

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



TESIS:

**Caracterización fenotípica, molecular y control *in vitro* del
agente causal de la pudrición blanda en papa, Ayacucho - 2025**

Para optar el título profesional de:

INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTADO POR:

Bach. Yhon Carlos MOROTE HUAYTALLA

ASESORA:

M.Sc. Angela Juana REQUIS QUINTANILLA

AYACUCHO - PERÚ

2025

A mi madre, Isabel, por brindarme su amor incondicional todos los días de mi vida, y a mis abuelos Domingo e Isabel † por su infinito cariño.

A mi hermano Renato, cómplice y compañero de aventuras y experiencias; A mi cuñada Jasmín y sobrina Ayelén, quienes con su llegada cambiaron nuestras vidas para bien.

A mi pareja Jeni y a mi hijo Stefano, por ser mi mayor inspiración y motivación para seguir adelante día tras día.

Agradecimiento

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, mi casa superior de estudios, por haber sido un espacio de formación, enseñanza y generación de conocimientos. A la Facultad de Ciencias Agrarias y, en particular a la Escuela Profesional de Agronomía, así como a su plana docente, por haber contribuido en mi formación académica y profesional a través de sus enseñanzas teórico-prácticas

A la M. Sc. Angela Requis Quintanilla, por la asesoría y orientación brindadas en el desarrollo del presente trabajo de investigación, así como por su dedicación, tiempo, constante apoyo durante su elaboración y culminación.

Al convenio interinstitucional entre CHIRAPAQ, la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y la organización ÑUQANCHIK, por haberme brindado la oportunidad de ser beneficiario de una beca, así como el apoyo psicológico, social, académico y económico, fundamentales para la culminación exitosa del presente trabajo de investigación.

Índice

	Pág.
Carátula.....	ii
Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Índice	iv
Índice de tablas	viii
Índice de figuras	ix
Índice de anexos	xi
Resumen	12
Abstract.....	13
Introducción.....	14
Capítulo I	17
Marco teórico.....	17
1.1. Antecedentes.....	17
1.1.1. Antecedentes internacionales.....	17
1.1.2. Antecedentes nacionales.....	23
1.1.3. Antecedentes regionales	25
1.1.4. Antecedentes locales.....	26
1.2. El cultivo de papa	26
1.2.1. Origen	27
1.2.2. Taxonomía	27
1.2.3. Botánica	28
1.3. Pudrición blanda	28
1.3.1. Epidemiología.....	28
1.3.2. Etiología.....	29
1.3.3. Parasitismo.....	29

1.4. <i>Pectobacterium</i>	31
1.4.1. Historia	31
1.4.2. Taxonomía	33
1.4.3. Morfología	33
1.5. Identificación de <i>P. carotovorum</i>	33
1.5.1. Métodos clásicos	34
1.5.2. Métodos moleculares	35
1.6. Mecanismos de control	36
1.6.1. Productos base de cobre	37
1.6.2. Productos a base de calcio	37
1.6.3. Productos naturales	38
Capítulo II	39
Material y métodos	39
2.1. Ubicación del estudio	39
2.1.1. Ubicación política	39
2.1.2. Ubicación geográfica	40
2.1.3. Fases y ambientes de la investigación	40
2.2. Tipo de investigación	41
2.3. Variables	41
2.3.1. Variable independiente	41
2.3.2. Variable dependiente	41
2.3.3. Indicadores	41
2.4. Población y muestra	42
2.4.1. Población	42
2.4.2. Muestra	42
2.5. Técnicas e instrumentos	43
2.5.1. Técnicas	43

2.5.2. Instrumentos	43
2.6. Procedimientos	44
2.6.1. Colección de muestras	44
2.6.2. Procesamiento de muestras.....	45
2.6.3. Obtención de aislamientos puros.....	46
2.6.4. Prueba de patogenicidad.....	47
2.6.5. Identificación fenotípica	49
2.6.6. Identificación molecular	53
2.6.7. Control in vitro	56
Capítulo III	58
Resultados y discusión	58
3.1. Obtención de aislamientos.....	58
3.2. Prueba de patogenicidad.....	60
3.3. Identificación fenotípica	63
3.3.1. Tinción Gram.....	63
3.3.2. Prueba de catalasa.....	64
3.3.3. Prueba de oxidación y fermentación.....	65
3.3.4. Crecimiento a 27 y 37°C	65
3.3.5. Crecimiento en 5% de NaCl	66
3.4. Identificación molecular	68
3.4.1. Extracción de ADN.....	68
3.4.2. PCR convencional para el primer general 16S.....	68
3.4.3. Secuenciamiento	69
3.5. Control <i>in vitro</i>	71
Conclusiones.....	73
Recomendaciones	74
Referencias bibliográficas	75

Anexos	86
--------------	----

Índice de tablas

	Pág.
Tabla 1.1 <i>Taxonomía de Solanum tuberosum.</i>	27
Tabla 1.2 <i>Enzimas involucradas en la degradación de la pared celular, maceración del tejido y disminución de los mecanismos de defensa de la planta.</i>	30
Tabla 1.3 <i>Clasificación taxonómica de Pectobacterium carotovorum.</i>	33
Tabla 1.4 <i>Resultados esperados de las pruebas bioquímicas para la detección de P. carotovorum.</i>	35
Tabla 1.5 <i>Primers usados para la identificación de Pectobacterium carotovorum.</i>	36
Tabla 2.1 <i>Ubicación política de la investigación.</i>	39
Tabla 2.2 <i>Ubicación geográfica del laboratorio de fitopatología.</i>	40
Tabla 2.3 <i>Fases y ambientes de la investigación.</i>	40
Tabla 2.4 <i>Tipo de investigación.</i>	41
Tabla 2.5 <i>Variables e indicadores.</i>	42
Tabla 2.6 <i>Escala de evaluación para la pudrición de láminas de papa.</i>	48
Tabla 2.7 <i>Insumos para la preparación del medio O/F para 1000 ml.</i>	50
Tabla 2.8 <i>Insumos para la preparación del medio con 5% de NaCl para 1000 ml.</i>	52
Tabla 2.9 <i>Reactivos para PCR con el primer general 16S.</i>	54
Tabla 2.10 <i>Programación PCR con el primer general 16S.</i>	55
Tabla 2.11 <i>Plataformas utilizadas en la identificación molecular.</i>	56
Tabla 2.12 <i>Tratamientos para la prueba de control in vitro</i>	57
Tabla 3.1 <i>Resumen de la obtención de cepas.</i>	58
Tabla 3.2 <i>Incidencia y severidad de las cepas bacterianas.</i>	63
Tabla 3.3 <i>Resultados de las pruebas fenotípicas en 11 cepas bacterianas.</i>	67
Tabla 3.4 <i>Alineación significativa de la muestra PO3b.</i>	69
Tabla 3.5 <i>Porcentaje de inhibición del crecimiento</i>	72

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1.1 <i>Morfología de la planta de papa.</i>	28
Figura 1.2 <i>Desarrollo de la enfermedad de la pudrición blanda en tubérculos de papa.</i>	31
Figura 2.1 <i>Ubicación política de la investigación.</i>	39
Figura 2.2 <i>Ubicación del laboratorio de fitopatología.</i>	40
Figura 2.3 <i>Muestra: Cultivo bacteriano de 48 horas en medio Agar Nutritivo (M3).</i>	42
Figura 2.4 <i>Búsqueda y colección de muestras en la zona de Aturqui – Socos.</i>	45
Figura 2.5 <i>Tratamiento de muestras en el laboratorio.</i>	46
Figura 2.6 <i>Purificación de aislamientos.</i>	47
Figura 2.7 <i>Procedimiento realizado para la prueba de patogenicidad.</i>	48
Figura 2.8 <i>Procedimiento ilustrativo de la tinción Gram.</i>	49
Figura 2.9 <i>Reacción de burbujeo indicando presencia de la enzima catalasa.</i>	50
Figura 2.10 <i>Preparación de medio O/F.</i>	51
Figura 2.11 <i>Programación de temperaturas para la prueba de crecimiento.</i>	52
Figura 2.12 <i>Placa de Petri con medio con 5% de NaCl.</i>	53
Figura 2.13 <i>Extracción de ADN.</i>	54
Figura 2.14 <i>Plataforma de búsqueda NCBI</i>	56
Figura 2.15 <i>Preparación de los extractos de hígado y cola de caballo.</i>	57
Figura 3.1 <i>Crecimiento de colonias de un aislamiento puro.</i>	60
Figura 3.2 <i>Patogenicidad de los aislamientos bacterianos.</i>	62
Figura 3.3 <i>Prueba de tinción de Gram.</i>	64
Figura 3.4 <i>Formación de burbujas (respuesta positiva a la presencia de catalasa).</i>	64
Figura 3.5 <i>Respuesta positiva a cambio de coloración del medio de cultivo con el aislamiento M3.</i>	65
Figura 3.6 <i>Crecimiento bacteriano a 37 °C.</i>	66
Figura 3.7 <i>Crecimiento en 5% de NaCl.</i>	66

Figura 3.8 <i>Extracción de ADN.</i>	68
Figura 3.9 <i>Productos PCR amplificados para el gen 16S.</i>	69
Figura 3.10 <i>Secuencia consenso de nucleótidos de Pectobacterium brasiliensis.</i>	70
Figura 3.11 <i>Tratamientos aplicados en la prueba de control in vitro</i>	72

Índice de anexos

	Pág.
Anexo 1 <i>Colección de muestras en las diferentes zonas contempladas en la metodología.....</i>	86
Anexo 2 <i>Trabajos de laboratorio usando la cámara de flujo laminar.....</i>	87
Anexo 3 <i>Plaqueado de medio de cultivo AN.....</i>	87
Anexo 4 <i>Crecimiento de colonias de aislamientos bacterianos (M1, M2 y M3).</i>	88
Anexo 5 <i>Tinción Gram en aislamientos bacterianos.</i>	88
Anexo 6 <i>Prueba de catalasa con respuesta positiva en aislamientos bacterianos.....</i>	89
Anexo 7 <i>Ambientes del laboratorio de biotecnología Umbrella.</i>	90
Anexo 8 <i>Características del kit utilizado para la extracción de ADN.</i>	91

Resumen

En localidades de las provincias de Huamanga y Cangallo en la región Ayacucho, diversas zonas productoras de papa fueron consideradas para la recolección de tubérculos con pudrición blanda y plantas con síntomas de pierna negra, con el objetivo de aislar e identificar el agente causal mediante caracterización fenotípica y molecular, así como evaluar alternativas de control *in vitro*. Las muestras fueron colectadas en las localidades de Aturqui, Ampuaccasa, Chiara, Canaán INIA, mercado “Las Américas”, Pucuhuillca, Incaraccay, Huahuapuquio y Cangallo. Se obtuvo un total de 23 cepas bacterianas, de las cuales 8 cepas presentaron alta virulencia con 100 % de incidencia, mientras que 3 cepas mostraron patogenicidad intermedia y el resto no evidenció capacidad patogénica en ensayos de inoculación en láminas de papa. Las cepas patogénicas fueron caracterizadas fenotípicamente, resultando todas Gram negativas, catalasas positivas, fermentativas, con crecimiento a 37 °C y tolerancia a 5% de NaCl. La identificación molecular determinó que las cepas corresponden a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* con un 99.50% de similitud. Para el control *in vitro* se empleó un diseño completamente al azar, evaluándose un producto químico y dos alternativas ecológicas. Los resultados mostraron un 100% de inhibición para el sulfato de cobre pentahidratado, mientras que los extractos de cola de caballo e higuierilla no presentaron efecto inhibitorio bajo las condiciones evaluadas. Se concluye que *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* es el agente causal de la pudrición blanda en papa en la región Ayacucho, constituyendo el primer reporte de esta bacteria en la zona.

Palabras clave: Bacteria, *Pectobacterium*, Pudrición blanda, identificación molecular, control *in vitro*.

Abstract

In the provinces of Huamanga and Cangallo in the Ayacucho region, various potato-producing areas were sampled to collect samples exhibiting symptoms of soft rot. The objective was to isolate and identify the causal agent through phenotypic and molecular characterization, as well as to evaluate in vitro control alternatives. Samples were collected in the towns of Aturqui, Ampuaccasa, Chiara, Canaán INIA, the "Las Américas" market, Pucuhuillca, Incaraccay, Huahuapuquio, and Cangallo. A total of 23 bacterial strains were obtained, of which 8 strains showed high virulence with 100% incidence, while 3 strains showed intermediate pathogenicity, and the rest did not demonstrate pathogenic capacity in inoculation tests on potato slides. The pathogenic strains were phenotypically characterized; all were Gram-negative, catalase-positive, fermentative, grew at 37 °C, and tolerated 5% NaCl. Molecular identification determined that the strains correspond to *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* with 99.50% similarity. A completely randomized design was used for in vitro control, evaluating one chemical product and two ecological alternatives. The results showed 100% inhibition for copper sulfate pentahydrate, while horsetail and castor bean extracts showed no inhibitory effect under the evaluated conditions. It is concluded that *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* is the causal agent of soft rot in potatoes in the Ayacucho region, constituting the first report of this bacterium in the area.

Keywords: Bacteria, *Pectobacterium*, soft rot, molecular identification, in vitro control.

Introducción

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los más importantes a nivel mundial, ocupando el cuarto lugar en producción después del maíz, arroz y trigo. Su consumo es ampliamente difundido, alcanzando aproximadamente mil millones de personas, debido a su alto valor nutricional (Cruzado, 2022). En Perú el consumo per cápita alcanza los 92 kg/hab/año, situando al país en el puesto 16 a nivel mundial en producción, con más de 3000 variedades registradas (MIDAGRI, 2020) así mismo este cultivo constituye una de las principales fuentes de ingresos económicos para los agricultores de la región andina (Arcos et al., 2020).

Como ocurre en otros cultivos, la papa es susceptible al ataque de diversos agentes fitopatógenos que ocasionan pérdidas económicas significativas. Entre las enfermedades bacterianas más importantes se encuentran la pudrición marrón (*Ralstonia solanacearum*), la necrosis bacteriana (*Clavibacter michiganensis*), la costra de la patata (*Streptomyces scabies*) y la pudrición blanda (*Pectobacterium carotovorum*) (Al-Zomor et al., 2013).

Históricamente, las bacterias pectinolíticas asociadas a la pudrición blanda fueron agrupadas dentro del género *Erwinia*, caracterizadas por ser Gram negativas, fermentativas, con flagelos peritricos y no esporulantes (Winslow et al., 1920). Sin embargo, estudios posteriores permitieron diferenciar este grupo, dando lugar a la creación del género *Pectobacterium*, perteneciente a la familia Pectobacteriaceae, cuya especie tipo es *Pectobacterium carotovorum* (Brenner et al., 1974; Waldee, 1974).

Pectobacterium carotovorum es el agente causal de enfermedades como la pierna negra o pudrición blanda, dependiendo de órgano afectado. Esta enfermedad es considerada de gran

importancia especialmente en poscosecha, debido a las pérdidas que puede ocasionar las cuales son de hasta un 100 % cuando las condiciones son favorables y de entre 10 % a 40 % durante la cosecha, almacenamiento y comercialización (Amaya et al., 2021; INIA, 2021).

En la región de Ayacucho, existe escasa información científica sobre enfermedades bacterianas en el cultivo de papa, y se desconocen las especies y subespecies de *Pectobacterium* presentes. Por tal motivo, la presente investigación tiene como objetivo identificar las características fenotípicas y moleculares del agente causal de la pudrición blanda en papa en esta región.

Problema general

¿Cuáles son las características fenotípicas y moleculares del agente causal de la pudrición blanda en papa en la región de Ayacucho?

Problemas específicos

- ¿Cuál es la capacidad patogénica del agente causal de la pudrición blanda en papa?
- ¿Cuáles son las características fenotípicas del agente causal de la pudrición blanda en papa?
- ¿Cuáles son las características moleculares del agente causal de la pudrición blanda en papa?
- ¿Cuál es la eficacia del control *in vitro* sobre los aislamientos del agente causal de la pudrición blanda en papa?

Objetivo general

Identificar las características fenotípicas y moleculares del agente causal de la pudrición blanda en papa en la región de Ayacucho.

Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad patogénica de los aislamientos del agente causal de la pudrición blanda en papa.
- Determinar mediante características fenotípicas el género del agente causal de la pudrición blanda en papa.
- Determinar mediante características moleculares el género y especie del agente causal de la pudrición blanda en papa.

- Evaluar el efecto de diferentes tratamientos en el control *in vitro* del agente causal de la pudrición blanda en papa.

Capítulo I

Marco teórico

1.1. Antecedentes

1.1.1. Antecedentes internacionales

En España Gorris et al. (1994) mencionan que se han producido siete anticuerpos monoclonales (MAb) para *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Uno, llamado 4G4, reaccionó con alta especificidad para el serogrupo I de *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, el serogrupo más común en tubérculos de patata en diferentes ensayos serológicos. Se analizaron ochenta y seis cepas pertenecientes a diferentes serogrupos de *E. carotovora* subsp. *atroseptica*. Algunas cepas del serogrupo XXII también reaccionaron positivamente. No se observaron reacciones cruzadas contra otras especies de bacterias fitopatógenas ni contra 162 bacterias saprofitas de tubérculos de patata. Solo una cepa de *E. chrysanthemi* de patata presentó reacción cruzada. Se realizó una comparación de varias técnicas serológicas para detectar *E. carotovora* subsp. *atroseptica* en tubérculos de patata con MAb 4G4 o anticuerpos policlonales. El organismo se extrajo directamente de cáscaras de patata de tubérculos inoculados artificialmente mediante remojo o enriquecimiento selectivo en anaerobiosis en un medio con polipectato. El anticuerpo monoclonal 4G4 detectó específicamente 240 células de *E. carotovora* subsp. *atroseptica* por ml mediante inmunofluorescencia indirecta y tinción de colonias por inmunofluorescencia, y tras el remojo, mediante ELISA-DAS (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas con doble anticuerpo en sándwich) tras el enriquecimiento. La misma cantidad de células se detectó mediante inmunoelectrotransferencia con anticuerpos policlonales, y *E. carotovora* subsp. *atroseptica* y subsp. *carotovora* se distinguieron mediante esta última técnica. ELISA-DAS utilizando el anticuerpo monoclonal 4G4 con un enriquecimiento.

En Canadá De Boer & Ward (1995) mencionan que se determinó la secuencia de nucleótidos para una sonda de hibridación de ADN específica para *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* y se seleccionaron cebadores para la detección del patógeno pata negra mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los cebadores ECA1f (5'-CGGCATCATCATCATAAACACG-3') y ECA2r (5'-GCACACTTCATCCAGCGA-3') amplificaron específicamente un fragmento de ADN de 690 pb de todas las cepas de *E. carotovora* subsp. *atroseptica* analizadas, pero no de cepas de otras subespecies de *E. carotovora* aisladas de varios huéspedes y regiones geográficas u otras bacterias asociadas a plantas y suelos. La visualización del producto de PCR específico de *E. carotovora* subsp. *atroseptica* en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio requirió un mínimo de 250 a 500 UFC por ml. Un total de 170 muestras de tejido de tallo y tubérculo de papa se analizaron por PCR y se compararon con reacciones en ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) con un anticuerpo monoclonal específico para el lipopolisacárido de *E. carotovora* subsp. *atroseptica*. Aunque el 50,6% de estas muestras fueron positivas en la PCR en comparación con el 46,5% en el ELISA, algunas de las muestras positivas para el ELISA fueron negativas en la PCR. Cuando se añadió ADN de *E. carotovora* subsp. *atroseptica* a estas muestras, se obtuvieron productos amplificados en todas las muestras excepto en dos después de repetir la PCR, lo que indica que en la mayoría de los casos el hecho de no obtener la amplificación por PCR para algunas de las muestras positivas para ELISA no se debió a la presencia de inhibidores.

En Europa Fraaije et al. (1997) mencionan que:

Se utilizaron mediciones automatizadas de conductancia en medio polipectato para la detección de podredumbre blanda patógena *Erwinia* spp. en extractos de cáscara de papa. El umbral de detección de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca) en extractos de cáscara inoculados fue de aprox. 10^4 unidades formadoras de colonias (ufc) ml^{-1} cuando las muestras se consideraron positivas sobre la base de una respuesta dentro de las 48 h a 20 °C. La detección de *E. chrysanthemi* (Ech) fue menos sensible, solo se detectaron 10^5 ufc ml^{-1} de extracto de cáscara en 36 h a 25 °C. La correlación lineal entre los tiempos de detección en conductimetría y los niveles de inóculo de Eca y Ech en extractos de cáscara se utilizó para una estimación cuantitativa de Eca y Ech en extractos de cáscara contaminados naturalmente. Las muestras que dieron una respuesta conductimétrica positiva tuvieron que confirmarse con un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) o una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar la

presencia de Eca y Ech, ya que *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) también generó una respuesta de conductancia. La conductimetría fue sensible y eficiente para la detección de niveles de contaminación de Eca superiores a 10^4 ufc ml^{-1} de extracto de cáscara. Para Ech, la detección conductimétrica fue menos sensible e ineficiente debido a los bajos niveles de contaminación de Ech y la presencia de altos números de Ecc en muchas muestras después del enriquecimiento, lo que interfirió con la prueba. La tinción celular por inmunofluorescencia (IF) combinada con el enriquecimiento y la tinción de colonias por inmunofluorescencia (IFC) fueron adecuadas para detectar y cuantificar números bajos de Eca y Ech a menos de 10^4 ufc ml^{-1} en extractos de cáscara. Sin embargo, dado que se observaron reacciones falsas positivas y negativas en la serología, se requirió el uso de PCR después del enriquecimiento, o en combinación con IFC para confirmar los resultados positivos, para una detección precisa. (p. 183)

En Korea Kang et al. (2003) mencionan que se generó un par de cebadores de 24 meros mediante la secuenciación de una banda polimórfica derivada de la huella genética URP-PCR, compartida de forma única por las cepas de *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* (Pcc). El conjunto de cebadores (EXPCCF/EXPCCR) amplificó una única banda del tamaño esperado (0,55 kb) a partir del ADN genómico obtenido de 29 cepas de Pcc y tres cepas de *Pectobacterium carotovorum* ssp. *wasabiae* (Pcw), pero no de otras subespecies de *P. carotovorum*: *atrosepticum*, *betavascularum* u *odoriferum*, ni de otras especies de *Erwinia* o géneros bacterianos. El perfil de digestión con *RsaI* de las bandas amplificadas dividió las cepas de Pcc en cinco grupos con un perfil único de las cepas de Pcw. La primera ronda de PCR detectó entre 5×10^{-2} y 1×10^{-3} unidades formadoras de colonias (UFC) mL^{-1} , y la sensibilidad de detección aumentó a tan solo 2–4 UFC mL^{-1} tras la segunda ronda de PCR (anidada). Este protocolo de PCR se utilizó directamente para detectar cepas de Pcc en tejidos vegetales infectados.

En Turquía Al-Zomor et al., (2013) mencionan que se estudia la propagación de la enfermedad de la pata negra en diferentes áreas productoras de papa en Jordania, incluidas; Valle del Jordán (Al-Karama, Ashshuna Al-Janubiyya, Muthallath Al-Misri, Mu'addi, Deir Alla, Dirar y Kurayyima). Ammán (Al-Yadoda), Madaba (Om Al-Amad), Jerash (Tawahin Al-1Udwan), Ma'an (Rum y Al-Mudawwara). Cuarenta y seis aislados bacterianos de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca), agente causal de la enfermedad, fueron aislados e

identificados mediante diferentes pruebas bioquímicas, fisiológicas y nutricionales a partir de 145 muestras de papa enferma recolectadas. Se utilizó la amplificación basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una banda de 690 pb para confirmar la presencia de Eca en las bacterias aisladas estimadas por el cultivo de referencia (ATCC 15713). Se siguió la amplificación por PCR en el aislamiento, identificación y detección de Eca en muestras de tallos y tubérculos de papa infectados y asintomáticos. Los resultados mostraron que Eca se aisló en el 30% de las muestras de papa con pata negra infectadas de forma natural, mientras que la banda de 690 pb se detectó en el 88% de los extractos de ADN de las muestras de papa infectadas de forma natural. Por otro lado, Eca no se aisló de las muestras de tallo de papa asintomáticas, mientras que la banda de 690 pb se detectó en el 8% del extracto de ADN de estas muestras de tallo. Sin embargo, el uso de muestras de tubérculos asintomáticos ha mejorado la eficiencia del aislamiento. Eca se aisló directamente del 4% de las muestras cuando su suspensión se sembró en placas de medio Logan; sin embargo, se detectó una banda de 690 pb en el 32% de su extracto de ADN amplificado con PCR. La variabilidad genética entre los aislados de Eca ha podido detectar productos de PCR de 690 pb para 46 aislados diferentes que fueron digeridos con enzimas de restricción, es decir, Alul, Hoell, Hpall y SauAL. Los análisis de reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) pudieron agrupar los aislados de Eca en cinco grupos de PCR-RFLP con baja variabilidad genética.

