) colonias redondas con borde irregular y opacas.
Pt4-7	Papa	Tallo	Tierra Blanca	K/K	-	+	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas opacas de borde irregular. En MacConkey coloración amarillenta- café (no fermenta lactosa) colonias redondas con borde irregular, opacas y alargadas.
CfspA	Chile	Fruto	Super Mercado	A/A	-	-	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas traslucidas de borde regular de 1-2 mm. En MacConkey coloración fuxia (fermenta lactosa) colonias redondas con borde regular, redondas, de 1-2 mm.
Cfsaa	Chile	Fruto	Super Mercado	A/A	-	-	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas, opacas, de borde regular de 1-3 mm. En MacConkey coloración rosada tenue (fermenta lactosa) colonias redondas con borde regular.
Csfab	Chile	Fruto	Super Mercado	A/A	-	-	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas y opacas de borde regular de 1-3 mm. En MacConkey coloración rosada (fermenta lactosa) colonias redondas con borde regular.
Iech2A	Chile	Fruto		A/A	-	-	Bacilos gram negativos, en agar nutritivo son colonias blancas y opacas de borde regular de 1-3 mm. En MacConkey coloración rosada (fermenta lactosa) colonias redondas con borde regular.

**Anexo 2.** Estadísticas obtenidas para los ensambladores Velvet y Spades, en los cuales se utilizó contings y scaffolds de k-mer de 33, 55 y 127.

Genome statistics	velvet_K127	velvet_K33	velvet_k55	spades_k127	spades_k21	spades_k33	spades_k55	spades_k127	spades_k21_scaffolds	spades_k33_scaffolds	spades_k55_scaffolds
# contigs	1673	2651	3230	1189	359	306	481	833	330	212	262
# contigs (>= 0 pb)	3360	7105	4812	1585	4917	1278	893	1171	4886	1178	661
# contigs (>= 1000 bp)	266	493	1752	894	316	276	417	664	289	191	237
# contigs (>= 5000 pb)	2	0	54	324	233	199	243	292	223	153	172
# contigs (>= 10000 bp)	1	0	3	144	167	139	151	157	161	117	123
# contigs (>= 25000 pb)	0	0	0	27	69	74	69	46	73	71	72
# contigs (>= 50000 pb)	0	0	0	6	23	27	22	11	26	33	32
Mayor contig	10488	2782	12660	65181	132645	155569	117186	113017	132645	157000	242806
Largo total		2117216	4685279	5636329	5531671	5587610	5634531	5666133	5532972	5590420	5641664
Longitud total (>= 0 pb)			5255238	5758879	5696074	5646955	5692192	5763132	5696504	5647904	5694648
Longitud total (>= 1000 pb)	393975	645111	3630567	5428409	5501364	5566472	5589212	5545721	5504193	5575996	5624209
Longitud total (>= 5000 pb)	15851	0	359289	4088837	5276746	5351336	5142735	4631288	5322101	5475071	5464111
Longitud total (>= 10000 pb)	10488	0	33929	2786888	4810102	4908256	4477870	3683550	4884849	5195204	5090493
Longitud total (>= 25000 pb)	0	0	0	1008779	3164326	3823295	3152605	1969304	3387039	4411391	4252018
Longitud total (>= 50000 pb)	0	0	0	357889	1586581	2108448	1636977	775098	1775797	2983164	2845068
N50	750	809	1791	9785	28984	39842	27421	16974	31448	56317	50043
N75	592	630	1065	4457	17179	21012	12826	6744	18099	30557	25201
L50	572	957	785	148	55	43	57	88	51	30	32
L75	1069	1704	1640	354	117	91	128	227	110	64	72
GC (%)	51.74	60.3	58.06	58.4	58.08	58.17	58.37	58.5	58.07	58.32	58.57

**Anexo 3.** Comparación de los genomas de la cepa *Raoultella terrigena* NCTC 13098 y la cepa Ech2A mediante la herramienta ANI calculator.

Métrico	Valor
Valor de OrthoANiU (%)	99.09
Longitud del genoma A (pb)	5,713,020
Longitud del genoma B (pb)	5,393,760
Longitud alineada promedio (bp)	3,849,166
Cobertura del genoma A (%)	67.38
Cobertura del genoma B (%)	71.36



**Anexo 4.** Precipitados o pellet resultantes de la purificación de enzimas mediante la saturación del sobrenadante con sulfato de amonio.