



**Caracterización del agente causal de la pudrición de bulbo en violeta de los
Alpes (*Cyclamen persicum* Mill.), en viveros de San Antonio del
Tequendama**

Daniel Eduardo Moya Ruiz

Cód. 160207243

**UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA DE INGENIERIA AGRONOMICA
FUSAGASUGA
2016**



Caracterización del agente causal de la pudrición de bulbo en violeta de los Alpes (*Cyclamen persicum* Mill.), en viveros de San Antonio del Tequendama.

**Daniel Eduardo Moya Ruiz
Cod.160207243**

Trabajo de grado, como requisito parcial para la obtención del título de Ingeniero Agrónomo

**Paola Moreno López
I. A., M.Sc. Ciencias Agrarias con énfasis en Fitopatología
Directora**

**UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA DE INGENIERIA AGRONOMICA
FUSAGASUGA
2016**



DEDICATORIA

Al gran misterio de la vida, por darme vida y a mi irreverente conciencia para vivirla.

Habiendo dicho eso, dedico este trabajo que realice con mucha entrega y dedicación:

A la ternura y dedicación de mi madre María Esperanza Ruiz una mujer admirable, su inteligencia no tiene límite. A la fortaleza y sacrificio de mi padre, un hombre inquebrantable, no existe alguien a quien admire más. Merecen esta ofrenda y millones más. Esta es una mínima muestra de mi amor y admiración.

A mis hermanos Eliza Moya Ruiz y Javier Moya Ruiz su apoyo en todas las formas posibles, me ha convertido en un mejor ser humano y sin lugar a duda me ha permitido ser lo que soy con la infinita alegría y agradecimiento con el universo por permitirme ser su hermano. El esfuerzo puesto en este trabajo y la dedicatoria a ustedes es una ofrenda a su paciencia y su fe en mí, los amo.

A María Angélica González y a su infinita nobleza, sin sus palabras de fe y apoyo esto no hubiese podido ser posible, por creer y esperar. Hemos decidido soñar pero también hemos decidido, no dejar en la imaginación nuestros sueños. Haremos nuestros sueños tan reales como sea posible. Eres y serás siempre el amor de mi vida.

A todos los actores del carnaval de mi vida estudiantil, y a todas las personas que de una u otra manera me ayudaron en mi formación, de todos ustedes he aprendido algo espero que la vida pueda retribuir el apoyo que en su momento pudieron darme, solo puedo agradecer y ofrendar con mis palabras, muchas gracias.

Al planeta hogar y más aun a la tierra americana a toda su vida sus plantas y animales a la tradición ancestral de sus pueblos. En mi formación académica encontré su sabiduría, ahora mi vida es un infinito jardín.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a las personas que me apoyaron y creyeron en mis capacidades para desempeñarme como ingeniero agrónomo.

Agradezco especialmente a mi directora de trabajo de grado; la profesora Paola Moreno López por la ayuda, conocimiento y dedicación puesta en este trabajo.

A mi familia por apoyarme incondicionalmente en mi proyecto de vida, a mi compañera de caminos por impulsarme a ser cada vez mejor.

Y por último a todas las personas que desde su cotidianidad colaboraron a que yo pudiera realizarme como persona.

Muchas gracias.



TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

1.	INTRODUCCION.....	15
2.	JUSTIFICACIÓN.....	16
3.	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	17
4.	OBJETIVOS.....	19
4.1.	General.....	19
4.2.	Objetivos específicos.....	19
5.	MARCO TEÓRICO.....	20
5.1.	Clasificación taxonómica (<i>Cyclamen persicum</i> Mill).....	20
5.2.	Origen.....	20
5.3.	Descripción botánica.....	22
5.4.	Usos.....	27
5.5.	Propagación.....	28
5.5.1	Propagación vegetativa.....	28
5.5.2	Propagación por semilla.....	28
5.5.3	Actividades de viverismo en Colombia.....	28
5.6.	Requerimientos edafoclimáticas.....	28
5.7.	Plagas limitantes.....	31
5.8.	Enfermedades limitantes.....	32
5.9.	Bacterias fitopatógenas.....	35
5.10.	Identificación preliminar de bacterias fitopatógenas.....	35
5.11.	Familia Enterobactereaceae.....	38
5.11.1	Genero <i>Erwinia</i>	39
5.11.2	Genero <i>Pseudomonas</i>	39
5.12.	Identificación de bacterias fitopatógenas.....	39
5.12.1	Extracción de bacterias a partir de material vegetal.....	39
6.	MATERIALES Y METODOS.....	42
6.1	Ubicación.....	42
6.2	Material vegetal.....	42



6.3 Aislamiento de bacteria a partir de plantas enfermas.....	43
6.4 Descripción macroscópica y microscópica de colonias.....	43
6.5 Caracterización del género del microorganismo fitopatógeno a través de sus propiedades fisiológicas y bioquímicas.....	43
6.6 Prueba de patogenicidad.....	44
6.7 Tipificación molecular.....	45
7. RESULTADOS Y DISCUSION	46
7.1 Establecimiento de la sintomatología de la pudrición de bulbo.....	46
7.2 Establecimiento de los estados de la enfermedad.....	47
7.3 Objetivo 1.....	49
7.3.1 Establecimiento de colonias <i>in vitro</i>	49
7.3.2 Descripción de colonias en agar nutritivo.....	50
7.3.3 Tinción de Gram.....	51
7.3.4 Aislamiento de colonias Gram negativas por método de siembra por estría.....	52
7.4 Objetivo 2.....	52
7.4.1 Tinción de Gram.....	53
7.4.2 Prueba de KOH.....	54
7.4.3 Medio selectivo Mac Conkey.....	55
7.4.4 Prueba oxidasa.....	56
7.4.5 Prueba ureasa.....	58
7.4.6 Prueba Hugh- Leifsson.....	59
7.4.7 Medio selectivo YGC.....	61
7.4.8 Licuefacción de la gelatina.....	62
7.4.9 Citrato de Simmons.....	63
7.4.10 Prueba Catalasa.....	64
7.4.11 Medio King B.....	65
7.5 Objetivo 3.....	70
7.5.1 Inoculación de rodajas de papa (<i>Solanum tuberosum</i>).....	70
7.5.2 Inoculación de plantas sanas de violeta de los alpes (<i>C. persicum Mill.</i>).....	72
7.6 Tipificación molecular del aislamiento E2M1.....	77
8. CONCLUSIONES.....	82
9. RECOMENDACIONES.....	84



10. BIBLIOGRAFIA.....	85
11. ANEXOS.....	89

LISTADO DE IMAGENES

Imagen # 1. Protocolo para el aislamiento de bacterias fitopatógenas a partir de material vegetal.....	40
Imagen # 2. Clorosis en las hojas de la base.....	46
Imagen # 3. Mancha negra a través de los peciolo.....	46
Imagen # 4. Mancha negra en el peciolo de la plántula.....	46
Imagen # 5. Estado # 1 de la pudrición de bulbo.....	47
Imagen # 6. Ascenso de la mancha negra por los peciolo.....	47
Imagen # 7. Estado # 2 de la pudrición de bulbo.....	48
Imagen # 8. Perdida de turgencia en el estado # 2.....	48
Imagen # 9. Estado # 3 de la pudrición de bulbo.....	48
Imagen # 10. Planta muy afectada por la pudrición de bulbo.....	48
Imagen # 11. Estado # 4 de la pudrición de bulbo.....	49
Imagen # 12. Peciolo totalmente afectados, planta marchita.....	49
Imagen # 13. Aislamiento de colonias según estado y muestra. A. Estado # 1 – muestra # 1.B. Estado # 1 – muestra # 2.C. Estado # 2 – muestra # 1. D Estado # 2 – muestra # 2. E. Estado # 3 – muestra # 1 .F. Estado # 3 – muestra # 2 .G. Estado # 4 – muestra # 1.H. Estado # 4 – muestra # 2.....	50
Imagen # 14. Aislamiento de colonias Gram negativas en siembra por método de estría. A. Estado # 1 – muestra # 1.B. Estado # 1 – muestra # 2.C. Estado # 2 – muestra # 1. D Estado # 2 – muestra # 2. E. Estado # 3 – muestra # 1 .F. Estado # 3 – muestra # 2 .G. Estado # 4 – muestra # 1.H. Estado # 4 – muestra # 2.....	51
Imagen # 15. Fotografía microscópica de bacilos Gram negativos.....	53
Imagen # 16. Resultado de la prueba de KOH. A. Estado # 1 – muestra # 1.B. Estado # 1 – muestra # 2.C. Estado # 2 – muestra # 1. D Estado # 2 – muestra # 2. E. Estado # 3 – muestra # 1 .F. Estado # 3 – muestra # 2 .G. Estado # 4 – muestra # 1.H. Estado # 4 – muestra # 2.....	55
Imagen # 17. Resultado de la siembra en agar Mac Conkey. A. Estado # 1 – muestra # 1.B. Estado # 1 – muestra # 2. C .Estado # 2 – muestra # 1.D estado # 2 – muestra # 2. E.	



Estado # 3 – muestra # 1. F. Estado # 3 – muestra # 2. G Estado # 4 – muestra # 1.H. Estado # 4 – muestra # 2.....	56
Imagen # 18. Resultado de la prueba de oxidasa. A. Estado # 1 – muestra # 1.B. Estado # 1 – muestra # 2. C. Estado # 2 – muestra # 1.D Estado # 2 – muestra # 2.E. Estado # 3 – muestra # 1 .F. Estado # 3 – muestra # 2.G. Estado # 4 – muestra # 1.H. Estado # 4 – muestra # 2.....	57
Imagen # 19. Resultado de la prueba de ureasa. A. Estado # 1 – muestra # 1.B. Estado # 1 – muestra # 2 .C. Estado # 2 – muestra # 1.D Estado # 2 – muestra # 2.E. Estado # 3 – muestra # 1.F. Estado # 3 – muestra # 2 .G. Estado # 4 – muestra # 1.H. Estado # 4 – muestra # 2.....	58
Imagen # 20. Resultado de la siembra en agar de Hugh y Leifsson. A. Estado # 1 – muestra # 1.B. Estado # 1 – muestra # 2.C. Estado # 2 – muestra # 1.D Estado # 2 – muestra # 2. E. Estado # 3 – muestra # 1 F. Estado # 3 – muestra # 2 G. Estado # 4 – muestra # 1. H. Estado # 4 – muestra # 2.....	60
Imagen # 21. Resultado de la siembra en agar selectivo YGC. A. Estado # 1 – muestra # 1. B. Estado # 1 – muestra # 2. C. Estado # 2 – muestra # 1. D Estado # 2 – muestra # 2. E. Estado # 3 – muestra # 1. F. Estado # 3 – muestra # 2. G Estado # 4 – muestra # 1. H. Estado # 4 – muestra # 2.....	61
Imagen # 22. Resultado de la prueba de licuefacción de la gelatina. A. Estado # 1 – muestra # 1. B. Estado # 1 – muestra # 2. C. Estado # 2 – muestra # 1. D Estado # 2 – muestra # 2. E. Estado # 3 – muestra # 1. F. Estado # 3 – muestra # 2. G Estado # 4 – muestra # 1. H. Estado # 4 – muestra # 2.....	62
Imagen # 23. Resultado de la siembra en agar citrato de Simmons. A. Estado # 1 – muestra # 1. B. Estado # 1 – muestra # 2. C. Estado # 2 – muestra # 1. D Estado # 2 – muestra # 2. E. Estado # 3 – muestra # 1. F. Estado # 3 – muestra # 2 .G Estado # 4 – muestra # 1. H. Estado # 4 – muestra # 2.....	64
Imagen # 24. Resultado de la prueba de catalasa. A. Estado # 1 – muestra # 1. B. Estado # 1 – muestra # 2. C. Estado # 2 – muestra # 1. D Estado # 2 – muestra # 2. E. Estado # 3 – muestra # 1. F. Estado # 3 – muestra # 2 G. Estado # 4 – muestra # 1 H. Estado # 4 – muestra # 2.....	65
Imagen # 25 resultado de pigmentos fluorescentes en medio King B. A. Estado # 1 – muestra # 1. B. Estado # 1 – muestra # 2. C. Estado # 2 – muestra # 1. D Estado # 2 – muestra # 2. E. Estado # 3 – muestra # 1. F. Estado # 3 – muestra # 2 .G Estado # 4 – muestra # 1. H. Estado # 4 – muestra # 2.....	66
Imagen # 26 inoculación de colonias en rodajas de papa. A. Espectrofotómetro para uso de escala Mac farland B. Inyección con jeringa de insulina a rodajas de papa C. Rodajas de papa mostrando síntomas de pudrición.....	70
Imagen # 27 rodajas de papa inoculadas después de 24 horas abajo colonias obtenidas por siembra en estría sobre agar Mac Conkey. A. Estado # 1 – muestra # 1. B. Estado # 1 –	



muestra # 2 C. Estado # 2 – muestra # 1.D. Estado # 2 – muestra # 2 E. Estado # 3 – muestra # 1. F. Estado # 3 – muestra # 2 G Estado # 4 – muestra # 1. H. Estado # 4 – muestra # 2.....71

Imagen # 28 inoculación de colonias en plantas sanas de violeta de los Alpes. A. espectrofotómetro para uso de escala Mac farland. B. inyección con jeringa de insulina a plantas sanas de violeta de los Alpes C. Plantas de violeta de los Alpes mostrando síntomas de pudrición.....72

Imagen # 29 sintomatología de las plantas ocho días después de la inoculación. A. Estado # 1 – muestra # 1. B. Estado # 1 – muestra # 2. C. Estado # 2 – muestra # 1. D Estado # 2 – muestra # 2. E. Estado # 3 – muestra # 1. F. Estado # 3 – muestra # 2 G Estado # 4 – muestra # 1. H estado # 4 – muestra # 3.....73

Imagen # 30 sintomatología de las plantas quince días después de la inoculación. A. Estado # 1 – muestra # 1. B. Estado # 1 – muestra # 2. C. Estado # 2 – muestra # 1. D Estado # 2 – muestra # 2. E. Estado # 3 – muestra # 1. F. Estado # 3 – muestra # 2 .G Estado # 4 – muestra # 1. H. Estado # 4 – muestra # 2.....74

Imagen # 31 resiembra total en agar nutritivo resultado de extracción de bacterias a partir de material vegetal. A. Estado # 1 – muestra # 1. B. Estado # 1 – muestra # 2. C. Estado # 2 – muestra # 1. D Estado # 2 – muestra # 2. E. Estado # 3 – muestra # 1 .F. Estado # 3 – muestra # 2. G Estado # 4 – muestra # 1. H. Estado # 4 – muestra # 2.....76

Imagen # 32 Secuencias con alineamientos significativos a la secuencia problema. Se observa un 99% de identidad con el género *Enterobacter* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).77

Imagen # 33 . Secuencias con alineamientos significativos a la secuencia problema. Se observa un 99% de identidad con el género *Enterobacter* (http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-last_interface.cgi).....78

Imagen # 34 Secuencias con alineamientos significativos a la secuencia problema. (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_detailhier.jsp?qvector=204&depth=0¤tRoot=0&querySeq=seqmatch_seq&seqid=&num=20).78

Imagen 35. Árbol de distancias utilizando las secuencias con mayor similitud a la secuencia problema, con respecto a la base de datos del NCBI.....79



LISTADO DE TABLAS

Tabla # 1. Porcentaje de participación de diferentes renglones en el mercado nacional de plantas ornamentales.....	29
Tabla # 2. Características usadas para la identificación de géneros reconocidos de bacterias fitopatógenas las cuales se desarrollan sobre medio estándar.....	37
Tabla # 3. Descripción de colonias en agar nutritivo.....	50
Tabla # 4. Tinción de Gram para diferentes colonias aislados según estado y muestra.....	51
Tabla # 5. Resultado de la prueba de tinción de Gram.....	53
Tabla # 6. Resultado prueba de KOH. (Hidróxido de potasio).....	54
Tabla # 7. Resultado de la siembra en agar Mac Conkey.....	56
Tabla # 8. Resultado de la prueba de oxidasa.	57
Tabla # 9. Resultado de la prueba de ureasa.....	58
Tabla # 10. Resultado de la siembra en agar selectivo de Hugh y Leifsson.....	59
Tabla # 11. resultado de la siembra en agar selectivo YGC.....	60
Tabla # 12. Resultado de la prueba de licuefacción de la gelatina.....	61
Tabla # 13. Resultado de la siembra en medio selectivo de citrato de Simmons.....	62
Tabla # 14. Resultado de la prueba de catalasa.....	63
Tabla # 15. Resultado de pigmentos fluorescentes en medio King B.....	65
Tabla # 16. Resultados totales de pruebas físicas y bioquímicas realizados a los aislamientos obtenidos a partir de estados y muestras seleccionados.....	67

LISTADO DE FIGURAS

Figura # 1. cormos de plantas de violeta de los Alpes.....	22
Figura # 2. Cormos de plantas de violetas de los Alpes.....	22
Figura # 3. Hojas de violeta de los Alpes. A. variedad de flor bicolor. B. variedad de flores crespas. C. variedad de flores jaspeadas.....	23
Figura # 4. Característica de las hojas de ciclamen. A. variedad de hojas verde oscuro y gris. B. variedad de hojas tradicionales. C. Variedad de hojas muy llamativas.....	23



Figura # 5. Cáliz de las flores que aún no han abierto. A. cáliz de plantas de violeta de los Alpes. B. cáliz de plantas de violeta de los Alpes. C. cáliz de plantas de violeta de los Alpes. D. cáliz de plantas de violeta de los Alpes.....	24
Figura # 6. Dirección y forma de la corola.....	25
Figura # 7. Dirección y forma de la corola.....	25
Figura # 8. Fruto de forma globosa de violeta de los Alpes.....	26
Figura # 9. Esquema de la morfología de violeta de los Alpes.....	27
Figura # 10. Violeta de los Alpes en cultivo exterior.	28
Figura # 11. Violeta de los Alpes en cultivo de maceta.....	29
Figura # 12. Violetas de los Alpes afectadas por <i>Botrytis cinerea</i> . A. toma completa B. daño en hojas	33
Figura # 13. Violetas de los Alpes afectadas por <i>Fusarium oxysporum</i> . A. planta totalmente afectada. B. planta con primeros síntomas.....	33
Figura # 14. Sintomatología de afectación por <i>Colletotrichum</i> . A. Toma total de la planta afectada. B. daño en la flor. C. daño en el bulbo.....	34
Figura # 15. Los géneros de bacterias fitopatógenas más importantes y los síntomas que causan.....	36
Figura # 16. Diagrama para identificación de bacterias fitopatógenas.....	41
Figura # 17. Diagrama de clasificación de la familia enterobactereaceae.....	80



RESUMEN

Las especies ornamentales alrededor del mundo se han consolidado como un renglón importante en las actividades agrícolas, países altamente agrícolas como Israel, Holanda, Alemania, Francia y Japón entre otros, han encontrado en estas especies oportunidades de negocio muy rentables y sostenibles en el tiempo. Para Colombia y en particular para el departamento de Cundinamarca esta situación no es ajena. Municipios como San Antonio del Tequendama y Fusagasugá basan parte de su economía agrícola en estas actividades. La violeta de los Alpes (*Cyclamen persicum* Mill.) es una especie muy apreciada por sus flores vivas y particulares. La empresa Plantas y Plantas de Colombia destina un área bastante amplia para la producción en masa de esta ornamental, con un volumen mensual de siembra de 6000 plántulas. Sin embargo, se ha venido presentado una enfermedad que ocasiona la pudrición de bulbo de las plantas, su incidencia es cada vez mayor generando pérdidas de hasta el 50 % de la producción. Debido a lo anterior se planteó caracterizar el agente causal de esta enfermedad. Inicialmente se procedió a observar y describir la sintomatología, determinando 4 estados de severidad de la enfermedad. De cada estado (E) se tomaron dos muestras (M) y se llevaron al laboratorio de microbiología y fitopatología de la Universidad de Cundinamarca para hacer aislamientos de bacterias de tejido enfermo por maceración y siembra en cajas de Petri con agar nutritivo. De las colonias obtenidas se seleccionaron las de color blanco que se encontraban en todas las cajas y que eran Gram negativas, estas se sembraron en agar nutritivo por estría. Cada aislamiento obtenido se sembró en medios selectivos (King B, Huhg y Leifson, YGC, agar Mac Conkey) y se realizaron pruebas físicas y bioquímicas (KOH, catalasa, oxidasa, ureasa, citrato) para hacer la caracterización de los aislamientos hasta género. Para verificar que los aislamientos obtenidos fueran causantes de los síntomas observados se hicieron pruebas de patogenicidad sobre rodajas de papa y plantas sanas de violeta de los Alpes. Adicionalmente, se hizo extracción de ADN, amplificación de 16S rDNA y secuenciación del aislamiento E2M1. Dicha secuencia se comparó con las bases de datos NCBI, Greengenes y RDP y se construyó un árbol de distancias. Los aislamientos E1M1, E1M2, E2M1, E3M1, E3M2 fueron caracterizados como género *Erwinia*, E2M2 y E4M2 como *Pseudomonas* y E4M1 como *Ralstonia*. Todos los aislamientos causaron pudrición tanto en las rodajas de papa como en las violetas de



los Alpes. La secuencia consenso obtenida a partir del aislamiento E2M1 se caracterizó como *Enterobacter* sp.