En Polonia Czajkowski et al. (2015) mencionan que las especies de Enterobacteriaceae de podredumbre blanda (SRE), *Pectobacterium* y *Dickeya* (anteriormente clasificadas como *Erwinia* spp. pectinolíticas), causan enfermedades importantes en la papa y otros cultivos herbáceos y hortícolas. Pueden afectar la planta de papa en crecimiento causando pierna negra y son responsables de la podredumbre blanda del tubérculo durante el almacenamiento, reduciendo así el rendimiento y la calidad. Es esencial contar con métodos de detección e identificación eficientes y rentables para investigar la ecología y la patogénesis de la SRE, así como en los programas de certificación de semillas. El objetivo de esta revisión fue recopilar toda la información existente sobre los métodos disponibles para la detección de SRE. La revisión informa sobre el muestreo y la preparación de material vegetal para pruebas y sobre más de treinta métodos para detectar, identificar y diferenciar las bacterias causantes de podredumbre blanda y pierna negra a nivel de especie y subespecie. Estos incluyen métodos

basados en caracteres bioquímicos, serología, técnicas moleculares que se basan en la amplificación de la secuencia de ADN, así como varios otros menos investigados.

En Turquía Dadaşoğlu & Kotan (2017) mencionan que El presente estudio tiene como objetivo identificar *Pectobacterium carotovorum*, conocido como uno de los agentes causales más comunes de podredumbre blanda utilizando métodos clásicos y moleculares. Se obtuvieron cuatro cepas diferentes de *P. c. subsp. carotovorum* de varios huéspedes, dos de las cuales son agentes causales de la enfermedad de podredumbre blanda en papa y las otras dos en cebolla o pimiento. Estas cepas fueron confirmadas como *P. c. subsp. carotovorum* por el sistema de identificación microbiana (MIS). Además, se utilizó el sistema BIOLOG para identificar estas cepas y se encontró que los resultados eran inconsistentes con los del sistema de identificación microbiana. Los resultados de las pruebas de reacción de hipersensibilidad (HR), patogenicidad y actividad pectolítica demostraron que todas las cepas eran patógenas. Se realizaron varios análisis bioquímicos y moleculares (16S rDNA y PCR específica) para la identificación y caracterización. Las cepas se identificaron a nivel de género mediante el método de PCR de 16S rDNA. Identificadas como *P. c. subsp. carotovorum*, según los resultados del MIS, estas cuatro cepas se analizaron mediante pruebas de PCR específicas y se observó una banda de 434 pb con cebadores Y1-Y2. Este es el primer estudio que revela que estas cuatro cepas son agentes causantes de la podredumbre blanda en la papa, la cebolla y el pimiento en Anatolia Oriental y también en Turquía.

En Jordania Abu-Obeid et al. (2018) mencionan que el estudio tiene como objetivo identificar *Pectobacterium carotovorum*, conocido como uno de los agentes causales más comunes de podredumbre blanda utilizando métodos clásicos y moleculares. Se obtuvieron cuatro cepas diferentes de *P. c. subsp. carotovorum* de varios huéspedes, dos de las cuales son agentes causales de la enfermedad de podredumbre blanda en papa y las otras dos en cebolla o pimiento. Estas cepas fueron confirmadas como *P. c. subsp. carotovorum* por el sistema de identificación microbiana (MIS). Además, se utilizó el sistema BIOLOG para identificar estas cepas y se encontró que los resultados eran inconsistentes con los del sistema de identificación microbiana. Los resultados de las pruebas de reacción de hipersensibilidad (HR), patogenicidad y actividad pectolítica demostraron que todas las cepas eran patógenas. Se realizaron varios análisis bioquímicos y moleculares (16S rDNA y PCR específica) para la identificación y caracterización. Las cepas se identificaron a nivel de género mediante el método de PCR de

16S rDNA. Identificadas como *P. c. subsp. carotovorum*, según los resultados del MIS, estas cuatro cepas se analizaron mediante pruebas de PCR específicas y se observó una banda de 434 pb con cebadores Y1-Y2. Este es el primer estudio que revela que estas cuatro cepas son agentes causantes de la podredumbre blanda en la papa, la cebolla y el pimiento en Anatolia Oriental y también en Turquía.

En Rusia Nikitin et al. (2018) mencionan lo siguiente:

Objetivo: Crear un método para la detección e identificación altamente sensible, selectiva, rápida y fácil de usar de patógenos económicamente significativos de la papa, incluyendo virus, bacterias y oomicetos, ya sea un solo patógeno o una gama de varios patógenos que ocurren simultáneamente.

Métodos y resultados: Se han desarrollado sistemas de prueba para PCR en tiempo real, que operan en el régimen de amplificación unificado, para *Phytophthora infestans*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya dianthicola*, *Dickeya solani*, *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium carotovorum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, virus de la papa Y (formas ordinarias y necróticas, así como sistema de prueba indiscriminado, detectando todas las formas), A, X, S, M, virus del enrollamiento de la hoja de la papa, virus de la parte superior de la fregona de la papa y viroide del tubérculo fusiforme de la papa. Los sistemas de prueba (incluyendo polimerasa y revertasa) se inmovilizaron y liofilizaron en microrreactores miniatura (1 ½ µl) en microarrays de ADN/ARN de silicio (micromatrices) para su uso con un amplificador móvil AriaDNA™.

Conclusiones: Las micromatrices precargadas de 30 reacciones con una vida útil de 3 y 6 meses (para patógenos basados en ARN y ADN, respectivamente) a temperatura ambiente sin condiciones especiales se probaron con éxito en muestras de referencia y de campo en comparación con los métodos tradicionales ELISA y microbiológicos, mostrando un rendimiento y una sensibilidad perfectos (1 pg). Importancia e impacto del estudio: El sistema de diagnóstico preciso, rápido y fácil de usar en formato de micromatrices puede contribuir significativamente al cribado de patógenos y a los estudios fitopatológicos. (p. 797)

En Colombia Amaya et al. (2021) mencionan que:

La papa (*Solanum tuberosum*) es un tubérculo de importancia a nivel mundial; es el cuarto cultivo de interés agronómico en términos de producción y área cultivada después del arroz (*Oryza sativa*), el maíz (*Zea mays*) y el trigo (*Triticum aestivum*). *Pectobacterium carotovorum* es un agente fitopatógeno de la papa que causa la podredumbre blanda del tubérculo, y es considerada como la enfermedad poscosecha más importante, pues genera grandes pérdidas económicas a nivel del almacenamiento. El presente documento pretende dar un esbozo de la biología del patógeno, los métodos existentes para la detección de dicho agente, la descripción del quorum sensing como mecanismo de la regulación de la expresión génica de sus factores de virulencia, el mecanismo de acción del patógeno, el proceso infectivo y los métodos actuales de control. (art. 1710)

1.1.2. Antecedentes nacionales

En Chíncha – Perú, Requis (2020) menciona que:

De la zona de Chíncha baja, se extrajeron muestras del cultivo de alcachofa, dos síntomas algo diferentes; en uno de ellos, se observaba pudrición húmeda a nivel del cuello, en la parte aérea había marchitez y tumbado de la planta, al realizar un corte en el cuello internamente había presencia de pudrición blanda de color verde claro a marrón oscuro; el otro síntoma, se caracterizaba por mostrar a nivel del cogollo una necrosis acuosa en el borde de las hojas tiernas y avanzaba de manera descendente hacia la parte central comprometiendo la formación del capítulo. Cinco aislamientos fueron positivos en la prueba de patogenicidad. Mediante pruebas fenotípicas como: tinción Gram, formación de cavidades en medio Cristal Violeta Pectato, catalasa, oxidación y fermentación y degradación de láminas de papa; se determinó que los aislamientos pertenecen a género *Pectobacterium*. Con las pruebas de sensibilidad a la erytromicina, crecimiento a 37°C, crecimiento en 5% de NaCl y degradación de sustancias a partir de sacarosa; se buscó determinar la subespecie de los aislamientos, sin embargo, esto no se determinó, porque los resultados obtenidos no coincidieron con los resultados de otros autores. Para la prueba de identificación molecular se usó primers específicos para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y otro para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atroseptica*, al realizar la PCR con estos primers no hubo resultado, por lo que se usó un juego de primers general de la región 16S ARN, llegando identificar a: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* (cuello y cogollo), *Pectobacterium*

carotovorum subsp. *odoriferum* (cogollo), y *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidae* (cuello). En la prueba de control *in vitro* los productos a base de cobre fueron los mejores, y en campo para la pudrición del cuello y cogollo los mejores resultados se obtuvieron con gluconato de cobre, proteinato de cobre, proteinato de calcio (solos o en combinación con el biocontrolador) y *Trichoderma* (cepa T22). (p. 13)

En Piura – Perú Aguilar et al. (2021) mencionan que:

El banano (*Musa* sp) es un cultivo muy importante en el desarrollo socioeconómico del Perú. La enfermedad de la pudrición blanda viene causando pérdidas económicas. El objetivo fue aislar e identificar el agente causal de la pudrición blanda en banano e implementar alternativas de manejo. Las bacterias fueron aisladas del pseudotallo con síntomas de pudrición blanda de 11 zonas productoras del valle del Chira. La prueba de patogenicidad se realizó en segmentos de pseudotallos y en hijuelos de banano. Ocho aislamientos fueron caracterizados cultural, morfológica y bioquímicamente: Todos los aislamientos tuvieron forma de bacilo, fueron Gram negativos, con flagelos peritricos y las colonias formaron cavidades en medio Cristal Violeta Pectato (CVP). Las pruebas bioquímicas mostraron una reacción positiva a la catalasa, hidrólisis de gelatina, fermentación de glucosa y lactosa, y tolerancia al NaCl 5%. Sin embargo, en medio TSI (Triple azúcar de hierro) y sensibilidad a la eritromicina solo los aislados A2M, A3Ma, A5Mall, A7VF, A9Sa y A10 reaccionaron positivamente y los aislados A6Q y A11Sal negativamente. El crecimiento a 28, 30, 36, 37 y 45°C fue positivo para los ocho aislados, a excepción de A6Q y A11Sal no desarrollaron a 45°C. Las características culturales, pruebas bioquímicas y de patogenicidad permitieron identificar seis aislados como *Pectobacterium chrysanthemi* y dos como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. El manejo de la enfermedad se basa en el uso de hijuelos certificados, adecuada fertilización, aplicaciones de materia orgánica, agentes biocontroladores y control del insecto picudo. (p. 571)

En Piura – Perú Maldonado et al. (2024) mencionan que:

Pectobacterium chrysanthemi es el agente causal de la pudrición blanda que comúnmente afecta los cultivos de banano orgánico de todo el planeta. Las políticas actuales de control fitosanitario se basan en la sintomatología causada por la enfermedad. Sin embargo, al existir otras especies que causan síntomas similares, se

recurre a pruebas de patogenicidad a las que se debe adicionar pruebas bioquímicas para llegar a identificar la bacteria, prescindiendo de ensayos moleculares que, en contraste, permitirían obtener resultados más específicos y en menor tiempo. Este artículo presenta una metodología alternativa en el diagnóstico rápido y específico de la pudrición blanda causada por *Pectobacterium chrysanthemi* en cultivos de banano orgánico del Perú. La detección mediante virulencia de la bacteria en tejido hospedante de *Solanum tuberosum* y la PCR del espaciador transcrito interno (ITS) del ADNr 16S/23S, permite el manejo oportuno de la enfermedad. Los resultados demuestran que en el complejo entre la prueba de patogenicidad y el ensayo PCR- ITS 16S/23S es posible detectar a *Pectobacterium chrysanthemi* en un periodo de 8 días, 3 horas y 15 minutos, demostrando que este método es más eficiente que las pruebas bioquímicas usualmente empleadas para el diagnóstico de la pudrición blanda en *Musa* sp. (p. 299)

En Piura – Perú Nolasco et al. (2022) mencionan que:

La pudrición blanda a nivel mundial, es una de enfermedad que afecta a cultivos de importancia agrícola económica como lo son cultivos de banano orgánico que se cultivan en la región norte tropical del Perú en el distrito de Querecotillo provincia de Sullana, departamento de Piura. Diversos estudios relacionan a especies bacterianas del género *Pectobacterium* y *Dickeya* (anteriormente *Erwinia*). Sin embargo, en los últimos años también se ha reportado la presencia de bacterias del género *Klebsiella* en muestras de pudrición blanda en banano. Con la finalidad de evidenciar que población bacteriana se encuentra presente en muestras de pudrición blanda en banano orgánico de Querecotillo, empleamos un análisis de similitud del gen 16S ARN (fragmento de 1492 nucleótidos) de 37 secuencias obtenidas de los aislados bacterianos de la muestra de pudrición blanda. Nuestros resultados concluyen que en la muestra de pudrición blanda se encontraban presentes bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*: *Klebsiella michiganensis* (29/37) y *Klebsiella variicola* (8/37). Este hallazgo refuerza la necesidad de continuar con estudios que permitan evidenciar el rol bacteriano del género *Klebsiella*. (p. 2)

1.1.3. Antecedentes regionales

En Ayacucho Cancho (2019) menciona que:

El presente trabajo, consistió en aislar y caracterizar al agente causal de la pudrición negra de la piña, para determinar un eficaz control *in vitro* del agente causante de la pudrición negra del fruto de piña, para lo cual se colectaron frutos de piñas con síntomas característicos del mercado local mayorista Nery García Zárate. Las muestras se transportaron al laboratorio de Fitopatología de la Escuela Profesional de Agronomía de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, donde se hizo el aislamiento del hongo en tres diferentes medios PDA (Papa Dextrosa Agar), PZA (Papa Zanahoria Agar) y Agar V8 a diferentes temperaturas 10, 20, 25 y 30°C, como resultado se determina que el medio más favorable para el crecimiento micelial del hongo patógeno con 3.8 cm/24 Hrs. es el PDA a una temperatura de 25 °C; posteriormente se realizó la caracterización e identificación morfológica del hongo mediante microscopia óptica, determinando estructuras reproductivas características del hongo y comprobación mediante criterios taxonómicos establecidos, del que se obtuvo como resultado que el patógeno causante de la pudrición negra de la piña es el hongo *Thielaviopsis paradoxa*. Finalmente se realizó el control químico *in vitro* donde los tratamientos más eficaces son: T1 (Mancozeb -dosis recomendado), T3 (Propineb - dosis recomendado), T5 (Benomil - dosis recomendado), T6 (Benomil - dosis al 50%), T7 (Procloraz - dosis recomendado) y T8 (Procloraz - dosis al 50%), estos tratamientos inhibieron el crecimiento de *Thielaviopsis paradoxa* al 100%. Sin embargo, el control biológico con *Trichoderma viride* obtuvo un porcentaje de inhibición (PI) de 94.96%, y el control con *Trichoderma harzianum* obtuvo un PI de 87.56 %. (p. 9)

1.1.4. Antecedentes locales

En el Perú existen diversos estudios sobre bacterias causantes de pudrición blanda en diferentes cultivos, principalmente relacionados con *Pectobacterium* sp., sin embargo, información específica en el cultivo de papa en la región de Ayacucho es limitada, evidenciando un vacío de información que justifica la presente investigación.

1.2. El cultivo de papa

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) se desarrolla a lo largo del territorio peruano en diversos agroecosistemas, como punas secas y húmedas, valles interandinos, vertientes orientales húmedas, vertientes occidentales semiáridas y valles costeros subdesérticos (Egúsquiza, 2000). Bajo este contexto, la región andina contempla la mayor

superficie de producción, constituyéndose como la principal zona productora del país (Campos, 2014).

1.2.1. Origen

El origen de especies cultivadas, como la papa, se asocia a regiones con alta variabilidad genética tanto de formas silvestres como cultivadas. Según Nikolai Vavilov (1951), citado por Montaldo (1984), los centros de origen se identifican en función de esta diversidad. En el caso de la papa, se reconocen dos principales centros de origen: el centro Chiloé y el centro andino Ecuador-Perú-Bolivia, siendo este último el más importante por su amplia variabilidad genética.

1.2.2. Taxonomía

La taxonomía de las especies de papa, tanto silvestres como cultivadas es compleja debido a la alta variabilidad morfológica y a la capacidad de hibridación natural entre ellas, lo que dificulta la delimitación precisa de especies (Rodríguez, 2009).

La papa pertenece a la familia Solanaceae y al género *Solanum*, el cual agrupa numerosas especies, subespecies y series. Existen diversos sistemas de clasificación basados en el número de especies reconocidas; si embargo, uno de los más aceptados es el que reconoce ocho especies cultivadas (Cronquist, 1981; Huamán, 1986).

La clasificación taxonómica utilizada en este estudio se basa en el sistema APG IV propuesto por Angiosperm Phylogeny Group (2016), el cual se fundamenta en relaciones filogenéticas:

Tabla 1.1

Taxonomía de Solanum tuberosum.

Categoría	Taxa
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	Solanum
Especie	<i>Solanum tuberosum</i> L.

Fuente: (Angiosperm Phylogeny Group, 2016)

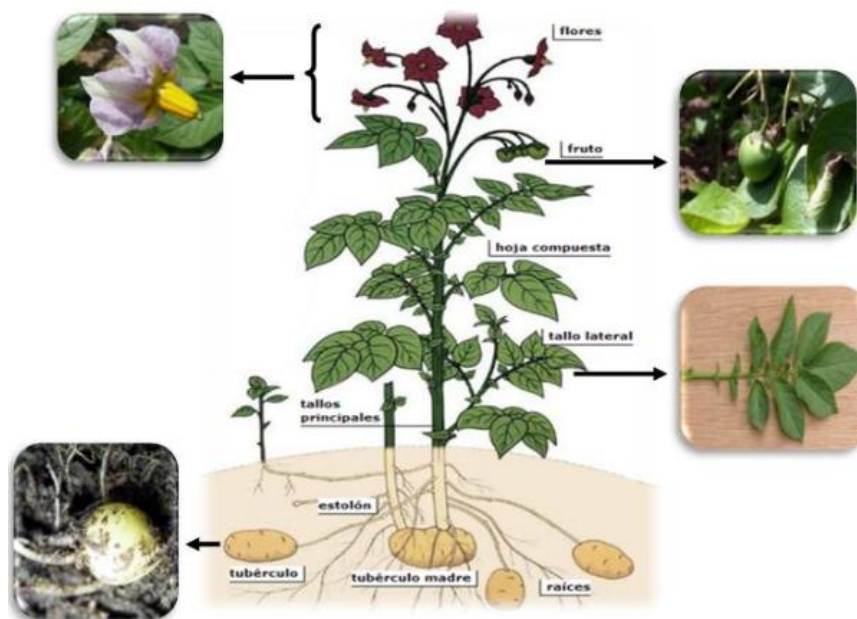
1.2.3. Botánica

La papa es una planta herbácea que puede comportarse como anual y potencialmente perenne. Se considera anual debido a que completa su ciclo de vida en un periodo aproximado de seis meses, mientras que por su carácter potencialmente perenne se debe a su capacidad de reproducción vegetativa mediante tubérculos.

Las hojas son compuestas e imparipinadas, con foliolos que presentan variabilidad en forma, número y tamaño según la especie las condiciones ambientales. Las flores son hermafroditas y autógamas, presentando diversos colores como el rojo, azul, blanco o morado, que en su conjunto forman una inflorescencia de tipo cimosa (Hawkes, 1988; López, 1979).

Figura 1.1

Morfología de la planta de papa.



Fuente: (Huamán, 1986)

1.3. Pudrición blanda

1.3.1. Epidemiología

Las bacterias causantes de la pudrición blanda tienden a sobrevivir por más tiempo en hospedantes alternos y restos de cosecha, mientras que su permanencia en el suelo es por un tiempo corto debido a condiciones como la temperatura, humedad y pH del suelo. Para el cultivo de la papa, la principal fuente de inóculo son los tubérculos semilla, cuando estos se pudren liberan bacterias al suelo y estas se trasladan a través del agua para infectar plantas

vecinas, las bacterias logran ingresar al hospedante a través de heridas o aberturas naturales, colonizan raíces y luego pueden trasladarse a través del sistema vascular. En los tallos pueden o no causar pudrición ya que esto también les permite sobrevivir en forma latente (Czajkowski et al., 2011; Perombelon, 1974).

La diseminación puede ocurrir también gracias al aire, la lluvia y sobre todo los insectos quienes dan lugar a que la infección sea llevada por largas distancias en campo como en almacenamiento. La bacteria puede estar presente en todas las etapas de desarrollo del insecto. Una forma de diseminar las bacterias es a través de los equipos de pulverización contaminados (Agrios, 2005; McCarter et al., 1984).

Requis (2020) menciona que *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atroseptica* fueron encontradas en aguas superficiales de Escocia y en Colorado Estados Unidos, al igual que en el aire en campos distantes donde no había presencia de hospedantes.

1.3.2. Etiología

El nivel de agua en el suelo es importante para el desarrollo de la enfermedad ocasionada por *Pectobacterium*. La presencia de una delgada capa de agua en la semilla condiciona una situación anaeróbica que favorece la multiplicación bacteriana y dar comienzo con la pudrición. Esta condición anaeróbica juega un rol en contra hacia la respuesta de resistencia del huésped ya que esta misma depende del oxígeno, dado a ello se da en forma exponencial la multiplicación bacteriana y producción de enzimas degradadoras de la pared celular que muestra como resultado lesiones en descomposición (Fuqua et al., 2001)

1.3.3. Parasitismo

El proceso comienza con la interacción entre el patógeno y el huésped mediante la secreción de proteínas efectoras (usando el sistema de secreción tipo III TTSS). Los efectores más otras proteínas externas actúan en forma no virulenta; es decir, permanecen ocultas a fin de estimular en la planta la respuesta de hipersensibilidad HR (Khosro, 2012).

Luego de la interacción, se desglosa el sistema de regulación génica QS y se da la liberación de los factores de virulencia, que incorporan enzimas extracelulares como las

pectinasas que poseen la capacidad de destruir la lámina media que cumple una función cementante entre las paredes celulares de células adyacentes y desarrollan un papel importante en el avance de la enfermedad. Con la disolución de la laminilla media hidrolizada, pueden prosperar también bacterias saprofitas (Bhat et al., 2012).

En la siguiente tabla se listan a algunas de las enzimas que actúan en el desarrollo de la enfermedad, pero también se mencionan a enzimas como las fosfoglucomutasas (PGM) y las PG o glucosidasas (Matsumoto et al., 2003).

Tabla 1.2

Enzimas involucradas en la degradación de la pared celular, maceración del tejido y disminución de los mecanismos de defensa de la planta.

Enzimas	Nomenclatura
Celulasas	Cel, EC 3.2.1.4
Proteasas	Prt, EC 3.4.24
Enzimas pectinolíticas	Pectinmetilesterasa (Pme, EC 3.1.1.11)
	Pectinlasi (Pnl, EC 4.2.2.2)
	Pectatoliasas (Pel, EC 4.2.2.2)
	Pectatohidrolasas (Peh, EC 3.2.1.15)
Enzimas pécticas	Pectinesterasas (PE)
	Pectinmetilesterasas (PME)
	Poligalacturonasas (PG)

Fuente: (Matsumoto et al., 2003).

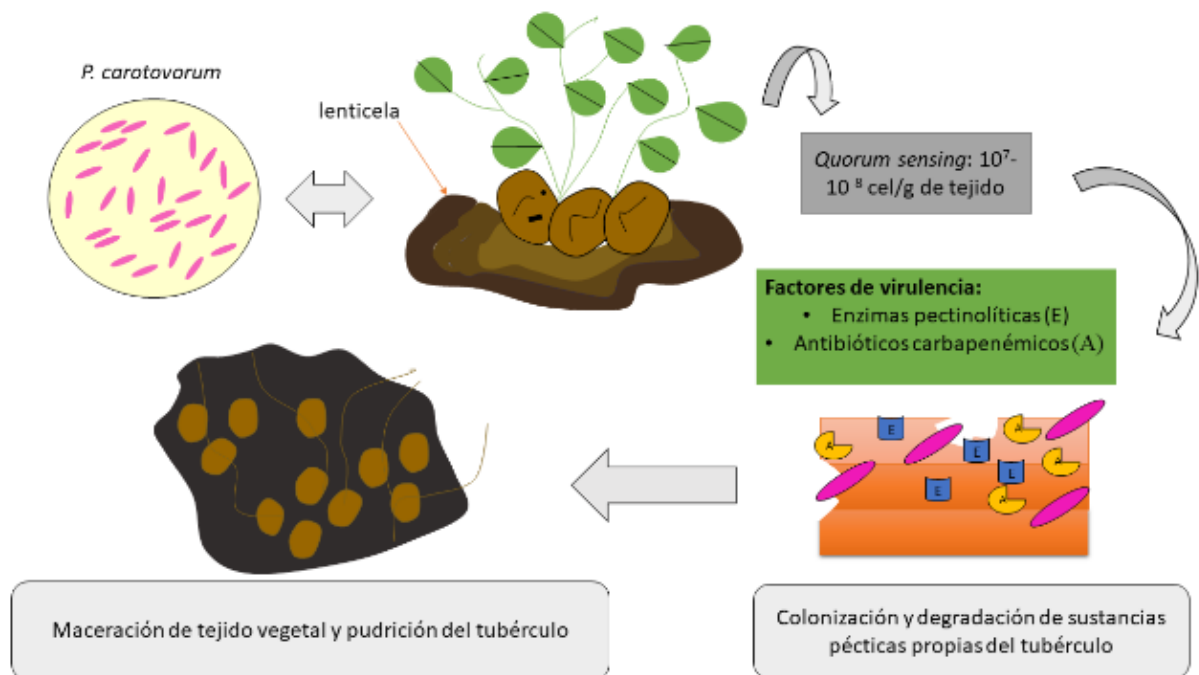
La enfermedad comienza su desarrollo tras la contaminación de restos de cosecha y tubérculos. La supervivencia de la bacteria en el suelo puede darse desde las dos semanas hasta los seis meses, la cual está determinada por condiciones como la humedad, pH y temperatura; este último factor puede ser determinante al momento de saber qué tipo de organismo predomina en la lesión. La bacteria puede pasar de un estado latente a estar muy activa cuando las condiciones ambientales lo permitan, comienza a multiplicarse hasta obtener una densidad celular de 10^7 y 10^8 células/g de tejido, indicador del umbral para la activación del sistema de regulación de la expresión génica QS (Smadja et al., 2004). Luego, la bacteria despliega los factores de virulencia produciendo la degradación o maceración del tubérculo que adquirirá una consistencia cremosa tornándose de color negro en presencia del aire (Czajkowski et al., 2011).

