

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Control de *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* *in vitro* en Tubérculos de  
*Papa Solanum tuberosum* L.

Por:

**MARLEN CORTES ADAN**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre de 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Control de *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* in vitro en Tubérculos de  
Papa *Solanum tuberosum* L.

Por:

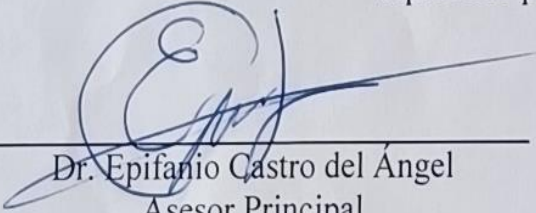
**MARLEN CORTES ADAN**

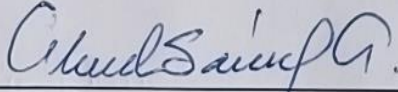
TESIS

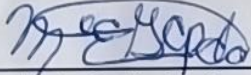
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

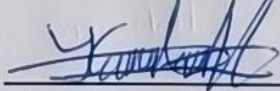
**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**


Aprobado por el Comité de Asesoría:

  
Dr. Epifanio Castro del Ángel  
Asesor Principal

  
M.C. Abiel Sánchez Arizpe  
Coasesor

  
Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda  
Coasesor

  
Ing. Lucero Elizabeth Aguilar Hernández  
Coasesor

  
Dr. Alberto Sandoval Rangel  
Coordinador de la División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México

Diciembre de 2024

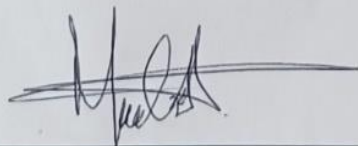
## DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir la verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (Corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar, o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, graficas , mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido o sancionado por las autoridades correspondientes.

Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.

Pasante



---

Marlen Cortes Adan

Firma y Nombre

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por lo bueno que ha sido conmigo y con mi familia, por darme la fuerza, el conocimiento y la sabiduría de seguir adelante y cumplir los anhelos de mi corazón.

A mi **ALMA MATER**, mi segundo hogar, que me brindó tanto amor, por alimentarme y darme todo lo necesario para seguir adelante y cumplir este gran sueño. Gracias por las bonitas experiencias con las personas que pusiste durante el trascurso de mi camino, por darme enseñanza, conocimientos, me enseñaste a valorar todo lo que había a mi alrededor, te llevaré siempre en mi corazón, nunca te olvidaré y diré con orgullo una vez buitre siempre buitre.

Al **Dr. Epifanio Castro del Ángel** por darme la oportunidad de realizar este proyecto, por su apoyo, su tiempo, paciencia, sus conocimientos y sus consejos que me ayudaron a salir adelante durante el trascurso de esta etapa.

Al **Dr. Abiel Sánchez Arizpe** por su tiempo, paciencia y conocimientos de hacer la revisión y comentarios.

A la **Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda** por las observaciones, conocimientos, tiempo y comentarios al escrito.

A la **T.A. María Cristina Sánchez Flores** por su apoyo, conocimientos y tiempo durante la investigación en Laboratorio, por darse el tiempo de explicarme con paciencia cada detalle y sobre todo gracias por motivarme y a aconsejarme siempre.

A la **Ing. Lucero Elizabeth Aguilar Hernández** por su apoyo incondicional, sus conocimientos, su tiempo, por las risas que nunca faltaron, sus consejos. Gracias por brindarme tu amistad la cual valoro y estimo mucho.

A mis **Amigos** que conocí durante mi estancia y se volvieron parte de mi familia, a Marisol Botello mi mejor amiga, confidente a la cual amo con todo mi corazón, Luis Gerardo, Ricardo López, Daniel Alfaro, Rubén Quintero por sus consejos, su compañía, a Monserrat, Cecilia, Kenia por su amistad, cariño, a Rosario Toribio con quien compartí un hogar, por su amor y cariño incondicional. Gracias por las anécdotas llenos de risas, travesuras, que marcaron mi vida, llevo conmigo todos esos bellos momentos.

## **DEDICATORIA**

### **A mis padres**

Santiago Pablo Cortes Alva y Ma. Florencia Adán Atilano, a quienes amo con todo mi corazón. Agradezco su apoyo incondicional, por su esfuerzo por sacarme adelante, por confiar en mí, gracias por permitirme llegar a lograr este sueño hecho realidad este logro es de ustedes. Gracias mamá por siempre cuidarme y apoyarme en los momentos difíciles, por tus oraciones día a día y por impulsarme a buscar a Dios. A ti papá, por tus consejos por tu apoyo, tu amor. Gracias por todo, aunque muchas veces sacrificaron sus sueños, comodidades por lo míos, estoy infinitamente agradecida, ustedes siempre serán mi motor, mi fuerza para seguir adelante.