ABSTRACT

Ornamental species around the world have been consolidated as an important issue in agricultural activities, countries highly agricultural as Israel, the Netherlands, Germany, France and Japan among others, have found in these species business opportunities very profitable and sustainable over time. For Colombia and in particular to the department of Cundinamarca this situation is not stranger. Municipalities such as San Antonio del Tequendama and Fusagasugá based part of its agricultural economy in these activities. The violet of Alps (*Cyclamen persicum* Mill.) is appreciated specie by its flowers alive and individuals. The company Plants and Plants of Colombia intended a fairly broad area for the mass production of this ornamental, with a monthly volume of planting of 6000 seedlings. However, has been presented a disease that causes the bulb-rot plants, its incidence is increasing causing losses of up to 50 % of the production. Due to the foregoing was raised to characterize the causal agent of this disease. Initially proceeded to observe and to describe the symptomatology, determining 4 states of severity of the disease. Of each State (E) it took two samples (M) and were brought to the Laboratory of Microbiology and plant pathology of the Universidad de Cundinamarca to make isolates of bacteria from diseased tissue by maceration and planting in Petri dishes with nutrient agar. The colonies obtained were selected those of white color that were found in all the boxes and that were Gram negative, they were planted in nutrient agar for groove. Each isolate obtained was planted in selective media (King B, Huhg and Leifson, YGC, agar Mac Conkey) and tests were carried out physical and biochemical (KOH, catalase, oxidase, urease, citrate) to make the characterization of the isolates to genera. To verify that the isolates obtained were causing the symptoms observed were made pathogenicity tests on potato slices and healthy plants of violet of Alps. In addition, DNA extraction, amplification of 16S rDNA and sequencing of isolation E2M1 was made. This sequence was compared with the databases NCBI, Greengenes and RDP and was built a distances tree. The isolates E1M1, E1M2, E2M1, E3M1, E3M2 were characterized as *Erwinia*, E2M2 and E4M2 as *Pseudomonas* and E4M1 as *Ralstonia*. All the isolates caused rot in both the



potato slices as in the violets of Alps. The consensus sequence obtained from isolation E2M1 was characterized as *Enterobacter* sp.



1. INTRODUCCION

La violeta de los Alpes o ciclamen (*Cyclamen persicum* Mill.), es una especie tuberosa de la familia Primulaceae, nativa de Palestina, Asia Menor e islas en los mares Egeo y Mediterráneo del este (Larson, 1992). Es un cultivo ornamental de maceta apreciado por su follaje y sus numerosas flores, cada una de estas dura cuatro semanas y la planta puede mantenerse en floración durante meses. (Widmer, 1992). Es un cultivo importante en Europa (Grey-Wilson, 1997), Japón (Koshioka y Masayuki, 1998) y EE.UU. (Boodley, 1996).

En Colombia la violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.) ha sido introducida en su mayoría por comercializadores de semillas y variedades trabajadas por empresas europeas, resaltando el trabajo y la especialidad de MOREL en Francia en el desarrollo de nuevas y mejores cultivares, no siendo esta la única empresa dedicada al mejoramiento genético de este cultivo. Para su cultivo bajo invernadero esta planta ha encontrado condiciones ideales en la región del Tequendama debido a que esta zona se adapta para la producción en masa especialmente el municipio de San Antonio del Tequendama, caracterizándose por su alta actividad económica en viverismo, donde empresas como Fred C. Gloeckner, Guaqueta trading y BALL Colombia comercializan semillas fruto del trabajo de mejoramiento genético de las empresas europeas.

El vivero finca los Alpes, propiedad de la empresa Plantas y Plantas está ubicado en el municipio de san Antonio del Tequendama y se dedica a la producción en masa de ciclamen, con una trayectoria de 12 años en la siembra de esta planta en macetas de 14 centímetros de diámetro y bajo sustratos especializados, con una siembra mensual de 6000 plántulas. Este cultivo como cualquier otro presenta problemáticas agronómicas en relación a su manejo. Desde hace algún tiempo se han encontrado plantas con pudrición de bulbos y finalmente muerte de las mismas, generando un impacto significativo por la reducción de la producción total en promedio en unas 3000 unidades y esto a su vez genera en la empresa valores de pérdida económica de 12 millones de pesos mensuales. (Comunicación personal empresa plantas y plantas 2015).

Este trabajo busca caracterizar el agente causal de esta pudrición blanda de bulbo por medio de pruebas de laboratorio que permitan llegar al nivel taxonómico de género del



microorganismo implicado, con el fin de brindar bases sólidas para el diseño de metodologías de manejo para este patógeno.

2. JUSTIFICACIÓN

Colombia es sin duda un país potencialmente agrícola, son incontables las posibilidades de desarrollo agrícola y sectores de esta misma producción, el sector de la horticultura ornamental en Colombia, está particularmente alejado de los estudios académicos. Las publicaciones de estudios relacionados con las especies ornamentales y sus diferentes eventualidades agronómicas son muy escasas.

En el país La producción y comercialización de plantas en ornamentales se ha instituido fuertemente en dos diferentes municipios en el departamento de Cundinamarca; Fusagasugá, al cual se le conoce como ciudad jardín, por su gran cantidad de viveros y alternativas de diseño de jardines y paisajismo; en donde la mayoría de plantas son de follaje y de gran tamaño además de esto se cultivan en bolsas plásticas. Por otro lado se encuentra el municipio de San Antonio del Tequendama, en donde hace más de 40 años, emprendedores alemanes capacitaron a trabajadores que hoy en día se desempeñan como propietarios de las empresas de mayor incidencia en el mercado de plantas en matera; éste municipio se ha especializado en la producción y comercialización de plantas pequeñas en matera. Ambos municipios proveen hoy a la mayoría de viveros comercializadores del país.

En Colombia no se encuentran fuentes oficiales para la recolección de información acerca del sector del viverismo u horticultura ornamental que esclarezca el área cultivada, su influencia en la economía y el número de empleos que genera; en ese sentido también el número de investigaciones nacionales de las especies cultivadas es muy escaso, para las plantas de materas la información es muy escasa y para la violeta de los Alpes en particular la información de manejo agronómico, las plagas y enfermedades en esta parte del mundo es muy escasa. Ya que el viverismo es una zona relativamente pequeña en la economía agrícola nacional no se había reportado a esta actividad ante el ministerio de agricultura. Solo hasta finales del año 2015 el ministerio de agricultura en actividad conjunta con asocolflores oficializo estas actividades y de esta manera la necesidad de sus estudios académicos a través del primer encuentro nacional de viveristas, el evento



promovió la formalización en todo sentido de las actividades viveristas. Esta situación de informalismo en el sector económico del viverismo no ha promovido las investigaciones oficiales de las especies y problemáticas del viverismo, así por ejemplo no se reportan trabajos de comportamiento de violeta de los Alpes en Colombia Sin embargo, en Europa, estados unidos y algunos países de centro América es una especie muy apreciada por los consumidores y altamente estudiada por los académicos y empresarios que han encontrado en ella una actividad económica rentable. Este trabajo justifica la necesidad de acercar las investigaciones académicas al sector de producción ornamental pues en el seguramente se encontraran muchas oportunidades de desarrollo agrícola para las zonas rurales.

3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La empresa viverista plantas y plantas es una empresa con una tradición de 18 años cultivando plantas de materas, la mayoría del material vegetal que se siembra y propaga en sus fincas es importado por empresas de comercialización que trabajan alrededor del mundo. La empresa ha establecido relaciones comerciales con el representante nacional de the Fred C. Glockner Company y así mismo con la empresa Guaqueta trading. Estas empresas proveen las semillas de violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.) que son productos comerciales principalmente de la empresa de hibridadores franceses Morel.

En la finca productora los Alpes los cultivos de Ciclamen no se separan por variedades y el manejo de plagas y enfermedades no cuenta con el seguimiento de un Ingeniero Agrónomo; esta situación ha generado algunas problemáticas de cultivo causadas básicamente por la falta de métodos de manejo agronómico. Para la fecha la aparición de pudriciones de bulbo; es una de las más grandes limitantes en el desarrollo del cultivo y genera pérdidas económicas representativas para la empresa. Teniendo en cuenta que la finca los Alpes está manejando un volumen de producción de 6000 plántulas mensuales, las cuales una vez culminado su proceso de producción en materas de 14 centímetros de diámetro al cabo de 48 semanas después de la siembra, tienen un precio en el mercado de 4000 pesos por unidad. Sin embargo, por acción del agente fitopatogeno y así mismo por el desconocimiento de su identidad, la empresa está perdiendo en el proceso un promedio de 3000 plantas, esto es sin duda una limitante en la actividad económica de la empresa y solicita la atención de académicos afines a las problemáticas con el fin de



caracterizar el agente causal de la enfermedad en las plantas y consolidar esta información como la herramienta base para el diseño de protocolos de manejo integrado para la enfermedad en este cultivo. (Comunicación personal 2015).

Este trabajo busca generar investigación para el sector de las plantas ornamentales, ya que en el departamento de Cundinamarca y en el territorio nacional los viveros se convierten en alternativas para la vida rural importantes dentro de la economía agrícola, es por eso que los profesionales en ciencias agrarias no deben dejar de lado el estudio de estas especies cultivadas y de muchas otras con potencial ornamental.



4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar el agente causal de la pudrición de bulbo en violeta de los Alpes (*Cyclamen persicum* Mill.), presente en viveros de san Antonio del Tequendama.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Reconocer las características morfológicas de las colonias en medio de cultivo.
- 2 Caracterizar el género del microorganismo Fitopatógeno a través de sus propiedades fisiológicas y bioquímicas.
- 3 Realizar pruebas de patogenicidad a las colonias obtenidas en los medios de cultivo.



5. MARCO TEÓRICO

5.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

La taxonomía del género *Cyclamen* está sin resolverse, en gran parte por su heterogeneidad genética. Se han descrito 20 especies.

Reino: vegetal

División: Traqueofitas

Clase: Magnoliopsida

Orden: Ericales

Familia: Primuláceas

Género: *Cyclamen*

Especie: *C. persicum*

Nombre común: violeta de los Alpes, violeta imperial o ciclamen (<http://www.itis.gov>
Consultado Octubre 2015)

5.2 ORIGEN

La primera mención de la especie aparece en reportes del siglo XV. Fue introducida a Europa Occidental como artículo para coleccionistas a principios del siglo XVII. Su mejoramiento se inició a mediados del siglo XIX, cuando la planta comenzó a tener importancia económica. Los primeros estudios del violeta de los Alpes se remontan hasta 1949, cuando en un reporte se menciona que la especie original *Cyclamen persicum* es nativa de Palestina, Asia Menor, Islas de los mares Egeo y del Mediterráneo del Este. En su hábitat, el violeta de los Alpes permanece en forma latente en los veranos calientes y secos, desarrolla nuevo follaje en respuesta a las lluvias de otoño y a las temperaturas más frescas. La floración continúa hasta el inicio del calor seco, provocada por las condiciones de verano, bajo las cuales las plantas duran floreado de dos a tres años. *Cyclamen* es un género de 20 especies dentro de la familia Primulaceae; en estado silvestre su distribución se centra en el Mediterráneo (Flores *et al*; 1998).



El cultivo de violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.) inició de manera comercial a mediados del siglo XIX. Los trabajos de selección y cruzamiento dieron como resultado flores de mayor tamaño, en comparación con la especie silvestre. La mayoría de estos trabajos comenzaron en Inglaterra y en los países bajos. El ciclamen, es una especie que destaca por sus características estéticas, larga duración y alto valor en el mercado. A juicio de muchos, es una planta muy hermosa, no sólo por sus flores de diversos colores y gran duración en maceta, sino también por su follaje. Cada flor suele durar cuatro semanas sin perder frescura y lozanía, y la planta puede mantenerse floreciendo durante cuatro meses. Quien obsequia una maceta de ciclamen da un espléndido ramo de flores vivas, que suele adquirir a un precio menor que un ramo de flores cortadas, pero que agradará los sentidos durante meses (Flores *et al*; 1998).

Originaria del Medio Oriente, la violeta de los Alpes crece de forma natural en países como Palestina, Siria, Israel, Grecia, Turquía, Túnez, e incluso en las islas del Mediterráneo: Rodas, Chipre, Sicilia. Pero no crece en Irán, antigua Persia, Como haría suponer su nombre científico. Fue introducida en Europa a fines del siglo XVI e inicios del XVII, pasando primero por Francia o por Gran Bretaña. Las opiniones varían. Tras cierto descuido en el siglo siguiente, la violeta de los Alpes vuelve a estar de moda en Francia en los años 1900. Pero desde 1860 aparecen en Inglaterra, y luego en Alemania. Las primeras variantes del ciclamen botánico o "silvestre", con flores mucho más gruesas y colores variados; ellos son los ancestros de las variedades actuales. Hoy día, nuevos métodos de cultivo y de obtención de nuevas variedades ofrecen floraciones más largas, más vigorosas, más regulares y una amplia gama de colores (www.cyclamen.com, consultado Octubre 2015).

La empresa MOREL se especializa en la selección y el cultivo de ciclámenes desde hace más de 90 años en el Sur de Francia. Esta selección es de un carácter único en cuanto a su resistencia al calor. Hasta 1975, Charles Morel había desarrollado una selección tradicional, Luego, Guy Morel perfeccionó los métodos de selección modernos para obtener híbridos (para la selección y producción de cada variedad se necesitan de 8 a 10 años de trabajo). Los primeros híbridos F1Ch.Morel salieron al mercado en 1989 y hoy son reconocidos mundialmente (www.cyclamen.com, consultado Octubre 2015).

5.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Cormo. El cormo de la violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.) es redondo y deprimido por los polos, de superficie áspera, algo fisurado y suberoso cuando madura (Figuras 1 y 2); con un sistema radicular numeroso, emitido desde la base (Flores *et al*; 1998).



Figuras 1 y 2. Cormos de violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.) (Flores *et al*; 1998).

Hojas. Un cotiledón se encuentra en el embrión. La primera hoja verdadera se desarrolla en forma opuesta al cotiledón. Los cotiledones se asemejan a las hojas verdaderas. Las hojas suelen ser redondas, con ligera forma acorazonada y de aspecto carnosos, en el haz su coloración forma dibujos en verde y blanco mármol. Los peciolo son carnosos, de diferentes longitudes y confieren a la vegetación forma circular. Todas las hojas de violeta de los Alpes son basales (nacen directamente del tubérculo); cuando emergen, la lámina de la hoja está plegada hacia dentro, con las dos mitades situadas lado a lado (ver Figuras 3 y 4), pero a medida que la hoja aumenta de tamaño (Flores *et al*; 1998).



Figura 3 A, B, C Hojas de violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.) (Moya 2016)



Figura 4 A, B, C características de las hojas de violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.) (Moya 2016)

Cáliz. Consiste de cinco sépalos simples y pequeños; iguales en tamaño y forma; y generalmente elípticos, lanceolados, con un ápice puntiagudo, unidos en la base, cerca de donde el cáliz se conecta con el pedúnculo (ver Figuras 5 A, B, C y D). Los sépalos siempre son glandulares, en ocasiones muy densamente. Los sépalos se aprietan estrechamente en la pared

del tubo de la corola y generalmente son más o menos de la misma longitud que el tubo; cuando la corola se cae, éste se pierde (Flores *et al*; 1998).

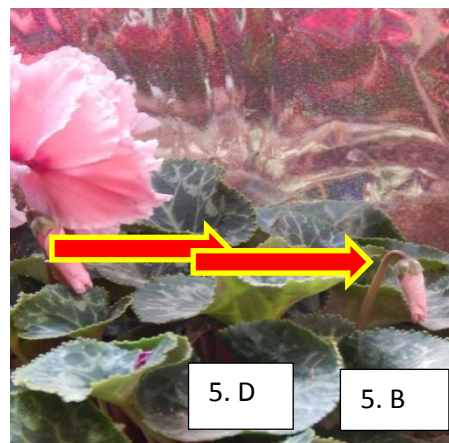
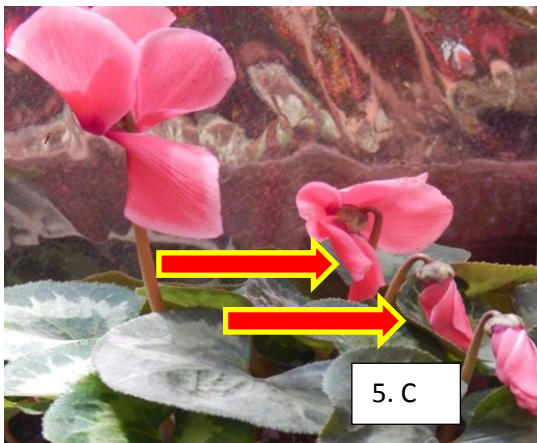
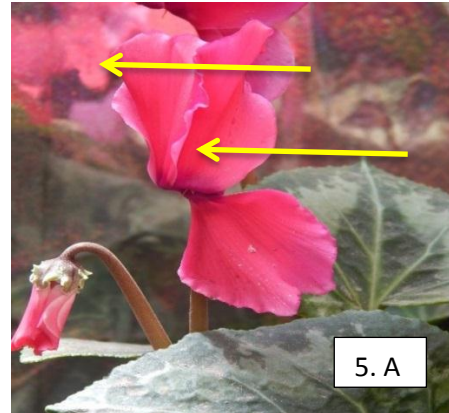
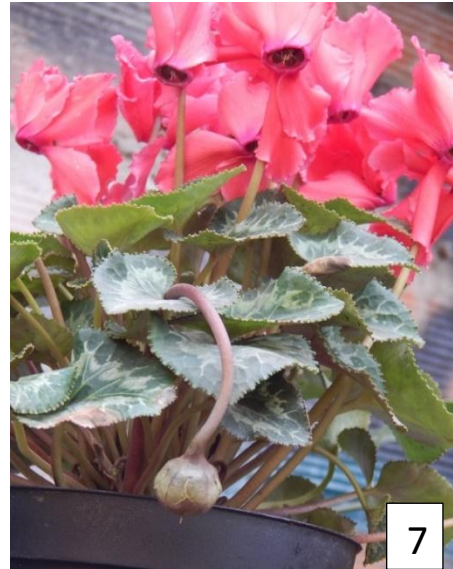
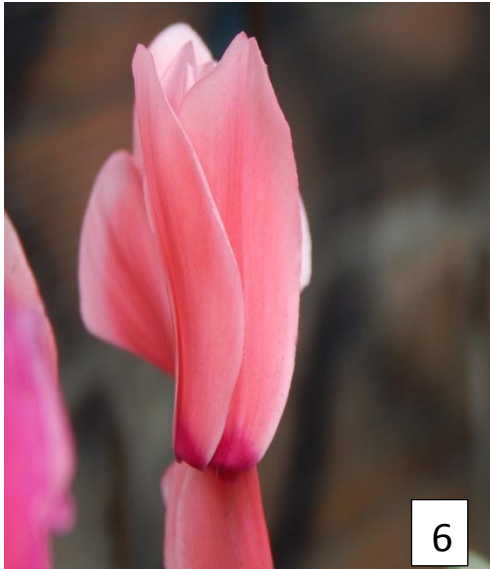


Figura 5. (A, B, C, D). Plantas de Violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.) donde se aprecia el cáliz cuando las flores aún no han abierto. (Moya 2016).

Corola. Es la parte más llamativa de la flor, a menudo con un color brillante. En flores normales existen cinco pétalos fusionados en la base, en un tubo corto ligeramente globoso que aloja los estambres y el ovario. En botón, la corola es recta y apunta hacia abajo, con los pétalos envueltos entre sí, en forma de espiral (torcidos), pero cuando se despliegan se doblan al revés y al mismo tiempo se tuercen. Los pétalos apuntan hacia atrás, con lo que dejan la boca de la corola abierta, apuntando hacia abajo y protegida de la lluvia (ver Figuras 6 y 7). El color de la corola va de blanco a rosa, en algunas ocasiones se presenta un rojo carmín; las formas más pálidas a menudo manifiestan una zona rosa o morada alrededor de la boca. Los pétalos varían en forma, desde oblongo a

elíptico o estrechamente lanceolado, de moderada a notablemente torcidos, de 2 a 3.7 centímetros de largo (mucho más largos en algunas variedades), sin aurículas en la base (Flores *et al*; 1998).



Figuras 6 y 7 dirección y forma de la corola de Violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.) (Moya 2016).

Frutos. El fruto de la violeta de los Alpes es globoso, con el cáliz adherido en la mitad basal. Es bastante duro, hasta la madurez, y se describe a menudo como leñoso, pero la cápsula es carnosa (ver Figura 8). Cuando madura, el fruto se hiende regularmente en el ápice en dientes pequeños y triangulares que se vuelven hacia atrás para descubrir las semillas. El fruto es lento para desarrollarse y en todas las especies (sin importar cuándo florecen) las cápsulas maduran alrededor de cuatro meses (Flores *et al*; 1998).



Figura 8 Fruto de forma globosa de la Violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.) (Moya 2016).

Semillas. Las semillas en desarrollo están embebidas en una pulpa blanca que se torna más suave a medida que el fruto madura; inicialmente son blancas, pero antes de que los frutos maduren son de color miel y después se vuelven café oscuro. Su número varía un poco de cápsula a cápsula y de especie a especie. Cuando las cápsulas abren las semillas son gordas y carnosas, y están cubiertas de un mucílago pegajoso y azucarado que atrae a hormigas, avispas y a otros insectos que actúan como agentes de dispersión. En condiciones secas, después de dos o tres días las semillas son menos pegajosas y cuando se oscurecen se encogen en magnitud, después de 15 días más, la pegajosidad se elimina (Flores *et al*; 1998).

Las semillas de violeta de los Alpes son de 3 a 4 milímetros de largo y de 2 a 3 milímetros de ancho. Contienen un pequeño embrión recto con un solo cotiledón, que está encerrado en un endospermo, rodeado por una delgada cubierta seminal. Después de la germinación del hipocótilo se presenta inmediatamente un pequeño tubérculo. El peso de las semillas varía en cada genotipo: mil semillas pesan de 11 a 14 gramos, esto en la mayoría de los tipos de mediana y gran floración (Flores *et al*; 1998).