Esta bacteria además de los tubérculos, puede infectar a los tallos y peciolo. La subespecie más comúnmente encontrada en la superficie de las plantas es *P. carotovora* subsp.

carotovora (Doolotkeldieva et al., 2016). El tallo puede infectarse mediante el sistema vascular a partir de la multiplicación de la bacteria en el tubérculo madre podrido, una vez en el tallo el patógeno puede permanecer en estado latente o producir infección, con las condiciones favorables se produce la enfermedad del pie negro. Por otro lado cuando el tubérculo madre se descompone por completo se liberan las bacterias al suelo y son trasladadas mediante el agua hacia los tubérculos hijos o plantas vecinas diseminando más la enfermedad (Acuña, 2021).

Figura 1.2

Desarrollo de la enfermedad de la pudrición blanda en tubérculos de papa.



Fuente: Adaptado de (Franco & Stefanova, 2008).

1.4. *Pectobacterium*

1.4.1. Historia

Erwinia era en principio el nombre común para bacterias con carácter fitopatógeno, el cual fue propuesto por Winslow en 1917, este investigador consideró dentro del grupo a aquellas que formaban colonias blanquecinas, viscosas y que no producían indol. Años después en 1920 se da como tal el nombre del género en honor al fitobacteriólogo Erwin F. Smith quien considera a las bacterias fitopatógenas como Gram negativas, con flagelos peritricos y no esporulantes (Winslow et al., 1920).

Waldee (1942), relata que tras estudios realizados con diferentes aislamientos, da con la conclusión de que existen un grupo de bacterias pectinolíticas distintas a las especies de *Erwinia*, por ello sugieren que estas pasen a formar un nuevo género separado en la familia enterobacteriaceae dado a que son fácilmente reconocibles; a raíz del descubrimiento se propone el nuevo género *Pectobacterium*, bacterias Gram negativas, no formadoras de esporas, con forma de bastón, móviles por medio de flagelos peritricos y no móviles. La especie es *Pectobacterium carotovorum* (Jones) n. comb. Syn *Bacillus carotovorus* Jones.

Brenner et al. (1974) menciona que se propusieron una extensa cantidad de esquemas taxonómicos para ambos grupos de *Erwinias*, tanto para el verdadero cuya especie es *Erwinia amylovora* y las *Erwinias* pectinolíticas como *Pectobacterium carotovorum*. Ambos géneros cuentan con las razones suficientes para mantenerse dentro de la familia Enterobacteriaceae. La diferencia entre ambos géneros se sostiene en la exhibición de patrones metabólicos de *Erwinia* y *Pectobacterium*, así como diferencias en la enfermedad que producen *Erwinia* (necrosis biliar, marchitez y seca) *Pectobacterium* (Pudrición blanda).

Hauben et al. (1998) trabajaron con 29 aislamientos y determinaron las secuencias del 16S ADNr cuyo análisis secuencial de las Enterobacterias fitopatógenas indicó nuevas relaciones entre especies, estos autores mencionan hasta 3 géneros marcados *Erwinia*, *Pectobacterium* y *Brenneria*. Y llegaron a determinar que las especies del género *Erwinia* pueden dividirse en dos grupos, el grupo I compuesto por *E. amylovora*, *E. malitiosa*, *E. persicinus*, *E. psidii*, *E. rhamptici* y *E. tracheiphila*. En el grupo II proponen que las *Erwinias* pasen a *Pectobacterium*. Estos mismos describen al género *Pectobacterium* como células con forma de bastón, Gram negativas, con una medida de 0.5 a 1 X 1 a 3 µm con extremos redondos, presentándose solos o en parejas y ocasionalmente en cadenas, pueden ser móviles por medio de flagelos peritricos. Las cepas de este género tienen reacción positiva a la catalasa y reacción negativa a la oxidasa, con metabolismo fermentativo y son aerobios facultativos, todas producen ácido a partir de fructosa, galactosa, glucosa, ribosa, sacarosa y entre otros sin embargo no de adonitol, arabitol, xilosa, p-methylmanosido, sorbosa y almidón. Las cepas de este género poseen también enzimas pectinolíticas que causan podredumbres blandas, necrosis y marchitamientos a excepción de *Pectobacterium cypripedii*.

De acuerdo con Czerwicka et al. (2011), Duarte et al. (2004) y Lee et al., (2017), el género *Pectobacterium* se divide en 6 especies y subespecies:

- *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (van Hall).
- *Pectobacterium betavascularum* (Gardan, Gouy, Christen, & Samson).
- *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Duarte, De Boer, Ward, & De Oliveira).
- *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones).
- *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* (Gallois, Samsung, Ageoron, & Grimont).
- *Pectobacterium wasabie* (Gardan, Gouy, Christen & Samson).

1.4.2. Taxonomía

El género, especie y subespecie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, se conocía anteriormente como *Erwinia carotovora* subsp. *carotovorum*, esta bacteria pertenece a las Gammaproteobacterias y a la familia Enterobacteriaceae (Czajkowski et al., 2011; Potrykus et al., 2014).

Tabla 1.3

Clasificación taxonómica de Pectobacterium carotovorum.

Categoría	Taxa
Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacterales
Familia	Pectobacteriaceae
Género	<i>Pectobacterium</i>
Especie	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
Subespecie	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i>

Fuente: (Hauben & Swings, 2015).

1.4.3. Morfología

Czajkowski et al. (2011) mencionan que es una bacteria pectinolítica gramnegativa, tiene forma de bacilo, mide entre 0.7 a 1 µm de ancho por a 1 a 2.5 µm de largo; no esporulada, motil y con flagelos peritricos; las colonias de esta bacteria muestran una elevación convexa y son de color blanco cremoso, sus células pueden aparecer en forma individual o en pares.

1.5. Identificación de *P. carotovorum*

Para la identificación de *P. carotovorum* se cuenta con dos métodos; los clásicos y moleculares. Los métodos clásicos consisten en caracterizar rasgos fenotípicos de nivel

morfológico, bioquímico, fisiológico y patológico además de pruebas a fin de evaluar reacciones serológicas. Con respecto al método molecular, se utilizan técnicas que involucran el ADN de los microorganismos con las que se emplean marcadores genéticos, es posible la identificación de *P. carotovorum* (Costa et al., 2006; Dadaşoğlu & Kotan, 2017; Zanolli & Spoto, 2013; Zhang & Tanner, 2017).

1.5.1. Métodos clásicos

Para el aislamiento de la bacteria se utiliza el medio de cultivo selectivo (CVP) Cristal Violeta Pectato, donde el aislamiento tiene la capacidad de degradar el pectato y sus colonias crecen en forma incolora (Scala et al., 2018). Además de ello está el medio de cultivo de Steward modificado, Caldo de Soja con Tripticasa (TSBA), Agar de Carbonato de Dextrosa de Levadura (YDC) y Agar Nutritivo (AN) (Dadaşoğlu & Kotan, 2017).

Fraaije et al., (1997) y Jones & Darrah (1994) mencionan que el aislamiento de este patógeno puede ser muy severamente afectado por la presencia de muchas cantidades de bacterias saprofitas en la misma muestra. También se sabe que la incubación a diferentes temperaturas permite detectar y diferenciar especies, pero no es lo adecuado cuando se trata de tubérculos de papa (Gorris et al., 1994).

A lo largo de los años diferentes pruebas bioquímicas y el perfil de ácidos grasos fueron usados para diferenciar a las diferentes subespecies de *Pectobacterium*, pero su uso era limitado dado a la falta de cultivos puros (Perombelon, 2002), sin embargo en la siguiente tabla se puede ver los resultados esperados de las pruebas bioquímicas usadas en la detección de la bacteria.

Tabla 1.4

Resultados esperados de las pruebas bioquímicas para la detección de P. carotovorum.

Prueba bioquímica	Resultado esperado
Oxidasa	-
Catalasa	+
Reducción de nitrato	+
Crecimiento a 37°C	+
Tolerancia al cloruro de sodio (5%)	+
Hidrólisis de almidón	-
Sustancias reductoras de sacarosa	+
Producción de H ₂ S	+
Producción de indol	-
Producción de ureasa	-
Producción de ácido a partir de α -metil-d-glucósido	+
Hidrólisis de gelatina	+
Pudrición blanda en papa	+

Fuente: (Amaya et al., 2021).

Czajkowski et al. (2015) mencionan que los aislamientos que muestren las características del género *Pectobacterium* pueden también ser identificadas a nivel de especie o subespecie en base a pruebas adicionales que se muestran a continuación:

- Formación de cavidades en CVP (24 horas a 28°C).
- Sensibilidad a la eritromicina.
- Producción de fosfatasa.
- Producción de ácido trehalosa.
- Producción de maltosa.
- Producción ácida de sorbitol.
- Utilización de malonato.
- Producción ácida a partir de lactosa.

1.5.2. Métodos moleculares

Mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede diagnosticar y detectar con mayor certeza aislamientos de *Pectobacterium carotovorum*, esta técnica es muy específica, rápida y sensible (Abu-Obeid et al., 2018; De Boer & Ward, 1995). Esta metodología presenta sus variantes como PCR anidada, PCR múltiple y PCR en tiempo real. Todas las mencionadas ocupan el uso de marcadores moleculares que identifican y caracterizan a *Pectobacterium* sp. como los 16S-23rRNA y 16S rDNA (Diallo et al., 2009; Nikitin et al., 2018).

En la siguiente tabla se adjuntan algunos primers utilizados para la amplificación del gen 16 r DNA de *Pectobacterium carotovorum*.

Tabla 1.5

Primers usados para la identificación de Pectobacterium carotovorum.

Primers Forward/Reverse	Especie que detecta	Referencia
ECA1 (CGGCATCATAAAAACACG)/ ECA2 (GCACACTTCATCCAGCGA)	<i>P. carotovorum</i>	De Boer & Ward (1995).
Df (AGAGTCAAAAGCGTCTTG)/ Dr (TTTCACCCACCGTCAGTC)	<i>Pectobacterium</i> sp., <i>Dickeya</i> sp.	Frechon et al. (1998) Kang et al., (2003), Laurila et al. (2010).
Y45 (TCACCGGACGCCAACTGTGGCGT)/ Y46 (TCGCCAACGTTTCAGCAGAACAGT)	<i>P. atrosepticum</i>	Frechon et al. (1998).
ExpccF (GAACTTCGCACCGCCGACCTTCTA)/ ExpccR (GCCGTAATTGCCTACCTGCTTAAG)	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Kang et al. (2003).
MseF (GACGATGAGTCCTGAG)/ MseR (TACTCAGGACTCAT)	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Doolotkeldieva et al. (2016)
27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3') 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Requis (2020).
ECA1F (5'CGGCATCATAAAAACG-3') ECA2R (5'-GCACACTTCATCCAGCGA-3')	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>atroseptica</i>	Requis (2020).
EXPCCF (5'GAACTTCGCACCGCCGACCTTCTA-3') EXPCCR (5'GCCGTAATTGCCTACCTGCTTAAG-3')	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Requis (2020).

1.6. Mecanismos de control

Para el control del agente causal de una enfermedad existen muchos métodos que involucran el uso de diferentes productos de origen sintético o natural. Estas estrategias se basan en erradicar el patógeno mediante la creación de un ambiente desfavorable para el avance de la enfermedad (Del Puerto et al., 2014).

Mayormente el uso de compuestos químicos engloba la acción de antibióticos y sales orgánicas e inorgánicas que actúan inhibiendo el crecimiento *in vitro* del patógeno. Este efecto se debe a la existencia de cationes que pueden limitar la función de proteínas de la membrana (Mills et al., 2006).

El antibiótico más usado es la estreptomina que es considerada fundamental para el control de *P. carotovorum* en la papa. El procedimiento a seguir consiste en sumergir los tubérculos de papa en una mezcla que contiene estreptomina, hipoclorito de oxitetraciclina y

mercurio. Esto debe realizarse previo a la siembra logrando así reducir la incidencia de la enfermedad (Czajkowski et al., 2011).

1.6.1. Productos base de cobre

En forma general los productos a base de cobre cumplen la función de reducir la propagación de patógenos (Gracia et al., 2002).

Sulfato de cobre pentahidratado. Resultado de la reacción entre el sulfato de cobre anhidrido y agua, es un producto que puede actuar en forma sistémica que se moviliza mediante iones de Cu^{++} o por contacto con la población patógena. Este producto induce las defensas naturales de las plantas (Coto & Wang, 1995).

Gluconato de cobre. Se origina de la oxidación de la glucosa, es la sal de cobre del ácido D-glucónico, es un compuesto orgánico. Este producto tiene características antisépticas y quelatantes, ya que puede quelar iones de Cu para formar compuestos más estables. Su función en la planta es ayudar a promover la síntesis de fitoalexinas y fenoles como sustancias naturales de defensa (Coto & Wang, 1995).

Proteinato de cobre. Se genera tras la quelación de una sal soluble con una proteína donde el cobre está muy contenido en aminoácidos libres. Este producto es muy móvil a través de los tejidos, raíces y haces vasculares. Su función consiste en brindar un efecto bioestimulante que mejora las condiciones biológicas de la planta y la ayuda a superar cualquier estrés (Coto & Wang, 1995).

1.6.2. Productos a base de calcio

El calcio es un nutriente de gran importancia dentro de la planta, ya que una deficiencia de este y otros nutrientes pueden dar como resultado una mayor susceptibilidad al ataque de enfermedades. El calcio mediante sus iones brinda a una mejor estructura e integridad a los componentes de la pared celular de las plantas lo que se traduce en una pared celular más resistente al ataque de enzimas pectinolíticas degradadoras de tejidos (Czajkowski et al., 2011).

1.6.3. *Productos naturales*

Cola de caballo. Es una planta medicinal cuyo nombre científico es *Equisetum arvense* L. es muy usada debido a su contenido de metabolitos secundarios como flavonoides, compuestos fenólicos, taninos y sílice. Estos compuestos se asocian con variadas actividades biológicas que incluyen efectos antioxidantes y antimicrobianos. Diferentes estudios demuestran que el extracto de cola de caballo presenta actividad antimicrobiana principalmente en bacterias de tipo Gram (+) mientras que su efecto en bacterias Gram (-) es limitado, esto se atribuye debido a la presencia de una membrana externa en las bacterias Gram (-) la cual actúa como barrera frente a estos compuestos (Cowan, 1999; Mimica et al., 2008).

Higuerilla. De nombre científico *Ricinus communis* L. es también una planta de múltiples aplicaciones medicinales. Sus semillas contienen compuestos bioactivos como la ricina, ácidos grasos como el ácido ricinoleico, alcaloides y compuestos fenólicos los cuales están relacionados con la actividad antimicrobiana. Estudios demuestran que la higuerilla presenta actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram (+) y Gram (-), lo cual es atribuido a sus compuestos lipofílicos capaces de interactuar con la membrana celular bacteriana provocando alteraciones en su integridad y funcionalidad (Okwu et al., 2004; Vieira et al., 2000).

Capítulo II

Material y métodos

2.1. Ubicación del estudio

2.1.1. Ubicación política

La ubicación política donde se realizó el trabajo de investigación se describe en la siguiente tabla.

Tabla 2.1

Ubicación política de la investigación.

Ítem	Ubicación
Departamento	Ayacucho
Provincia	Huamanga
Distrito	Ayacucho
Dirección	Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga

Figura 2.1

Ubicación política de la investigación.



Fuente: (Sud América Index, 2025).

2.1.2. *Ubicación geográfica*

La ubicación geográfica donde se realizó la investigación se describe a continuación.

Tabla 2.2

Ubicación geográfica del laboratorio de fitopatología.

Ítem	Datos
Altitud	2790 msnm
Coordenadas	13°08'53" S - 74°13'12" O
Huso horario	UTC-05

Figura 2.2

Ubicación del laboratorio de fitopatología.



Fuente: (Google Earth, 2025).

2.1.3. *Fases y ambientes de la investigación*

Las fases y los ambientes donde se realizó la investigación se describen a continuación.

Tabla 2.3

Fases y ambientes de la investigación.

Fase	Lugar de trabajo/muestreo	Altitud (msnm)
Laboratorio	Laboratorio de Fitopatología - UNSCH	2790
	Umbrella Genomics Company SAC	120
Campo	Aturqui	3495
	Ampuccasa	3462
	Mercado “Las Américas”	2738
	INIA - Canaán	2736
	Pucuhuillca	3772
	Chiara	3556
	Incaraccay	3255
	Huahuapuquio	3260
	Cangallo	2698

2.2. Tipo de investigación

De acuerdo a los siguientes criterios, el trabajo de investigación se clasificó según su propósito como aplicada ya que además de identificar a la bacteria se propone un control *in vitro* con productos a fin de contribuir con un resultado práctico en el área de la fitopatología. Con respecto al alcance o nivel de profundidad fue una investigación descriptiva, ya que se dio a conocer aspectos fenotípicos que incluyen características morfológicas y reacciones bioquímicas, así como el análisis molecular del agente patógeno considerado en el estudio. Así mismo se le consideró experimental debido a que el patógeno fue sometido a pruebas de control en condiciones controladas a fin de evaluar el efecto antagónico de productos. Metodológicamente, el trabajo de investigación es cuantitativo dado a que se tuvo que recolectar datos como el conteo de colonias y concentraciones de los tratamientos.

Tabla 2.4

Tipo de investigación.

Según	Investigación
El propósito	Aplicada
El nivel de profundidad	Descriptiva
La metodología	Cuantitativa
La manipulación de variables	Experimental

2.3. Variables

2.3.1. Variable independiente

- Tratamientos aplicados para el control *in vitro*.

2.3.2. Variable dependiente

- Crecimiento bacteriano.
- Incidencia de la enfermedad.

2.3.3. Indicadores

Los indicadores de las variables se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 2.5*Variables e indicadores.*

Variable independiente	Indicador
Tratamientos de control <i>in vitro</i>	• Sulfato de cobre pentahidratado. • Extracto de cola de caballo. • Extracto de higuierilla.
Cepa bacteriana	• Aislamientos M1-M23
Variable dependiente	Indicador
Crecimiento bacteriano	• Presencia o ausencia de crecimiento bacteriano.
Incidencia	• Número de unidades experimentales infectadas. • Porcentaje de incidencia (%)
Severidad	• Escala de severidad

2.4. Población y muestra

2.4.1. Población

La población estuvo conformada por placas de Petri con colonias de *Pectobacterium* sp. aislados de las zonas de Aturqui, Ampuccasa, Mercado “Las Américas”, INIA Canaán, Pucuhuillca, Chiara, Incaraccay, Huahuapuquio y Cangallo.

2.4.2. Muestra

La muestra estuvo conformada por una placa de Petri colonizada con *Pectobacterium* sp. aislados de las zonas de Aturqui, Ampuccasa, Mercado “Las Américas”, INIA Canaán, Pucuhuillca, Chiara, Incaraccay, Huahuapuquio y Cangallo.

Figura 2.3

Muestra: Cultivo bacteriano de 48 horas en medio Agar Nutritivo (M3).



2.5. Técnicas e instrumentos

2.5.1. Técnicas

- Colección de muestras.
- Aislamiento y purificación.
- Prueba de patogenicidad.
- Identificación fenotípica.
- Identificación molecular.
- Prueba de control *in vitro*.

2.5.2. Instrumentos

Material biológico.

- Muestras con sintomatología de pudrición blanda.
- Aislamientos de *Pectobacterium* sp.

Material de laboratorio.

- | | |
|----------------------------|---|
| - Agar Nutritivo (AN). | - Bolsas de polipropileno. |
| - Kit para tinción de Gram | - Cinta Parafilm. |
| - Placas de Petri. | - Envases de vidrio. |
| - Alcohol 70° y 96°. | - Aceite de inmersión. |
| - Mecheros. | - Asa bacteriológica (punta recta y redonda). |
| - Vasos de precipitado. | - Sacabocado. |
| - Triangulo de Drigalsky. | - Envases herméticos de plástico. |
| - Micropipetas. | - Micropipetas. |
| - Matraz. | - Tips o puntas de micropipeta. |
| - Tubos de ensayo. | - Papel toalla estéril. |
| - Gradillas. | - Porta y cubre objetos. |
| - Vaso precipitado. | |
| - Probetas. | |
| - Mechero de alcohol. | |

Equipos.

- | | |
|--------------|----------------------------|
| - Laptop. | - Cámara de flujo laminar. |
| - Autoclave. | - Estufa. |

- Microscopio óptico.
- Estereoscopio.
- Cámara germinadora.
- Balanza de precisión.
- Refrigeradora.
- Horno microondas.

Software.

- Excel.
- Word.
- Canva.
- Infostat.
- Zotero.

2.6. Procedimientos

2.6.1. Colección de muestras

La colección de muestras se realizó en campos de cultivo de papa pertenecientes a las comunidades campesinas de Aturqui y Ampuccasa, ubicadas en el distrito de Socos; así como en puestos de venta de tubérculos del mercado “Las Américas” en el distrito de San Juan Bautista. Asimismo, se incluyeron parcelas experimentales de la Estación Experimental Agraria Canaán – INIA, ubicada en el distrito de Andrés Avelino Cáceres; la comunidad campesina de Pucuhuillca en el distrito de Acocro; plantaciones de papa en el distrito de Chiara, provincia de Huamanga; y parcelas pertenecientes a las comunidades de Incaraccay, Huahuapuquio y Cangallo en el distrito y provincia de Cangallo.

Como primer paso, se realizó la identificación *in situ* de la sintomatología característica de la enfermedad, tanto en plantas como en tubérculos. Se consideraron criterios como la presencia de tallos y peciolo debilitados y resquebrajados, con coloración oscura típica, así como tubérculos con pudrición, olor fétido y consistencia blanda, características asociadas a infecciones por bacterias del género *Pectobacterium*.

Las muestras que presentaron la sintomatología descrita fueron colectadas y manipuladas con cuidado debido a su fragilidad. Estas fueron colocadas en bolsas de papel limpias y debidamente rotuladas con marcador indeleble, consignando información sobre su procedencia, variedad y órgano vegetal muestreado. Además, se asignó un código de identificación para su adecuado registro y trazabilidad.

Posteriormente, las muestras fueron almacenadas en un contenedor hermético de tecnopor, utilizando gel packs para mantener en condiciones de temperatura adecuadas durante su transporte al laboratorio, donde fueron procesadas para su respectivo aislamiento bacteriano.

Figura 2.4

Búsqueda y colección de muestras en la zona de Aturqui – Socos.



Nota: Búsqueda y colección de muestras en la zona de Aturqui – Socos

2.6.2. Procesamiento de muestras

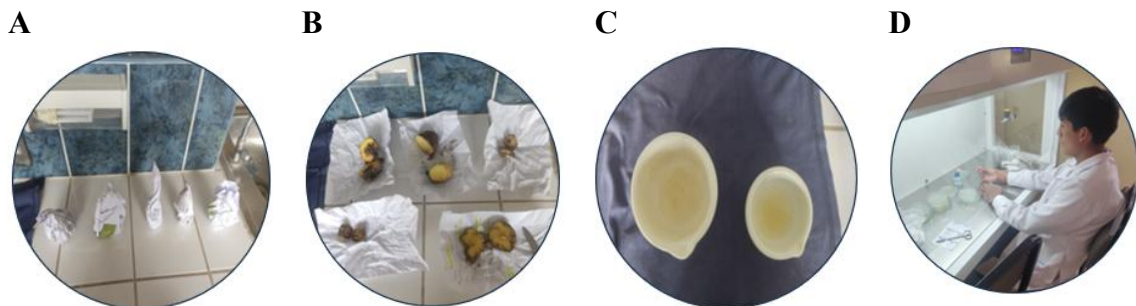
Una vez trasladadas al laboratorio, las muestras fueron procesadas el mismo día de su colección o, como máximo, al día siguiente, con el fin de aislar el agente causal de la pudrición blanda.

Inicialmente, las muestras fueron lavadas con agua de caño para eliminar impurezas superficiales y posteriormente enjuagadas con agua estéril. Luego, con la ayuda de un bisturí estéril, se extrajeron fragmentos de tejido de la zona de avance de la lesión los cuales fueron triturados en un mortero previamente esterilizado. Durante este proceso se añadió agua estéril para obtener una suspensión bacteriana, la cual se dejó reposar durante 5 minutos.