### **A mis hermanos**

Ana María, Mari mar, Luz Areli por su apoyo, su amor, su cariño, gracias por acompañarme en este camino, gracias por confiar en mí, ustedes han sido mi ejemplo a seguir. A mi hermanito Marcos Oziel que amo y adoro con todo mi corazón, que siempre me saco una sonrisa a pesar de la distancia.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	IV
DEDICATORIA .....	V
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	VI
ÍNDICE DE CUADROS .....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XIII
RESUMEN .....	XIV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivos .....	3
1.1.1 Objetivo general.....	3
1.1.2 Objetivos específicos .....	3
1.2 Hipótesis.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
2.1 Origen del cultivo.....	4
2.2 Clasificación taxonómica. ....	4
2.3 Morfología.....	5
2.4 Importancia económica .....	6
2.5 Problemática del cultivo.....	6
2.6 Antecedentes de <i>Pectobacterium</i> .....	7
2.7 <i>Pectobacterium carotovorum</i> .....	8
2.8 Caracterización de la bacteria .....	9
2.9 Agente causal .....	9
2.10 Síntomas y signos.....	9
2.11 Adaptabilidad. ....	11
2.12 Diseminación de <i>Pectobacterium</i> .....	11

2.13	Ciclo de la enfermedad.....	12
2.14	Importancia del patógeno .....	12
2.15	Epidemiología .....	13
2.16	Medidas de prevención .....	13
2.17	Hongos antagonistas.....	14
2.17.1	<i>Trichoderma harzianum</i> .....	14
2.17.2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> . .....	14
2.18	Extractos vegetales.....	15
2.18.1	<i>Hamelia patens</i> .....	15
2.18.1.1	Descripción de botánica .....	15
2.18.1.2	Taxonomía de <i>H. patens</i> .....	15
2.18.1.3	Origen y distribución.....	15
2.18.1.4	Composición fitoquímica del extracto.....	16
2.18.2	<i>Argemone mexicana</i> .....	16
2.18.2.1	Descripción botánica .....	16
2.18.2.2	Taxonomía de <i>A. mexicana</i> .....	16
2.18.2.3	Origen y distribución.....	17
2.18.2.4	Composición fitoquímica del extracto.....	17
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1	Localización del Experimento.....	18
3.2	Recolecta del material .....	18
3.3	Aislamiento del fitopatógeno .....	18
3.3.1	Purificación del fitopatógeno.....	19
3.4	Caracterización del fitopatógeno.....	19
3.4.1	Evaluación de las características fenotípicas, bioquímicas y moleculares de <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> ( <i>Pectobacterium carotovorum</i> ) (Goszczyńska et al., 2000).....	20

3.4.1.1	Tinción de Gram .....	20
3.4.1.2	Prueba de R Y U .....	20
3.4.1.3	Prueba de Oxidasa.....	20
3.4.1.4	Prueba de Catalasa .....	21
3.4.1.5	Tolerancia de NaCl al 5% .....	21
3.4.1.6	Prueba de Fermentación/oxidación.....	21
3.4.1.7	Producción de indol.....	21
3.4.1.8	Producción de acetoin .....	22
3.4.1.9	Prueba de Pudrición de papa .....	22
3.4.1.10	Prueba de Hidrolisis de gelatina .....	22
3.4.1.11	Prueba de Producción de H <sub>2</sub> S.....	22
3.4.1.12	Prueba de Producción de ácido para carbohidratos.....	23
3.4.1.13	Prueba de Producción de ureasa .....	23
3.5	Obtención de los Extractos Vegetales de <i>Hamelia patens</i> y de <i>Argemone mexicana</i> .....	23
3.6	Actividad inhibitoria de los extractos contra <i>Pectobacterium carotovorum</i> ...	24
3.6.1	Inhibición in vitro de <i>Pectobacterium carotovorum</i> con extractos crudos de <i>H. patens</i> y <i>A. mexicana</i> .....	24
3.6.2	Inhibición in vitro de <i>Pectobacterium carotovorum</i> con <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	25
3.7	Control de <i>P. carotovorum</i> con microorganismos antagonistas y extractos vegetales en papa.....	25
3.7.1	Preparación de los antagonistas para el ensayo en tubérculos de papa ....	25
3.8	Establecimiento del experimento para la evaluación del control de la pudrición blanda de la papa.....	26
3.9	Evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad en tubérculos de papa .....	27
3.9.1	Incidencia de la enfermedad .....	27