Porte. La violeta de los Alpes es una planta de porte herbáceo, las flores tienden a disminuir de tamaño conforme aumenta la edad de la planta. La altura de la planta es de 30 a 40 centímetros y presenta debajo de los cormos raíces fibrosas (Figura 9) (Flores *et al*; 1998).

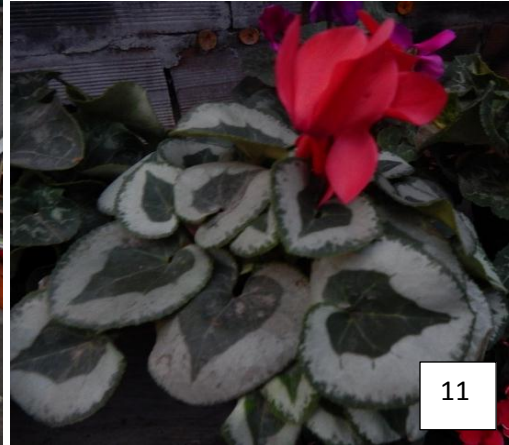


Figura 9. Esquema general de la morfología de la Violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.) (Flores *et al*; 1998).

5.4 USOS. La violeta de los Alpes es una planta de maceta que se puede cultivar en el jardín (Figura 10), ya que soporta el frío; pero también es muy popular en interiores con buena iluminación (Figura 11) (Flores *et al*; 1998).



10



11

Figuras 10 y 11. Violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.) como cultivo de exterior o en maceta (Moya 2016).

5.5 PROPAGACIÓN

En la actualidad la reproducción se realiza principalmente por semilla. La propagación por partida de bulbos resulta demasiado laboriosa y poco práctica, y sólo se efectúa con el propósito de mantener clones específicos con fines de mejoramiento (Flores *et al*; 1998).

5.5.1. PROPAGACIÓN VEGETATIVA. La propagación vegetativa en violeta de los Alpes es muy compleja. En el caso de ciclamen se ha detectado que algunos brotes florales pueden desarrollarse en los lados del cormo, inclusive se desarrollan raíces y hojas, sin embargo este proceso es muy lento. La inducción de un proceso acelerado de estos brotes permitiría una propagación vegetativa con bastante potencial. Es importante mencionar que los cotiledones cortados de los cormos enraízan bien, pero las hojas verdaderas no. La división del cormo es un método más complicado y con más riesgos en cuanto a incidencia de enfermedades se refiere, así como también presenta un alto riesgo de perder la planta madre (Flores *et al*; 1998).

5.5.2. Propagación por semilla. La principal forma de propagación de la violeta de los Alpes es por semilla, que se obtiene generalmente por polinización cruzada. Cuando el fruto se encuentra suave al tacto y de color café la semilla debe presentar una coloración café brillante. Ése es el momento recomendable para cosechar. La siembra debe efectuarse en bandejas con de 3 centímetros. La semilla se cubre con sustrato con pH



próximo a 6. Se recomienda aportar un abono completo con micro elementos y aplicar fertirriego con pequeñas concentraciones de nutrientes. El tiempo de germinación es de cuatro semanas. La aparición de las primeras hojas se produce entre los 80 y 90 días después de la siembra (Flores *et al*; 1998).

5.5.3 Actividades de viverismo en Colombia.

En Colombia el viverismo es un sector importante de la economía en muchos municipios, uno de los casos más relevantes es san Antonio del Tequendama. Para el 2012 el plan de ordenamiento territorial (POT) en San Antonio del Tequendama reportaba que el 55% de las actividades económicas rurales corresponden a la agricultura y de ese 55%, el 13% lo representa la producción de plantas ornamentales en vivero. Estas empresas son de carácter familiar en su mayoría y muchas de ellas no cuentan con tecnología ni asesoría profesional especializada y se han desarrollado en función de un mercado informal de plaza de mercado tradicional. El POT definía la actividad económica del viverismo en este municipio como un renglón económico importante por la generación de empleo e ingresos para la economía de la región. Según la Secretaría de Salud de San Antonio del Tequendama; actualmente existen 20 empresas formales de viveros establecidos en el Municipio, donde sus dueños están asociados en la organización AVITEQ, comercializan con todo el país y venden directamente a sus clientes en plazas de mercado como la de Paloquemao (comunicación personal).

El sector del Tequendama no es la única zona en Colombia que se dedica a la producción ornamental en materas; zonas como Antioquia, el eje cafetero y la sabana de Bogotá también participan en la producción a continuación se describe su participación en el mercado nacional.



Tabla # 1 porcentaje de participación de diferentes regiones en el mercado nacional de plantas ornamentales.

Zonas de Siembra	Participación
Tequendama (Santandercito)	70%
Antioquia	15%
Otros (Sabana de Bogotá, Costa, Eje Cafetero)	15%

Comunicación personal con proveedores de material genético.

En estos momentos la mayoría de productores de plantas en materia se han especializado en la producción en masa en contenedores convencionales y homogéneos, la producción en masa ha generado un crecimiento de las áreas cultivadas y una demanda de estructuras cada vez más constante dando un indicativo de crecimiento constante de la actividad no solo en Colombia si no en el mundo; es el caso de México por ejemplo. Donde se reportan 6,500 ha dedicadas a la horticultura ornamental. Morelos es el primer productor de plantas ornamentales y de flor en maceta, ocupando 32%, o sea 2,100 has las cuales son ocupadas con 2,200 viveros distribuidos en toda la entidad donde producen más de 1,000 especies y generan 11,000 empleos, el 40% de los cuales lo ocupan mujeres. En estas 2,100 has, el 58% se cultivan a cielo abierto (1,218 ha), el 20% bajo invernadero (420 ha) y 22% a media sombra (462 ha). Algunas empresas que tienen arriba de 10 has de producción de plantas en maceta bajo invernadero, malla sombra o a cielo abierto, sin embargo, la superficie promedio por productor es de 3,000 a 5,000 m². (Memorias del IV Simposio Nacional de Horticultura. MEXICO).

5.6 REQUERIMIENTOS EDAFOCLIMATICOS

Temperatura. La temperatura óptima para la germinación de la semilla de violeta de los Alpes es de 15 °C. Se recomienda evitar temperaturas por encima de 23 °C, ya que tienden a inhibir la germinación y provocan que la plántula tenga un crecimiento desigual. Después de la germinación de la semilla, la temperatura óptima para su crecimiento es de 18 a 20 °C (Flores *et al*; 1998).



Luz. La germinación de la semilla de violeta de los Alpes es inhibida por la irradiación continua de luz blanca. El nivel de luz que satisface a la planta en la etapa de crecimiento es de 40 mil luxes (Flores *et al*; 1998).

Humedad. Antes de la siembra se recomienda remojar las semillas en agua (a 24 °C) durante toda una noche, después debe conservarse húmedo el sustrato. Se sugiere una humedad relativa de 80 a 90% (Flores *et al*; 1998).

PH. El pH ideal es de 5.6 a 5-8. Debido a que éste no es estable durante el crecimiento de violeta de los Alpes es necesario monitorearlo periódicamente (Flores *et al*; 1998).

Sustrato. Para el crecimiento la planta prefiere un sustrato que siempre este húmedo, pero que también drene bien, con la mejor aireación u oxigenación posible y buena conductividad de calor, de lo contrario se produce un crecimiento débil y se promueve la presencia de enfermedades. Se debe evitar que el sustrato quede seco, pues se provocaría marchitamiento severo, amarillamiento de hojas y aborto de botones florales (Flores *et al*; 1998).

Fertilización. Las exportaciones de elementos nutritivos de la violeta de los Alpes se cifran en miligramos por planta para 12 o 13 meses de cultivo. Con frecuencia, un exceso de nitrógeno provoca un importante desarrollo foliar. Para los ciclámenes miniaturas cultivados en siete u ocho meses los requerimientos de nitrógeno oscilan entre 200 y 300 miligramos por planta (Flores *et al*; 1998).

5.7 PLAGAS LIMITANTES

Ácaros (*Steneotarsonemus pallidus* Banks). El principal daño de esta plaga es causado por las larvas que emergen en los brotes, de donde se alimentan. La incidencia de esta plaga en violeta de los Alpes se manifiesta en las partes meristemáticas que aparecen necrosadas y en el desarrollo de hojas deformes y amarillentas. Las flores tampoco se desarrollan (Flores *et al*; 1998).



Trips. (*Frankliniella occidentalis* Pergande). Son insectos pequeños, angostos y alargados; generalmente se encuentran en botones florales y flores (Flores *et al*; 1998).

Araña roja (*Tetranychus urticae*). Después de la infestación de este insecto se desarrollan puntos amarillos o cafés en el follaje. En puntos avanzados se forman redes de hilos sedosos. La araña roja generalmente se encuentra en el envés de hojas y flores; Es posible el control biológico mediante otro ácaro *Phytoseiulus persimilis* (Flores *et al*; 1998).

Mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood). Plaga común en hortalizas y ornamentales. Su control es importante ya que puede ser un vector de virus (Flores *et al*; 1998).

5.8 ENFERMEDADES

Dentro de los principales problemas que surgen en la producción de violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.) se encuentran algunas enfermedades provocadas por virus, bacterias y hongos transmitidos por plagas, con un impacto significativo en el cultivo (Flores *et al*; 1998).

Pudrición de la corola (*Botrytis cinerea*). Es una descomposición blanda de flores, hojas y frecuentemente de la corola. Las partes afectadas generalmente se cubren con un hongo gris. También provoca la mancha de las flores (ver Figuras 12 A, B y C). El desarrollo de *Botrytis* es estimulado por alta humedad, poca circulación de aire, plantas amontonadas, falta de fertilización y por una temperatura nocturna por debajo de los 16 °C (Flores *et al*; 1998).



Figura 12 A, B plantas de la Violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.) afectadas por *B. cinerea* (Flores *et al*; 1998).

Marchitamiento por *Fusarium oxysporum* y/o *Fusarium cyclaminis*.

Cuando se presenta este hongo en violeta de los Alpes, la hoja del cotiledón se vuelve amarilla; esto generalmente se confunde con su caída natural. En las hojas adultas (de seis a siete meses) esta enfermedad generalmente comienza con una coloración amarillenta en la base de la lámina de la hoja (ver Figura 13 A y B), los puntos se alargan y se puede presentar una decoloración en las raíces, los cormos adquieren un color café rojizo y posteriormente se tornan amarillos. Estos síntomas se ven limitados hasta la etapa de floración, cuando la planta se marchita rápidamente (Flores *et al*; 1998).





Figura 13 A, B Plantas de la Violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.) afectadas por *Fusarium oxysporum* (Flores *et al*; 1998).

Colletotrichum gloeosporoides. Los primeros síntomas visibles se observan en las hojas jóvenes, las cuales presentan deformaciones y tejidos necróticos. La infección del cormo se caracteriza por manchas negras que aumentan de tamaño rápidamente. En la flor, *Colletotrichum gloeosporoides* deseca el cáliz; en el escapo, la infección se presenta como una mancha amarilla-naranja, que pronto se vuelve café oscura o negra, los escapos se curvan y agrietan. Los pedúnculos de las hojas presentan los mismos

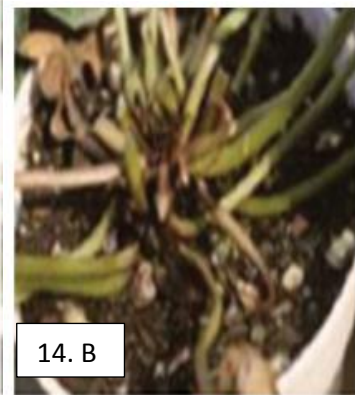
síntomas que los escapos (ver Figura 14 A y B), (Flores *et al*; 1998).



14. A



14. A



14. B

Figura 14 A, B, C sintomatología de *Colletotrichum gloeosporoides* en plantas de la Violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.) (Flores *et al*; 1998).

Podredumbre de raíz. Enfermedad causada por el hongo *Thielaviopsis basicola* Berk, que provoca el marchitamiento y pérdida de color de las hojas, e incluso la detención del crecimiento de la planta por la destrucción del sistema radical. El control preventivo consiste en la desinfección del sustrato, evitar los encharcamientos, riegos y abonados excesivos, particularmente con bajas temperaturas (Flores *et al*; 1998).

Pudrición blanda (*Erwinia carotovora*). En las condiciones agroclimáticas del estado de Morelos en México esta enfermedad provoca un marchitamiento repentino y colapso de la planta; parte del bulbo se puede volver blando y acuoso, mientras que las raíces están intactas. Los pecíolos y escapos florales también se pueden volver blandos y acuosos.



Cuando se presenta pudrición blanda se pueden apreciar manchas aceitosas en las hojas. Altas temperaturas estimulan el progreso de esta enfermedad, mientras que el espaciamiento apropiado, evitar salpicar con agua, así como eliminar plantas enfermas disminuyen la incidencia de la bacteria *Erwinia carotovora*. (Flores *et al*; 1998). Para Colombia no existen registros de esta enfermedad en este cultivo, cabe resaltar que las especies ornamentales han sido muy poco estudiadas y que su comportamiento en las diferentes condiciones agroclimáticas de los diferentes sectores de producción son una amplia fuente de estudios académicos en razón de un sector de la economía rural que se encuentra en continuo crecimiento.

5.9 BACTERIAS FITOPATÓGENAS

Las pérdidas de cosechas causadas por bacterias fitopatógenas son de menor importancia que las causadas por agentes fungicos y virales. Los ejemplos incluyen la marchitez bacterial en papa, tomate y otras cosechas ocasionada por *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum*, y el tizón de las peras ocasionada por *Erwinia amylovora*. Se han reportado severas pérdidas en cosechas de alimentos importantes como arroz por *Xanthomonas campestris p.v oryzae*, en trigo por *Pseudomonas syringae*. En soya por *P. siringe pv. glycines*, en yuca por *P. syringae pv. manihotis* y en papa por *Erwinia carotovora*. En la mayoría de los casos las pérdidas son principalmente por pudrición en el almacenaje. La importancia económica de las enfermedades bacteria es mayor en las regiones de clima subtropical que en las de clima templado (Billings 1987).

Entre las principales enfermedades causadas por bacterias Fitopatógenas se encuentran marchitez vascular, cáncer, agallas, pudriciones blandas, entre otras (Billings 1987).

5.10 IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS

Síntomas asociados a bacterias

Las bacterias fitopatógenas producen diferentes síntomas en las plantas infectadas, tanto como los hongos. Entre los más comunes se encuentran los moteados, tizones, pudriciones blandas marchitez de plantas, agallas, sarnas y chancros. Muchos de estos

síntomas pueden estar asociados a uno o más de los géneros de bacterias y una bacteria del mismo género puede causar diferentes síntomas. De tal modo que la identificación de estos agentes causales debe ser realizada por laboratorios de diagnóstico fitopatológico especializado (Agrios, 1997)

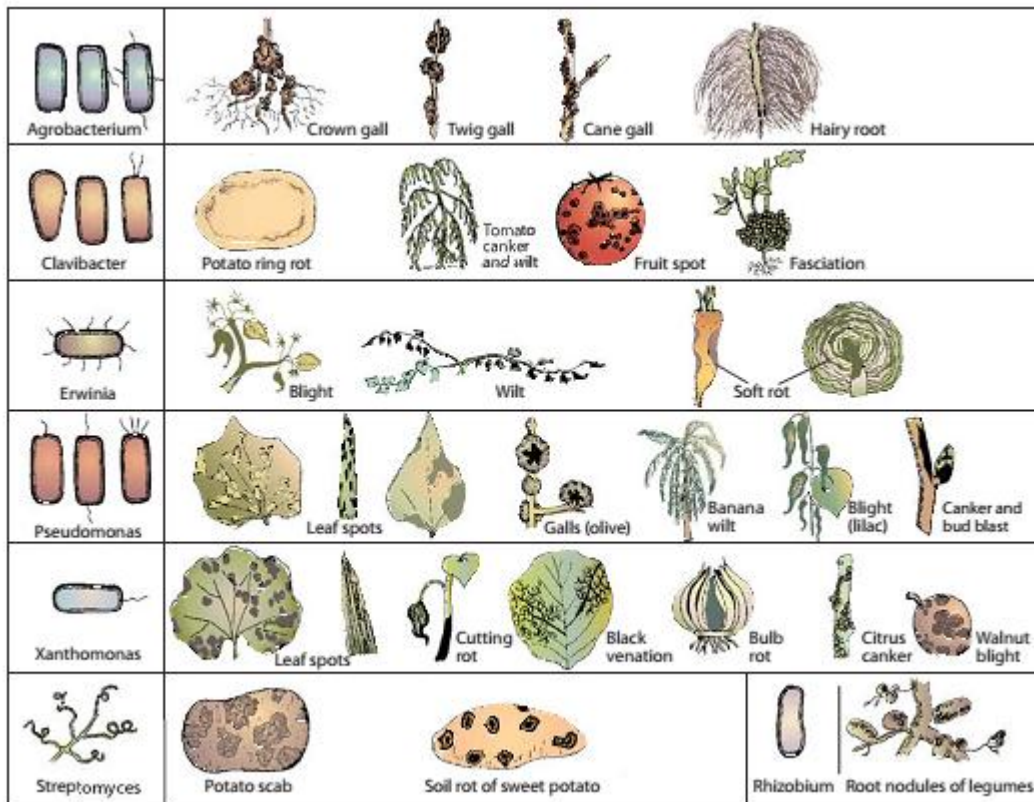


Figura 15. Los géneros de bacterias Fitopatógenas más importantes y los síntomas que causan (Agrios, 2005).

Las bacterias Fitopatógenas convencionales se dividen en dos grupos:

1. Aquellas que se desarrollan en un medio bacteriológico estándar
2. Aquellas que no se desarrollan en un medio bacteriológico estándar. (Schaad 1998).

Los géneros dentro del primer grupo son relativamente fáciles de diferenciar entre sí con base en la coloración de Gram, presencia de esporas, presencia de flagelos, desarrollo aeróbico y anaeróbico y características de la colonia sobre ciertos medios de agar. La coloración de Gram está relacionada con las propiedades estructurales y químicas de la



pared celular y estas características sirven como paso básico y rápido de identificación inicial de bacterias fitopatógenas. La coloración de Gram es muy importante cuando se identifica una bacteria que es desconocida y es un procedimiento que no debe ser omitido (Schaad 1998).

La prueba de anaerobiosis es clave para la identificación de los géneros *Erwinia* y *Clostridium*. También la presencia de esporas es una prueba importante para la identificación de bacterias Gram positivas. (Schaad 1998).

Los miembros del segundo grupo se diferencian inicialmente sobre las siguientes bases:

- a) Desarrollo sobre medio complejo
- b) Presencia o ausencia de pared celular
- c) Morfología helicoidal

Tabla # 2. Características usadas para la diferenciación de géneros reconocidos de bacterias fitopatógenas, las cuales se desarrollan sobre un medio estándar.

Características	<i>Erwinia</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>xanthomonas</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Clavibacter</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Streptomyces</i>
Colonias amarillas o naranjas sobre medio NGA, YDC o NBY	v-	-	+a	-	+b	-	-	-
Pigmento fluorescente sobre KB	-	v+	-	-	-	-	-	-
Desarrollo anaeróbico	+	-	-	-	-	+	+	-
Desarrollo aeróbico	+	+	+	+	+	-	+	+
Más de 4 flagelos peritricos	+	-	-	-	-	v+	V+	-
Desarrollo sobre medio DIM	-	-	-	+	-	-	-	-
Tinción de Gram	-	-	-	-	+	+	v+	+



Presencia de esporas	-	-	-	-	-	+	+	-
Micelio aéreo	-	-	-	-	-	-	-	+

(Tomado de Schaad, 1998).

V, variable de un 21 a 79 % positivo

a, colonias de los *patovares manihotis* y *mangiferaeindicae* son poco coloreadas.

b, colonias de *clavibacter michiganense subsp. sepedonicum* son generalmente coloreadas

5.11 FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE

Las bacterias del grupo entérico forman un conjunto heterogéneo de microorganismos que comprende importantes patógenos en humanos, como *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*. También, algunas especies de este grupo causan enfermedades en vegetales con pérdidas en la producción de frutales, ornamentales y hortalizas, entre otros. El género *Pectobacterium*, antes conocido como *Erwinia*, es representativo de este grupo y comprende especies que ocasionan pudriciones blandas por la degradación enzimática de la pectina estructural de la pared celular vegetal (Shevchik y Hugouvieux–Cotte–Pattat, 2003 citado de Iglesias-Andreu *et al.*, 2009). Algunas como *Pectobacterium carotovorum* (Jones) Waldee, [Sin. *Erwinia carotovora* (Jones) Bergey], constituyen un taxón complejo que incluye razas con un amplio rango de características génicas, fenotípicas, bioquímicas y de hospederos, y en consecuencia de su distribución (Yap *et al.*, 2004, citado de Iglesias-Andreu *et al.*, 2009); por lo que la heterogeneidad de las especies del grupo ha contribuido a que aún no se cuente con descriptores satisfactorios de subespecies o patovares (Schaad *et al.*, 2001, citado de Iglesias-Andreu *et al.*, 2009). Sin embargo, para propósitos de identificación de las subespecies de *P. carotovorum*, algunos estudios han generado un criterio fenotípico confiable que diferencia dos o más subespecies (Gardan *et al.*, 2003, citado de Iglesias-Andreu *et al.*, 2009). En consecuencia de los casos donde los resultados de pruebas para identificar aislamientos locales, no se apegan en su totalidad a la información documental empleada para la identificación, se considera que está abierta la oportunidad de indagar acerca de la variación de características génicas, fenotípicas, bioquímicas, entre otras, con el propósito de encontrar diferencias que contribuyan a ampliar el conocimiento de este grupo.