Para la siembra, se utilizó un asa bacteriológica estéril con la que se tomó una alícuota de la suspensión, procediéndose a realizar el estriado en placas de Petri conteniendo medio Agar Nutritivo (AN). Las placas fueron debidamente codificadas e incubadas a 27°C durante 48 horas para el desarrollo de colonias bacterianas.

Figura 2.5

Tratamiento de muestras en el laboratorio.



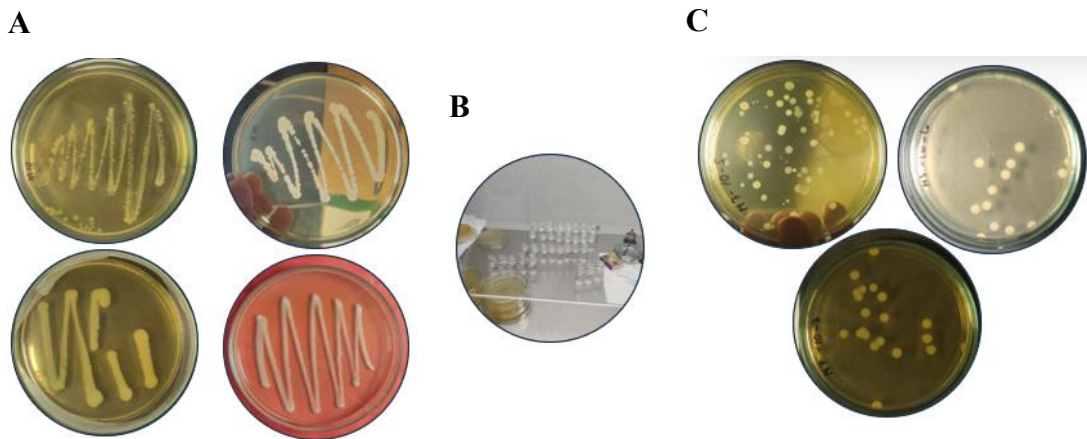
Nota: (A: Separación de muestras, B: Muestras partidas por la mitad, C: Trituración en mortero, D: Siembra en medio AN).

2.6.3. Obtención de aislamientos puros

Una vez obtenido el crecimiento de colonias tras 48 horas de incubación, se procedió a la observación macroscópica con la ayuda de un estereoscopio, donde se evidencio la presencia de colonias con diferentes formas, tamaños y coloraciones.

Debido a esta variabilidad, se realizó el repique de colonias individuales. Para ello, con un asa bacteriológica estéril se tomó una colonia aislada (Unidad Formadora de Colonia, UFC) y se transfirió a otros tubos tipo Eppendorf con capacidad de 3 ml, que contenían 1,5 ml de agua destilada biesterilizada. Este procedimiento se repitió sucesivamente hasta obtener cultivos aparentemente puros.

Posteriormente, a partir de los aislamientos que presentaban características de pureza, se realizaron diluciones seriadas, con el fin de obtener colonias bien aisladas en placas de Petri. Este procedo permitió complementar y asegurar la purificación de los aislamientos bacterianos.

Figura 2.6*Purificación de aislamientos.*

Nota: A: (Crecimiento de colonias por estriado, B: Dilución seriada, C: Colonias aisladas).

2.6.4. Prueba de patogenicidad

Para esta prueba se usaron tubérculos de papa variedad Yungay los cuales fueron enjuagados con abundante agua de caño para quitar impurezas como tierra impregnada en la parte superficial de la cascara, luego fue sumergida en hipoclorito de sodio a una concentración del 2 % por 5 minutos y finalmente enjuagada con agua destilada estéril. Seguido, las papas fueron cortadas en láminas de 1.5 cm de grosor aproximadamente, a cada lámina se le realizó un hoyo de 5 mm de diámetro y 5 mm de profundidad en el centro con la ayuda de un sacabocado. Luego, se prepararon las cámaras húmedas en envases herméticos de plástico los cuales contenían placas de Petri que a su vez contenían papel toalla estéril humedecido con agua destilada estéril, por encima del papel toalla húmedo se colocaron dos portaobjetos sobrepuestos a fin de evitar el contacto directo de la rodaja de papa con la humedad contenida en el papel toalla.

Para la inoculación, se tomó de 1 a 2 ml de agua destilada estéril con una micropipeta y se colocó en el hoyo previamente realizado en las láminas de papa. Prosiguiendo, con un asa bacteriológica se tomó una masa bacteriana de una colonia pura y fue diluida en el hoyo de la lámina de papa, se realizaron tres repeticiones por aislamiento incluyendo un testigo al cual se le inoculó solamente agua estéril y otro al que no se le agrego nada.

La incidencia de la enfermedad fue determinada como el porcentaje de unidades experimentales, donde cada unidad experimental será igual a una lámina o rodaja de papa que presentó síntomas de pudrición blanda, para ello se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Incidencia (\%)} = \frac{\text{Número de unidades enfermas}}{\text{Número total de unidades evaluadas}} \times 100$$

Para evaluar la severidad de los síntomas de pudrición blanda que se generaron luego de la inoculación del patógeno en las láminas de papa, se utilizó la escala descrita por Bartz (1999).

Tabla 2.6

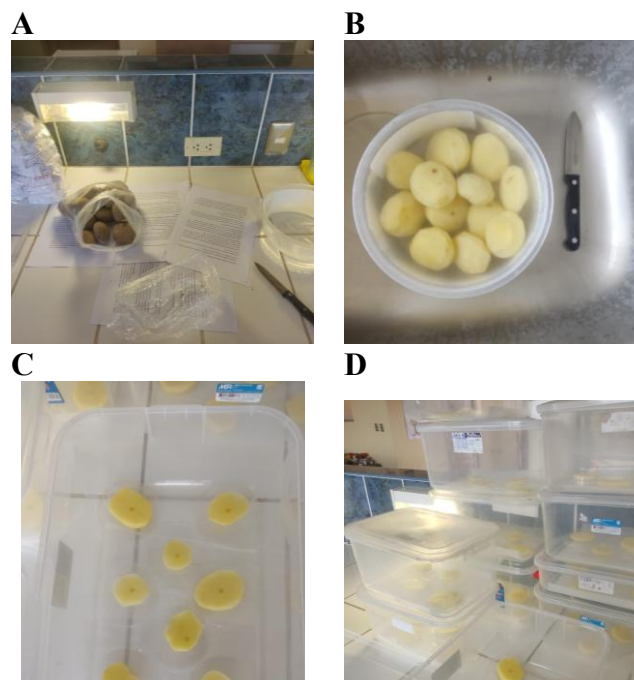
Escala de evaluación para la pudrición de láminas de papa.

Descripción	Medida (cm)	Simbolización
Sin pudrición	0	-
Pudrición restringida	<1	+
Pudrición activa pequeña	1-2	++
Pudrición muy activa	>2	+++

Fuente: (Bartz, 1999).

Figura 2.7

Procedimiento realizado para la prueba de patogenicidad.



Nota: A: Selección de tubérculos, B: Lavado y pelado, C: Inoculación, D: Cámara húmeda

2.6.5. Identificación fenotípica

Para la identificación fenotípica de las colonias bacterianas aisladas, se realizaron las siguientes pruebas:

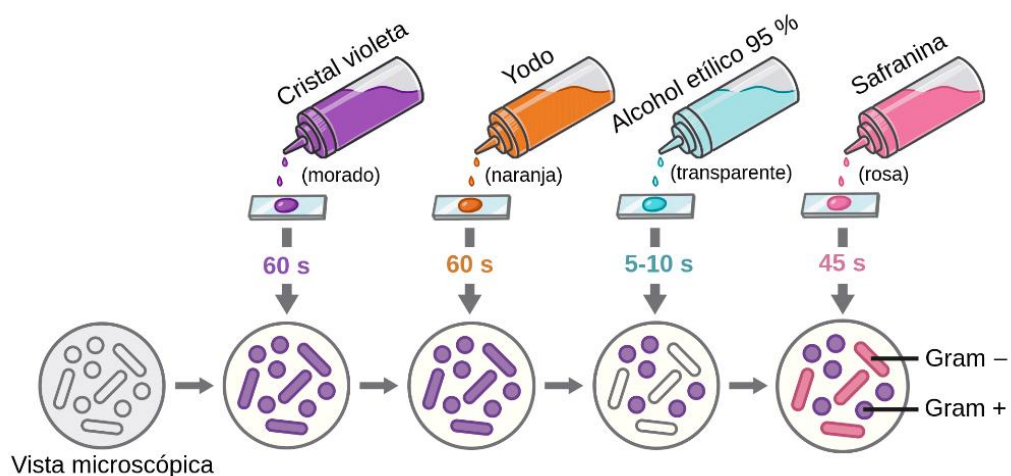
a. Tinción de Gram

Para esta prueba se utilizó la metodología contemplada por Casasola (2022), quien señala que su correcta ejecución es fundamental para una adecuada interpretación de resultados. Aunque el procedimiento es relativamente sencillo, es susceptible a errores, por lo que se recomienda seguir los siguientes pasos:

- Utilizar cultivos bacterianos de 18 a 24 horas de incubación.
- Verificar que los reactivos estén en condiciones óptimas.
- Poner una gota de agua en el portaobjetos limpio.
- Tomar una porción de colonia bacteriana y diluirla en la gota de agua.
- Fijar la muestra mediante calor.
- Cubrir la muestra con cristal violeta durante 60 segundos y enjuagar con agua destilada, evitando el contacto directo del chorro con la muestra.
- Añadir lugol durante 60 segundos y enjuagar nuevamente.
- Decolorar con alcohol etílico al 95%, durante 10 segundos y enjuagar.
- Aplicar safranina durante 45 segundos y enjuagar.
- Observar al microscopio con objeto de 100X.

Figura 2.8

Procedimiento ilustrativo de la tinción Gram.



Fuente: (Labster, 2025).

b. Prueba de catalasa

Para esta prueba se utilizó peróxido de hidrogeno (H₂O₂). Se colocó una gota sobre un portaobjetos y, con la ayuda de un mondadientes estéril, se tomó una porción de colonia bacteriana de 24 horas de incubación, la cual fue puesta en contacto con el reactivo.

La prueba consistió en observar la formación de burbujas, producto de la descomposición del peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno, reacción catalizada por la enzima catalasa. Esta enzima protege a las células del daño oxidativo y su presencia es característica de bacterias aerobias o facultativas como *Pectobacterium* sp. (Lifeder, 2023b).

Figura 2.9

Reacción de burbujeo indicando presencia de la enzima catalasa.



Fuente: (Lifeder, 2023a)

c. Prueba de oxidación y fermentación

Para esta prueba se preparó el medio O/F (Oxidación/Fermentación) de acuerdo a lo descrito por Perombelon y Van Der Wolf (2002).

Tabla 2.7

Insumos para la preparación del medio O/F para 1000 ml.

Reactivo/ingrediente	Cantidad
Bacto peptona	2 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	0.3 g
Azul de Bromothymol	0.03 g
Agar	10 g
Glucosa	10 g
Agua destilada	1000 ml

(Requis, 2020)

Para su preparación:

- Se disolvieron los reactivos en agua destilada, excepto la glucosa.
- Posteriormente, se añadió la glucosa y se ajustó el pH a 7.
- El medio fue esterilizado a 121 °C durante 15 minutos.
- Una vez enfriado (40-50 °C), se distribuyó en tubos de ensayo.

Para la siembra:

- Se inoculó cada aislamiento en 8 tubos.
- 4 tubos en condición aeróbica.
- 4 tubos cubiertos con vaselina líquida estéril (condición anaeróbica).
- Los tubos fueron incubados a 28 °C durante 48 horas.

Esta prueba permitió determinar la vía metabólica utilizada por las bacterias para la degradación de carbohidratos, diferenciando bacterias oxidativas como *Pseudomonas* de fermentativas como *Enterobacteriaceae* (Dahal, 2023).

Figura 2.10

Preparación de medio O/F.



Nota: Preparación de 250 ml de medio O/F.

d. Crecimiento a 27 °C y 37 °C

Se preparó una suspensión bacteriana ajustada mediante diluciones seriadas. A partir de esta, se inocularon 0.2 ml sobre placas con Agar Nutritivo (AN), distribuyéndose con un triángulo de Drigalsky

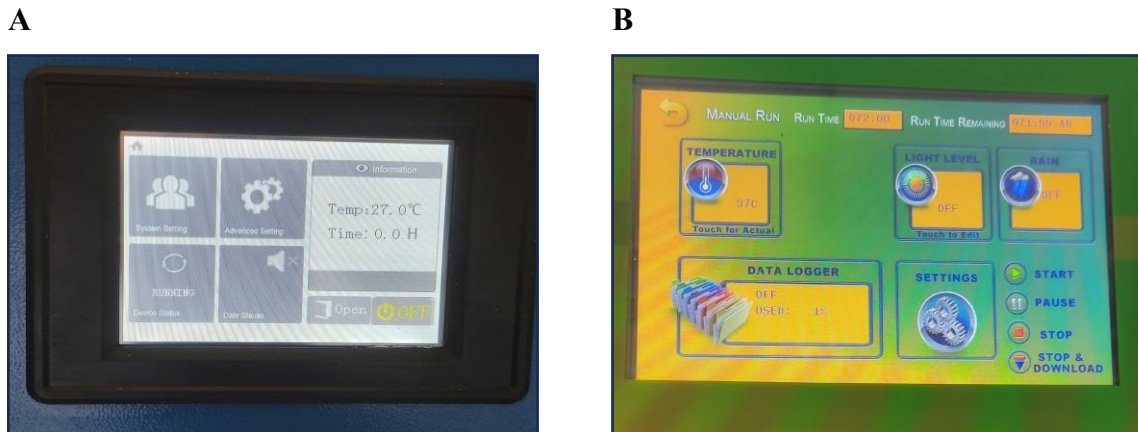
Se sembraron 10 placas por aislamiento:

- 5 incubadas a 27 °C.
- 5 incubadas a 37 °C.

Esta prueba permitió evaluar la capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas, útil para diferenciar especies dentro del género *Pectobacterium* y otros géneros relacionados como *Dickeya*. Generalmente, se espera un crecimiento óptimo a 27 °C, mientras que el crecimiento a 37 °C puede indicar adaptación a condiciones más cálidas (Oulghazi et al., (2021).

Figura 2.11

Programación de temperaturas para la prueba de crecimiento.



Nota: A: Temperatura a 27 °C y B: Temperatura a 37 °C

e. Crecimiento en 5% de cloruro de sodio (NaCl)

El medio fue preparado según Perombelon & Van Der Wolf (2002), disolviendo los componentes en agua destilada y esterilizándolos a 121 °C por 15 minutos. Posteriormente, el medio fue vertido en placas de Petri estériles. Se realizaron 5 repeticiones por aislamiento y se evaluó el crecimiento bacteriano.

Tabla 2.8

Insumos para la preparación del medio con 5% de NaCl para 1000 ml.

Reactivo/ingrediente	Cantidad
Bacto peptona	10 g
NaCl	50 g
Agua destilada	1000 ml
Agar	20 g

(Requis, 2020)

Esta prueba permitió determinar la tolerancia a condiciones de alta presión osmótica. En el género *Pectobacterium*, esta característica es útil para diferenciar, por ejemplo, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* presenta crecimiento positivo, mientras que *P. carotovorum* subsp. *atroseptica* muestra crecimiento limitado (He et al., 2023).

Figura 2.12

Placa de Petri con medio con 5% de NaCl.



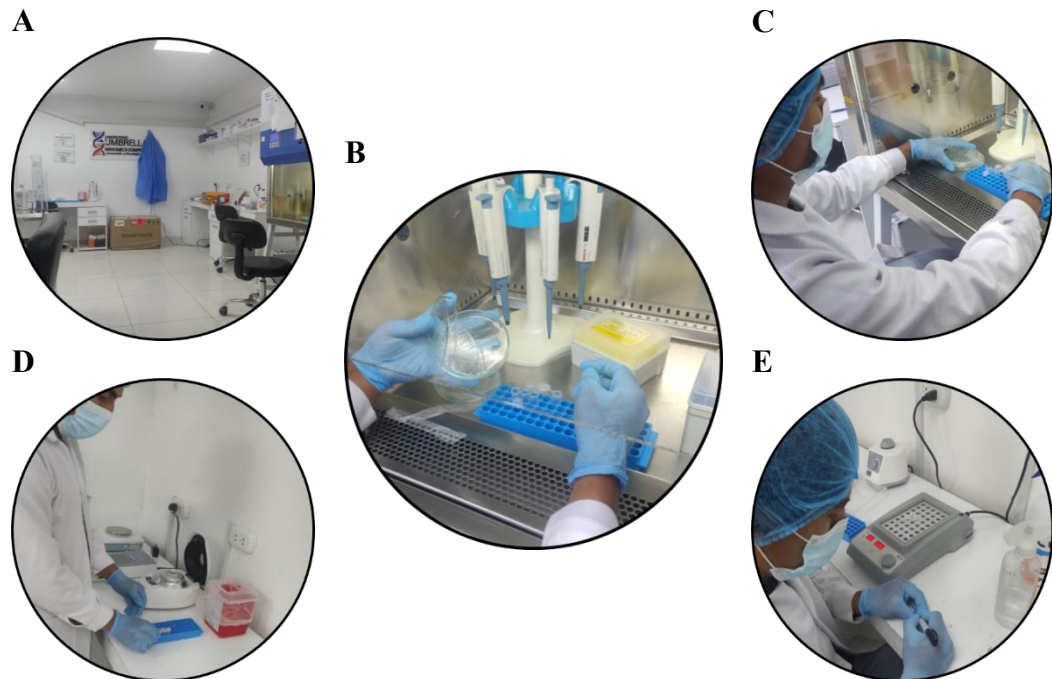
2.6.6. Identificación molecular

a. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se empleó el método por ebullición (boilling), lisis térmica o shock térmico, cuyo procedimiento fue rápido, económico y sencillo, empleado fundamentalmente para obtener ADN molde de bacterias que pueden ser conservadas o corridas en aplicaciones de PCR (Loberiza et al., 2025).

El protocolo que se utilizó para la extracción de ADN, fue brindado por el laboratorio de biotecnología Umbrella Genomics Company SAC cuyos pasos fueron los siguientes:

- Cosechar el crecimiento de una cepa bacteriana joven de 24 horas e incubada a 28°C y diluirlo con 500 µL de agua destilada estéril en un tubo de Eppendorf.
- Centrifugar a 10 000 RPM por 5 minutos.
- Extraer el sobrenadante y volver a suspender el pellet con 100 µL de agua libre de nucleasas.
- Hervir con flotador en agua 95-100°C por 5 minutos y hacer el cambio a la conservadora con 4 °C por 5 minutos y repetir el ciclo 3 veces.
- Centrifugar a una velocidad de 12 000 RPM por 10 minutos.
- Extraer el sobrenadante y almacenar en tubos de 600 µL o 1,5 ml.

Figura 2.13*Extracción de ADN.*

Nota: A: Ambientes del lab. Umbrella, B: Cultivo de 24 horas, C: Cosecha de la cepa, D: Centrifugador y E: Rotulado de tubos.

b. PCR convencional para el primer general 16S

La preparación del master mix para la amplificación por PCR se realizó de acuerdo a la tabla 2.9.

Tabla 2.9*Reactivos para PCR con el primer general 16S.*

Componente	Volumen para 1X (uL)
repliQa HiFi ToughMix (2X)	25
Forward primer	300 nM
Reverse primer	300 nM
Nuclease free water	Variable
Template	2-5 µL
Volumen final	50 µL

Fuente: (Requis, 2020).

El PCR se realizó usando los primers universales para 16S ARN, forward: 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y reverse: 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3').

Tabla 2.10*Programación PCR con el primer general 16S.*

Procedimiento	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	98 °C	30 segundos	
Denaturación	98 °C	10 segundos	
Annealing	59 °C	5 segundos	35
Amplificación	68 °C	5 segundos	
Amplificación final	68 °C	60 segundos	

c. Electroforesis en gel

La confirmación de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,0%. Para ello, se preparó el gel en buffer TAE 1X y se cargaron 5 µL del producto PCR junto con 5 µL de un marcador de peso molecular en los pocillos correspondientes.

La migración electroforética se llevó a cabo a 100 V durante 30 minutos. Posteriormente las bandas de ADN fueron visualizadas bajo luz azul, verificándose la presencia de fragmentos de aproximadamente 1500 pb correspondientes al gen 16S rARN.

d. Secuenciamiento

El producto amplificado del gen 16S rARN correspondiente al aislamiento seleccionado fue enviado a un laboratorio especializado para su secuenciamiento mediante tecnología de Oxford Nanopore.

La secuencia obtenida fue procesada mediante herramientas bioinformáticas proporcionadas por el laboratorio, generándose secuencia consenso en formato FASTA. Para la aproximación taxonómica, la secuencia consenso fue comparada con bases de datos del NCBI utilizando la herramienta BLAST, empleando parámetros alta similitud. Este análisis permitió determinar la identidad taxonómica del aislamiento en función del porcentaje de similitud con secuencias previamente reportadas

Tabla 2.11

Plataformas utilizadas en la identificación molecular.

Plataforma	Descripción
FASTA	Formato de texto usado para representar secuencias de ácidos nucleicos.
NCBI	(National Center for Biotechnology Information) base de datos biológicos internacional.
BLAST	Algoritmo del NCBI que funciona como un buscador y determina a que ser vivo corresponde tal secuencia.

Figura 2.14

Plataforma de búsqueda NCBI

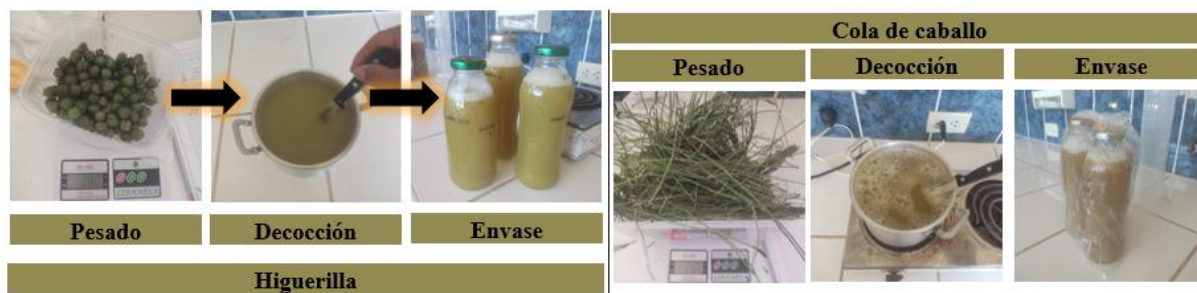
2.6.7. Control *in vitro*

Para esta prueba se utilizó la técnica de medio envenenado, donde se usaron cinco envases de vidrio previamente esterilizados en los cuales se prepararon 100 ml de medio agar nutritivo que luego fueron esterilizados a 121 °C por 15 minutos. Posteriormente cuando el medio estuvo a una temperatura de 40 a 50°C se agregaron la cantidad exacta de los productos correspondientes, se mezcló y plaquéó. Una vez solidificadas las placas con medio envenenado se procedió a sembrar 0.2 ml de suspensión bacteriana a una dilución de 10^{-5} y se dispersó con la ayuda de un triángulo de Drigalsky; y posteriormente se incubó a 28°C por 48 horas.

Los extractos a base de cola de caballo e higuerilla fueron obtenidos mediante decocción, para ello el material vegetal fue hervido en agua destilada por 20 minutos, con el fin de extraer compuestos hidrosolubles. Luego la solución fue filtrada con un colador fino a fin de eliminar residuos sólidos y cuando la temperatura estuvo a 35-40°C se diluyó con 250 gramos de jabón neutro, este actuó como agente tensioactivo en combinación con el extracto vegetal.

Tabla 2.12*Tratamientos para la prueba de control in vitro*

Trat.	Producto	Dosis (ml/100ml)	Rep.
T1	Cola de caballo	13.33	5
T2	Higuerilla	13.33	5
T3	Cola de caballo + Higuerilla	6.66 + 6.66	5
T4	Sulfato de cobre pentahidratado	0.25	5
T5	Testigo	-	5

Figura 2 15*Preparación de los extractos de higuerilla y cola de caballo.*

Capítulo III

Resultados y discusión

3.1. Obtención de aislamientos

Luego de salidas a campo, se colectaron un total de 54 muestras de tallos y tubérculos de papa que presentaban sintomatología típica de pudrición blanda y pie negro en las diferentes zonas contempladas en la metodología. A partir de estas muestras, se logró aislar un total de 23 cepas bacterianas, las cuales fueron conservadas en tubos tipo Eppendorf con agua destilada estéril para mantener su viabilidad y pureza.

Tabla 3.1

Resumen de la obtención de cepas.