5.11.1 Genero *Erwinia*

Las bacterias *Erwinia carotovora* y *E. chrysanthemi* son bacterias fitopatógenas que atacan diferentes plantas cultivadas. Pertenecen al grupo de las Eubacterias (bacterias verdaderas) y a la familia de las Enterobacteriáceas. Se presentan en forma de bastoncitos rectos, móviles gracias a la presencia de flagelos dispuestos en torno a la célula bacteriana. Son capaces de vivir en un medio aerobio o anaerobio en presencia de agua libre, y se propagan rápidamente. Son parásitos débiles. Todo lo que pone la planta en situación de debilidad puede implicar el desarrollo de la enfermedad, tanto más cuanto que los factores de estrés para la planta son factores favorables a la multiplicación de la bacteria. (www.cyclamen.com).

5.11.2 Genero *Pseudomonas*

Las bacterias de este género son bacilos rectos o ligeramente curvos, pero nunca helicoides, su tamaño oscila entre 0.5 a 1.0 por 1.5 a 5.0 micras. Muchas especies acumulan poly-B-hidroxybutyrato como reserva de carbono las cuales se observan como inclusiones sudanofilicas en el citoplasma. Son Gram negativos y pueden ser oxidasa positivo o negativo, pero su reacción a la catalasa siempre es positiva. Son bacterias aeróbicas con un sistema de respiración estricto donde el oxígeno es el receptor final del electrón, en algunos casos el nitrato puede ser usado como receptor alternativo de electrón, permitiendo que el desarrollo pueda ocurrir anaeróticamente. (Garcés de granada *et al* 1996).

5.12 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS

5.12.1 Extracción de bacterias a partir de material vegetal.

Para la extracción de bacterias a partir de material vegetal, se seleccionan muestras que presenten síntomas de la enfermedad en estudio, este material se somete a desinfección durante 1 o 2 minutos en hipoclorito de sodio y posteriormente en la misma cantidad de tiempo con alcohol antiséptico. Posterior a esto se procede a enjuagar 3 veces con agua



estéril y a secar con toallas de papel previamente esterilizadas. Este tejido obtenido se macera en agua estéril y a partir de este macerado se inicia el proceso de diluciones consecutivas con el fin de generar una suspensión bacteriana de la concentración deseada, esta suspensión posteriormente es el material para la siembra en cajas de Petri sobre agar convencional (Imagen # 1).

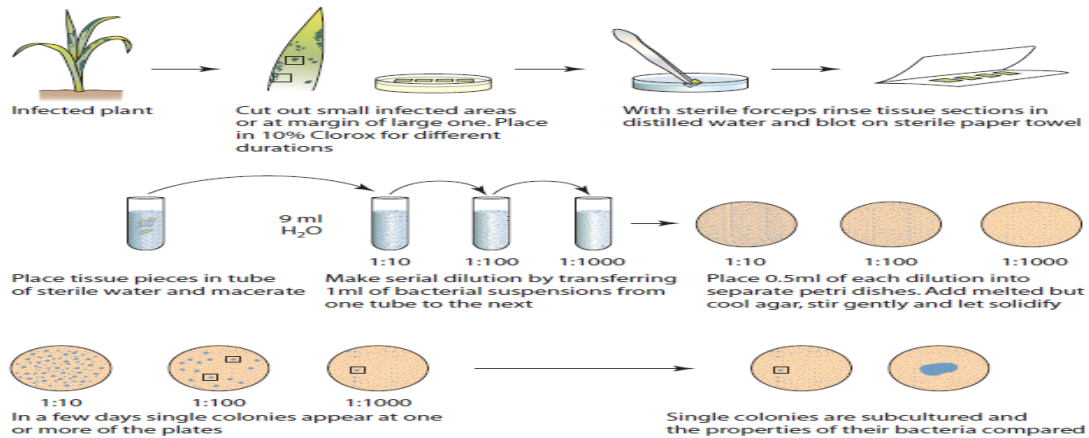


FIGURE 12-6 Isolation of bacterial pathogens from infected plant tissue.

Imagen # 1 protocolo para aislamiento de bacterias fitopatogenas a partir de material vegetal (tomado de Agrios, 2005).

Una buena práctica para diferenciar entre aislamientos de bacterias fitopatogenas es el uso de medios de cultivo selectivos comunes en la industria. Para *Erwinia*, *Xanthomonas* y *Agrobacterium* por ejemplo, se desarrollan bien sobre agar nutritivo-glucosa (NGA) o sobre agar extracto de levadura-dextrosa-carbonato de calcio (YDC). Unas pocas especies o pathovares no se desarrollan sobre NGA, por ejemplo, *E. stewartii* y *X. campestris* pv. *Oryzae* pero crecen bien sobre caldo nutritivo- extracto de levadura (NBY); el medio agar D1M (medio modificado de Kado), es selectivo para *agrobacterium* sp. Las *Pseudomonas* fluorescentes tienen un desarrollo muy característico sobre medio agar King et al medio B (KB); *Clavibacter* sp. Crece bien sobre NBY (figura 16) (Garcés de Granada et al 1996).

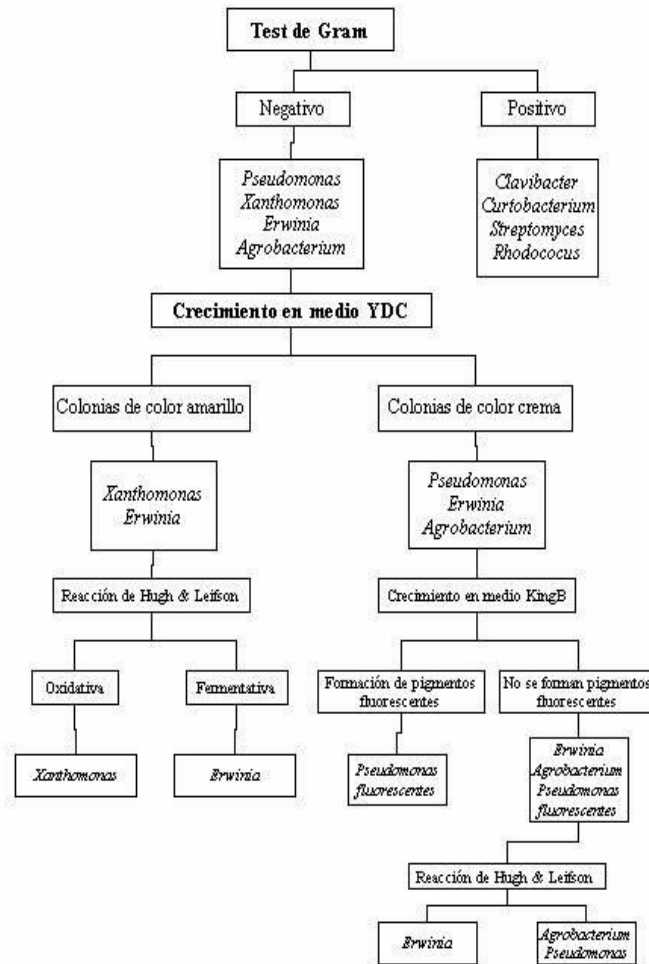


Figura # 16 diagrama para identificación de bacterias fitopatogenas Tomado de: (Schaad, 1998).



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 UBICACIÓN

Las muestras de material vegetal con síntomas de la enfermedad que se utilizaron para este trabajo se tomaron de la empresa Plantas y Plantas de Colombia S.A.S, el cultivo estaba situado en la finca los Alpes ubicada en el km 14 vía Bogotá- Mesitas, corregimiento de Santandercito del municipio de San Antonio del Tequendama, con una altitud de 1645 m.s.n.m y temperatura media anual oscila entre 19 y 21°C. Estas muestras se transportaron al laboratorio de microbiología y fitopatología de la Universidad de Cundinamarca en Fusagasugá donde se desarrolló toda la metodología de laboratorio pertinente para la identificación hasta género bacteriano del agente causal de la pudrición de bulbo de la violeta de los Alpes

6.2 MATERIAL VEGETAL

Para el desarrollo de este trabajo se tomaron plantas de violeta de los Alpes (*C. persicum Mill.*), teniendo en cuenta criterios como la identificación de síntomas de clorosis y manchas necróticas ascendentes en la parte basal de la arquitectura de la planta. Se seleccionaron 8 plantas: 4 estados diferentes de avance de la enfermedad y dos muestras por cada estado, esto con el fin de verificar las características de la enfermedad y ver la relación de estos síntomas con un agente patógeno.

6.2.2 Establecimiento de la sintomatología de la pudrición de bulbo

Debido a que no hay mucha información de esta enfermedad se quiso establecer el avance de los síntomas de la enfermedad en condiciones de vivero realizando observaciones en el tiempo del avance de la enfermedad desde la aparición de estos hasta la muerte de las plantas. De acuerdo a las observaciones realizadas, se establecieron cuatro estados definidos de la enfermedad, los cuales fueron objeto de estudio.



6.3 AISLAMIENTO DE BACTERIAS A PARTIR DE MATERIAL VEGETAL ENFERMO

Las muestras seleccionadas se llevaron al laboratorio de microbiología y fitopatología de la Universidad de Cundinamarca sede Fusagasugá. Se tomaron dos muestras por cada estado de la enfermedad. Para realizar el aislamiento se tomaron trozos de hojas y bulbos afectados se realiza el corte en la zona de avance del síntoma (entre los tejidos sanos y afectados) generando trozos pequeños los cuales se lavan con agua destilada estéril (ADE). Se tomaron trozos del material afectado los cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaCl) al 2% durante 1 min y posteriormente se lavaron tres veces con ADE y se maceraron. El macerado se pasó a un tubo de ensayo con 9 ml de ADE y a partir de este tubo se tomó 1 ml de la solución con el fin de realizar diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-6} , utilizando el último tubo para la siembra. Posteriormente se sembraron las respectivas diluciones de cada aislamiento en cajas de Petri con agar nutritivo (AN) con un rastrillo de Drigalsky. Las cajas de Petri se incubaron durante 48 horas hasta la aparición de colonias (Agrios 2005). Los aislamientos se marcaron de acuerdo al estado de la enfermedad (E1, E2, E3, E4) y la muestra o repetición respectiva (M1, M2).

6.4 DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE LAS COLONIAS ENCONTRADAS

Las características culturales se evaluaron por medio de la descripción de la forma de las colonias, es decir por el color su elevación y consistencia como aislamiento patogénico sobre los medios AN (agar nutritivo). Por otra parte, las características morfológicas microscópicas se establecen mediante tinciones de Gram (Schaad, 1994; citado de Suslow et al 1982). Después de la tinción de Gram se seleccionaron las colonias Gram negativas que fueron sembradas individualmente mediante estría en agar nutritivo.

6.5 CARACTERIZACIÓN DEL GÉNERO DEL MICROORGANISMO FITOPATÓGENO A TRAVÉS DE SUS PROPIEDADES FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS.

Para las pruebas de caracterización fisiológicas y bioquímicas del microorganismo fitopatogénico que se utilizaron fueron KOH (hidróxido de potasio) al 3%, catalasa, oxidasa,



oxidación - fermentación en medio de Hugh y Leifson, utilización de citrato, licuefacción de la gelatina, producción de ureasa (Holt *et al.*, 1994 citado de Schaad, 1994). Adicionalmente se utilizaron los medios selectivos King – B, para observar la producción de pigmentos fluorescentes, YGC para la producción de pigmentos amarillos.

6.6 PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

Con el fin de determinar la capacidad de las colonias aisladas se hicieron dos pruebas de patogenicidad. Para observar si se producían pudriciones blandas se utilizaron rodajas de papa (*Solanum tuberosum*) y si causaban enfermedad en hospederos de los cuales fueron aisladas se utilizaron plantas sanas de violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill). Para los dos ensayos Se tomaron porciones de colonias bacterianas sembradas con 24 horas de anterioridad y se realizaron diluciones seriadas en base 10 (Transfiriendo 1ml de la primera suspensión a tubos de ensayo con 9 ml agua destilada estéril (ADE)). Seguidamente se realizaron mediciones con un espectrofotómetro Genesys 10S UV – VIS Thermo scientific™, con absorbancias entre 0,08 y 0,1 a a una longitud de onda de 625nm, lo que equivale a una concentración bacteriana aproximada de 1.0×10^8 unidades formadoras de colonia (Perilla *et al.*, 2004).

Se utilizaron tubérculos de papa sanos adquiridos en el mercado local, estos se lavaron con agua destilada estéril, para posteriormente ser desinfectados con hipoclorito de sodio al 5 % por dos minutos, se enjuagaron con agua destilada estéril nuevamente y se desinfectaron nuevamente esta vez con alcohol antiséptico por dos minutos. Finalmente se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril y se procedió a cortar rodajas de un centímetro en promedio de grosor, obteniendo 16 rodajas a las que se les inyectaron 500 µl de la suspensión bacteriana con jeringas para insulina estériles, estas rodajas se dispusieron en 8 cámaras húmedas individuales previamente preparadas para 4 estados de la enfermedad y una repetición de cada estado, estas cámaras húmedas debidamente rotuladas se incubaron a 26° -28°C durante 8 días, las observaciones se hicieron diariamente.



Las plantas sanas de ciclamen se inocularon en maceta inyectando 500 μ l de la suspensión bacteriana con jeringas para insulina estériles. Estas fueron mantenidas en el laboratorio de microbiología y fitopatología de la Universidad de Cundinamarca a temperatura ambiente (Temperatura 20°C y humedad relativa del 85%), con un riego constante. En cada uno de los experimentos se tuvieron dos repeticiones de cada estado y cada muestra y se tuvieron testigos absolutos, inoculados con agua destilada estéril.

6.7 TIPIFICACIÓN MOLECULAR DEL AISLAMIENTO E2M1

Con el fin de corroborar el género caracterizado mediante pruebas bioquímicas del aislamiento E2M1 se envió un repique de este al laboratorio CorpoGen.

Se extrajo DNA, se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la región de 1465 pb del gen ribosomal 16S. Se purificaron los fragmentos de PCR y se secuenció con los primers 27F, 518F, 800R, y 1492R del gen ribosomal 16S. El laboratorio al que se enviaron las muestras hizo limpieza manual de cada una de las secuencias de los fragmentos obtenidos. Se hizo el ensamblaje de las secuencias y se obtuvo la secuencia problema.

El análisis taxonómico de la secuencia problema ensamblada se realizó mediante la comparación contra las bases de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information), Greengenes (Laurence Berkeley National Laboratory) y RDP (Ribosomal Database Project).

Se hizo el alineamiento y generación de un árbol de distancias utilizando las secuencias con mayor similitud a la secuencia problema. El análisis bioinformático fue realizado por el estudiante y por los docentes de Fitopatología y Genética vegetal.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 ESTABLECIMIENTO DE LA SINTOMATOLOGÍA DE LA PUDRICIÓN DE BULBO

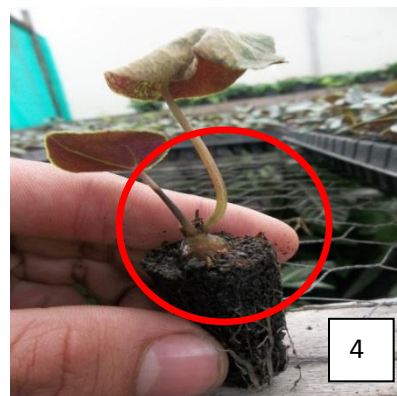
Como primer síntoma se evidencia la clorosis de las hojas de la base de la planta, estas mismas hojas continúan en un proceso de senescencia el cual se puede evidenciar en la imagen número dos además de la pérdida de la turgencia de peciolo y pedúnculos por igual en toda la planta.



(Imagen # 2 clorosis de la hojas de la base).



(Imagen # 3 mancha negra a través de los peciolo).



(Imagen # 4 mancha negra en peciolo de plántula)

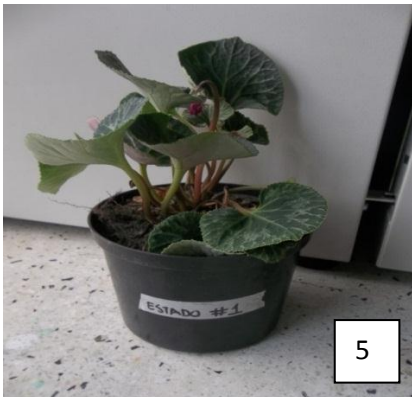


Las imágenes tres y cuatro muestran otro síntoma relevante por el cual se seleccionaron las muestras para realizar los aislamientos: una mancha negra ascendente desde el bulbo a los órganos aéreos de la planta alcanzando incluso hojas y flores. Ya que este síntoma se encontró en todas las plantas que presentaron la pudrición de bulbo se le asocia como indicativo para la selección de muestras. También se evidenció en plántulas como se muestra en la imagen # 4.

7.2 ESTABLECIMIENTO DE LOS ESTADOS DE LA ENFERMEDAD.

ESTADO # 1

Las plantas se mantienen turgentes, sin embargo se evidencia clorosis en las hojas basales, además se empieza a evidenciar el ascenso de una mancha negra a través del peciolo de la hoja.



(Imagen # 5 estado uno de la La pudrición de bulbo).



(Imagen # 6 ascenso de la mancha negra por los peciolos).

ESTADO # 2

Las plantas pierden la turgencia, las hojas de la base mueren y asciende la coloración negra por el peciolo hasta la hoja, provocando la senescencia prematura de hojas y flores.



(Imagen # 7 estado dos de la Pudrición de bulbo).



(Imagen # 8 perdida de turgencia en el Estado dos)

ESTADO # 3

Muchas de las hojas se encuentran entrando en senescencia y la coloración oscura de los pecioloos inicia desde el bulbo y se ven infectados la mayoría de los pecioloos presentes.



(Imagen # 9 estado tres de la pudrición de bulbo).



(Imagen # 10 planta totalmente afectada por la De)

ESTADO # 4

El bulbo de la planta presenta un color negro oscuro este asciende a través de todos los órganos de la planta generando marchitamiento en general, se evidencia la presencia de hongos saprófitos en las hojas muertas.



(Imagen # 11 estado cuatro de Pudrición de bulbo)



(Imagen # 12 peciolo totalmente afectados).

7.3 RESULTADOS DEL OBJETIVO 1

Reconocimiento de las características morfológicas de las colonias en medio de cultivo.

7.3.1 Establecimiento de colonias *in vitro*

Después del aislamiento de las plantas en cada estado en algunas cajas se encontraron principalmente dos tipos de colonias bacterianas, una de las colonias tiene un color blanco y la otra colonia tiene un color beige, siendo estas las colonias más frecuentes (Imagen 13 A, B, C, D). La descripción de cada una de ellas se encuentra en la tabla # 2.

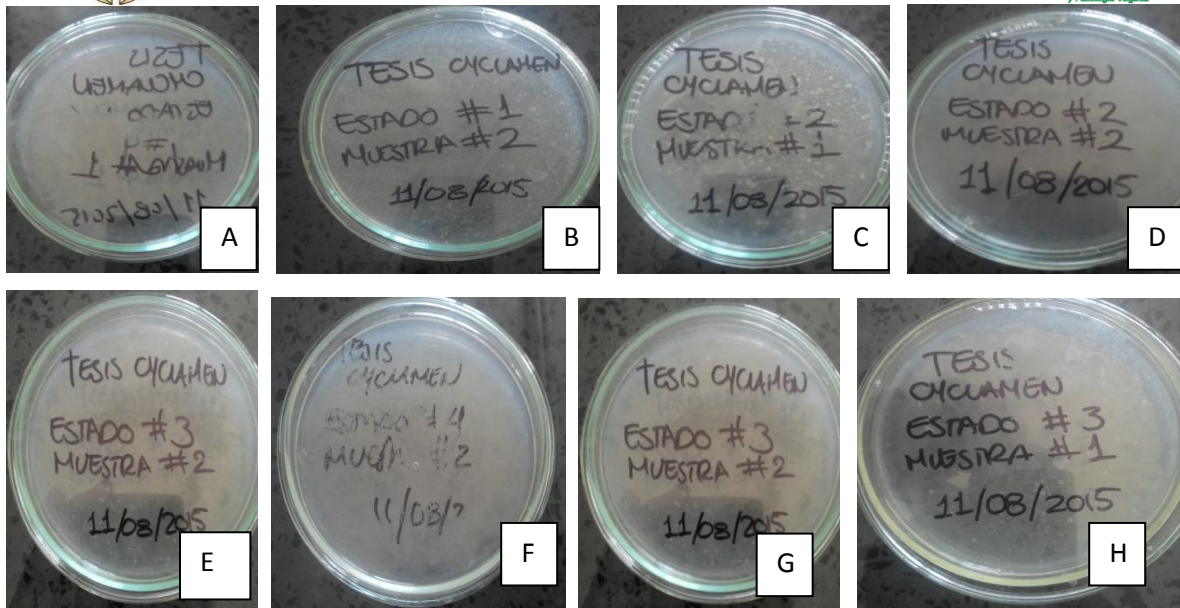


Imagen # 13 A, B, C, D, E, F, G, H. Aislamiento de colonias según estado y muestra

7.3.2 DESCRIPCIÓN DE COLONIAS EN AGAR NUTRITIVO

Tabla # 3 Descripción de colonias en agar nutritivo

Estado y muestra	Colonia	Superficie	Forma	Borde	Color
E1M1	C1	planoconvexa	Ovalada	Redondeando	Blanca
E1M2	C1	Planoconvexa	Ovalada	Redondeando	Blanca
	C2	Planoconvexa	Irregular	Ondulado	Blanca
E2M1	C1	Planoconvexa	ovalada	Redondeado	Blanca
	C2	Planoconvexa	Irregular	Ondulado	Blanca
E2M2	C1	Planoconvexa	Irregular	Ondulado	Blanca
E3M1	C1	Planoconvexa	Irregular	Ondulado	Blanca
	C2	Planoconvexa	Irregular	Ondulado	Amarillenta
	C3	Convexa	Circular	Redondeando	Amarillenta
E3M2	C1	Planoconvexa	Circular	Redondeando	Amarillenta
E4M1	C1	planoconvexa	Irregular	Ondulado	Blanca
	C2	Convexa	Circular	Ondulado	Blanca



	C3	Convexa	Circular	Redondeado	Negra
E4M2	C1	planoconvexa	Irregular	Ondulado	Amarillenta

Donde E= estado, M= muestra, C=colonia.

7.3.3 TINCIÓN DE GRAM

Se procedió a hacer tinción de Gram de dichas colonias encontrando bacterias Gram positivas y Gram negativas como se observa en la tabla # 4.

Tabla # 4 Tinción de Gram para la diferentes colonias encontradas en los diferentes estados y muestras.

Estado y muestra	Colonia	Tinción de Gram
E1M1	C1	Negativa
E1M2	C1	Negativa
	C2	Positiva
E2M1	C1	Negativa
	C2	Positiva
E2M2	C1	Negativa
	C2	Positiva
E3M1	C1	Negativa
	C2	Positiva
E3M2	C1	Negativa
E4M1	C2	Positiva
	C3	Positiva
E4M2	C1	Negativa

Donde E= estado, M= muestra y C=colonia.

7.3.4 AISLAMIENTO DE COLONIAS GRAM NEGATIVAS POR MÉTODO DE SIEMBRA POR ESTRÍA.

Una vez se identificaron las colonias Gram negativas se procedió a sembrarlas en cajas de Petri con agar nutritivo mediante estría simple (Imagen 14), de esta manera se busca seleccionar cuanto más sea posible las colonias responsables de la pudrición de bulbo.

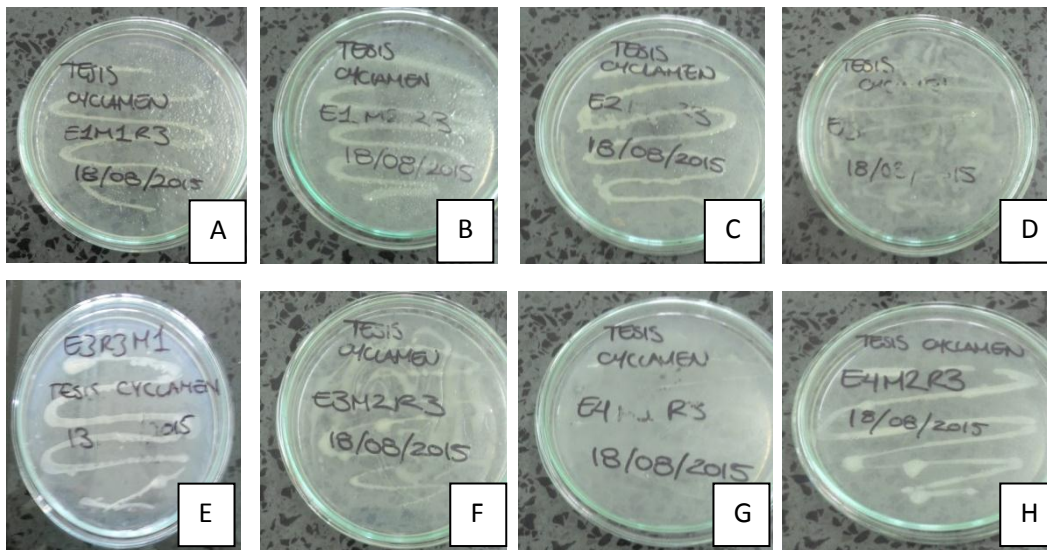


Imagen # 14 A, B, C, D, F, G, H. asilamiento de bacterias Gram negativas en método de siembra por estría según estado y muestra.

7.4 RESULTADOS DEL OBJETIVO 2

CARACTERIZAR EL GÉNERO DEL MICROORGANISMO FITOPATÓGENO A TRAVÉS DE SUS PROPIEDADES FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS.

Como se describió en la metodología del objetivo dos se procedió a realizar pruebas de laboratorio a los aislamientos obtenidos, con base en estos aislamientos se realizaron pruebas de oxidasa, catalasa, KOH (hidróxido de potasio), hidrolisis de gelatina y ureasa, también se realizan siembras en medios selectivos como YGC (Levadura-Glucosa-agar), Hugh y Leifson, citrato de Simmons y agar Mac Conkey.



7.4.1 TINCIÓN DE GRAM

A las colonias seleccionadas como Gram negativas y sembrados por método de estría, se les realizó nuevamente la prueba de tinción de Gram y verificar que tuviesen la característica morfológica de ser bacilos, esto debido a que los géneros de bacterias fitopatógenas más comunes presentan esta característica básica (Schaad, 1998). Esta prueba reveló la presencia de bacilos Gram negativos en todos los aislamientos, con base en esto se realizó un cultivo puro por el método de replicación continua y siembra por estría.

Tabla # 5 Resultado de las pruebas de tinción de Gram

ESTADO Y MUESTRA	RESULTADO
E1m1	negativa
E1m2	negativa
E2m1	negativa
E2m2	negativa
E3m1	negativa
E3m2	negativa
E4m1	negativa
E4m2	negativa

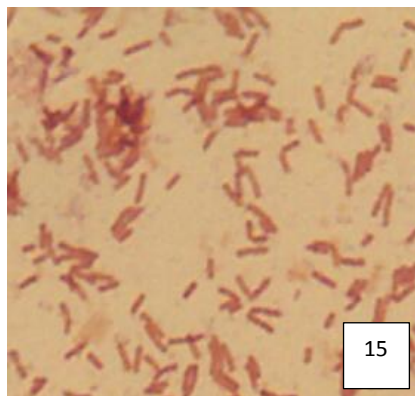


Imagen # 15 fotografía microscópica de bacilos Gram negativos obtenidos de los aislamientos provenientes de violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.).



7.4.2 PRUEBA DE KOH

El método de comprobación de tinción de Gram por medio del KOH es una alternativa simple y eficiente para la clasificación de bacterias según sus características químicas y comportamiento en relación a los reactivos. El KOH se probó en 69 cepas de bacterias (Fluharty and Packard 1967), además de esto la eficiencia del método fue confirmada con 22 bacterias de la industria cervecera (Lin 1980). La prueba se realiza tomando una porción de aislamiento bacteriano y utilizando una gota del reactivo sobre las bacterias pasado un minuto de agitación de la solución esta debe mostrar características gelatinosas y generar un hilo entre el hace bacteriana y la laminilla donde se encuentra la bacteria de lo contrario la prueba es negativa, para el caso de los diferentes aislamientos provenientes de bulbos de violeta de los Alpes la mayoría de las muestras y estados reaccionaron positivamente al KOH con excepción del aislamiento E4M1 (imagen # 16 G) posiblemente por contaminación en los aislamientos.

Tabla # 6 Resultado de la prueba de KOH.

ESTADO Y MUESTRA	RESULTADO	PARED CELULAR
E1m1	Positiva	Gram negativa
E1m2	Positiva	Gram negativa
E2m1	Positiva	Gram negativa
E2m2	Positiva	Gram negativa
E3m1	Positiva	Gram negativa
E3m2	Positiva	Gram negativa
E4m1	Negativa	Gram positiva
E4m2	Positiva	Gram negativa

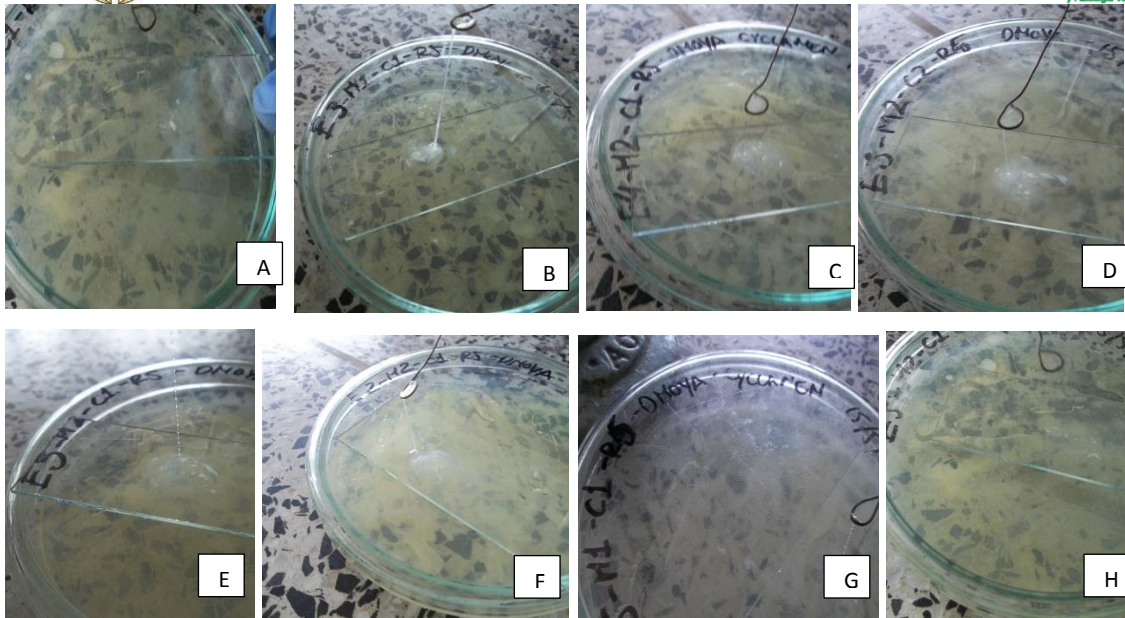


Imagen # 16 resultado de colonias sometidas a comprobación de tinción de Gram por método de KOH a colonias provenientes de bulbos enfermos de violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.). . (A, B, C, D, E, F, G, H).

7.4.3 MEDIO SELECTIVO MAC CONKEY.

Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos. Permite diferenciar bacterias que utilizan o no, lactosa. En el medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva. Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares. Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras (www.britanialab.com).

Para los aislamientos realizados con las colonias provenientes de los bulbos de violeta de los Alpes sobre agar Mac Conkey se obtuvo crecimiento a las 24 horas de siembra en todas las muestras seleccionadas por muestra y estado.

Tabla # 7 resultado de la prueba de medio selectivo Mac Conkey

ESTADO Y MUESTRA	RESULTADO
E1m	Presentó crecimiento
E1m2	Presentó crecimiento
E2m1	Presentó crecimiento
E2m2	Presentó crecimiento
E3m1	Presentó crecimiento
E3m2	Presentó crecimiento
E4m1	Presentó crecimiento
E4m2	Presentó crecimiento

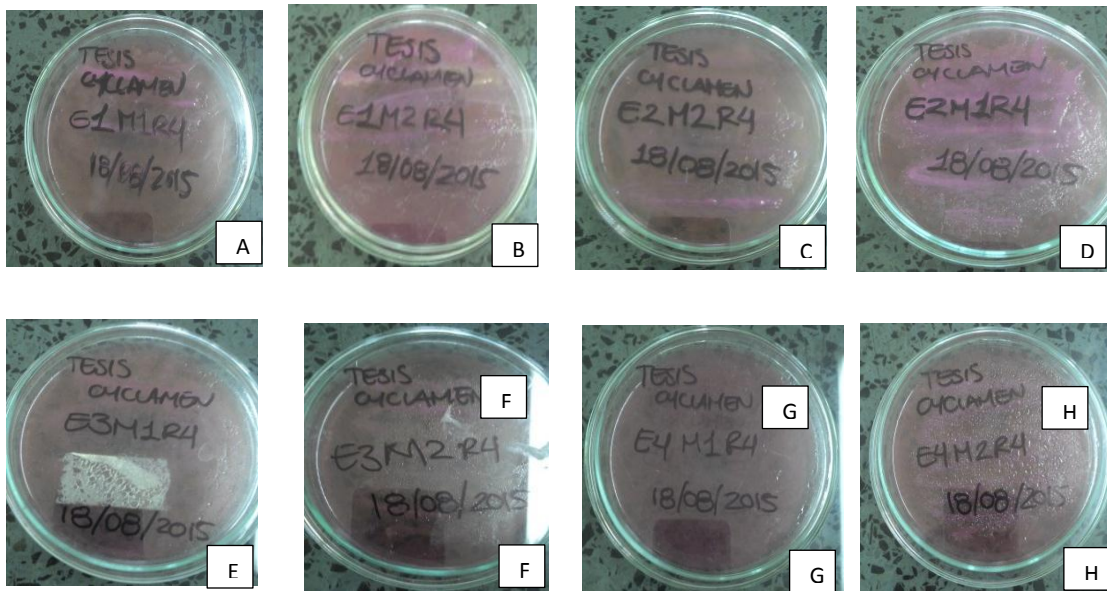


Imagen # 17 resultado de la prueba de siembra en medio selectivo Mac Conkey para diferentes estados y muestras provenientes de violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.). . (A, B, C, D, E, F, G, H).

7.4.4. PRUEBA DE OXIDASA.

La prueba de oxidasa se usa para determinar la presencia del citocromo c en las bacterias que lo poseen en sus cadenas respiratorias. La reacción positiva para esta prueba fue evidenciada a través de un color purpura que se desarrolló sin que hubiesen pasado más de 60 segundos (Garcés de granada *et al* 1996). Sin embargo, para esta prueba las

muestras descritas en las imágenes A, B, C, D, E y F (E1M1, E1M2, E2M1, E2M2, E3M1 y E3M2) no mostraron cambio de coloración, es decir, que tuvieron resultados negativos para la prueba. Este resultado concuerda con la información descrita para el género *Erwinia* según lo descrito por Garcés de granada *et al* (1996).

Tabla # 8 resultado de la prueba de oxidasa.

ESTADO Y MUESTRA	RESULTADO
E1m1	Sin cambio antes de 10 segundos
E1m2	Sin cambio antes de 10 segundos
E2m1	Sin cambio antes de 10 segundos
E2m2	Sin cambio antes de 10 segundos
E3m1	Sin cambio antes de 10 segundos
E3m2	Sin cambio antes de 10 segundos
E4m1	Hubo coloración
E4m2	Hubo coloración

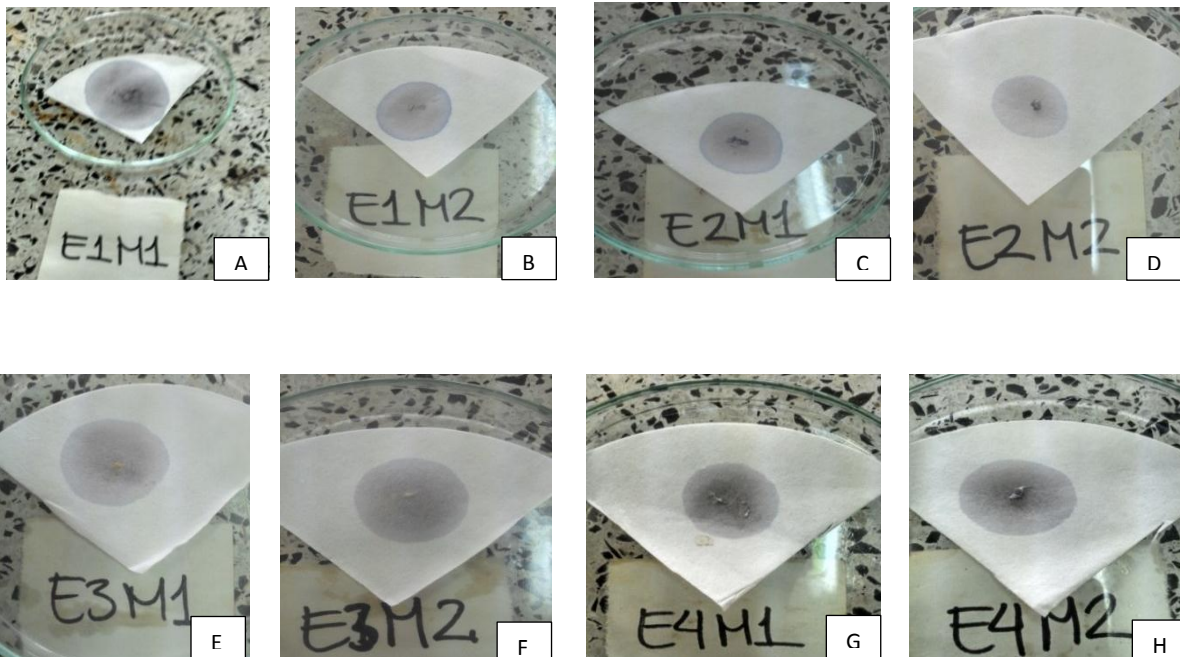


Imagen # 18 resultado de la prueba de oxidasa para diferentes estados y muestras provenientes de violeta de los Alpes. (*C. Persicum* Mill.). (A, B, C, D, E, F, G, H).

7.4.5 PRUEBA DE UREASA.

Los aislamientos puros obtenidos por la siembra de estría se sometieron a la prueba de ureasa esto con el fin de evidenciar la capacidad de las colonias de incrementar la alcalinidad dentro del medio de cultivo generando así la aparición de la coloración rosado fucsia esto indica la actividad positiva de la ureasa, debido a la hidrólisis de urea de amonio (Schaad, 1998). Se obtuvo prueba de ureasa positiva para todos los aislamientos puros provenientes de bulbos enfermos de violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.).

Tabla # 9 Resultado de la prueba de ureasa.

ESTADO Y MUESTRA	RESULTADO
E1m1	Rosado
E1m2	Rosado
E2m1	Rosado
E2m2	Rosado
E3m1	Rosado
E3m2	Rosado
E4m1	Rosado
E4m2	Rosado

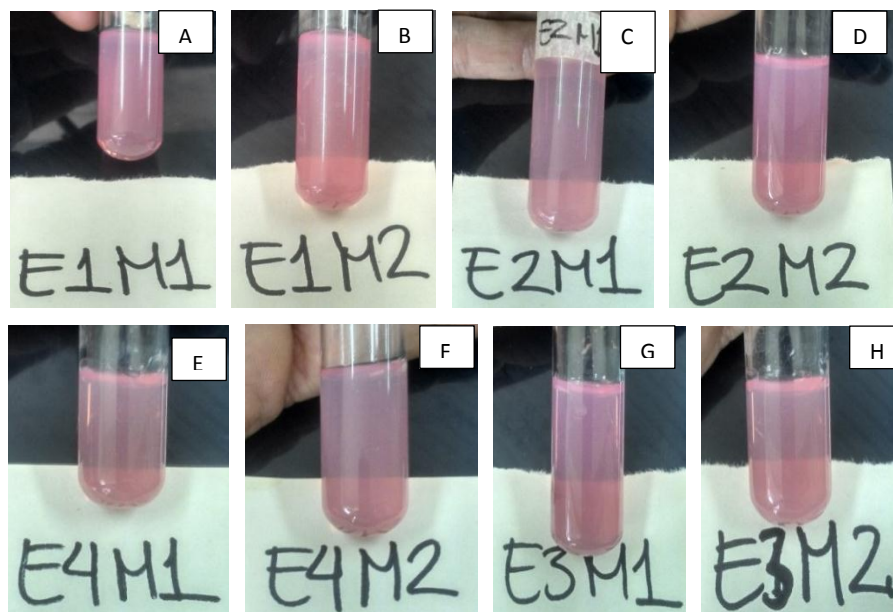


Imagen # 19 Resultado de la prueba de ureasa para diferentes muestras y estados provenientes de violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.). (A, B, C, D, E, F, G,



7.4.6 PRUEBA DE HUGH LEIFSON (METABOLISMOS OXIDATIVOS / FERMENTATIVOS).

El medio basal O.F. fue desarrollado por Hugh y Leifson para evidenciar la importancia del significado taxonómico del metabolismo oxidativo-fermentativo de los hidratos de carbono por las bacterias Gram negativas. La lectura del medio según laboratorios Britania en su ficha técnica para el medio de Hugh y Leifson es de la siguiente manera:

- El uso del hidrato de carbono, ya sea por fermentación u oxidación, produce acidez en el medio, con el consecuente viraje del color verde al amarillo.
- Microorganismos oxidativos del hidrato de carbono en estudio: producen una reacción ácida solo en el tubo “abierto”. Presentan poco o nulo desarrollo y ausencia de producción de ácido en el tubo “cerrado”.
- Microorganismos fermentadores del hidrato de carbono en estudio: producen una reacción ácida en ambos tipos de tubos. Microorganismos que no utilizan el hidrato de carbono en estudio: no producen cambio ninguno de los 2 tubos, los cuales permanecen verdes. (www.britanialab.com consultado en Diciembre de 2015).

Para este caso la muestras reportadas en las imágenes A, B, C y F (E1M1, E1M2, E2M1, E3M2). Reportaron reacción en ambos tubos es decir que las bacterias obtenidas como objeto de estudio en esas muestras son organismos con facultades fermentadoras, y por otra parte las demás solo tuvieron reacción en los tubos abiertos es decir que se clasifican como organismos oxidativos, esto concuerda con las parámetros para la identificación del genero *Erwinia*, los demás aislamientos como se observa en las imágenes D, E, G y H (E2M2, E3M1, E4M1, E4M2) muestran un comportamiento diferente. Se sugiere la posible actuación de un complejo bacteriano en la pudrición de bulbo de violeta de los Alpes o la presencia de microorganismos contaminantes.

Tabla # 10 resultado de las prueba de medio selectivo Hugh & Leifson para colonias provenientes de violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.).