Nº	Procedencia	Variedad	Parte vegetal	Código
1	Aturqui	Yungay	Tubérculo	M1
2	Aturqui	Yungay	Tubérculo	M2
3	Ampuccasa	Canchan	Tallo	M3
4	Ampuccasa	Canchan	Tallo	M4
5	Chiara	Canchan	Tubérculo	M5
6	Chiara	Canchan	Tubérculo	M6
7	Chiara	Canchan	Tubérculo	M7
8	Canaán – INIA	Yungay	Tallo	M8
9	Canaán – INIA	Yungay	Tallo	M9
10	Mercado Américas	Peruanita	Tubérculo	M10
11	Mercado Américas	Peruanita	Tubérculo	M11
12	Mercado Américas	Única	Tubérculo	M12
13	Mercado Américas	Única	Tubérculo	M13
14	Mercado Américas	Única	Tubérculo	M14
15	Pucuhuillca	Canchan	Tubérculo	M15
16	Pucuhuillca	Canchan	Tubérculo	M16
17	Pucuhuillca	Canchan	Tubérculo	M17
18	Incaraccay	Canchan	Tallo	M18
19	Incaraccay	Canchan	Tallo	M19
20	Huahuapuquio	Yungay	Tubérculo	M20
21	Huahuapuquio	Yungay	Tubérculo	M21
22	Cangallo	Canchan	Tubérculo	M22
23	Cangallo	Canchan	Tubérculo	M23

De acuerdo con la Tabla 3.1, se observa que la mayor proporción de cepas bacterianas fue aislada a partir de tubérculos (17 aislamientos), mientras que un menor número correspondió a muestras de tallos (6 aislamientos). Este resultado sugiere que los tubérculos constituyen una fuente importante de inóculo del patógeno, especialmente en condiciones de almacenamiento, donde las bacterias pectinolíticas encuentran condiciones favorables para su proliferación. Este comportamiento ha sido reportado por Amaya et al. (2021), quienes indican que los tubérculos infectados representan un reservorio clave en la diseminación de la enfermedad.

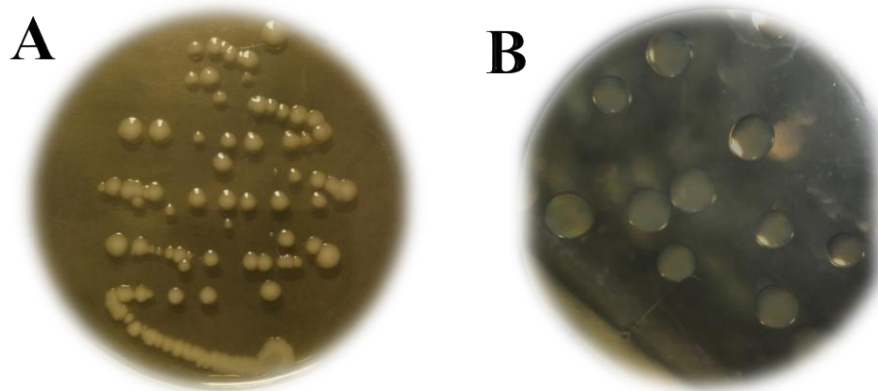
Con respecto a la caracterización cultural, las cepas bacterianas fueron seleccionadas considerando los criterios descritos por Requis (2020), quien señala que las colonias bacterianas asociadas a pudrición blanda presentan morfología ligeramente elevada, convexa, casi translúcida y de margen entero. En el presente estudio, las colonias aisladas mostraron características similares, evidenciando un crecimiento circular, superficie lisa y coloración blanco cremosa, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura.

Estas características macroscópicas son típicas en bacterias del género *Pectobacterium*, las cuales se distinguen por formar colonias de aspecto húmedo y brillante en medios de cultivo, además a su capacidad de producir enzimas pectinolíticas. La similitud entre las colonias observadas y las descritas previamente refuerza la presunción de que los aislamientos obtenidos pertenecen a este grupo bacteriano, lo cual deberá ser confirmado mediante pruebas bioquímicas y moleculares posteriores.

Asimismo, las características observadas se muestran en la Figura 3.1, donde se evidencia la morfología típica de las colonias tanto a nivel macroscópico como bajo estereoscopio.

Figura 3.1

Crecimiento de colonias de un aislamiento puro.



A: Visualización macroscópica del crecimiento de colonias. B: Visualización de colonias con estereoscopio (aumento de 3X).

3.2. Prueba de patogenicidad

A partir de las cepas bacterianas obtenidas, se realizó la prueba de patogenicidad evaluando la incidencia de la enfermedad en láminas de papa. Los primeros síntomas de pudrición blanda se evidenciaron a partir de las 48 horas posteriores la inoculación, manifestándose como maceración del tejido vegetal.

Se observó que no todas las cepas presentaron capacidad patogénica. Las cepas M1, M2, M4, M9, M13, M14, M18, M19, M20, M21, M22 y M23 no produjeron pudrición (-) en ninguna de las repeticiones, registrando una incidencia del 0 %, por lo que fueron consideradas no patogénicas bajo las condiciones del ensayo y descartadas de las evaluaciones posteriores.

En contraste, las cepas que si generaron pudrición evidenciaron una marcada variabilidad en la capacidad patogénica, observándose que las cepas M3, M5, M8, M10, M11, M12, M15 y M16 presentaron una incidencia del 100 %, asociada a una pudrición muy activa (+++). Mientras que, las cepas M6, M7 y M17 mostraron una incidencia intermedia de 66.7 % presentando una pudrición activa pequeña (++)

Estos resultados evidencian la existencia de variabilidad en la agresividad entre los aislamientos bacterianos, lo cual es característico en poblaciones del género *Pectobacterium*, donde la capacidad de causar enfermedad está directamente relacionada con la producción de enzimas pectinolíticas responsables de la degradación de tejidos vegetales.

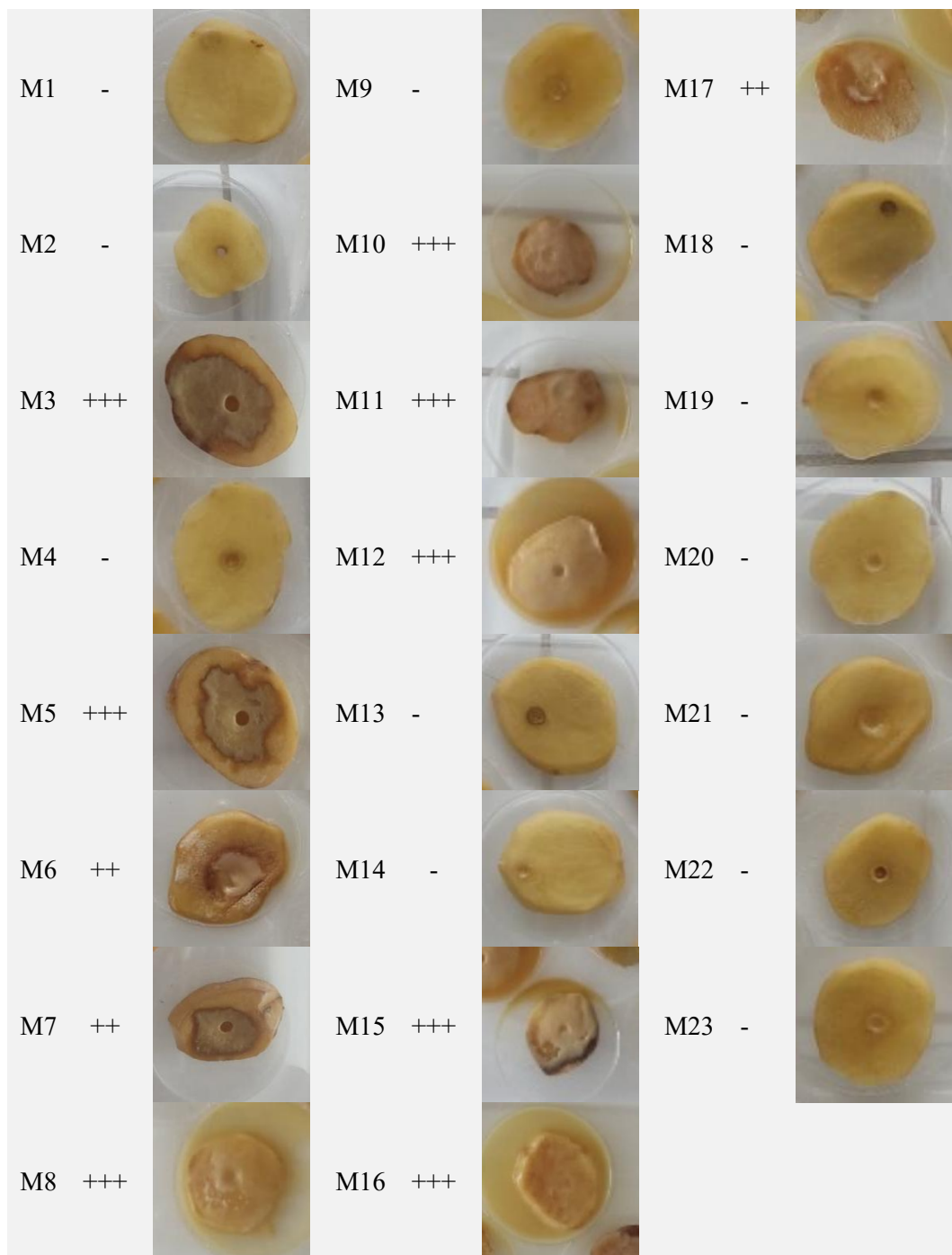
Así mismo, la evaluación cepa por cepa permitió una caracterización más precisa del comportamiento patogénico, evitando generalizaciones y proporcionando información detallada sobre la virulencia de cada aislamiento, lo cual resulta importante para la selección de cepas representativas en estudios posteriores.

Las cepas con mayor grado de patogenicidad procedieron de las zonas de Ampuuccasa, Chiara, Canaán-INIA, Acocro y Pucuhuilla, lo cual podría estar relacionado con prácticas agrícolas como la siembra continua e intensiva, que favorecen la acumulación y diseminación del inoculo en el campo.

La prueba de patogenicidad permitió confirmar la capacidad de ciertos aislamientos para reproducir los síntomas característicos de la enfermedad en el hospedero, lo cual constituye un criterio fundamental para la identificación del agente causal, en concordancia con los postulados de Koch aplicados a fitopatógenos (Agrios, 2005).

Asimismo, las cepas que produjeron pudrición blanda evidencian la capacidad de sintetizar enzimas pectinolíticas responsables de la degradación de la pectina en la pared celular vegetal, provocando la maceración de los tejidos. Esta característica es típica de bacterias del género *Pectobacterium*, las cuales se distinguen por su elevada actividad enzimática y su papel en enfermedades de pudrición blanda en diversos cultivos (Perombelon, 2002).

Los resultados obtenidos son consistentes con lo reportado en la literatura, donde se indica que no todos los aislamientos bacterianos asociados a tejidos infectados presentan igual grado de virulencia, lo que sugiere variabilidad en la agresividad de las cepas dentro de una misma especie (Toth et al., 2003).

Figura 3.2*Patogenicidad de los aislamientos bacterianos.*

(-: sin pudrición; +: pudrición restringida; ++: pudrición activa pequeña; +++: pudrición muy activa)

Tabla 3.2*Incidencia y severidad de las cepas bacterianas.*

Cepa	Rep. con pudrición	Incidencia (%)	Severidad
M1	0/3	0	-
M2	0/3	0	-
M3	3/3	100	+++
M4	0/3	0	-
M5	3/3	100	+++
M6	2/3	66.7	++
M7	2/3	66.7	++
M8	3/3	100	+++
M9	0/3	0	-
M10	3/3	100	+++
M11	3/3	100	+++
M12	3/3	100	+++
M13	0/3	0	-
M14	0/3	0	-
M15	3/3	100	+++
M16	3/3	100	+++
M17	2/3	66.7	++
M18	0/3	0	-
M19	0/3	0	-
M20	0/3	0	-
M21	0/3	0	-
M22	0/3	0	-
M23	0/3	0	-

3.3. Identificación fenotípica

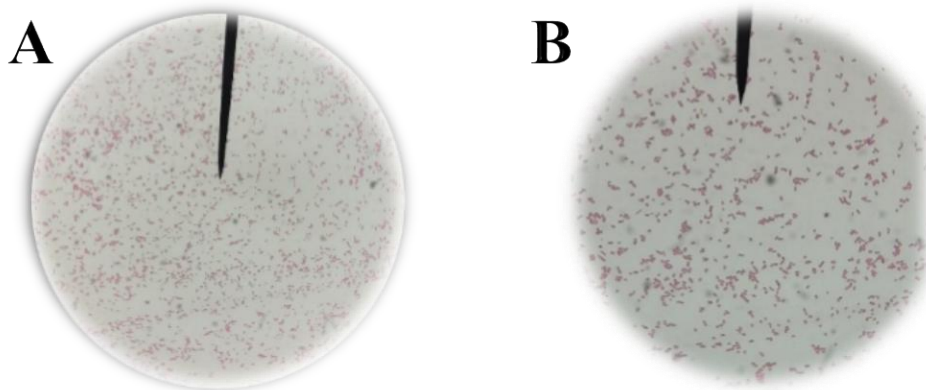
3.3.1. Tinción Gram

Tras la tinción de Gram, todas las cepas evaluadas (M3, M5, M6, M7, M8, M10, M11, M12, M15, M16 y M17) presentaron una reacción Gram negativa, evidenciada por una coloración rojiza característica. Este resultado concuerda con lo descrito para bacterias del género *Pectobacterium*, las cuales son bacilos Gram negativos (Amaya et al., 2021; Perombelon, 2002).

La naturaleza Gram negativa de estas bacterias se asocia a la presencia de una pared celular delgada compuesta por una capa de peptidoglicano y una membrana externa, característica típica de bacterias fitopatógenas pertenecientes a la familia Pectobacteriaceae. Los resultados obtenidos respaldan la posible pertenencia de los aislamientos a este grupo bacteriano (Amaya et al., 2021).

Figura 3.3

Prueba de tinción de Gram.



Nota: Observación microscópica de la cepa M3, A:40X y B:100X. Se evidencia la coloración rojo-grosella.

3.3.2. *Prueba de catalasa*

Todas las cepas evaluadas presentaron una reacción positiva a la prueba de catalasa, evidenciada por la formación inmediata de burbujas tras la adición de peróxido de hidrogeno. Este resultado indica la presencia de la enzima catalasa, responsable de la descomposición del peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno.

La actividad catalasa positiva es característica de bacterias aerobias y facultativas incluyendo especies del género *Pectobacterium*, lo cual coincide con lo reportado en estudios previos (Amaya et al., 2021; Toth et al., 2003).

Figura 3.4

Formación de burbujas (respuesta positiva a la presencia de catalasa).



Nota: formación de burbujas por la cepa M3.

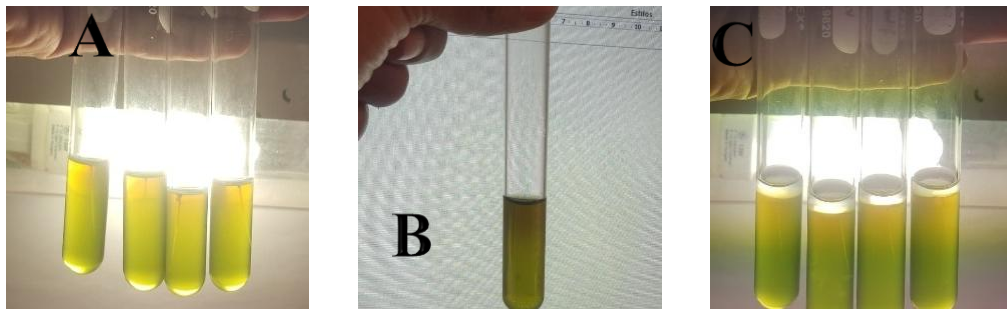
3.3.3. Prueba de oxidación y fermentación

En la prueba de oxidación y fermentación, todas las cepas mostraron un metabolismo fermentativo, evidenciado por el cambio de coloración del medio de verde a amarillo tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Este resultado indica la capacidad de las cepas para metabolizar carbohidratos en ausencia de oxígeno.

Este comportamiento es característico de bacterias fermentativas como *Pectobacterium*, diferenciándose de otros géneros fitopatógenos como *Pseudomonas*, los cuales presentan metabolismo estrictamente oxidativo (Toth et al., 2003). Por lo tanto, este resultado contribuye a la diferenciación taxonómica de los aislamientos.

Figura 3.5

Respuesta positiva a cambio de coloración del medio de cultivo con el aislamiento M3.



A: Tubos abiertos, B: Testigo, C: Tubos cerrados.

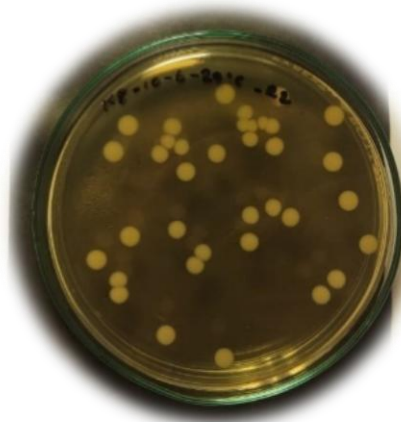
3.3.4. Crecimiento a 27 y 37°C

Todas las cepas mostraron crecimiento tanto a 27 °C como a 37 °C, lo que indica una amplia tolerancia térmica. Este resultado permitió descartar especies como *Pectobacterium atrosepticum*, la cual no presenta crecimiento a 37 °C.

En contraste, especies como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* si presentan crecimiento a esta temperatura, lo que sugiere que los aislamientos obtenidos podrían pertenecer a este grupo (Oulghazi et al., 2021). Este criterio es fundamental para la diferenciación a nivel de especie.

Figura 3.6

Crecimiento bacteriano a 37 °C.



Nota: La cepa M8 logro formar 34 colonias a 37 °C.

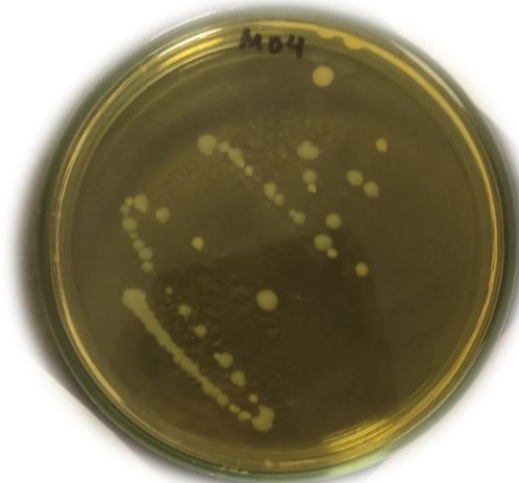
3.3.5. Crecimiento en 5% de NaCl

Todas las cepas mostraron crecimiento en medio con 5% de NaCl, evidenciando tolerancia a condiciones de alta presión osmótica. Este resultado permitió descartar nuevamente la presencia de *Pectobacterium atrosepticum*, ya que esta especie por lo general no crece en dichas condiciones.

Por otro lado, especies como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* presentan crecimiento positivo en medios con NaCl al 5%, lo cual coincide con los resultados obtenidos (He et al., 2023; Toth et al., 2003).

Figura 3.7

Crecimiento en 5% de NaCl.



Los resultados de todas las pruebas realizadas se pueden observar en la siguiente tabla.

Tabla 3.3

Resultados de las pruebas fenotípicas en 11 cepas bacterianas.

Pruebas	Cepas										
	M3	M5	M6	M7	M8	M10	M11	M12	M15	M16	M17
Tinción de Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Degradación de láminas de papa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba de catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba de oxidación y fermentación	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a 27 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a 37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en 5% de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Nota: (-) respuesta negativa y (+) respuesta positiva

3.4. Identificación molecular

3.4.1. Extracción de ADN

Tras evidenciar la similitud en las características fenotípicas de las cepas bacterianas, se procedió a la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) de la cepa M15, seleccionada por su alta patogenicidad, cabe señalar que, durante el procesamiento en el laboratorio de biología molecular, dicha cepa fue recodificada como PO3b para fines de análisis, manteniendo correspondencia con el aislamiento original.

La obtención de ADN de buena calidad permitió su posterior uso en técnicas de amplificación molecular, evidenciando la ausencia de inhibidores que pudieran interferir en la reacción de PCR.

Figura 3.8

Extracción de ADN.

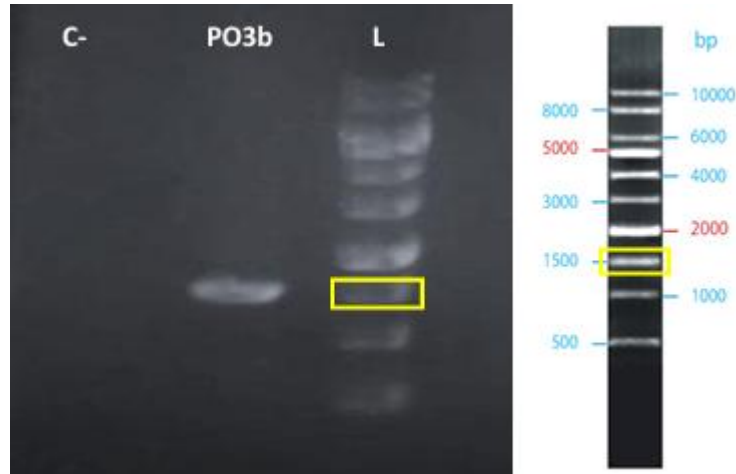


3.4.2. PCR convencional para el primer general 16S

Mediante la amplificación del gen 16S rRNA utilizando los cebadores universales 27F y 1492R, se obtuvo un producto de aproximadamente 1500 pares de bases y una concentración de 128 ng/ μ L para la cepa PO3b. Este tamaño corresponde al esperado para este marcador molecular, ampliamente utilizado en la identificación bacteriana debido a su alta conservación y valor filogenético. La obtención de un amplicón de tamaño adecuado confirma la integridad del ADN extraído y su aptitud para estudios moleculares, lo cual coincide con lo reportado por Toth et al. (2003), quienes destacan el uso del gen 16 rRNA como herramienta fundamental en la identificación de bacterias fitopatógenas del género *Pectobacterium*.

Figura 3.9

Productos PCR amplificados para el gen 16S.



Nota: 1: Gel de agarosa al 1% que muestra la calidad de los amplicones. El tercer carril (L) corresponde a un Ladder de 1 Kb (GRISP). Los fragmentos amplificados presentan un tamaño cercado a 1500 pb, confirmando la integridad y ausencia de inhibidores en el ADN extraído.

3.4.3. Secuenciamiento

El producto amplificado del gen 16S rARN correspondiente al aislamiento PO3b fue secuenciado mediante tecnología Oxford Nanopore. La secuencia obtenida en formato FASTA fue comparada con la base de datos del NCBI con el algoritmo BLAST, mostrando una similitud del 99.50% con *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* como se muestra en la tabla 3.4.

Tabla 3.4

Alineación significativa de la muestra PO3b.

Nombre científico	Total Score	E value	% de identidad	Número de accesoión
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i>	2699	0.0	99.50%	CP047495.1

Este resultado confirma que la cepa PO3b pertenece a dicho taxón respaldando los resultados obtenidos en la caracterización fenotípica y pruebas de patogenicidad. La alta similitud (>99 %) es considerada suficiente para la identificación a nivel de especie mediante el gen 16S rRNA.

Figura 3.10

Secuencia consenso de nucleótidos de Pectobacterium brasiliensis.

```
>CP047495.1 Pectobacterium brasiliense
CCGGCAGGTCATGGTCTGACTTCAACGCCACCGACGCCGACTTCCCGCA
GGATGCGCTCATCCATCAGCTCGTTGAAGACCAGGCCGCCCGCACGCC
CGAGGCCATCGCCGTCCTCTTTGAAGACCAGCACCTCTCCTATGACGCA
CTCAACCGCCGTGCCAACCAGCTCGCGCACCACTGCTGTCACTCGGC
GTCCAGCCCGATGACCGCGTCGCCATTTGCGTCGAGCGCTCTCTCGACA
TGGTCATCGGCCTCCTCGGCATTCTCAAGGCCGGTGCCGCCTATGTTCC
GCTCGACCCCGGCTACCCCGCCGAGCGTCTCGCCTACATGCTCGACGAT
GCCGCCCCCGTCCGCCCTGCTCACCCAGGCCGGCCGTCACGAGCTTCAG
ACCGGGGGCTCTCCCGCTCATCCTGCTCGATACCGCCGACTTCAGCACGC
TGAGTGACCACAACCCCGACATCGCCGGAATCGATGCCACCATCTGGC
CTACGTCATCTACACCTCCGGCTCCACCGGTAAACCCAAGGGCGTCATG
AACAGCCATCGCGGACTCTGCAACCGTCTCGTCTGGATGCAGAACACCT
ATCGTCTCACCCCCGATGACCGCGTCCTGCAGAAGACCCCTTCAGCTT
CGACGTCTCCGTCTGGGAGTTCTTCTGGCCCTTGCTCTACGGCGCGCG
CCTCGTCATGGCCCGTCCCGACGGCCACAAGGATGCCGCCTACCTCGC
GCAGCTCATCGAGCGCACCGGCATCACCACTGCACTTCGTCCCCTCC
ATGCTCCAGCAGTTCGTCCAGTGGGCCGATGCAGACTGTGCCTGTGACT
CACTGCGCCGCGTCATCTGCAGCGGCGAAGCCCTCCCGGCCGAAGTCC
AGCAGCGCTTCTTTGCCCGCTTCAACGCCAGCTCCATAACCTCTATGGC
CCCACCGAGGCCGCCATTGACGTCACCTTCTGGGCCTGTCAGCCTGAC
GATCGTCGGTGAAATCCGCCAACTGTTGCAGGGTCAGCAGGATGCCCTG
CCAACGCCGCTACCGTACCGTAACTTTATTGCCCAAATATTAAGCGTCCC
GAACACGGAGCATGAAGCGTATTTCCGCGAACGGCTGGCGGATATTGAT
GCGCCGACGATTCTTTTCGATTACTGGATACACAGGGAGAGGGAGAAA
ATATCGCTGAAGTCCGCATGCCGCTTCTGCGCCATTATCCAGCGCAATA
```

La identificación de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* es importante debido a su reconocimiento como uno de los principales agentes causales de pudrición blanda en papa. Caracterizado por su capacidad de producir enzimas pectinolíticas que degradan la pared celular vegetal, generando los síntomas observados en campo y condiciones de laboratorio.

Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Toth et al. (2003), quienes señalan que esta subespecie presenta una amplia distribución y alta agresividad en cultivos de papa, especialmente en sistemas de producción intensiva. Asimismo, la concordancia entre los resultados fenotípicos y moleculares fortalece la validez de la identificación realizada, mostrando la importancia de un enfoque polifásico en la caracterización de bacterias fitopatógenas.

3.5. Control *in vitro*

La prueba de control *in vitro* evidenció la nula eficacia de los productos naturales a base de cola de caballo e higuerilla, mientras que el producto químico anuló por completo al crecimiento de la cepa bacteriana.

La prueba de control *in vitro* evidenció diferencias en los tratamientos evaluados frente a la cepa bacteriana identificada. Los tratamientos a base de extractos naturales de cola de caballo e higuerilla, así como su combinación, no mostraron efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano, comportándose de manera similar al testigo. Por otro lado, el tratamiento con sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) inhibió completamente el crecimiento bacteriano, evidenciando una alta eficacia en condiciones *in vitro*.

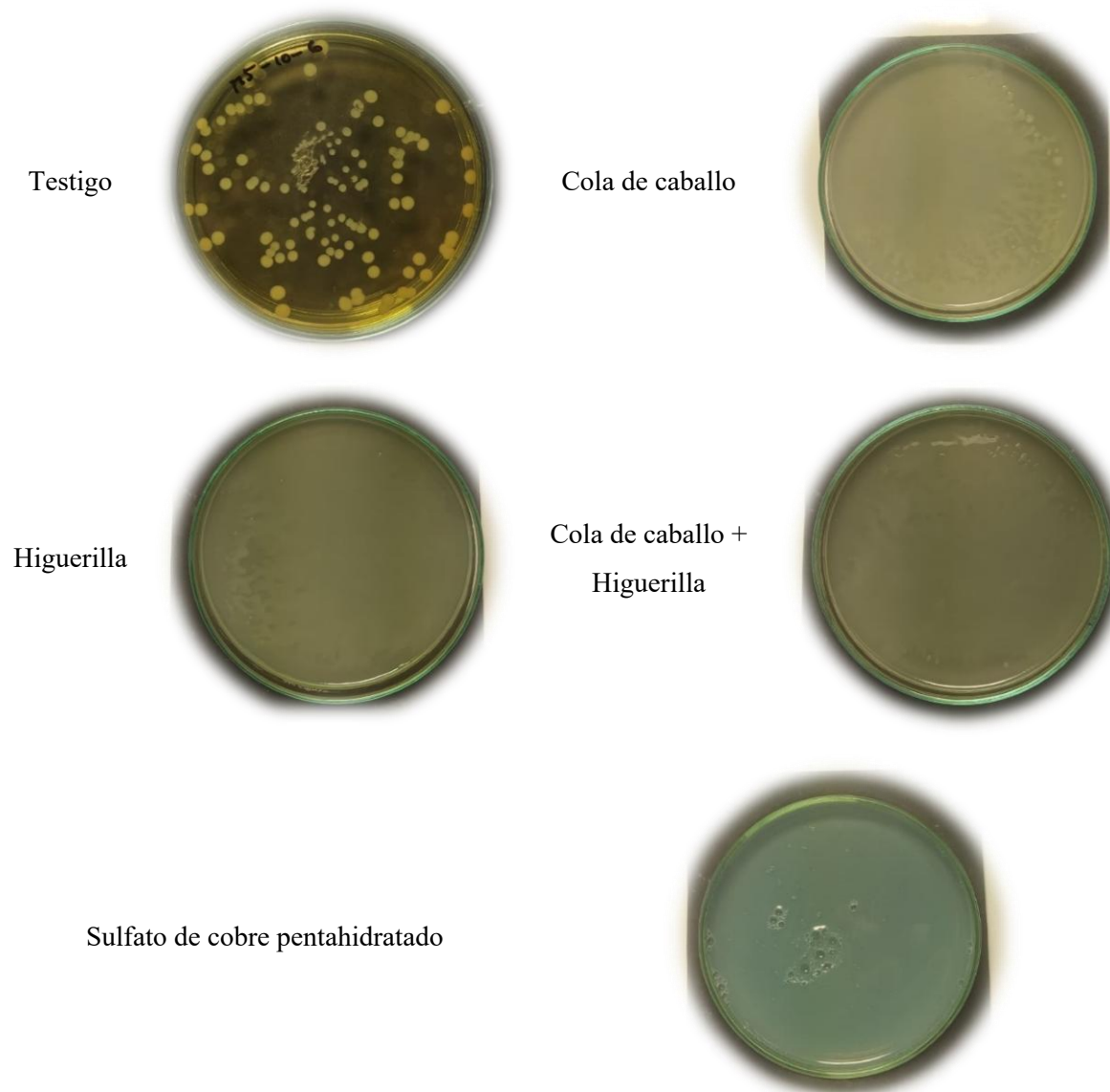
La falta de efecto inhibitorio de los extractos vegetales puede atribuirse a que, si bien contienen compuestos bioactivos como saponinas, flavonoides, alcaloides y taninos, estos suelen tener una mayor eficacia frente a hongos o actuar principalmente de manera preventiva en plantas, más que como agentes bactericidas directos en condiciones *in vitro*. En ese sentido, su aplicación resulta más adecuada en campo como parte de estrategias de manejo preventivo lo cual coincide con lo reportado por Camacho (2012),

Por otro lado, el sulfato de cobre pentahidratado mostró una acción bactericida efectiva, lo cual se explica por su capacidad de desnaturalizar proteínas y alterar la integridad de la membrana celular bacteriana. Este comportamiento concuerda con lo reportado por Requis (2020), quien también obtuvo inhibición total del crecimiento bacteriano al emplear este compuesto.

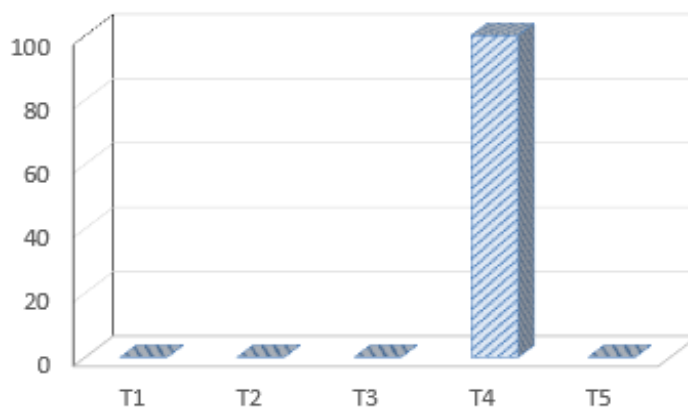
Estos resultados evidencian que bajo condiciones *in vitro*, los productos de origen natural no constituyen una alternativa eficaz para el control de bacterias del género *Pectobacterium*, mientras que el uso de compuestos químicos como el sulfato de cobre continúa siendo una opción efectiva para su control. Sin embargo, su uso debe ser manejado cuidadosamente debido a posibles efectos ambientales y fitotóxicos.

Figura 3.11

Tratamientos aplicados en la prueba de control in vitro

**Tabla 3.5**

Porcentaje de inhibición del crecimiento



T1: Cola de caballo T2: Higuerilla T3: Cola de caballo + Higuerilla T4: Sulfato de cobre pentahidratado T5: Testigo

Conclusiones

1. La prueba de patogenicidad evidenció variabilidad en la capacidad patogénica de las cepas, determinándose que 8 cepas presentaron alta virulencia con 100% de incidencia, 3 mostraron patogenicidad intermedia 66.7 % y el resto no evidenció capacidad patogénica bajo las condiciones evaluadas.
2. Se concluye que los aislamientos bacterianos obtenidos a partir de muestras de papa con síntomas de pudrición blanda en la región de Ayacucho corresponden a bacterias del género *Pectobacterium*, de acuerdo con las características fenotípicas evaluadas, tales como reacción Gram negativa, actividad catalasa positiva, metabolismo fermentativo, y capacidad de crecimiento a 37 °C y en 5% de NaCl.
3. La identificación molecular permitió determinar con un 99.50% de similitud que las cepas analizadas pertenecen a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*, confirmando así la identidad del agente causal de la enfermedad en la zona de estudio.
4. En la evaluación del control *in vitro*, el tratamiento con sulfato de cobre pentahidratado, mostró un 100% de inhibición del crecimiento bacteriano, mientras que los extractos de cola de caballo e higuierilla, no presentaron efecto inhibitorio bajo las condiciones experimentales.

Recomendaciones

1. Ampliar los estudios de identificación molecular mediante el uso de más marcadores genéticos o secuenciación de genes adicionales, con el fin de confirmar con mayor precisión la identidad de las cepas bacterianas aisladas.
2. Evaluar la variabilidad genética y patogénica de un mayor número de aislamientos de diferentes zonas productoras de papa de la región Ayacucho, para comprender mejor la diversidad del agente causal.
3. Optimizar las condiciones de obtención y aplicación de extractos vegetales, como los de cola de caballo e higuera, evaluando diferentes concentraciones, métodos de extracción y formas de aplicación, con el fin de mejorar su posible efecto antibacteriano.
4. Realizar ensayos de control en condiciones de campo para validar la eficacia del sulfato de cobre pentahidratado y otras alternativas de control bajo condiciones reales del cultivo.

Referencias bibliográficas

- Abu-Obeid, I., Khlaif, H., & Salem, N. (2018). Detection and Identification of Potato Soft Rot *Pectobacterium carotovorum* Subspecies *carotovorum* by PCR Analysis of 16S rDNA in Jordan. *Agricultural Sciences*, 9(5), Article 5. <https://doi.org/10.4236/as.2018.95037>
- Acuña, I. (2021). Pudriciones blandas y pie negro. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/68307>
- Agrios, G. (Ed.). (2005). *Plant Pathology* (Fifth Edition). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-047378-9.50006-3>
- Aguilar, R., Ruiz, W. R., Morales-Pizarro, A., Rafael-Rutte, R., Tirado-Lara, J., Saucedo-Bazalar, M., Tuesta-Albán, C., Apaza-Apaza, S., & Teodor, K. K. (2021). Pudrición blanda en el pseudotallo de banano orgánico (*Musa* sp): Sintomatología, caracterización cultural y bioquímica, patogenicidad y alternativas de manejo. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 571-578. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.061>
- Al-Zomor, R., Khlaif, H., & Akash, M. (2013). Detection and Identification of *Erwinia carotovora* Subsp. *Atroseptica* (Van Hall, 1902) the Causal Agent of Potato Blackleg by RFLP-PCR. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 173(805), 1-28. <https://doi.org/10.12816/0001100>
- Amaya, A. P., Beltrán Pineda, M. E., Alfonso Vargas, N. C., Amaya Guerrero, A. P., Beltrán Pineda, M. E., & Alfonso Vargas, N. C. (2021). *Pectobacterium carotovorum*: Agente fitopatógeno causante de la pudrición blanda en la papa (*Solanum tuberosum*). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 22(2). https://doi.org/10.21930/rcta.vol22_num2_art:1710
- Angiosperm Phylogeny Group. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1-20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>

- Arcos, J., Mamani Huayta, H., Barreda Quispe, W. L., & Holguín Chuquimamani, V. (2020). MANUAL TÉCNICO: MANEJO INTEGRADO DEL CULTIVO DE PAPA. Instituto Nacional de Innovación Agraria. <https://repositorio.inia.gob.pe/handle/20.500.12955/1146>
- Bartz, J. A. (1999). Suppression of bacterial soft rot in potato tubers by application of kasugamycin. *American Journal of Potato Research*, 76(3), 127-136. <https://doi.org/10.1007/BF02853577>
- Bhat, K. A., Bhat, N. A., Mohiddin, F. A., Sheikh, P. A., & Wani, A. H. (2012). Studies on pectinase activities of isolates of *Erwinia carotovora* and *Rhizopus* sp. Causing soft rot in cabbage (*Brassica oleracea* var *capitata* L.). *African Journal of Agricultural Research*, 7(45), 6062-6067. <https://doi.org/10.5897/AJAR12.1215>
- Brenner, D. J., Fanning, G. R., & Steigerwalt, A. G. (1974). Deoxyribonucleic Acid Relatedness Among *Erwiniae* and Other Enterobacteriaceae: The Gall, Wilt, and Dry-Necrosis Organisms (Genus *Erwinia* Winslow et al., sensu stricto). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 24(2), 197-204. <https://doi.org/10.1099/00207713-24-2-197>
- Camacho, V. J. (2012). Control con extractos de hojas, tallos y semillas de higuierilla (*Ricinus communis* L.) en posturas y larvas del gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith), en un entisol de Pacacocha Pucallpa.
- Campos, C. R. (2014). Efecto de la fertilización en el rendimiento y características biométricas del cultivo de papa variedad Huayro en la comunidad Aramachay (valle del Mantaro). <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/1390>
- Cancho, F. A. (2019). Aislamiento, caracterización, control biológico y químico *in vitro* del agente causal de la pudrición negra de la piña (*Ananas comosus*), Ayacucho

- [Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga].
<http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/3583>
- Casasola, M. (2022). La importancia de realizar una correcta tinción de Gram en la identificación bacteriana. *Rev. Colegio de Microb. Quím. Clín. De Costa Rica*, 27(2), 89-98.
- Costa, A. B., Eloy, M., Cruz, L., Janse, J., & Oliveira, H. (2006). STUDIES ON PECTOLYTIC *ERWINIA* SPP. IN PORTUGAL REVEAL UNUSUAL STRAINS OF *E. CAROTOVORA* SUBSP. *ATROSEPTICA*. *Journal of Plant Pathology*.
<https://www.semanticscholar.org/paper/STUDIES-ON-PECTOLYTIC-ERWINIA-SPP.-IN-PORTUGAL-OF-Costa-Eloy/90b9a20d8eafa27e6f28aa1ef817221174183625>
- Coto, B., & Wang, A. (1995). EVALUACION DE CINCO TRATAMIENTOS QUIMICOS PARA EL COMBATE DE LA BACTERIOSIS (*Erwinia* sp.) EN FRUTOS DE MANGO VARIEDAD TOMMY ATKINS, EN TURRUBARES, COSTA RICA. *AGRONOMIA COSTARRICENSE*, 19(1), 15-20.
- Cowan, M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582. <https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.564>
- Cronquist, A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press. <http://archive.org/details/integratedsystem0000cron>
- Cruzado, G. J. (2022). Producción de tubérculo de cinco clones de papa a partir de la primera generación (G1) en la E.E.A. El Mantaro-UNCP, Campaña 2019-2020.
<http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/20.500.12894/7972>
- Czajkowski, R., Pérombelon, M. c. m., Jafra, S., Lojkowska, E., Potrykus, M., van der Wolf, J. m., & Sledz, W. (2015). Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: A review. *Annals of Applied Biology*, 166(1), 18-38. <https://doi.org/10.1111/aab.12166>

- Czajkowski, R., Pérombelon, M. C. M., van Veen, J. A., & van der Wolf, J. M. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: A review. *Plant Pathology*, 60(6), 999-1013. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02470.x>
- Czerwicka, M., Marszewska, K., Bychowska, A., Dziadziuszko, H., Brzozowski, K., Łojkowska, E., Stepnowski, P., & Kaczyński, Z. (2011). Estructura química del O-polisacárido aislado de *Pectobacterium atrosepticum* SCRI 1039. *Carbohydrate Research*, 346(18), 2978-2981. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.10.026>
- Dadaşoğlu, F., & Kotan, R. (2017). Identification and characterization of *Pectobacterium carotovorum*. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 27, 647-654.
- Dahal, P. (2023, febrero 19). OF Test- Oxidation/Oxidative-Fermentation/Fermentative Test. <https://microbenotes.com/oxidation-fermentation-of-test/>
- De Boer, S. H., & Ward, L. J. (1995). PCR Detection of *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* Associated with Potato Tissue. *Phytopathology*, 85(8), 854. <https://doi.org/10.1094/Phyto-85-854>
- Del Puerto, A. M., Suárez Tamayo, S., & Palacio Estrada, D. E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372-387.
- Diallo, S., Latour, X., Groboillot, A., Smadja, B., Copin, P., Orange, N., Feuilloley, M. G. J., & Chevalier, S. (2009). Simultaneous and selective detection of two major soft rot pathogens of potato: *Pectobacterium atrosepticum* (*Erwinia carotovora* subsp. *atrosepticum*) and *Dickeya* spp. (*Erwinia chrysanthemi*). *European Journal of Plant Pathology*, 125(2), 349-354. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9477-4>

- Doolotkeldieva, T., Bobusheva, S., & Suleymankisi, A. (2016). Biological Control of *Erwinia carotovora* ssp. *Carotovora* by *Streptomyces* Species. *Advances in Microbiology*, 6(2), Article 2. <https://doi.org/10.4236/aim.2016.62011>
- Duarte, V., De Boer, S. H., Ward, L. J., & de Oliveira, A. M. R. (2004). Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 96(3), 535-545. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02173.x>
- Egúsquiza, B. R. (2000). La papa: Producción, transformación y comercialización. International Potato Center.
- Fraaije, B. A., Appels, M., De Boer, S. H., Van Vuurde, J. W. L., & Van den Bulk, R. W. (1997). Detection of soft rot *Erwinia* spp. on seed potatoes: Conductimetry in comparison with dilution plating, PCR and serological assays. *European Journal of Plant Pathology*, 103(2), 183-193. <https://doi.org/10.1023/A:1008684428898>
- Franco, Y., & Stefanova, M. (2008). DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS IMPLICADAS EN LA VIRULENCIA DE CEPAS DE *Pectobacterium carotovorum* SUBSP: *Carotovorum* Y *Dickeya chrysanthemi* AISLADAS DE PAPA. *Agro Sur*, 36(3), 130-136. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2008.v36n3-02>
- Frechon, D., Exbrayat, P., Helias, V., Hyman, L. J., Jouan, B., Llop, P., Lopez, M. M., Payet, N., Pérombelon, M. C. M., Toth, I. K., van Beckhoven, J. R. C. M., van der Wolf, J. M., & Bertheau, Y. (1998). Evaluation of a PCR kit for the detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. *Potato Research*, 41(2), 163-173. <https://doi.org/10.1007/BF02358439>

- Fuqua, C., Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: Acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annual Review of Genetics*, 35, 439-468. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.090913>
- Google Earth. (2025). Google Earth. Google Earth. <https://earth.google.com/>
- Gorris, M. T., Alarcón, B., Lopez, M. M., & Cambra, M. (1994). Characterization of Monoclonal Antibodies Specific for *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* and Comparison of Serological Methods for Its Sensitive Detection on Potato Tubers. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), 2076-2085. <https://doi.org/10.1128/aem.60.6.2076-2085.1994>
- Gracia, J. A., Allen, W., Blom, T.J., & and Brown, W. (2002). Pre- and post-plant applications of copper-based compounds to control *Erwinia* soft rot of calla lilies. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24(3), 274-280. <https://doi.org/10.1080/07060660209507009>
- Hauben, L., Moore, E. R., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., & Swings, J. (1998). Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Systematic and Applied Microbiology*, 21(3), 384-397. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(98\)80048-9](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(98)80048-9)
- Hauben, L., & Swings, J. (2015). *Erwinia*. En *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1-19). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01146>
- Hawkes, J. G. (1988). The evolution of cultivated potatoes and their tuber-bearing wild relatives. *Die Kulturpflanze*, 36(1), 189-208. <https://doi.org/10.1007/BF01986960>
- He, W., Luo, W., Zhou, J., Zhu, X., & Xu, J. (2023). *Pectobacterium carotovorum* Subsp. *Brasiliense* Causing Soft Rot in Eggplant in Xinjiang, China. *Microorganisms*, 11(11), 2662. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112662>

- Huamán, Z. (1986). Botánica sistemática y morfología de la papa. International Potato Center.
[https://www.bing.com/search?pglt=427&q=Huam%C3%A1n%2CZ.+\(1986\).+Bot%C3%A1nica+sistem%C3%A1tica+y+morfolog%C3%ADa+de+la+papa.+International+Potato+Center.&cvid=7cae60f11dab4be582b0db0cd6a241aa&gs_lcrp=EgRlZGdlKgYIABBFgdKyBggAEEUYOdIBCDY3NTZqMGoxqAIAsAIA&FORM=ANSPA1&adppc=EDGEDBB&PC=EDGEDBB](https://www.bing.com/search?pglt=427&q=Huam%C3%A1n%2CZ.+(1986).+Bot%C3%A1nica+sistem%C3%A1tica+y+morfolog%C3%ADa+de+la+papa.+International+Potato+Center.&cvid=7cae60f11dab4be582b0db0cd6a241aa&gs_lcrp=EgRlZGdlKgYIABBFgdKyBggAEEUYOdIBCDY3NTZqMGoxqAIAsAIA&FORM=ANSPA1&adppc=EDGEDBB&PC=EDGEDBB)
- INIA. (2021). Enfermedades Papa—INIA. <https://enfermedadespapa.inia.cl/pieNegro.php>
- Jones, D. L., & Darrah, P. R. (1994). Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. *Plant and Soil*, 166(2), 247-257.
<https://doi.org/10.1007/BF00008338>
- Kang, H. W., Kwon, S. W., & Go, S. J. (2003). PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *Carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant Pathology*, 52(2), 127-133.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00822.x>
- Khosro. (2012). Antagonism of *Bacillus* species against *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*. *African Journal of Microbiology Research*, 6(7). <https://doi.org/10.5897/ajmr12.075>
- Labster. (2025). Reactivos utilizados en la tinción de Gram. Labster.
<https://theory.labster.com/es/reagents/>
- Laurila, J., Hannukkala, A., Nykyri, J., Pasanen, M., Hélias, V., Garland, L., & Pirhonen, M. (2010). Symptoms and yield reduction caused by *Dickeya* spp. Strains isolated from potato and river water in Finland. *European Journal of Plant Pathology*, 126(2), 249-262. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9537-9>
- Lee, J., Kim, S., & Park, T. H. (2017). Diversity of Bacteriophages Infecting *Pectobacterium* from Potato Fields. *Journal of Plant Pathology*, 99(2), 453-460.