MUESTRA/TUBO	ABIERTO	CERRADO
E1m1	Amarillo	Amarillo
E1m2	Amarillo	Amarillo
E2m1	Amarillo	Amarillo
E2m2	Ligeramente amarillo	verde
E3m1	Amarillo	verde
E3m2	Amarillo	Amarillo
E4m1	Ligero amarillo	verde
E4m2	Amarillo	verde



Imagen # 20 resultado de la prueba de oxidación fermentación por el medio selectivo de Hugh Leifson para diferentes estados y muestras provenientes de violeta de los Alpes. (A, B, C, D, E, F, G, H).

7.4.7 MEDIO SELECTIVO YGC

Se obtuvieron colonias color crema sobre el medio YGC. Este es una variación del medio YDC (Levadura-dextrosa-carbonato de calcio) (Garcés de granada, 1996), siendo selectivos para bacterias del género *Xanthomonas*, cuyas colonias crecerán de color amarillo (Gilchrist-Saavedra et al., 1995)

Tabla # 11 resultado de la prueba de medio diferencial YGC

ESTADO Y MUESTRA	RESULTADO
E1m1	Colonias color crema
E1m2	Colonias color crema
E2m1	Colonias color crema
E2m2	Colonias color crema
E3m1	Colonias color crema
E3m2	Colonias color crema
E4m1	Colonias color crema
E4m2	Colonias color crema

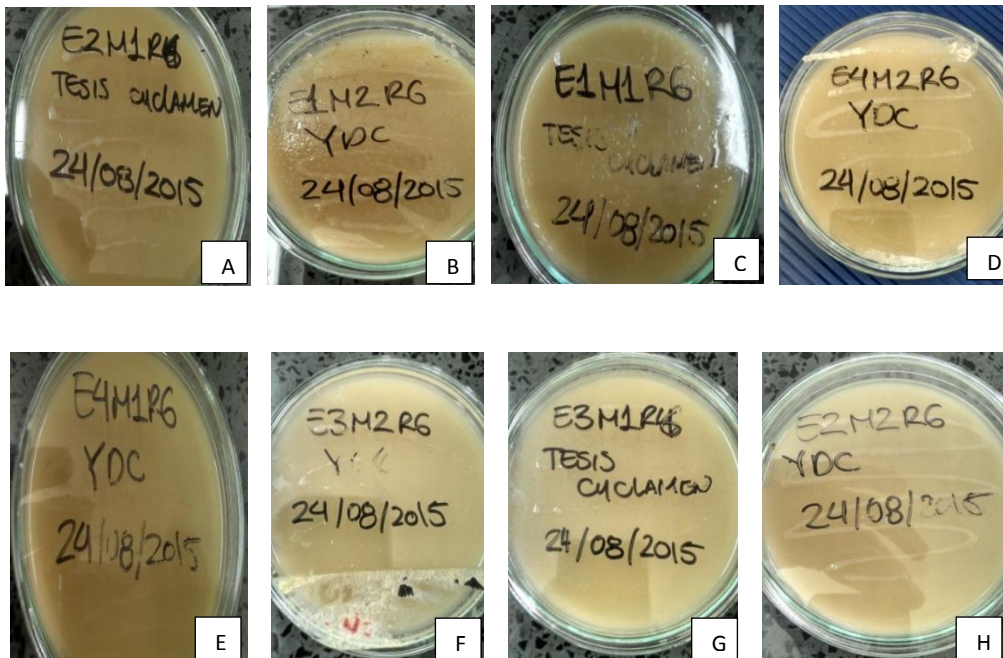


Imagen # 21 resultado de la prueba de medio diferencial YGC. (A, B, C, D, E, F, G, H).

7.4.8 PRUEBA LICUEFACCIÓN DE LA GELATINA.

La gelatina es una proteína que tiene la capacidad de gelificar, cuando es hidrolizada por la gelatinasa en los aminoácidos que la componen pierde su característica de gelificar (Bergey, 1974). Al cabo de 24 de incubación a 26 °C los tubos de ensayo se guardaron en la nevera común por tres horas. Como resultado se obtuvo que ningún aislamiento gelificó la gelatina, esto quiere decir que las estas colonias no generan licuefacción de la gelatina.

Tabla # 12 resultado de la prueba de licuefacción de la gelatina.

ESTADO Y MUESTRA	RESULTADO
E1m1	No solidifica
E1m2	No solidifica
E2m1	No solidifica
E2m2	No solidifica
E3m1	No solidifica
E3m2	No solidifica
E4m1	No solidifica
E4m2	No solidifica

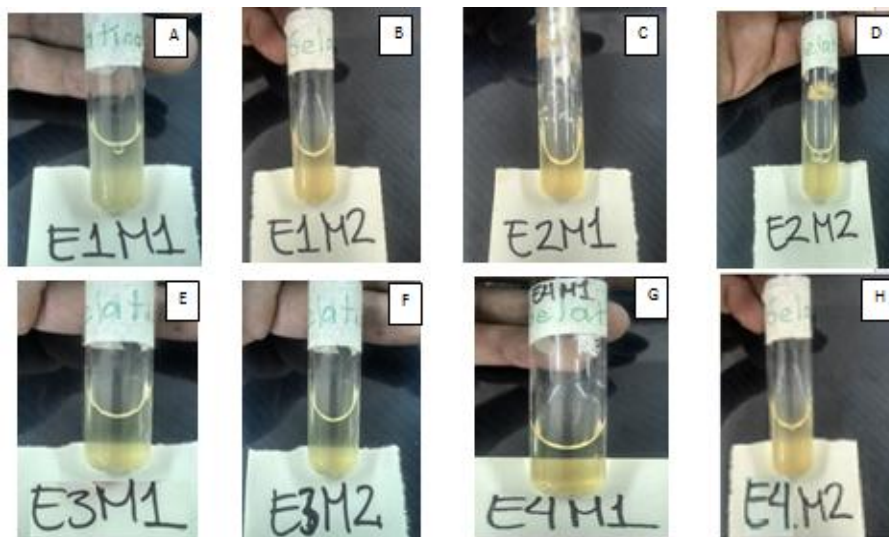


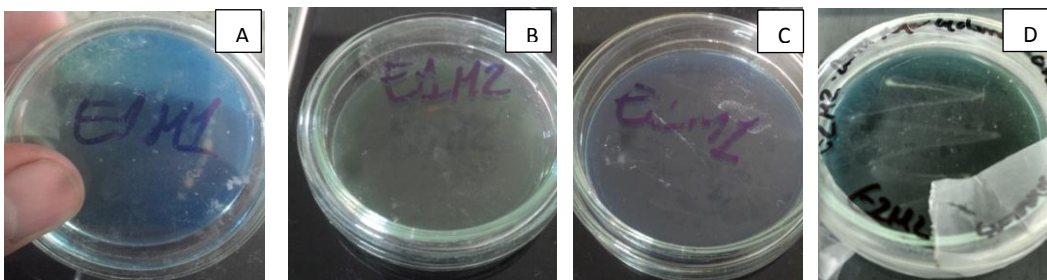
Imagen # 22 resultado de la prueba de licuefacción de la gelatina para diferentes estados y muestras provenientes de violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.). . (A, B, C, D, E, F, G, H).

7.4.9 CITRATO DE SIMMONS.

Esta prueba muestra la capacidad de las bacterias para metabolizar el citrato, para esto se utiliza el medio de Simmons ya que contiene citrato como única fuente de carbono, fosfato de amonio como fuente de nitrógeno y azul de bromo timol como indicador de pH. Aquellas bacterias capaces de metabolizar el citrato podrán multiplicarse produciendo la alcalinización del medio dando como resultado un cambio de color en el medio de verde a azul (Agrios, 2005). Los aislamientos E3M1 (Imagen 23 E) y E4M1 (Imagen 23 G) son citrato negativos, mientras que el resto de los aislamientos son citrato positivos.

Tabla # 13 Resultado de la prueba en medio diferencial citrato de Simmons

ESTADO Y MUESTRA	RESULTADO
E1m1	Positiva
E1m2	Positiva
E2m1	Positiva
E2m2	Positiva
E3m1	Negativa
E3m2	Positiva
E4m1	Negativa
E4m2	Positiva



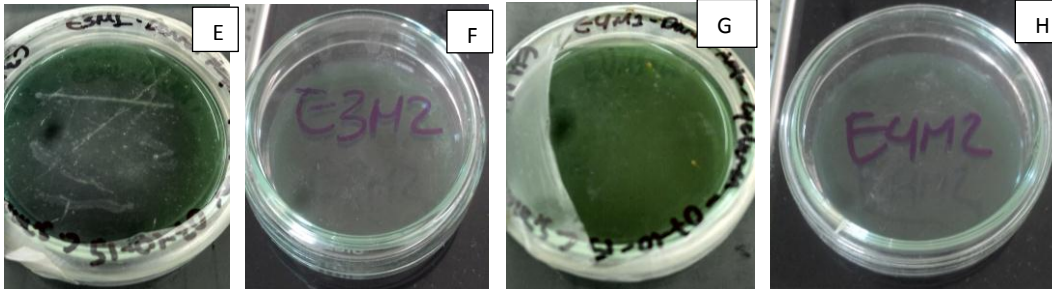


Imagen # 23 resultado de la prueba en medio diferencial citrato de Simmons para diferentes estados y muestras provenientes de violeta de los Alpes. (*C. persicum* Mill.). (A, B, C, D, E, F, G, H).

7.4.10 PRUEBA DE CATALASA.

La enzima catalasa se encuentra presente en muchos microorganismos aeróbicos. La catalasa descompone el peróxido de hidrógenos dando lugar a la formación de oxígeno molecular. (Garcés de granada *et al.*, 1996). Para esta prueba la mayoría de las muestras tomadas los estados de la enfermedad de bulbos de violeta de los Alpes, resultaron positivas solo la colonia obtenida del estado 4 muestra 1 (E4M1) no reaccionó a la prueba de catalasa.

Tabla # 14 resultado de la prueba de catalasa.

ESTADO Y MUESTRA	RESULTADO
E1m1	Positiva
E1m2	Positiva
E2m1	Positiva
E2m2	Positiva
E3m1	Positiva
E3m2	Positiva
E4m1	Negativa
E4m2	Positiva

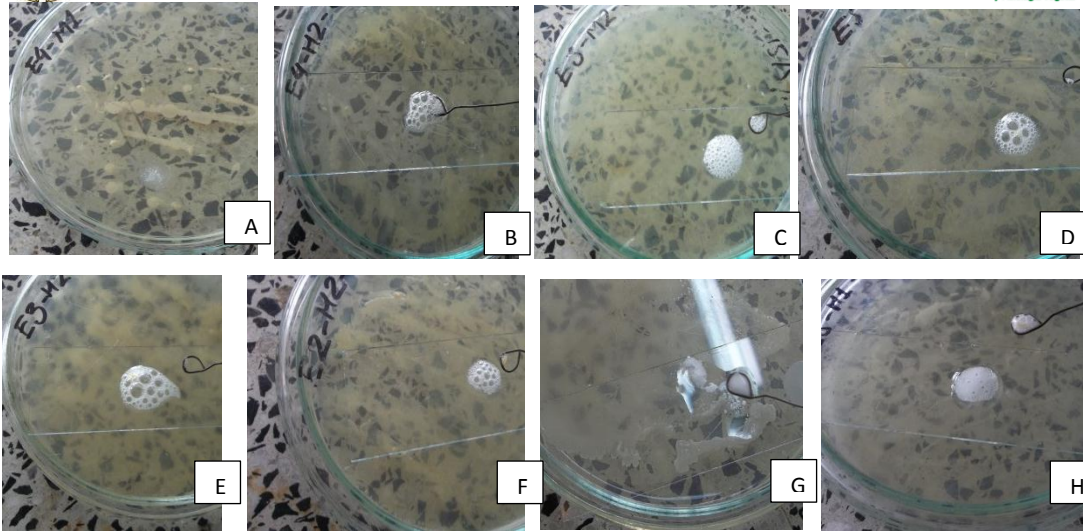


Imagen # 24 resultado de la prueba de catalasa para diferentes estados y muestras provenientes de violeta de los Alpes. (*C. persicum* Mill.). (A, B, C, D, E, F, G, H).

7.4.11 MEDIO KING B.

En el medio de cultivo, la tripteína y la peptona de carne aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la glicerina favorece la producción de pigmentos, la concentración de fosfato dipotásico estimula la producción de fluoresceína e inhibe la producción de piocianina y piorrubina. El sulfato de magnesio provee los cationes necesarios que incrementan la producción de fluoresceína y el agar es el agente solidificante (www.britanialab.com consultado en Enero de 2016). Para este caso los aislamientos obtenidos de plantas de violetas de los Alpes no presentaron pigmentos fluorescentes, a excepción del aislamiento E2M2 y E4M1 (Imágenes 25 A y F). La ausencia de pigmentos fluorescentes es una característica para la identificación de patógenos del género *Erwinia* esto concuerda con los reportes documentados en Francia por la empresa Morel en su página oficial (www.cyclamen.com, consultado en Enero de 2016), sin embargo la presencia de pigmentos fluorescentes en los aislamientos E2M2 y E4M1 puede sugerir la presencia de un patógeno del género *Pseudomonas*, el cual podría actuar de la mano con el patógeno del género *Erwinia* generando un complejo bacteriano en la pudrición de bulbo de violeta de los Alpes.

Tabla # 15 resultado de la prueba en medio diferencial King B.

ESTADO Y MUESTRA	RESULTADO
E1m1	Sin fluorescencia
E1m2	Sin fluorescencia
E2m1	Sin fluorescencia
E2m2	Presenta fluorescencia
E3m1	Sin fluorescencia
E3m2	Sin fluorescencia
E4m1	Sin fluorescencia
E4m2	Presenta fluorescencia

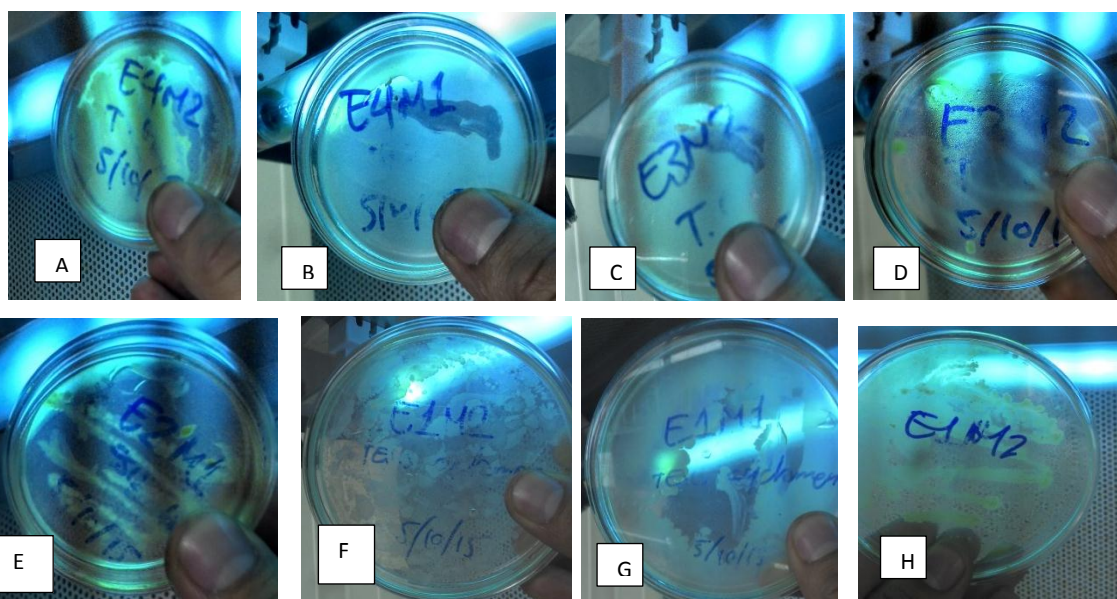


Imagen # 25 resultado de la prueba sobre medio de cultivo diferencial King B, para diferentes estados y muestras provenientes de violeta de los alpes. (A, B, C, D, E, F, G, H).



Tabla # 16 Resultado de pruebas bioquímicas de los aislamientos realizados.

PRUEBA	Aislamiento							
	E1M1	E1M2	E2M1	E2M2	E3M1	E3M2	E4M1	E4M2
Tinción de Gram	-	-	-	+	-	-	+	+
Reconfirmación del Gram con KOH al 3%	-	-	-	+	-	-	+	+
Forma	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos
Crecimiento en medio Mac Conkey	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento medio YGC (Colonias amarillas)	-	-	-	+	-	-	+	+
Crecimiento en Citrato de Simmons	+	+	+	+	-	+	+	+
Pigmentos fluorescentes en KB	-	-	-	+	-	-	+	+
Oxidasa	-	-	-	+	-	-	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+
Ureasa	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento aeróbico	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento anaeróbico	+	+	+	+	-	+	+	+
Licuefacción de la gelatina	+	+	+	+	+	+	+	+

Amarillo= genero *Erwinia*, Azul rey = *Pseudomonas*, azul agua marina = *Ralstonia*.



Tabla # 17. Géneros comunes de bacterias fitopatógenas y sus principales características bioquímicas (adaptada de Schaad (1988)).

	<i>Erwinia</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Acidovorax</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Ralstonia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>Xylophilus</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Clavibacter</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Streptomyces</i>
Gram positivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Crecimiento anaeróbico	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Crecimiento aeróbico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Colonias amarillas en YDC	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Colonias mucoides en YDC a 30 oC.	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
Pigmentos fluorescentes en KB.	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pigmentos no fluorescentes difusibles al medio de cultivo en KB	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Ureasa	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
Catalasa	+	+	VR+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Oxidasa	-	-	+	+	+	+	+	+	+				+
Formación de esporas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Presencia de micelio aéreo.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Licuefacción de gelatina	VR+	VR+	VR-	VR+	-	VR+	+	VR+	VR+	+	-	+	
Citrato	+	+	VR+	+	+	+	+		+	-		-	

Por los resultados de las pruebas bioquímicas los aislamientos E1M1, E1M2, E2M1, E3M1 y E3M2 tienen un mayor número de coincidencias con el género *Erwinia*, pese a que el aislamiento E3M1 no presenta crecimiento fermentativo en el medio de Hugh y Leifson; E2M2 y E4M2 con el género *Pseudomonas* y E4M1 con el género *Ralstonia*.

Los resultados de los aislamientos E2M2, E4M1 y E4M2 pese a indicar géneros diferentes a *Erwinia* hacen pensar que también hubo contaminación pero también cabe la posibilidad de estar ante un complejo de microorganismos patógenos en algunos estados de la enfermedad, principalmente los más avanzados, ya que como se observará en las pruebas de patogenicidad realizadas, todos los aislamientos inoculados causaron enfermedad.



Se han encontrado reportes del género *Pseudomonas* causando pudrición en bulbos, por ejemplo la pudrición blanda de la cebolla (*Allium cepa* L) causada por *P. viridiflava* (Gitaitis et al., 1998) y la pudrición blanda de la cala (*Zantedeschia* spp.) causada por *P. marginalis* (Krejzar et al., 2008). En este último caso es importante resaltar que según Kunstmann et al (2006) dicha pudrición es causada por bacterias del género *Erwinia*, más específicamente *E.carotovora* subsp. *atroseptica* y *E.carotovora* subsp. *carotovora*. Pese a ser trabajos diferentes se encuentran dos de los géneros encontrados en el presente trabajo.

Por otra parte, se ha asociado a *Ralstonia solanacearum* (raza 3, biovar 2) como el agente causal de la pudrición café de la papa (Janse, 1996).

Géneros de la familia Enterobacteriaceae con la posibilidad de generar pudriciones como lo son bacterias del género *Pseudomonas*. El género *Pseudomonas* son colonias Gram negativas que pueden ser oxidasa positivo o negativo, y su reacción a la catalasa es positiva. Son aeróbicas con un metabolismo de respiración estricto donde el oxígeno puede ser el receptor final del electrón; en algunos casos el nitrato puede ser usado como un receptor alternativo de electrón, permitiendo el desarrollo anaeróbico. (Garcés de granada et al 1996).

Las bacterias del género *Pseudomonas* causan numerosas enfermedades en plantas con diversa sintomatología incluyendo marchitamiento vascular, cáncer, pudriciones, pudriciones blandas, marchitamiento de inflorescencias y vástagos, manchas en las hojas, tumores o agallas y marchitamiento en setas (Garcés de granada et al 1996).

La condición de asepsia en el laboratorio de investigación de la universidad no se cumple en un 100 % esto puede influir en los resultados debido a que eventualmente se puede generar contaminación en los aislamientos por parte de microorganismo que habitan en el ambiente del laboratorio. Es necesario evaluar la posibilidad de que haya más de un agente causal de pudrición de bulbo ya que la aparición otros géneros de microorganismos también podría estar relacionada con esto.

7.5 Resultados del objetivo 3

Realizar pruebas de patogenicidad a las colonias obtenidas en los medios de cultivo.

Para el cumplimiento del objetivo específico tres, se procedió a implementar las pruebas de patogenicidad con el fin de cumplir los postulados de Koch.

7.5.1 Inoculación de rodajas de papa (*Solanum tuberosum*)

La imagen # 27 y sus derivadas muestra el crecimiento uniforme para todos los estados y muestras, en agar selectivo (Gram negativas) Mac Conkey, estas colonias se utilizaron para para el desarrollo de la suspensión bacteriana fuente de inoculación, las rodajas ubicadas en cámara húmeda manifiestan síntomas de pudrición tres días después de la inoculación; sin embargo, estos síntomas son absolutamente representativos ocho días después de la inoculación. La muestra 2 del estado 3 y la muestras 1 del estado 4 presentaron un síntoma de tejido blando y necrótico, con olor fétido síntoma característico del genero *Erwinia*, de la misma manera los estados iniciales de la enfermedad (1 y 2 y sus respectivas repeticiones) mostraron un síntoma en común, presentaron exudados blancos creciendo en todo el tejido de la rodaja, esto síntomas concuerda con el protocolo establecido por la universidad del estado de Washington, para patógenos asociados al género *Erwinia* en papa (*Solanum tuberosum*).

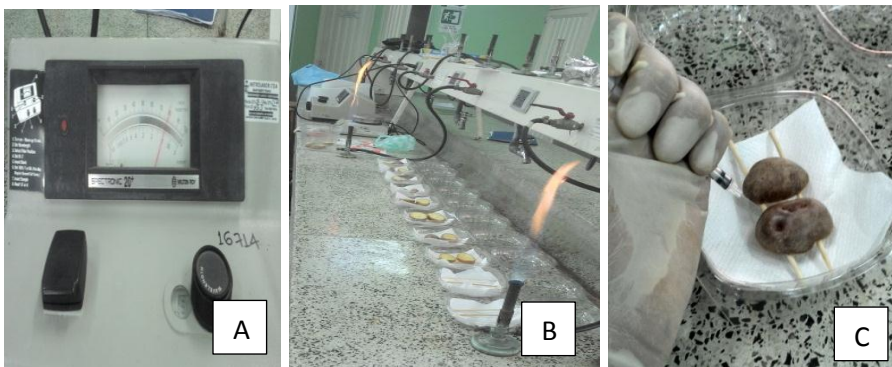


Imagen # 26 inoculación de colonias bacterianas cultivadas en rodajas de papa (pruebas de patogenicidad). (A, B, C).

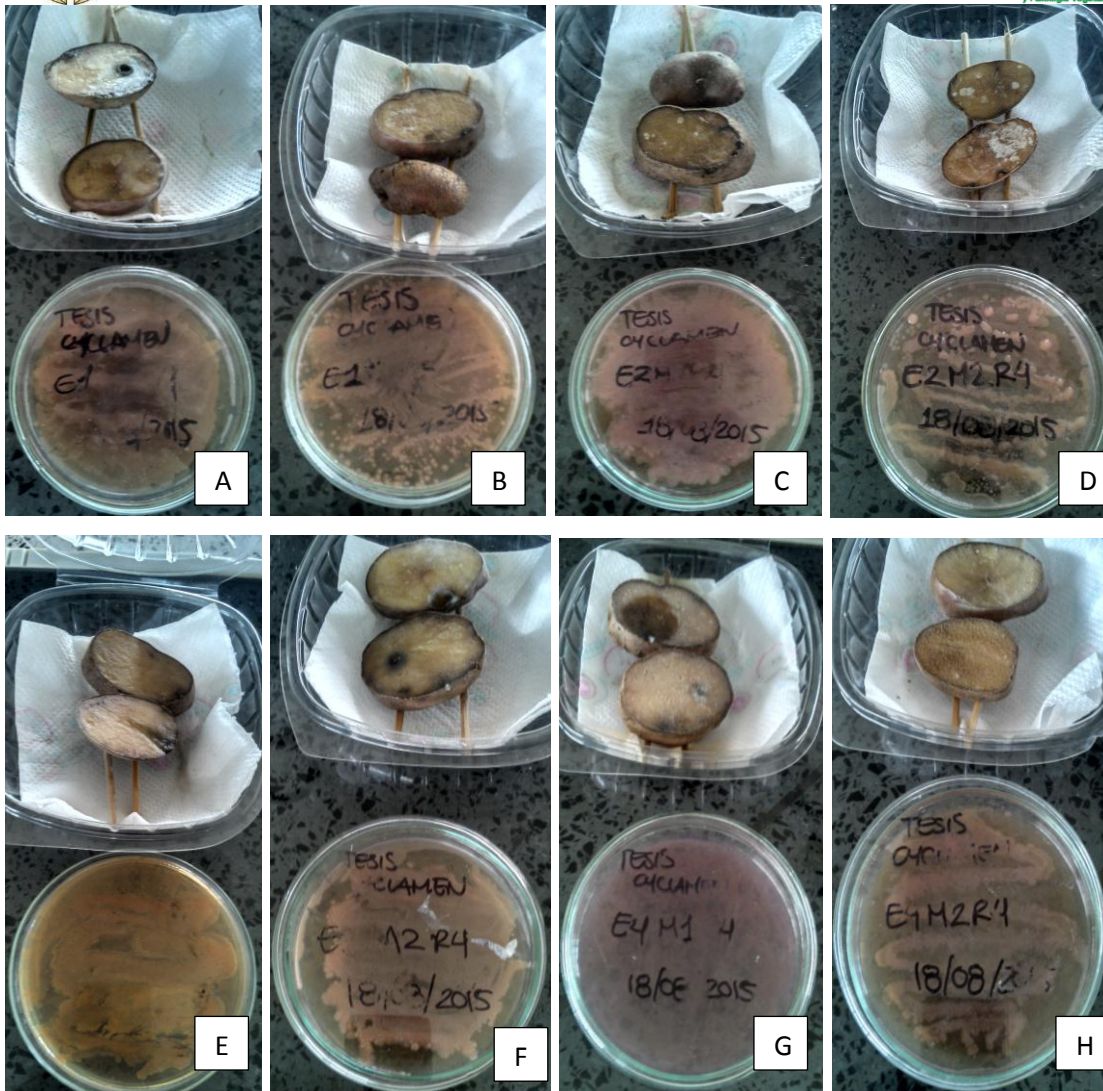


Imagen # 27. Rodajas de papa inoculadas con colonias bacterianas luego de 24 horas, abajo colonias obtenidas por siembra de estría en medio selectiva Mac Conkey para diferentes estados y muestras de violeta de los Alpes. (A, B, C, D, E, F, G, H).

“Cuando la pudrición blanda se desarrolla, el tejido del tubérculo se descompone, se hace blando y de color tostado. A menudo hay un borde negro alrededor de la descomposición, esto es muy escaso en campo, en papas cosechadas, los síntomas son más notables de 4 a 10 días después de la cosecha y el embalaje. Los síntomas se caracterizan por bronceado a marrón oscuro, manchas circulares, acuosas o lesiones pequeñas que rodean las lenticelas en la superficie del tubérculo. El tejido



infectado por lo general no se extiende a una profundidad mayor de aproximadamente 4 mm en el tubérculo. Lesiones adyacentes pueden unirse para formar, de forma irregular, lesiones hundidas grandes. En condiciones húmedas, las lesiones se incrementan, y pueden tomar rápidamente una apariencia hinchada esto debido a la producción de gases por el que respiran las bacterias. Las infecciones a través de las heridas pueden contribuir a la pudrición blanda eventual de todo el tubérculo. Sin embargo, si las condiciones siguen siendo de poca humedad, las lesiones se limitan” (Adaptado de Bacterial Soft Rot and Lenticel Spot on Potato Tubers -WASHINGTON STATE UNIVERSITY EXTENSION FACT SHEET • FS066E).

Las rodajas inoculadas con agua destilada estéril (Testigos absolutos) no presentaron pudriciones.

8.3.2 Inoculación de plantas sanas de violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.)

Para la implementación de esta prueba se usa la misma metodología anteriormente, en este caso se utilizaron plantas sanas de violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.) las cuales se mantuvieron en el laboratorio de fitopatología de la universidad de Cundinamarca a temperatura ambiente (20°C, HR 85%) con un riego constante, esperando evidenciar los estados de la sintomatología descritos en la caracterización de la enfermedad.

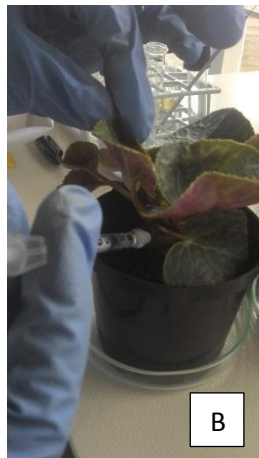


Imagen # 28 Inoculación de colonias bacterias obtenidas por asilamiento de diluciones consecutivas y siembra agar nutritivo, en plantas sanas de violeta de los Alpes. (A, B, C).



Imagen # 29 Sintomatología de plantas sanas de violeta de los Alpes ocho días después de la inoculación con colonias obtenidas en el laboratorio. (A, B, C, D, E, F, G, H).

Ocho días después de la inoculación las plantas sanas de violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.) empezaron a presentar un síntoma de clorosis en las hojas de la base, esta clorosis es un primer indicio de la presencia de la enfermedad, la muestras uno y dos del estado 1 representados en la imagen 29 A y B, presentaron una sintomatología más evidente ocho días después de la inoculación momento en el que se tomó el registro fotográfico. Los estados más avanzados de la enfermedad (Estado 3 ver imagen 29 E y F y estado 4 ver imagen G y H) por el contrario mostraron muy pocos síntomas y se extendió el tiempo de observación y toma de datos una semana más.

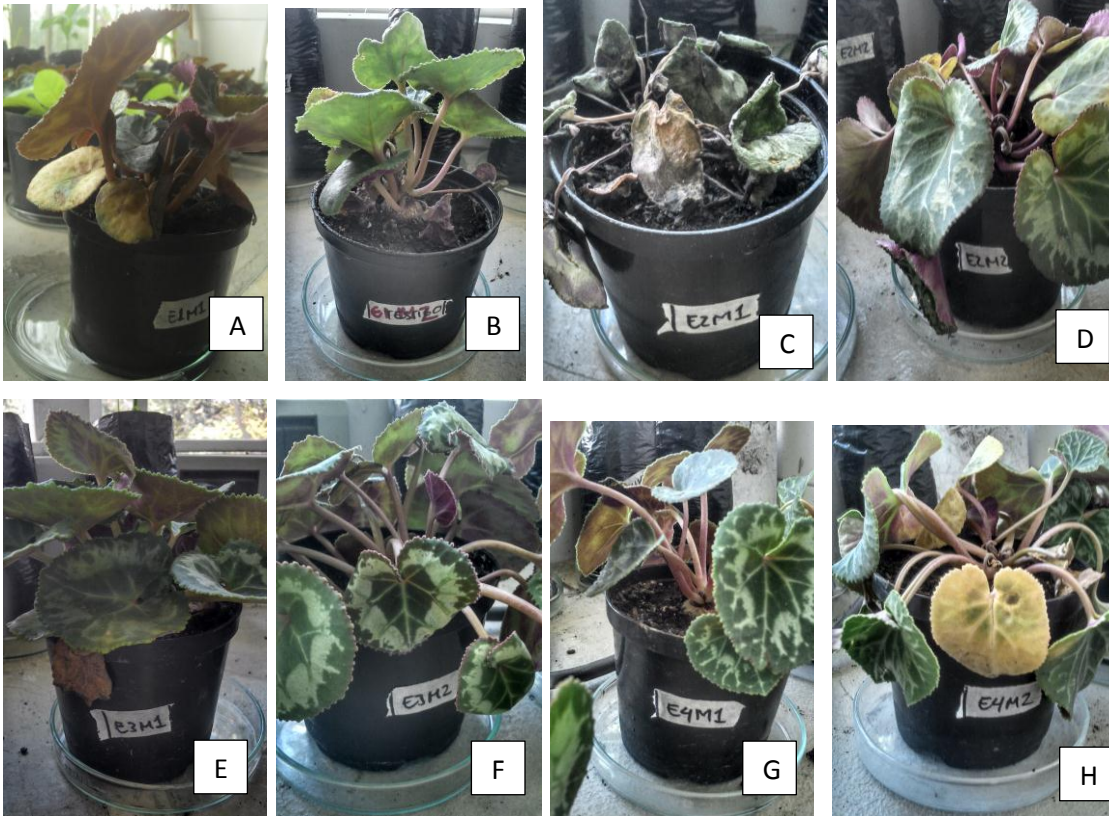


Imagen # 30 Sintomatología de plantas sanas de violeta de los Alpes quince días después de la inoculación con colonias obtenidas en el laboratorio. (A, B, C, D, E, F, G, H).

Quince días después de la inoculación los resultados fueron precisamente los síntomas con los que se empezó el estudio, todas las plantas inoculadas habían perdido su turgencia las muestras 1 y 2 del estado 1 representado en la imagen 30 A y B se tornaron cloróticas a medida que perdían la turgencia y en ellas se empezaron a evidenciar manchas negras ascendentes en peciolo y pedúnculos de hojas y flores, la muestra uno del estado 2 representado en la imagen 30 C, sucumbió ante la enfermedad. Todos sus tejidos fueron invadidos y necrosados por la pudrición. Por otro lado la muestra dos del estado 4 presente una clorosis muy fuerte en las hojas de la base de la planta el marchitamiento era progresivo toda la turgencia de la planta se había perdido y las manchas necróticas ascendían por peciolo y pedúnculos las plantas presentaban los mismos síntomas descritos al principio del estudio, esto genera más credibilidad en las técnicas de identificación taxonomía en relación al



patógeno de esta especie. No se evidenciaron síntomas en las plantas testigo, inoculadas con agua destilada estéril.

En la violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.) se observa en primer lugar la aparición de los síntomas aéreos. Mientras que la enfermedad se traduce por un oscurecimiento del interior del bulbo, que terminará por descomponerse desprendiendo un olor fétido desagradable, la parte aérea se marchita y se desploma brutalmente en la maceta. Las raíces también se invaden. El peciolo de las hojas es blando; también se puede constatar la presencia de manchas de aspecto aceitoso en el punto de inserción entre el peciolo y el limbo. A veces el amarilleo puede preceder la marchitez. La evolución es muy rápida, de la noche a la mañana. Solamente permite detectar las plantas infectadas a una fase muy avanzada en la que el tubérculo blando y fétido se aplasta bajo la presión de los dedos. A veces una mucosa blanquizca se encuentra en la superficie del bulbo. Toda la planta termina por ser contaminada por vía ascendente, y se obstaculiza la circulación del agua y las materias nutritivas (www.cyclamen.com consultado en Enero de 2016).

Para penetrar en la planta, la bacteria debe utilizar las vías naturales (estomas) o las lesiones en el vegetal. De hecho, no poseen ningún órgano diferenciado para penetrar mecánicamente ni las enzimas para debilitar la epidermis cerosa. En el caso de la violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.), las bacterias penetran esencialmente por las lesiones y estrías del tubérculo y las heridas de deshojado y desyemado. Estas heridas son especialmente numerosas después del trasplante y las contaminaciones frecuentes durante los días que siguen estas operaciones. Las bacterias se conservan en el suelo y en los residuos de cultivo. Una vez dentro del vegetal, invaden los tejidos de reserva, mientras que se extienden por la planta a través de las vías vasculares. (www.cyclamen.com consultado en Enero de 2016).

Generalmente, la contaminación se hace de planta a planta. Las bacterias se extienden por mancha o por flujo a partir de una planta infectada. Pueden igualmente sobrevivir en el agua y en los sustratos. Solamente pueden proceder de plantas enfermas que introdujeron la enfermedad en el establecimiento. Con la destrucción

total o parcial del bulbo, las bacterias se liberan por millares en el suelo y son arrastradas por las aguas de riego. La multiplicación de la bacteria se ve favorecida por las elevadas temperaturas (entre 25 y 30°C) en medio húmedo (www.cyclamen.com consultado en Enero de 2016). Los invernaderos de la finca los Alpes pertenecientes a la empresas plantas y plantas de Colombia S.A.S. son estructuras convencionales y no cuentan con dispositivos o mecanismos de aireación, el aire caliente se encierra tras techos y paredes del invernadero esta situación contribuye a la proliferación de la enfermedad y a que su incidencia sea mayor.

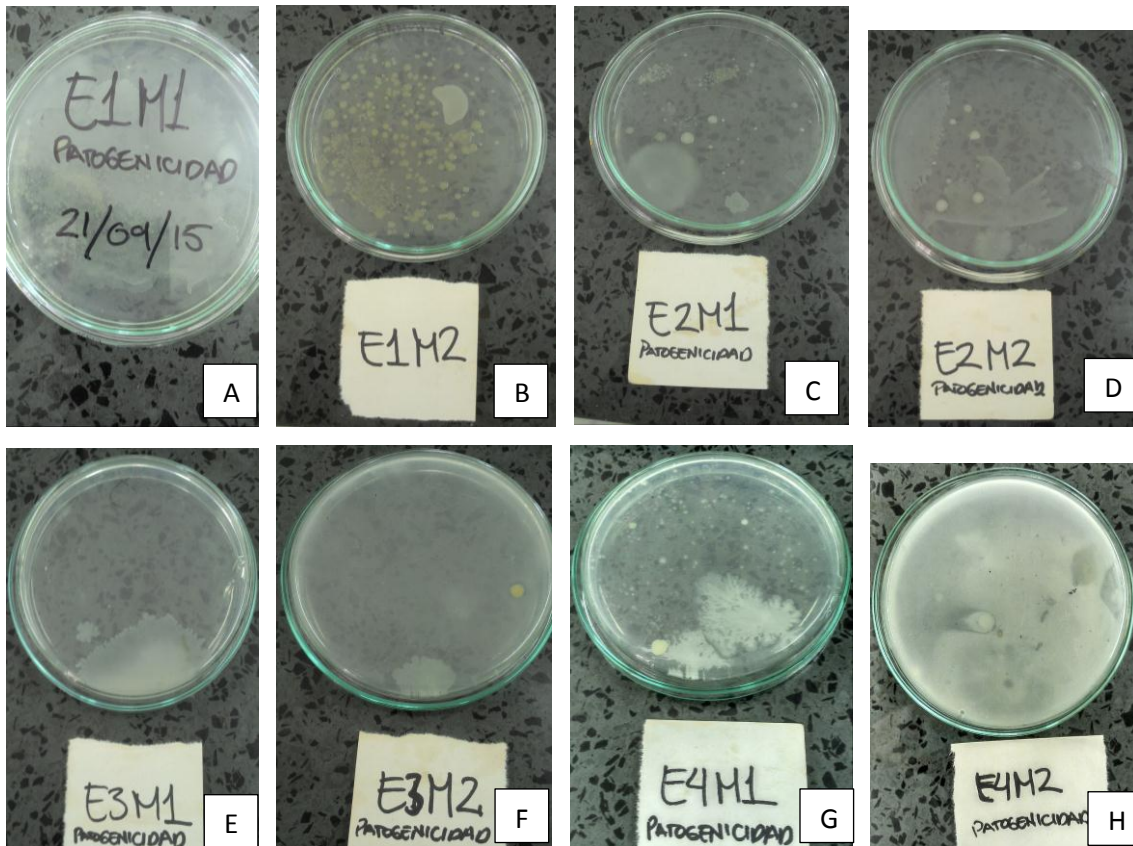


Imagen # 31 resiembra total en agar nutritivo de los resultados del método de extracciones consecutivas.

Para concluir las pruebas de patogenicidad se realizó un reaislamiento, esta vez las muestras fueron tomadas de las plantas de violeta de los Alpes inoculadas en laboratorio, se tomaron los bulbos para realizar la extracción por diluciones



consecutivas y posteriormente la siembra por cubrimiento total en agar nutritivo, observándose el crecimiento de colonias con características morfológicas muy similares a las obtenidas en la primera siembra a partir de violetas de los Alpes.

7.6 Tipificación molecular del aislamiento E2M1

Una vez obtenida la secuencia enviada por el laboratorio MacroGen® (ver anexo 1) se hizo un contraste con las base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information), Greengenes (Laurence Berkeley National Laboratory) y RDP (Ribosomal Database Project), mediante la herramienta BLAST

Se encuentra una identidad del 99% con el género *Enterobacter* como se observa en las imágenes 31, 32 y 33.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Enterobacter asburiae Lf7a strain Lf7a 16S ribosomal RNA, complete sequence	2689	2689	100%	0.0	99%	NR_074722.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter asburiae Lf7a, complete genome	2689	18799	100%	0.0	99%	CP003026.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter sp. SPh 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2686	2686	100%	0.0	99%	FJ405367.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone RPR-CFL17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2684	2684	100%	0.0	99%	KR612022.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter sp. LSRC89 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2684	2684	100%	0.0	99%	JF772075.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter soli strain LF7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2684	2684	100%	0.0	99%	NR_117547.1
<input type="checkbox"/> Uncultured Enterobacter sp. clone S7110 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2684	2684	100%	0.0	99%	GU296865.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter sp. WAB1915 partial 16S rRNA gene, strain WAB1915	2684	2684	100%	0.0	99%	AM184256.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter sp. WAB1929 partial 16S rRNA gene, strain WAB1929	2680	2680	100%	0.0	99%	AM184268.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter sp. WAB1926 partial 16S rRNA gene, strain WAB1926	2678	2678	100%	0.0	99%	AM184265.1
<input type="checkbox"/> Uncultured Enterobacter sp. clone EIT304_F06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2675	2675	99%	0.0	99%	GU201549.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter sp. WAB1884 partial 16S rRNA gene, strain WAB1884	2671	2671	99%	0.0	99%	AM184226.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter sp. B3(2013) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2669	2669	100%	0.0	99%	KF010356.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter sp. 4APG gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	2667	2667	100%	0.0	99%	AB665355.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter sp. B4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2667	2667	100%	0.0	99%	GQ304785.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone f6x1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2667	2667	100%	0.0	99%	DQ068815.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter sp. SPI 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2663	2663	100%	0.0	99%	FJ405369.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter sp. WAB1896 partial 16S rRNA gene, strain WAB1896	2662	2662	99%	0.0	99%	AM184237.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter sp. TUT1014 gene for 16S rRNA, partial sequence	2662	2662	100%	0.0	99%	AB086582.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter sp. WAB1956 partial 16S rRNA gene, strain WAB1956	2660	2660	99%	0.0	99%	AM184235.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter sp. Cg20b gene for 16S rRNA, partial sequence	2651	2651	100%	0.0	99%	AB673458.1

Imagen # 32. Secuencias con alineamientos significativos a la secuencia problema. Se observa un 99% de identidad con el género *Enterobacter* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



greengenes.lbl.gov

Functions

- Home
- Browse
- Export
- Slice
- Consensus
- Compare
- Search
- Probe
- Align
- Trim
- Download
- Curate
- More Tools...