- Lifeder. (2023a, julio 21). Prueba de la catalasa: Qué es, fundamento, técnicas y uso. Lifeder. <https://www.lifeder.com/prueba-catalasa/>
- Lifeder. (2023b, noviembre 20). Catalasa: Qué es, características, estructura, funciones y patologías. Lifeder. <https://www.lifeder.com/catalasa/>
- Loberiza, I. R., Falk, F. E., Green, T. J., & Loudon, A. H. (2025). Efficacy of different “boiling” methods for bacterial DNA extraction. *Journal of Microbiological Methods*, 237, 107245. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2025.107245>
- López, L. E. (1979). Morfología y taxonomía de la papa. 1-16.
- Maldonado, E. A. M., Vigíl-Correa, A. M., Chinguel, L. G. Z., León, M. D. T. de, Rendón, R. M., Saavedra-Rios, C. Y., Guevara, I. D. V., Zúñiga, C. E. C., Zarate, M. C. P., Estrada, K. N. V., & Polo, A. A. R. (2024). Patogenicidad de *Pectobacterium chrysanthemi* en *Solanum tuberosum* y PCR del espaciador transcrito interno (ITS) del ADNr 16S/23S en aislados de *Musa* sp. Del norte del Perú. *Manglar*, 21(3), 299-304. <https://doi.org/10.57188/manglar.2024.032>
- Matsumoto, H., Jitareerat, P., Baba, Y., & Tsuyumu, S. (2003). Comparative Study of Regulatory Mechanisms for Pectinase Production by *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 16(3), 226-237. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.3.226>
- McCarter, N. J., Franc, G. D., Harrison, M. D., Michaud, J. E., Quinn, C. E., Sells, I. A., & Graham, D. C. (1984). Soft rot **Erwinia** bacteria in surface and underground waters in southern Scotland and in Colorado, United States. *Journal of Applied Bacteriology*, 57(1), 95-105. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1984.tb02361.x>
- MIDAGRI. (2020). Papa: Producción, Mercado, Comercialización y Oportunidades. <https://repositorio.agromercado.gob.pe/bitstream/handle/SSE/178/INFORME%20FINAL%20PAPA-%20VERSION%20FINAL.pdf?sequence=1>

- Mills, A. A. S., (Bud) Platt, H. W., & Hurta, R. A. R. (2006). Sensibilidad de *Erwinia* spp. A los compuestos salinos *in vitro* y su efecto sobre el desarrollo de podredumbre blanda en tubérculos de patata almacenados. *Postharvest Biology and Technology*, 41(2), 208-214. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.03.015>
- Mimica, N., Simin, N., Cvejic, J., Jovin, E., Orcic, D., & Bozin, B. (2008). Phenolic compounds in field horsetail (*Equisetum arvense* L.) as natural antioxidants. *Molecules*, 13(7), 1455-1464. <https://doi.org/10.3390/molecules13071455>
- Montaldo, A. (1984). Cultivo y mejoramiento de la papa. Bib. Orton IICA / CATIE.
- Nikitin, M. M., Statsyuk, N. V., Frantsuzov, P. A., Dzhavakhiya, V. G., & Golikov, A. G. (2018). Matrix approach to the simultaneous detection of multiple potato pathogens by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 124(3), 797-809. <https://doi.org/10.1111/jam.13686>
- Nolasco, O. P., Velarde Vélchez, M. M., Murrugarra Bringas, V. Y., Acuña Payano, R., & Chacón Aguilar, C. I. (2022). Ribotipificación de bacterias relacionadas a pudrición blanda en banano orgánico del distrito de Querecotillo. <https://hdl.handle.net/20.500.13084/8633>
- Okwu, D. E., Okwu, M. E., Okwu, D. E., & Okwu, M. E. (2004). Chemical composition of *Spondias mombin* Linn plant parts. *Journal of Sustainable Agriculture and the Environment*, 6(2), 140-147.
- Oulghazi, S., Sarfraz, S., Zaczek-Moczydłowska, M. A., Khayi, S., Ed-Dra, A., Lekbach, Y., Campbell, K., Novungayo Moleleki, L., O'Hanlon, R., & Faure, D. (2021). *Pectobacterium brasiliense*: Genomics, Host Range and Disease Management. *Microorganisms*, 9(1), 106. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010106>

- Perombelon. (1974). The role of the seed tuber in the contamination by *Erwinia carotovora* of potato crops in Scotland. *Potato Research*, 17(2), 187-199. <https://doi.org/10.1007/BF02360386>
- Perombelon. (2002). Potato diseases caused by soft rot erwinias: An overview of pathogenesis. *Plant Pathology*, 51(1), 1-12. <https://doi.org/10.1046/j.0032-0862.2001.Shorttitle.doc.x>
- Perombelon, M., & Van Der Wolf, J. (2002). Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *Atropsetica* on potatoes. Laboratory Manual. ResearchGate. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.24610.99528>
- Potrykus, M., Sledz, W., Golanowska, M., Slawiak, M., Binek, A., Motyka, A., Zoledowska, S., Czajkowski, R., & Lojkowska, E. (2014). Simultaneous detection of major blackleg and soft rot bacterial pathogens in potato by multiplex polymerase chain reaction. *Annals of Applied Biology*, 165(3), 474-487. <https://doi.org/10.1111/aab.12156>
- Requis, A. J. (2020). Identificación y control del agente causal de la pudrición húmeda en alcachofa (*Cynara scolymus* L.) en Chincha Baja. <https://hdl.handle.net/20.500.12996/4350>
- Scala, V., Pucci, N., & Loreti, S. (2018). The diagnosis of plant pathogenic bacteria: A state of art. *Frontiers in Bioscience-Elite*, 10(3), Article 3. <https://doi.org/10.2741/E832>
- Smadja, B., Latour, X., Faure, D., Chevalier, S., Dessaux, Y., & Orange, N. (2004). Involvement of N-acylhomoserine Lactones Throughout Plant Infection by *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*). *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 17(11), 1269-1278. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.11.1269>
- Sud América Index. (2025). Ayacucho (Perú) ciudad: Datos turísticos. Sud América Index. <http://www.am-sur.com/am-sur/peru/Ayacuch/Ayacuch-stadt-ESP-datos-turisticos.html>

- Toth, I. K., Bell, K. S., Holeva, M. C., & Birch, P. R. J. (2003). Soft rot erwiniae: From genes to genomes. *Molecular Plant Pathology*, 4(1), 17-30. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00149.x>
- Vieira, C., Evangelista, S., Cirillo, R., Lippi, A., Maggi, C. A., & Manzini, S. (2000). Effect of ricinoleic acid in acute and subchronic experimental models of inflammation. *Mediators of Inflammation*, 9(5), 223-228. <https://doi.org/10.1080/09629350020025737>
- Waldee, E. (1942). Comparative Studies Of Some Peritrichous Phytopathogenic Bacteria. *Plant Pathogens*, Estados Unidos, 129.
- Waldee, E. (1974). Comparative Studies Of Some Peritrichous Phytopathogenic Bacteria. <https://vdoc.pub/documents/comparative-studies-of-some-peritrichous-phytopathogenic-bacteria-23v4rinnqosg>
- Winslow, C. E., Broadhurst, J., Buchanan, R. E., Krumwiede, C., Rogers, L. A., & Smith, G. H. (1920). The Families and Genera of the Bacteria: Final Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types. *Journal of Bacteriology*, 5(3), 191-229. <https://doi.org/10.1128/jb.5.3.191-229.1920>
- Zanoli, L. M., & Spoto, G. (2013). Isothermal Amplification Methods for the Detection of Nucleic Acids in Microfluidic Devices. *Biosensors*, 3(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/bios3010018>
- Zhang, Y., & Tanner, N. A. (2017). Isothermal Amplification of Long, Discrete DNA Fragments Facilitated by Single-Stranded Binding Protein. *Scientific Reports*, 7(1), 8497. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09063-x>

Anexos

Anexo 1

Colección de muestras en las diferentes zonas contempladas en la metodología.

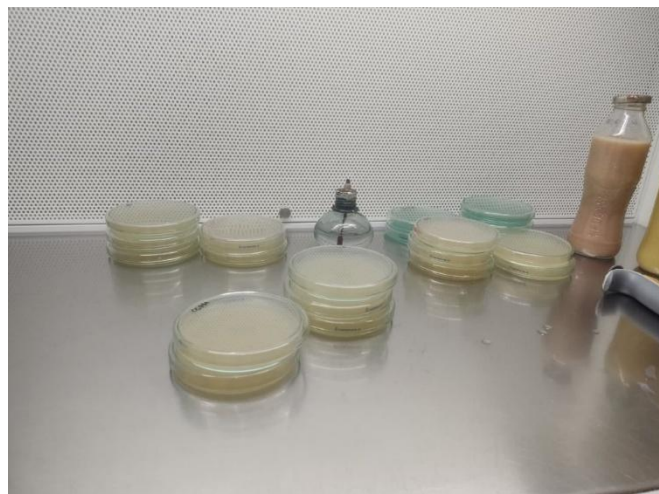


Anexo 2

Trabajos de laboratorio usando la cámara de flujo laminar.

**Anexo 3**

Plaqueado de medio de cultivo AN.

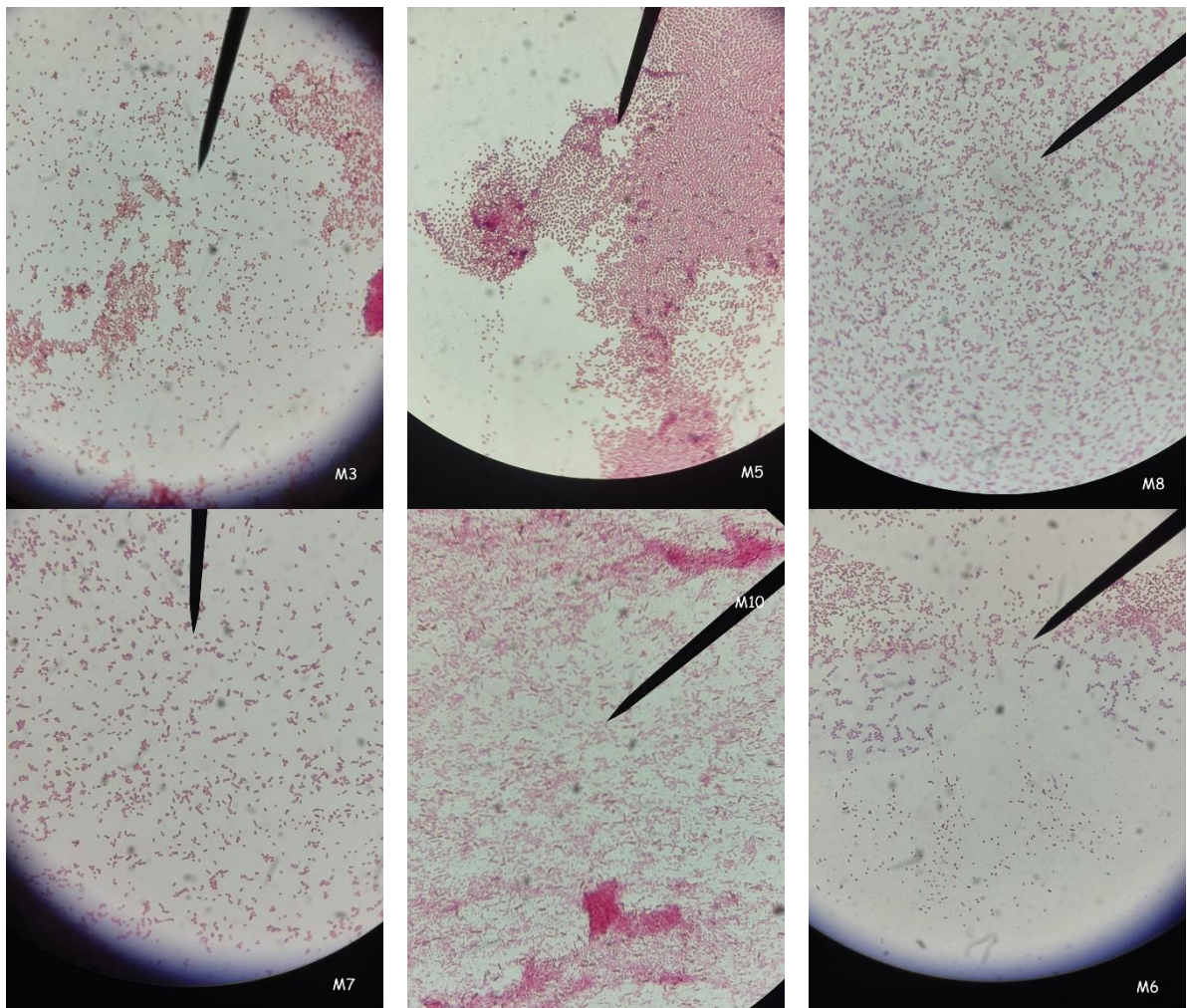


Anexo 4

Crecimiento de colonias de aislamientos bacterianos (M1, M2 y M3).

**Anexo 5**

Tinción Gram en aislamientos bacterianos.



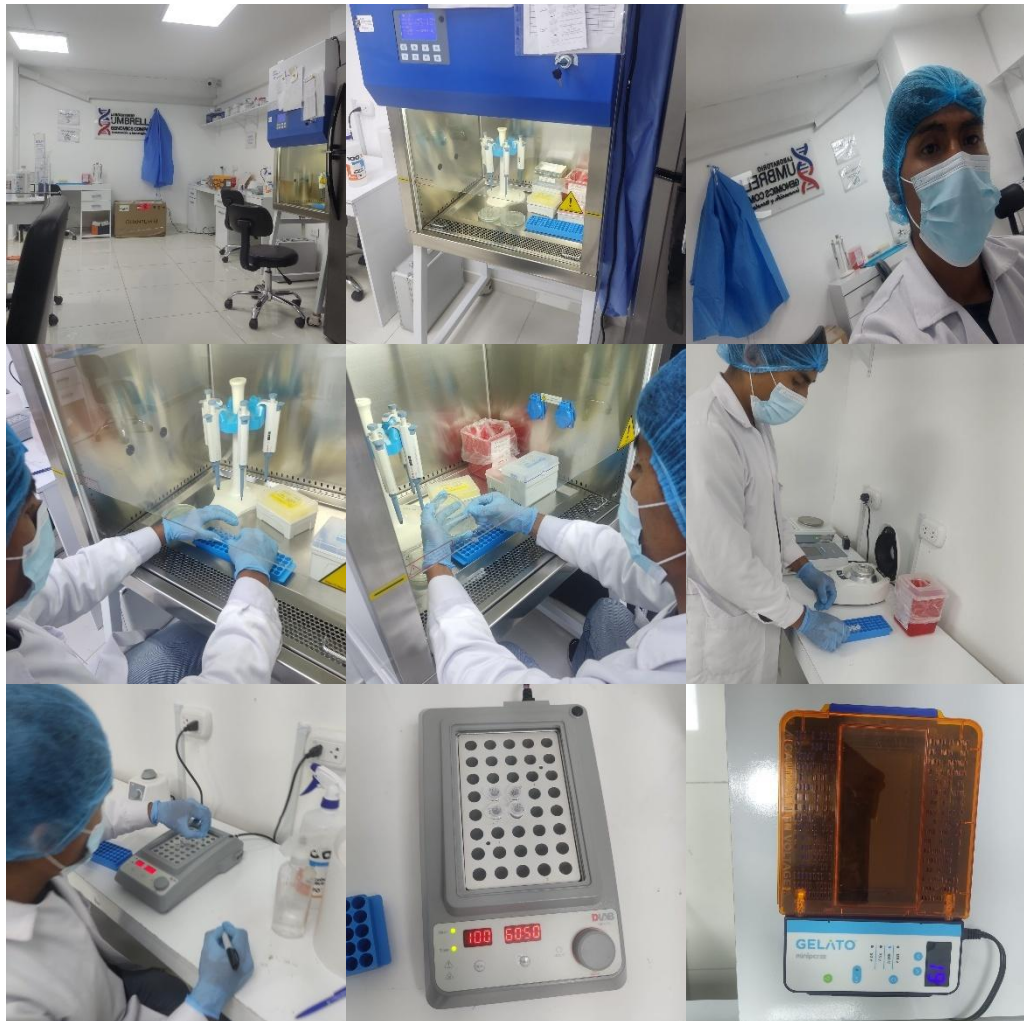
Anexo 6

Prueba de catalasa con respuesta positiva en aislamientos bacterianos.



Anexo 7

Ambientes del laboratorio de biotecnología Umbrella.



Anexo 8

Características del kit utilizado para la extracción de ADN.

Para la extracción de ADN se empleó el kit NucleoSpin Microbial DNA (Imagen Nro 1), la cual está diseñada para la purificación de ADN genómico de alta pureza de microorganismos. Gracias al uso de una disrupción mecánica con tubos de microesferas y en combinación con la proteinasa K líquida, este kit permite obtener altos rendimientos de ADN de una amplia gama de muestras microbianas.

Características del kit:

- Nombre del producto: NucleoSpin® Microbial DNA.
- Fabricante: MACHEREY-NAGEL GmbH, Alemania.
- Referencia (REF): 740235.50 • Lote (LOT): 2509-001
- Vencimiento: 2027-09



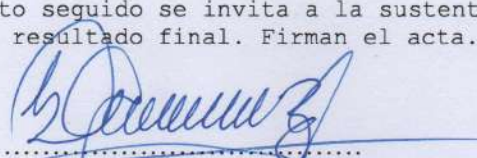
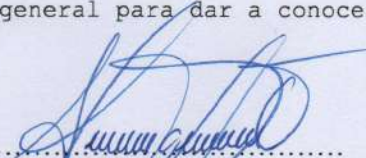
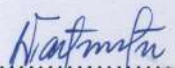
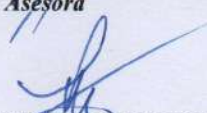
**UNSCH**FACULTAD DE CIENCIAS
AGRARIAS**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**
Bach. YHON CARLOS MOROTE HUAYTALLA**R.D. N° 129-2026-UNSCH-FCA-D**

En la ciudad de Ayacucho, a los ocho días del mes de mayo del año dos mil veintiséis, siendo las quince con treinta horas, se reunieron en el auditorio de la Facultad de Ciencias Agrarias, bajo la presidencia del Dr. Felipe Escobar Ramírez Decano de la Facultad de Ciencias Agrarias; los miembros del jurado conformado por el Ph.D. Germán Fernando De La Cruz Lapa, M.Sc. Angela Juana Requis Quintanilla como asesora, M.Sc. Walter Augusto Mateu Mateo y el Ing. Guillermo Carrasco Aquino; actuando como secretario de actas el Mtro. Rodolfo Alca Mendoza, para recibir la sustentación de la Tesis titulado: **Caracterización fenotípica, molecular y control in vitro del agente causal de la pudrición blanda en papa, Ayacucho - 2025**, para obtener el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo, presentado por el Bachiller **YHON CARLOS MOROTE HUAYTALLA**.

El señor Decano previa verificación de los documentos exigidos solicitó se proceda con la sustentación y posterior defensa de la tesis en un periodo de cuarenta y cinco minutos de acuerdo al reglamento de grados y títulos vigente. Terminado la exposición, los miembros del Jurado, formularon sus preguntas, aclaraciones y/o observaciones correspondientes. Luego se invito a los miembros del jurado pasar a otra aula para la deliberación y calificación del trabajo de tesis, teniendo el siguiente resultado:

Jurado evaluador	Exposición	Respuestas a las preguntas	Generación de conocimiento	Promedio
Ph.D. Germán Fernando De La Cruz Lapa	18	17	18	18
M.Sc. Angela Juana Requis Quintanilla	18	17	18	18
M.Sc. Walter Augusto Mateu Mateo	16	14	16	15
Ing. Guillermo Carrasco Aquino	16	16	15	16
PROMEDIO GENERAL				17

Acto seguido se invita a la sustentante y público en general para dar a conocer el resultado final. Firman el acta.


.....
Ph.D. Germán Fernando De La Cruz Lapa
Presidente
.....
M.Sc. Angela Juana Requis Quintanilla
Asesora
.....
M.Sc. Walter Augusto Mateu Mateo
Jurado
.....
Ing. Guillermo Carrasco Aquino
Jurado
.....
Mtro. Rodolfo Alca Mendoza
Secretario/Docente

**UNSCH**FACULTAD DE CIENCIAS
AGRARIAS

CONSTANCIA DE CONTROL DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

El que suscribe, miembro de la comisión de docentes instructores responsables de operativizar, verificar, garantizar y controlar la originalidad de los trabajos de **TESIS** de la Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, autorizado por R.D N° 213-2025-UNSCH-FCA-D; hace constar que el trabajo titulado;

Caracterización fenotípica, molecular y control *in vitro* del agente causal de la pudrición blanda en papa, Ayacucho – 2025

Autor : Yhon Carlos MOROTE HUAYTALLA
Asesor : Angela Juana REQUIS QUINTANILLA

Ha sido sometido al control de originalidad mediante el software TURNITIN UNSCH, acorde al Reglamento de originalidad de trabajos de tesis, aprobando mediante de RCU 039-2021-UNSCH-CU, arrojando un resultado de catorce por ciento **(14%)** de índice de similitud, realizado con **depósito de trabajo estándar**.

En consecuencia, se otorga la presente Constancia de Originalidad para los fines pertinentes.

Nota: Se adjunta el resultado con identificador de la entrega: 3000421900

Ayacucho, 19 de julio de 2026

Angela J. Requis Quintanilla

M.Sc. en Fitopatología

E.P. Agronomía

Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga

Caracterización fenotípica, molecular y control in vitro del agente causal de la pudrición blanda en papa, Ayacucho – 2025

por Yhon Carlos Morote Huaytalla

Caracterización fenotípica, molecular y control in vitro del agente causal de la pudrición blanda en papa, Ayacucho – 2025

INFORME DE ORIGINALIDAD

14%

INDICE DE SIMILITUD

13%

FUENTES DE INTERNET

6%

PUBLICACIONES

6%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.lamolina.edu.pe	5%
	Fuente de Internet	
2	revistacta.agrosavia.co	4%
	Fuente de Internet	
3	Submitted to Kovadata Ltda	1%
	Trabajo del estudiante	
4	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga	1%
	Trabajo del estudiante	
5	repositorio.unsch.edu.pe	1%
	Fuente de Internet	
6	repositorio.uncp.edu.pe	<1%
	Fuente de Internet	
7	caelum.ucv.ve	<1%
	Fuente de Internet	
8	Submitted to Universidad Del Magdalena	<1%
	Trabajo del estudiante	
9	hdl.handle.net	<1%
	Fuente de Internet	
10	mediatum.ub.tum.de	<1%
	Fuente de Internet	
11	repositorio.unp.edu.pe	<1%
	Fuente de Internet	
12	1library.co	<1%
	Fuente de Internet	
13	dspace.uazuay.edu.ec	<1%
	Fuente de Internet	

Exclur citas
Exclur bibliografia

Activo
Activo

Exclur coincidencias

< 30 words

Caracterización fenotípica, molecular y control *in vitro* del agente causal de la pudrición blanda en papa, Ayacucho – 2025

Phenotypic, molecular characterization and *in vitro* control of the causal agent of soft rot in potatoes, Ayacucho – 2025

Yhon Carlos Morote Huaytalla¹

Angela Juana Requis Quintanilla²

ychon.morote.01@unsch.edu.pe

angela.requis@unsch.edu.pe

Área de investigación: Biotecnología

Línea de investigación: Diagnóstico y manejo integrado de plagas y enfermedades de plantas

RESUMEN

En localidades de las provincias de Huamanga y Cangallo en la región Ayacucho, diversas zonas productoras de papa fueron consideradas para la colección de muestras con síntomas de pudrición blanda, con el objetivo de aislar e identificar el agente causal mediante caracterización fenotípica y molecular, así como evaluar alternativas de control *in vitro*. Las muestras fueron colectadas en las localidades de Aturqui, Ampuacasa, Chiara, Canaán INIA, mercado “Las Américas”, Pucuhuillca, Incaraccay, Huahuapuquio y Cangallo. Se obtuvo un total de 23 cepas bacterianas, de las cuales 8 presentaron alta virulencia con 100 % de incidencia, 3 mostraron patogenicidad intermedia y el resto no evidenció capacidad patogénica en ensayos de inoculación en láminas de papa. Las cepas patogénicas fueron caracterizadas fenotípicamente, resultando todas Gram negativas, catalasas positivas, fermentativas, con crecimiento a 37 °C y tolerancia a 5% de NaCl. La identificación molecular determinó que las cepas corresponden a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* con un 99.50% de similitud. Para el control *in vitro* se empleó un diseño completamente al azar, evaluándose un producto químico y dos alternativas ecológicas. Los resultados mostraron un 100% de inhibición para el sulfato de cobre pentahidratado, mientras que los extractos de cola de caballo e higuierilla no presentaron efecto inhibitorio bajo las condiciones evaluadas. Se concluye que *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* es el agente causal de la pudrición blanda en papa en la región Ayacucho, constituyendo el primer reporte de esta bacteria en la zona.

Palabras clave: Bacteria, *Pectobacterium*, pudrición blanda, identificación molecular, control *in vitro*.

ABSTRACT

In the provinces of Huamanga and Cangallo in the Ayacucho region, various potato-producing areas were sampled to collect samples exhibiting symptoms of soft rot. The objective was to isolate and identify the causal agent through phenotypic and molecular characterization, as well as to evaluate in vitro control alternatives. Samples were collected in the towns of Aturqui, Ampuaccasa, Chiara, Canaán INIA, the "Las Américas" market, Pucuhuillca, Incaraccay, Huahuapuquio, and Cangallo. A total of 23 bacterial strains were obtained, of which 8 strains showed high virulence with 100% incidence, while 3 strains showed intermediate pathogenicity, and the remaining strains did not demonstrate pathogenic capacity in inoculation tests on potato slices. The pathogenic strains were phenotypically characterized; all were found to be Gram-negative, catalase-positive, fermentative, with growth at 37 °C and tolerance to 5% NaCl. Molecular identification determined that the strains correspond to *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* with 99.50% similarity. A completely randomized design was used for in vitro control, evaluating one chemical product and two ecological alternatives. The results showed 100% inhibition for copper sulfate pentahydrate, while horsetail and castor bean extracts showed no inhibitory effect under the evaluated conditions. It is concluded that *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* is the causal agent of soft rot in potatoes in the Ayacucho region, constituting the first report of this bacterium in the area. **Keywords:** Bacteria, *Pectobacterium*, soft rot, molecular identification, in vitro control.

INTRODUCCION

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) es de gran importancia, siendo el cuarto cultivo más producido y sustento para mil millones de personas aproximadamente debido a su alto valor nutritivo (Cruzado, 2022). En nuestro país, el consumo de papa alcanza los 92 kg/hab/año, y el país se sitúa en el puesto 16 en producción mundial con alrededor de 3000 variedades registradas, constituyendo una fuente vital de ingresos para los agricultores (Arcos et al., 2020; MIDAGRI, 2020).

Este cultivo es susceptible a diferentes agentes fitopatógenos que ocasionan pérdidas económicas significativas. Entre las enfermedades bacterianas mas importantes se encuentran la pudrición marrón (*Ralstonia solanacearum*), la necrosis bacteriana (*Clavibacter michiganensis*), la costra de la patata (*Streptomyces scabies*) y la pudrición blanda (*Pectobacterium carotovorum*) (Al-Zomor et al., 2013). Según reportes

científicos, las bacterias pectinolíticas causantes de pudrición blanda fueron clasificadas dentro del género *Erwinia*, por ser típicamente Gram negativas, fermentativas, con flagelos peritricos y no esporulantes. No obstante, estudios posteriores llevaron a la creación del género *Pectobacterium*, dentro de la familia Pectobacteriaceae, con *Pectobacterium carotovorum* como especie tipo (Brenner et al., 1974; Waldee, 1942). *P. carotovorum* es el agente causal de la pudrición blanda o pierna negra, con pérdidas significativas que pueden alcanzar el 100% en poscosecha y entre 10% y 40% durante la cosecha, almacenamiento y comercialización (Amaya et al., 2021; INIA, 2021). En la región de Ayacucho, la información científica sobre enfermedades causadas por bacterias es limitada, y se desconocen las especies y subespecies de *Pectobacterium* presentes. Por tal motivo, esta investigación tuvo como objetivo principal identificar las características fenotípicas y moleculares del agente causal de la pudrición blanda en papa en esta región.