About

- Citation
- Tutorial
- FAQ
- Objectives
- Methods
- Contact

My Interest List

remove all
collapse all
show marked

My Taxonomy

greengenes ▾
Activate
Changing taxonomy will

BLAST Results

Job ID = 6753
Untitled
GCTCAGATTGAACGCTGGCGCAAGCTAACACATGCAAGTCCGAGCGGTAAACACAGGGAGCTTCTCCTGGGTGACGAGCGCGGACGGGTGAAGTATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAAGCT
length:1470
algorithm BLASTN
Reporting MATCH LENGTHS over: 200 base pairs

BLAST summary by My Taxonomy shown below. [Complete BLAST output](#) can be viewed.

greengenes Taxonomy	MIL	Bel	Score	Identity	Match Length	Accession	prokMSAname	Study
k__Bacteria								
p__Proteobacteria								
c__Gammaproteobacteria								
o__Enterobacteriales								
f__Enterobacteriaceae								
Unclassified								
otu_3529								
	159764		1447	99.52	1471	AM184268.1	Enterobacter sp. str. WAB1929	27980
	159857		1441	99.25	1469	AM184237.1	Enterobacter sp. str. WAB1096	27980
	160051		1443	99.66	1457	AM184226.1	Enterobacter sp. str. WAB1004	27980
	161397		1446	99.52	1471	AM184265.1	Enterobacter sp. str. WAB1926	27980
	161565		1440	99.45	1457	AM184295.1	Enterobacter sp. str. WAB1956	27980
	161634		1448	99.59	1471	AM184256.1	Enterobacter sp. str. WAB1915	27980
	356789		1441	99.32	1471	FJ405369.1	Enterobacter sp. str. SPJ	36996
	368859		1449	99.59	1471	FJ405367.1	Enterobacter sp. str. SPH	36996
	579068		1437	99.39	1472	GQ304785.1	Enterobacter sp. str. B4	39195

Imagen # 33. Secuencias con alineamientos significativos a la secuencia problema. Se observa un 99% de identidad con el género *Enterobacter* (http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-blast_interface.cgi)

BROWSERS | CLASSIFIER | LIBCOMPARE | SEQMATCH | PROBE MATCH | FUNGENE | RDPipeline | SEQART | TAXOMATIC | TREE BUILDER | ASSIGNGEN

rdp login

SeqMatch :: Summary [new match | summary | detail | help]

Select All Match Hits to seqCART

Display depth: Auto ▾

Lineage (click node to return it to hierarchy view):

Hierarchy View: [options]

rootrank Root (1) (query sequences) [show printer friendly results] [download as text file]

- domain Bacteria (1)
 - phylum "Proteobacteria" (1)
 - class Gammaproteobacteria (1)
 - order "Enterobacteriales" (1)
 - family Enterobacteriaceae (1)
 - genus Enterobacter (1)
 - seqmatch_seq [view selectable matches]

Data Set Options:

Imagen # 34. Secuencias con alineamientos significativos a la secuencia problema. (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_detailhier.jsp?qvector=204&depth=0¤tRoot=0&querySeq=seqmatch_seq&seqid=&num=20)



El clasificador de RDP (Ribosomal Database Project) pudo determinar que se trata de una secuencia de un microorganismo perteneciente al género *Enterobacter*, sin embargo el poder de resolución de este clasificador, no permite asignar una especie.

Se construyó árbol de distancias utilizando las secuencias con mayor similitud a la secuencia problema, con respecto a la base de datos del NCBI (Imagen 34).

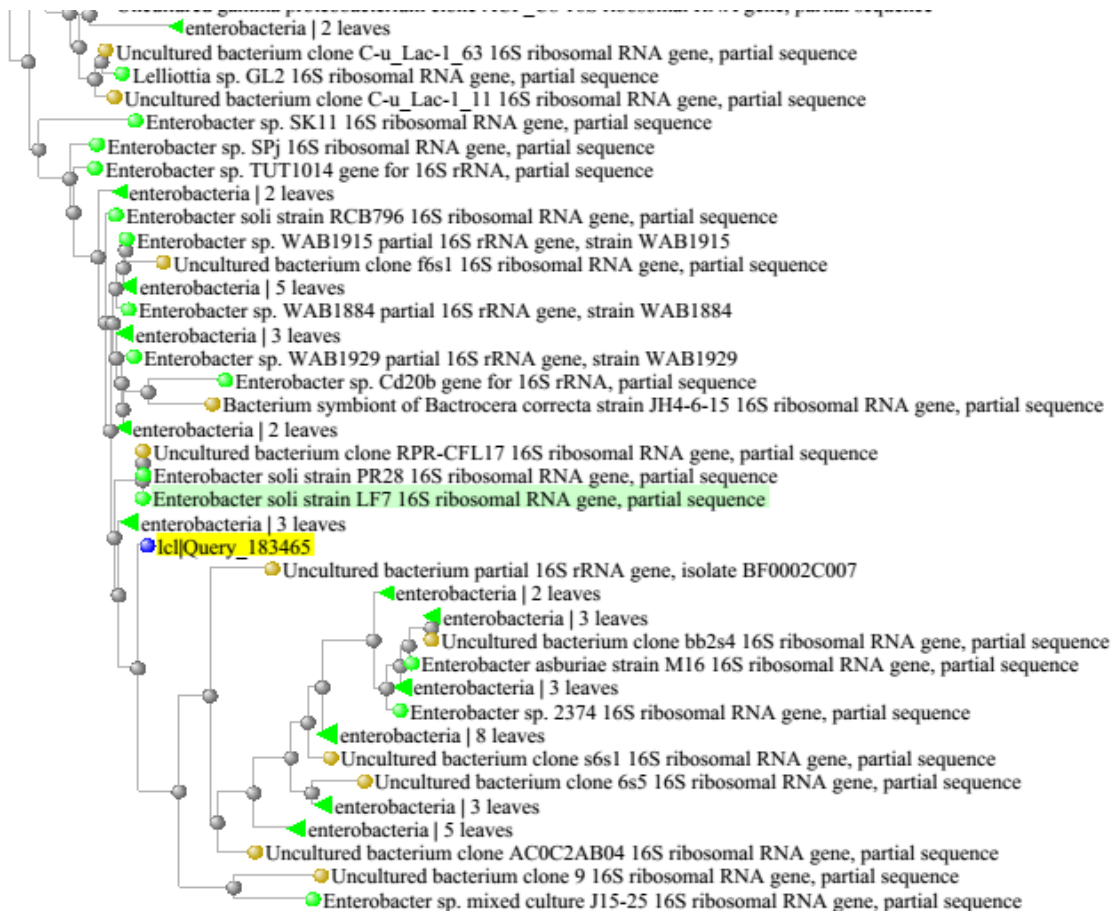


Imagen 35. Árbol de distancias utilizando las secuencias con mayor similitud a la secuencia problema, con respecto a la base de datos del NCBI.

Con los resultados anteriores la secuencia problema solo se puede clasificar hasta *Enterobacter* sp. hay que anotar que para este análisis solo se utilizó un aislamiento y no se enviaron contramuestras que corroboren los resultados.

Según el diagrama de identificación de bacterias fitopatogenas del manual de Bergey especies del género *Erwinia* como *Erwinia carotovora* se encuentran ubicados en el taxón de la familia *enterobacteriaceae* esto debido a que comparten gran variedad de comportamientos con otros géneros pertenecientes a esta familia.

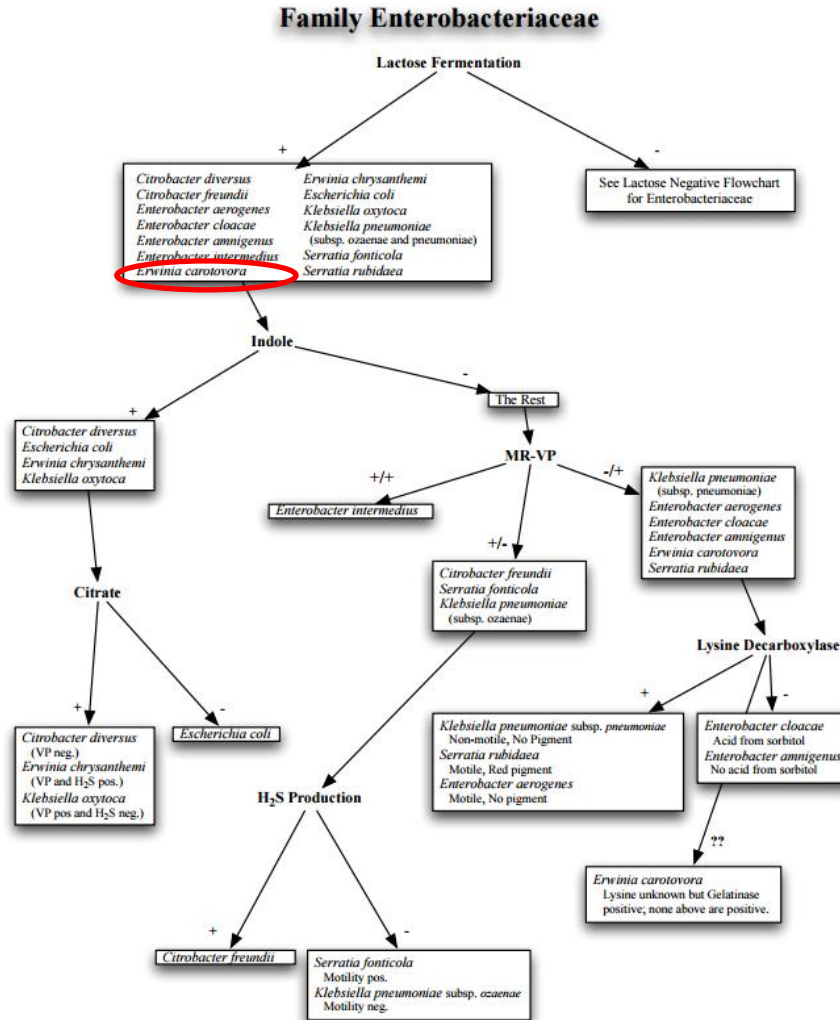


Figura # 17 diagrama de clasificación de la familia *enterobacteriaceae*.

Los miembros del género *Erwinia* son principalmente fitopatógenos y bacterias asociadas a las plantas. Estudios de comparación de las secuencias rDNA 16S han propuesto cambiar especies que originalmente se encontraban dentro del género



Erwinia a los géneros *Pantoea*, *Enterobacter*, *Pectobacterium* o *Brenneria*. Un Ejemplo de esto es *Enterobacter disolvens*, que causa pudrición en maíz (Kado, 2006).

Otras bacterias que anteriormente pertenecían al género *Erwinia* y que se han reclasificado como *Enterobacter*, son *Erwinia pirina* y *E. minipressuralis* que ahora cambiaron su denominación por *Enterobacter pirinus* y *E. minipressuralis*. *E. pirinus* es ureasa positiva y produce la enfermedad de las hojas pardas de los perales. Cabe mencionar que en la prueba de la ureasa los aislamientos que coinciden con el género *Erwinia* fueron ureasa positiva. (Koneman et al., 1999).



8. CONCLUSIONES

- Se lograron establecer 4 estados claros de la pudrición de bulbo de la violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.). En el estado 1 Las plantas se evidencia clorosis en las hojas basales y se empieza a ver el ascenso de una mancha negra a través del peciolo de la hoja. En el estado 2 Las plantas pierden la turgencia, las hojas de la base mueren y asciende la coloración negra por el peciolo hasta la hoja. En el estado 3 muchas de las hojas entran en senescencia y la coloración oscura de los peciolos inicia desde el bulbo y en el estado 4 El bulbo de la planta presenta un color negro oscuro y se observa marchitamiento general.
- Se aislaron dos tipos de colonias a partir de los bulbos de plantas enfermas de violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.), una de color blanco y otra de color crema. La colonia color blanco tenía bacilos Gram negativos.
- 5 de las 8 colonias (E1M1, E1M2, E2M1, E3M1 y E3M2) obtenidas en el laboratorio aisladas a partir de muestras de bulbos de violeta de los Alpes infectados con pudrición, son colonias Gram negativas, oxidasa negativas, ureasa positiva, fermentativas, no hidrolizan gelatina y catalasa positiva, estas características coinciden principalmente con el género *Erwinia*.
- Por medio de la siembra en medios selectivos y pruebas bioquímicas se pudo determinar que el agente causal de la pudrición de bulbo en violetas de los Alpes, cultivadas bajo invernadero en san Antonio del Tequendama. Se encuentra asociado a una infección bacteriana de colonias ubicadas del género *Erwinia* en colonias bacterianas de los estados 1, 2 y 3.
- Se encontraron también los géneros *Pseudomonas* (E2M2 y E4M2) y *Ralstonia* (E4M1), estos resultados indican que posiblemente exista una asociación del *Erwinia* con otros agentes fitopatógenos en etapas avanzadas de la enfermedad.



- Todos los aislamientos inoculados tanto en las rodajas de papa (*S. tuberosum*) como en las plantas sanas de violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.) presentaron síntomas asociados a pudrición bacteriana.
- Las condiciones utilizadas para las pruebas de patogenicidad (20°C, 85% de humedad relativa por un periodo de 8 días) fueron óptimas para el desarrollo de la enfermedad, pues todos los aislamientos inoculados tanto en las rodajas de papa (*S. tuberosum*) como en las plantas sanas de violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.) presentaron síntomas asociados a pudrición bacteriana.



9. RECOMENDACIONES

- Utilizar sistemas más sensibles como API20, ya que permiten realizar una mayor cantidad de pruebas bioquímicas, en menor tiempo y con mayor precisión.
- Realizar la tipificación molecular de aislamientos de los cuatro estados de desarrollo de la enfermedad, enviando por lo menos tres muestras por cada aislamiento.
- Los estudios relacionados a las especies con valor ornamental deben ampliarse. En Colombia y alrededor del mundo el sector agrícola ornamental viene tomando fuerza como una actividad económica de importancia y para que esta pueda expresarse de la mejor manera merece la atención de los profesionales del agro, que en esta actividad pueden encontrar una actividad agrícola muy rentable y con mucho potencial hacia el futuro.
- Las investigaciones de agentes causal de enfermedades y en general las investigaciones realizadas en el claustro universitario deben buscar las vías de comunicar lo aprendido con los agricultores quienes de una u otra manera tienen necesidad de esclarecer las problemáticas de carácter patogénico que tienen en sus cultivos.
- La investigación de agentes causales es una herramienta de suma importancia en el manejo integrado de enfermedades, el conocimiento de la identidad del patógeno permite conocer mejor la enfermedad y con base en esto generar metodologías de manejo capaces de integrar las condiciones agroecológicas con las diferentes herramientas de manejo, ya sean químicas, biológicas u ecológicas; todo esto en pro de brindar al agricultor lo necesario para que este entregue al mercado un producto de alta calidad.



10. BIBLIOGRAFÍA

AGRIOS, G. 2005. Plant pathology. 5Th edition. Elsevier Academic Press,

BARRET, T. 1975. Preparation of bacterial vaccine in: R.N. Godman (Ed). proceedings of the first workshop of phytobacteriology. University of Missouri press. Columbia. P 73.

BERGEY, D. H., BUCHANAN, R. E., GIBBONS, N. E., & American Society for Microbiology. (1974). Bergey's manual of determinative bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins

BILLING, E 1987. Bacteria as plant pathogens. Van nostrand reinhold Co. Ltd. Berkshire, inglaterra.

BOODLEY, J.W. 1996. The commercial greenhouse. 2da edicion. ed. delmar publishers. New York, 612 p.

FLUHARTY, D. M., AND W. L. PACKARD. 1967. Differentiation of Gram-positive and Gram-negative bacteria without staining. Am. J. Vet. Clin. Pathol. 1:31-35.

FLORES A., R.; LAGUNES T., A. 1998. La Horticultura Ornamental en México. Ed. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática - Colegio de Postgraduados. Aguascalientes, Ags. México. 88 p.

FLORES, A. R; RODRIGUEZ, M.A; MEJIA, J.M. 2009. Producción de plantas en maceta. Academia de floricultura del departamento de fitotecnia De la universidad autónoma Chapingo, MEXICO. P. 31 -39



GARDAN, L., GOUY, C., CHRISTEN, R., and SAMSON, R. 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53:381–391

GAVINI FJ, MERGAERT A, BEJI C, MIELCAREK D, IZARD K, KERSTERS, DE LEY J. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen nov. as *Pantoea dispersa* sp. Nov. Journal Syst. Bacteriol.1989. 39: 337-345.

GILCHRIST-SAAVEDRA, L., G. FUENTES-DÁVILA Y C. MARTÍNEZ-CANO. 1995. Guía Práctica para la Identificación de Algunas Enfermedades de Trigo y Cebada. CIMMYT. México, D. F. 64 p

GITAITIS, R., MACDONALD, G., TORRANCE, R., HARTLEY, R., SUMNER, D. R., GAY, J. D., AND JOHNSON, W. C., III. 1998. Bacterial streak and bulb rot of sweet onion: II. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* in association with multiple weed hosts. Plant Dis. 82:935-938.

GREY-WILSON, C. 1997. Cyclamen. A Guide for Gardeners, Horticulturists and Botanists. Ed. B.T. Bats ford Ltd. Londres. 192 p.

GRANADA E, GUTIERREZ B, CASTILLO N. 1996. Identificación de bacterias fitopatógenas. Universidad nacional de Colombia. Sede Bogotá.

HOLT. J, N.R. KRIEG; P.H. SNEATH, T. STANLEY Y T. WILLIAMS. 1994. Bergey's manual of determinate bacteriology. Williams and Wilkins. Baltimore, Mary land

JANSE, J. D. 1996. Potato brown rot in Western Europe – History, presence occurrence



and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. Bull. OEPP/EPPO Bull. 26:679-985.

KREJZAR V., MERTELÍK J., PÁNKOVÁ I., KLOUDOVÁ K., KÚDELA V. (2008): *Pseudomonas marginalis* associated with soft rot of *Zantedeschia* spp. Plant. Protect. Sci., 44: 85–90.

KUNSTMANN, JUAN PABLO, CIAMPI, LUIGI, BÖHM, LAURA, BARRERA, SYLVIA, & COLLADO, LUIS. (2006). Determinación de Especies de *Erwinia* (grupo carotovora) como Agentes Causales de (Pudrición Blanda) en Cala (*Zantedeschia* spp.). Agricultura Técnica, 66(3), 247-255.

KADO, C.I. Y M.G. HASKETT. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology 6: 969-976.

KADO, C.I. 2006. *Erwinia* and related genera. Prokaryotes. 6:443–450

KONEMAN EW, ALLEN SD, JANDA WM, SCHRECKENBERGER PC, Winn WC. 1999. "Diagnóstico Microbiológico". 5ª ed. Ed. Médica Panamericana SA. Buenos Aires.

KOSHIOKA, M.; MASAYUKI, A. 1998. World trends and requirements: Japan. Proceedings of the Third International Symposium on New Floricultural Crops, Perth, Western Australia, 1-4 Octubre 1996. Acta Horticulturae No. 454. pp. 19-28.

LARSON. R. A. 1992. Introduction to Floriculture. 2nd Edition. Academic Press, Inc. San Diego, California, USA. 407 p.

LIN, Y. 1980. Use of potassium hydroxide technique for the differentiation of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Brew. Dig. 55:36-37.



MOREL, G, MOREL, P. Recuperado de www.cyclamen.com

PERILLA, M., AJELLO, G., BOPP C., ELLIOT, J., FACKLAM, R., KNAPP, J., POPOVIC, T., WELLS, J., DOWELL, S. 2004. Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. Organización mundial de la salud. OMS.

SCHAAD, N.W.(Ed). 1994. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. American phytopathological society, ST. Paul, Minnesota. 148 p.

SCHAAD, N. W. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. The American Phytopathological Society St. 2a, Edición. Minnesota, USA. 164 p.

SCHAAD, N.W., JONES, J.B., and CHUN, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. The American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. 373 p.

SHEVCHIK, V.E., AND HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. 2003. PaeX, a second pectin acetylesterase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. Journal of Bacteriology 185:3091–100.

SUSLOW, T.M. SCHORTH Y M.ISAKA. 1982. Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprofitic acteria without staining phytopathologic. 72: 917-918

WIDMER, R.E.; STUART, M.C.; LYONS, R.E. 1991. Seven month 4" cyclamen – WIDMER PLAN. PP. 477-480. *In*: Ball RedBook 15° Edición. V. Ball (Ed). Ed. Geo. J. Ball Publishing. Chicago.

YAP, M.N., BARAK, J.D., and CHARKOWSKI, A.O. 2004. Genomic diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and its correlation with virulence. Applied and Environmental Microbiology 70:3013–3023.



12. ANEXOS

ANEXO 1. Secuencia ensamblada obtenida por el método de secuenciación de Sanger

5`

GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACACA
GGGAGCTTGCTCCTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACT
GCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCG
AAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGA
TTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGA
GAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTA
TGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTAAGTT
AATAACCTTGTTGATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG
CGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAA
CTGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCT
GGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTG
GCTTCCGGAGCTAACGCGTTAARTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTA
AACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTC
GATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTCCAGAGATG
GATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGT
GTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCC
AGCGGTTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTG
GGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTC
GTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATC



GTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
CACCATGGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGC
TTACCACTTTGTGATTCTGACTGGGGTGAA

3`