MATERIALES Y METODOS

Ubicación

La investigación se realizó en el departamento de Ayacucho, provincia de Huamanga, distrito de Ayacucho, específicamente en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH) a 2790 msnm. Además, la prueba molecular se realizó en el laboratorio Umbrella Genomics Company SAC (120 msnm). Las muestras de papa se colectaron en diversas zonas productoras de papa, contemplando Aturqui (2738 msnm), Ampuccasa (3462 msnm), Mercado “Las Américas” (2738 msnm), INIA-Canaán (2736 msnm), Pucuhuilca (3772 msnm), Chiara (3556 msnm), Incaraccay (3255 msnm), Huahuapuquio (3260 msnm) y Cangallo (2698 msnm).

Colección de muestras

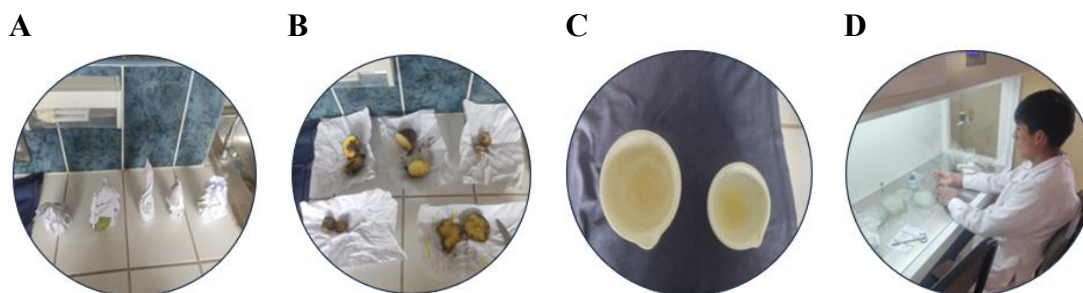
Se colectaron 54 muestras de tallos y tubérculos de papa con sintomatología típica de la enfermedad. La identificación *in situ* se basó en tallos y peciolo debilitados con coloración oscura, y tubérculos con pudrición, olor fétido y consistencia blanda. Las muestras se rotularon, codificaron y transportaron en envases herméticos con gel packs.

Procesamiento de muestras

Las muestras se lavaron, enjuagaron y extrajeron pedazos de tejido de la zona de avance de la lesión con bisturí estéril. Estos se machacaron en mortero con agua estéril para obtener una suspensión bacteriana. Se realizó estriado en placas de Petri con Agar Nutritivo (AN) e incubación a 27°C por 48 horas.

Figura 2.5

Tratamiento de muestras en el laboratorio.



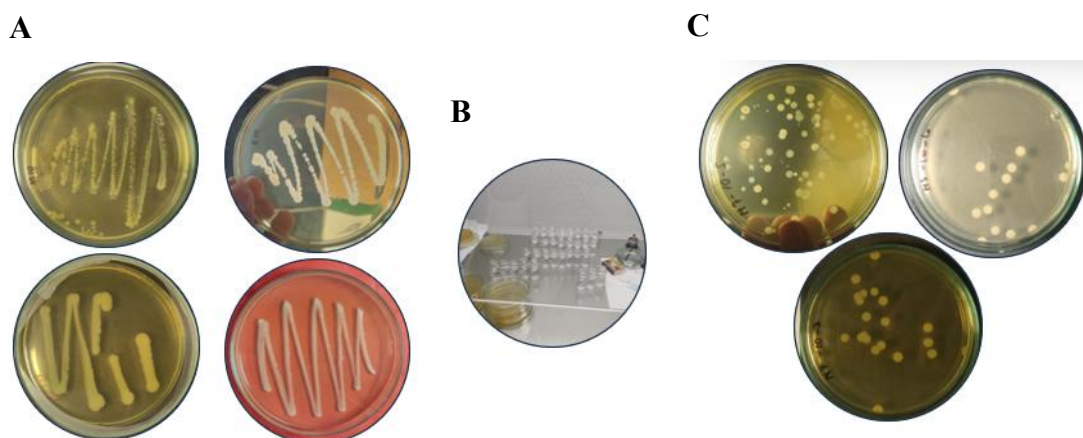
Nota: (A: Separación de muestras, B: Muestras partidas por la mitad, C: Trituración en mortero, D: Siembra en medio AN).

Obtención de aislamientos puros

Se observaron crecimientos coloniales con diferentes formas, tamaños y coloraciones. Se realizaron repiques sucesivos de colonias individuales (UFC) en tubos Eppendorf con agua destilada biesterilizada hasta obtener cultivos puros. Luego se hicieron diluciones seriadas para obtener colonias aisladas en placas de Petri y se conservaron en tubos Eppendorf con su código correspondiente.

Figura 2.6

Purificación de aislamientos.



Nota: A: (Crecimiento de colonias por estriado, B: Dilución seriada, C: Colonias aisladas).

Prueba de patogenicidad

Se utilizaron tubérculos de papa variedad Yungay, previamente desinfectados y cortados en láminas de 1.5 cm de grosor. Se realizó un hoyo de 5 mm de diámetro y profundidad en cada lámina. Se realizó la preparación de cámaras húmedas con papel toalla estéril y portaobjetos. Se inoculó una masa bacteriana de una colonia pura diluida en agua estéril en el hoyo de la lámina de papa. Se trabajaron 3 repeticiones por aislamiento, incluyendo un testigo con solo agua estéril y otro sin nada. La incidencia se calculó como el

porcentaje de unidades experimentales con sintomatología de pudrición blanda mientras que la severidad se evaluó con la escala de Bartz (1999).

Tabla 2.6

Escala de evaluación para la pudrición de láminas de papa.

Descripción	Medida (cm)	Simbolización
Sin pudrición	0	-
Pudrición restringida	<1	+
Pudrición activa pequeña	1-2	++
Pudrición muy activa	>2	+++

Identificación fenotípica

- **Tinción de Gram:** Siguiendo la metodología usada por Casasola (2022), se utilizaron cultivos bacterianos jóvenes de 18 a 24 horas. Se aplicó cristal violeta, lugol, alcohol etílico y safranina. Observando al microscopio (100X). La coloración rojiza evidencia presencia de bacterias Gram negativas.
- **Prueba de catalasa:** Se colocó una gota de agua oxigenada (H_2O_2) en un portaobjetos y se añadió una porción de colonia bacteriana. La formación de burbujas evidenció una reacción positiva.
- **Prueba de oxidación y fermentación:** Se usó medio O/F (Bacto peptona, NaCl, K_2HPO_4), Azul de Bromothymol, Agar, Glucosa, Agua destilada) (Requis, 2020). Se inocularon 8 tubos por cada aislamiento (4 aeróbicos y 4 anaeróbicos con vaselina líquida) e incubaron a 28 °C por 48 horas. El cambio de coloración verde a amarillo indicó metabolismo fermentativo.
- **Crecimiento a 27 °C y 37 °C:** Se inocularon placas con AN con suspensiones bacterianas. 5 placas para cada aislamiento y se incubaron a 27 °C y 5 a 37 °C. se evaluó la capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas.
- **Crecimiento en 5% de cloruro de sodio (NaCl):** Se preparó un medio con 5% de NaCl (Bacto peptona, NaCl, Agua destilada, Agar) (Requis, 2020). Se trabajaron 5 repeticiones por aislamiento y se evaluó el crecimiento bacteriano.

Identificación molecular

- **Extracción de ADN:** Se utilizó el método por ebullición (boiling), lisis térmica o shock térmico, un procedimiento rápido y económico (Loberiza et al., 2025). El protocolo incluyó cosechar cepas jóvenes, centrifugar, resuspender el pellet, hervir y enfriar en ciclos, y centrifugar nuevamente para obtener el sobrenadante con ADN.

- **PCR convencional para el primer general 16S:** Se preparó un master mix con repliQa HiFi ToughMix (2X), primers forward y reverse (27F y 1492R), agua libre de nucleasas y ADN molde. La amplificación se realizó con un programa de PCR que incluyó denaturación inicial (98°C, 30s), 35 ciclos de denaturación (98°C, 10s), annealing (59°C, 5s) y amplificación (68°C, 5s), y una amplificación final (68°C, 60s) (Requis, 2020). Se esperaba un producto de 1500 pb.
- **Electroforesis en gel:** Se confirmó la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0% con buffer TAE 1X. Se cargaron 5 µL del producto PCR y un marcador de peso molecular. La migración se realizó a 100 V por 30 minutos, visualizando bandas de ADN bajo luz azul.
- **Secuenciamiento:** El producto amplificado del gen 16S rARN del aislamiento seleccionado (PO3b) se envió a un laboratorio especializado para secuenciamiento con tecnología Oxford Nanopore. La secuencia consenso obtenida en formato FASTA se comparó con bases de datos del NCBI usando BLAST para determinar la identidad taxonómica.

Control *in vitro*

Se utilizó la técnica de medio envenenado. Se prepararon 100 ml de medio AN en envases de vidrio, esterilizados a 121 °C por 15 minutos. A 40-50 °C, se agregaron los productos, se mezcló y plaquéó. Una vez solidificadas se sembraron 0.2 ml de suspensión bacteriana a una dilución de 10^{-5} y se incubaron a 28 °C por 48 horas. Los tratamientos que se utilizaron fueron:

Tabla 2.12

Tratamientos para la prueba de control in vitro

Trat.	Producto	Dosis (ml/100ml)	Rep.
T1	Cola de caballo	13.33	5
T2	Higuerilla	13.33	5
T3	Cola de caballo + Higuerilla	6.66 + 6.66	5
T4	Sulfato de cobre pentahidratado	0.25	5
T5	Testigo	-	5

Los extractos de cola de caballo e higuerilla se obtuvieron por decocción, es decir hirviendo el material vegetal en agua destilada por 20 minutos, filtrado y diluyendo con jabón neutro (250 g) como agente tensioactivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de aislamientos

Se colectaron un total de 54 muestras entre tallos y tubérculos de papa con síntomas de pudrición blanda y pie negro, de los cuales se aislaron 23 cepas bacterianas, conservadas en tubos Eppendorf con agua destilada estéril. La mayoría de las cepas (17) se aislaron de tubérculos, lo que sugiere que son una fuente importante de inóculo. Las colonias aisladas mostraron características culturales típicas de *Pectobacterium* como crecimiento circular, superficie lisa y coloración blanda cremosa, lo que se relaciona con la literatura (Amaya et al., 2021).

Tabla 3.1

Resumen de la obtención de cepas.

Nº	Procedencia	Variedad	Parte vegetal	Código
1	Aturqui	Yungay	Tubérculo	M1
2	Aturqui	Yungay	Tubérculo	M2
3	Ampuccasa	Canchan	Tallo	M3
4	Ampuccasa	Canchan	Tallo	M4
5	Chiara	Canchan	Tubérculo	M5
6	Chiara	Canchan	Tubérculo	M6
7	Chiara	Canchan	Tubérculo	M7
8	Canaán – INIA	Yungay	Tallo	M8
9	Canaán – INIA	Yungay	Tallo	M9
10	Mercado Américas	Peruanita	Tubérculo	M10
11	Mercado Américas	Peruanita	Tubérculo	M11
12	Mercado Américas	Única	Tubérculo	M12
13	Mercado Américas	Única	Tubérculo	M13
14	Mercado Américas	Única	Tubérculo	M14
15	Pucuhuilla	Canchan	Tubérculo	M15
16	Pucuhuilla	Canchan	Tubérculo	M16
17	Pucuhuilla	Canchan	Tubérculo	M17
18	Incaraccay	Canchan	Tallo	M18
19	Incaraccay	Canchan	Tallo	M19
20	Huahuapuquio	Yungay	Tubérculo	M20
21	Huahuapuquio	Yungay	Tubérculo	M21
22	Cangallo	Canchan	Tubérculo	M22
23	Cangallo	Canchan	Tubérculo	M23

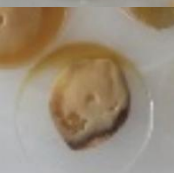
Prueba de patogenicidad

Los síntomas de pudrición blanda aparecieron a las 48 horas después de la inoculación. No todas las cepas fueron patogénicas. Las cepas M1, M2, M4, M9, M13, M14, M18, M19, M20, M21, M22 y M23 no causaron pudrición (0% de incidencia) y fueron descartadas. Las cepas M3, M5, M8, M10, M11, M12, M15 y M16 mostraron 100% de incidencia con pudrición muy activa (+++). Las cepas M6, M7 y M17 tuvieron una incidencia intermedia del 66.7% con pudrición activa pequeña (++) . Esta variabilidad en

agresividad es característica de *Pectobacterium* y se relaciona con la producción de enzimas pectinolíticas (Perombelon, 1974). Las cepas más patogénicas provinieron de Ampuaccasa, Chiara, Canaán-INIA, Acocro y Pucuhuillca, posiblemente debido a prácticas agrícolas intensivas (Toth et al., 2003).

Tabla 3.2

Incidencia y severidad de las cepas bacterianas.

M1	-		M9	-		M17	++	
M2	-		M10	+++		M18	-	
M3	+++		M11	+++		M19	-	
M4	-		M12	+++		M20	-	
M5	+++		M13	-		M21	-	
M6	++		M14	-		M22	-	
M7	++		M15	+++		M23	-	
M8	+++		M16	+++				

Identificación fenotípica

Las cepas patogénicas (M3, M5, M6, M7, M8, M10, M11, M12, M15, M16 y M17) mostraron las siguientes características:

- **Tinción de Gram:** Todas fueron Gram negativas (coloración rojiza), relacionado con *Pectobacterium* (Amaya et al., 2021; Perombelon, 1974).
- **Prueba de catalasa:** Todas fueron catalasa positivas, es decir formaron burbujas indicado la presencia de la enzima, típica de bacterias aerobias y facultativas (Amaya et al., 2021; Toth et al., 2003).
- **Prueba de oxidación y fermentación:** Todas mostraron metabolismo fermentativo (cambio de color verde a amarillo en condiciones aeróbicas como anaeróbicas)
- **Crecimiento a 27 °C y 37 °C:** todas crecieron a ambas temperaturas descartando *Pectobacterium atrosepticum* que no crece a 37 °C y sugiriendo *P. carotovorum* y *P. brasiliensis* (Oulghazi et al., 2021).
- **Crecimiento en 5% de NaCl:** Todas crecieron en este medio, evidenciando tolerancia a alta presión osmótica, lo que también descarta *P. atrosepticum* y es consistente con *P. carotovorum* y *P. brasiliensis* (He et al., 2023; Toth et al., 2003).

Los resultados fenotípicos se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 3.3

Resultados de las pruebas fenotípicas en 11 cepas bacterianas.

Pruebas	Cepas										
	M3	M5	M6	M7	M8	M10	M11	M12	M15	M16	M17
Tinción de Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Degradación de láminas de papa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba de catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba de oxidación y fermentación	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a 27 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a 37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en 5% de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Nota: (-) respuesta negativa y (+) respuesta positiva

Identificación molecular

Se extrajo ADN de la cepa M15 (recodificada como PO3b) debido a su alta patogenicidad. La prueba de PCR del gen 16S rRNA con los primer 27F y 1492R produjo un amplicón de ~1500 pb (128ng/ μ L), confirmando la integridad del ADN (Toth et al., 2003). El secuenciamiento con Oxford Nanopore y la comparación con BLAST en NCBI relevaron un 99.50 % de similitud con *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*. Este resultado confirma la identidad del agente causal y es el primer reporte de esta bacteria en Ayacucho.

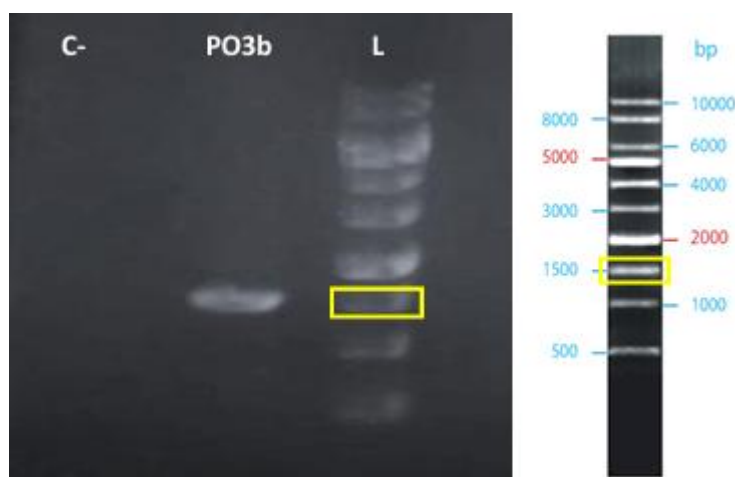
Tabla 3.4

Alineación significativa de la muestra PO3b.

Nombre científico	Total Score	E value	% de identidad	Número de accesoión
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i>	2699	0.0	99.50%	CP047495.1

Figura 3.9

Productos PCR amplificados para el gen 16S.



Nota: 1: Gel de agarosa al 1% que muestra la calidad de los amplicones. El tercer carril (L) corresponde a un Ladder de 1 Kb (GRISP). Los fragmentos amplificados presentan un tamaño cercado a 1500 pb, confirmando la integridad y ausencia de inhibidores en el ADN extraído.

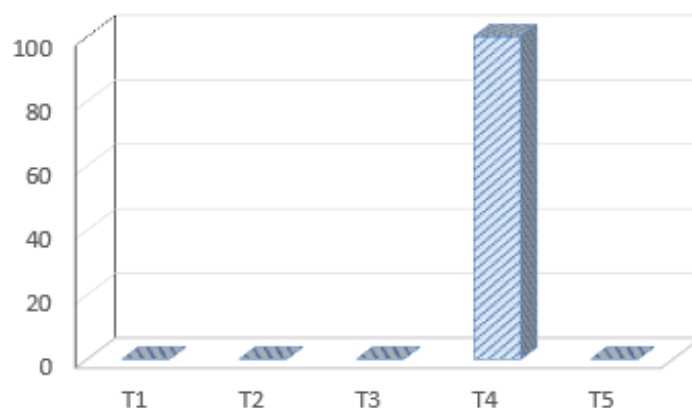
Control *in vitro*

El sulfato de cobre pentahidratado (T4) mostró un 100% de inhibición del crecimiento bacteriano. Por el contrario, los extractos de cola de caballo (T1), higuerilla (T2) y su combinación (T3) no tuvieron efecto inhibitorio comportándose como el testigo (T5). La falta de eficacia de los extractos vegetales pudiese deberse a que sus compuestos bioactivos son mas eficientes contra hongos o como preventivos en plantas, no como bactericidas directos *in vitro* (Camacho, 2012). El sulfato de cobre actúa desnaturalizando

proteínas y alterando la membrana celular bacteriana (Amaya et al., 2021). Estos resultados evidencian que, en condiciones de laboratorio, los productos naturales no son una alternativa útil contra *Pectobacterium*, mientras que los compuestos químicos como el sulfato de cobre son efectivos, considerando que su uso requiere precaución debido a los posibles efectos ambientales y fitotóxicos.

Tabla 3.5

Porcentaje de inhibición del crecimiento



T1: Cola de caballo T2: Higuierilla T3: Cola de caballo + Higuierilla T4: Sulfato de cobre pentahidratado T5: Testigo

CONCLUSIONES

1. La prueba de patogenicidad evidenció variabilidad en la capacidad patogénica de las cepas, determinándose que 8 cepas presentaron alta virulencia con 100% de incidencia, 3 mostraron patogenicidad intermedia 66.7 % y el resto no evidenció capacidad patogénica bajo las condiciones evaluadas.
2. Los aislamientos bacterianos obtenidos a partir de muestras de papa con síntomas de pudrición blanda en la región de Ayacucho corresponden a bacterias del género *Pectobacterium*, según las características fenotípicas evaluadas.
3. La identificación molecular permitió determinar con un 99.50% de similitud que las cepas analizadas pertenecen a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*, confirmando así la identidad del agente causal de la enfermedad en la zona de estudio.
4. En la evaluación del control *in vitro*, el tratamiento con sulfato de cobre pentahidratado, mostró un 100% de inhibición del crecimiento bacteriano, mientras que los extractos de cola de caballo e higuierilla, no presentaron efecto inhibitorio bajo las condiciones experimentales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Zomor, R., Khlaif, H., & Akash, M. (2013). Detection and Identification of *Erwinia carotovora* Subsp. *Atroseptica* (Van Hall, 1902) the Causal Agent of Potato Blackleg by RFLP-PCR. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 173(805), 1-28. <https://doi.org/10.12816/0001100>
- Amaya, A. P., Beltrán Pineda, M. E., Alfonso Vargas, N. C., Amaya Guerrero, A. P., Beltrán Pineda, M. E., & Alfonso Vargas, N. C. (2021). *Pectobacterium carotovorum*: Agente fitopatológico causante de la pudrición blanda en la papa (*Solanum tuberosum*). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 22(2). https://doi.org/10.21930/rcta.vol22_num2_art:1710
- Arcos, J., Mamani Huayta, H., Barreda Quispe, W. L., & Holguín Chuquimamani, V. (2020). *MANUAL TÉCNICO: MANEJO INTEGRADO DEL CULTIVO DE PAPA*. Instituto Nacional de Innovación Agraria. <https://repositorio.inia.gob.pe/handle/20.500.12955/1146>
- Bartz, J. A. (1999). Suppression of bacterial soft rot in potato tubers by application of kasugamycin. *American Journal of Potato Research*, 76(3), 127-136. <https://doi.org/10.1007/BF02853577>
- Brenner, D. J., Fanning, G. R., & Steigerwalt, A. G. (1974). Deoxyribonucleic Acid Relatedness Among *Erwiniae* and Other Enterobacteriaceae: The Gall, Wilt, and Dry-Necrosis Organisms (Genus *Erwinia* Winslow et al., sensu stricto). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 24(2), 197-204. <https://doi.org/10.1099/00207713-24-2-197>
- Camacho, V. J. (2012). *Control con extractos de hojas, tallos y semillas de higuierilla (Ricinus communis L.) en posturas y larvas del gusano cogollero del maíz (Spodoptera frugiperda J.E. Smith), en un entisol de Pacacocha Pucallpa*.
- Casasola, M. (2022). La importancia de realizar una correcta tinción de Gram en la identificación bacteriana. *Rev. Colegio de Microb. Quím. Clín. de Costa Rica*, 27(2), 89-98.
- Cruzado, G. J. (2022). *Producción de tubérculo de cinco clones de papa a partir de la primera generación (G1) en la E.E.A. El Mantaro-UNCP, Campaña 2019-2020*. <http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/20.500.12894/7972>

- He, W., Luo, W., Zhou, J., Zhu, X., & Xu, J. (2023). *Pectobacterium carotovorum* Subsp. *Brasiliense* Causing Soft Rot in Eggplant in Xinjiang, China. *Microorganisms*, 11(11), 2662. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112662>
- INIA. (2021). *Enfermedades Papa—INIA*. <https://enfermedadespapa.inia.cl/pieNegro.php>
- Loberiza, I. R., Falk, F. E., Green, T. J., & Loudon, A. H. (2025). Efficacy of different “boiling” methods for bacterial DNA extraction. *Journal of Microbiological Methods*, 237, 107245. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2025.107245>
- MIDAGRI. (2020). *Papa: Producción, Mercado, Comercialización y Oportunidades*. <https://repositorio.agromercado.gob.pe/bitstream/handle/SSE/178/INFORME%20FINAL%20PAPA-%20VERSION%20FINAL.pdf?sequence=1>
- Oulghazi, S., Sarfraz, S., Zaczek-Moczydłowska, M. A., Khayi, S., Ed-Dra, A., Lekbach, Y., Campbell, K., Novungayo Moleleki, L., O’Hanlon, R., & Faure, D. (2021). *Pectobacterium brasiliense*: Genomics, Host Range and Disease Management. *Microorganisms*, 9(1), 106. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010106>
- Perombelon. (1974). The role of the seed tuber in the contamination by *Erwinia carotovora* of potato crops in Scotland. *Potato Research*, 17(2), 187-199. <https://doi.org/10.1007/BF02360386>
- Requis, A. J. (2020). *Identificación y control del agente causal de la pudrición húmeda en alcachofa (Cynara scolymus L.) en Chíncha Baja*. <https://hdl.handle.net/20.500.12996/4350>
- Toth, I. K., Bell, K. S., Holeva, M. C., & Birch, P. R. J. (2003). Soft rot erwiniae: From genes to genomes. *Molecular Plant Pathology*, 4(1), 17-30. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00149.x>
- Waldee, E. (1942). Comparative Studies Of Some Peritrichous Phytopathogenic Bacteria. *Plant Pathogens, Estados Unidos*, 129.