3.9.2	Severidad de la enfermedad .....	28
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
4.1	Aislamiento e identificación macroscópica del agente causante de la pudrición blanda de la papa. ....	29
4.2	Caracterización morfológica y bioquímica de <i>P. carotovorum</i> de la papa. ....	29
4.2.1	Resultados de la tinción de Gram .....	30
4.2.2	Resultados de la prueba de RYU .....	31
4.2.3	Resultados de la patogenicidad de la bacteria (pudrición de papa) .....	31
4.2.4	Resultados de la prueba de Oxidasa .....	31
4.2.5	Resultados de la prueba Catalasa.....	32
4.2.6	Resultados de la prueba de Tolerancia de NaCl al 6% .....	32
4.2.7	Resultados de la prueba de Fermentación/oxidación.....	32
4.2.8	Resultados de la prueba producción de indol .....	33
4.2.9	Resultados de la prueba de producción de acetoin .....	33
4.2.10	Resultados de la prueba de hidrolisis de gelatina .....	33
4.2.11	Resultados de la prueba producción de H <sub>2</sub> S .....	34
4.2.12	Resultados de la prueba de producción de ácido a partir de carbohidratos: .....	34
4.2.13	Resultados de la prueba de producción de ureasa.....	35
4.2.14	Inhibición in vitro del extracto acuoso de <i>Hamelia patens</i> contra <i>Pectobacterium carotovorum</i> .....	35
4.3	Inhibición in vitro del extracto metanólico de <i>Hamelia patens</i> contra <i>Pectobacterium carotovorum</i> .....	36
4.4	Comparación de la eficiencia de extracto acuoso y metanólico de <i>Hamelia patens</i> contra <i>Pectobacterium carotovorum</i> .....	37
4.5	Efecto inhibitorio del extracto acuoso y metanólico de <i>Argemone mexicana</i> contra <i>Pectobacterium carotovorum</i> .....	38

4.6	Antagonismo in vitro de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> sobre <i>P. carotovorum</i> .....	39
4.6.1	<i>Trichoderma harzianum</i> .....	39
4.6.2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	40
4.7	Control de la pudrición blanda de la papa con extractos vegetales y microorganismos antagonistas. ....	40
4.7.1	Efecto de control de los extractos y antagonistas sobre la incidencia y severidad de la enfermedad. ....	40
5.	CONCLUSIONES.....	43
6.	LITERATURA CITADA.....	45
7.	ANEXOS.....	53

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Terminología de las enfermedades de <i>Solanum tuberosum</i> por la podredumbre blanda de <i>Erwinia carotovora</i> (Pérombelon & Kelman, 1987).....	10
Cuadro 2. Pruebas bioquímicas para la caracterización morfológica de <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> ( <i>Pectobacterium carotovorum</i> ) (Schaad <i>et al.</i> , 2001)....	19
Cuadro 3. Concentración / Dosis de los microorganismos antagonistas y extractos vegetales.....	26
Cuadro 4. Escala para evaluar la severidad de la pudrición blanda de la papa Montanelli <i>et al.</i> (1995) modificada por Fonseca (2014).....	28
Cuadro 5. Resultados de las pruebas realizadas para la caracterización de <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> ( <i>Pectobacterium carotovorum</i> ) (Schaad <i>et al.</i> , 2001)....	30
Cuadro 6. Incidencia y severidad de <i>P. carotovorum</i> en tubérculos de papa variedad Orquesta.....	41
Cuadro 7. Eficiencia técnica de tratamientos en el control de <i>Pectobacterium carotovorum</i> ajustado de acuerdo a (Abbott, 1925). ....	43
Cuadro 8. Varianza del extracto acuoso de <i>Hamelia patens</i> contra el crecimiento de <i>Pectobacterium carotovorum</i> . subsp. <i>carotovorum</i> .....	53
Cuadro 9. Varianza del extracto metanólico de <i>Hamelia patens</i> contra el crecimiento de <i>Pectobacterium carotovorum</i> . subsp. <i>carotovorum</i> .....	53
Cuadro 10. Varianza de la incidencia de los tratamientos contra la pudrición blanda de la papa.....	54
Cuadro 11. Análisis probit del extracto acuoso de <i>Hamelia patens</i> contra el crecimiento de <i>Pectobacterium carotovorum</i> . subsp. <i>carotovorum</i> .....	54
Cuadro 12. Historia de interacción para el estimador del parámetro extracto acuoso de <i>Hamelia patens</i> contra el crecimiento de <i>Pectobacterium carotovorum</i> . subsp. <i>carotovorum</i> .....	54
Cuadro 13. Análisis Probit del extracto metanólico de <i>Hamelia patens</i> contra el crecimiento de <i>Pectobacterium carotovorum</i> . subsp. <i>carotovorum</i> .....	55

Cuadro 14. Historia de interacción para el estimador del parámetro extracto metanólico de <i>Hamelia patens</i> contra el crecimiento de <i>Pectobacterium carotovorum</i> . subsp. <i>carotovorum</i> .....	55
Cuadro 15. Prueba de Kruskal-Wallis para determinar la severidad de <i>Pectobacterium carotovorum</i> . subsp. <i>carotovorum</i> .....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida patológico de la pudrición blanda de las hortalizas producida por la bacteria <i>Erwinia</i> sp (Agrios, 1991).....	12
Figura 2. Porcentaje de inhibición in vitro del extracto acuoso de <i>H. patens</i> contra <i>P. carotovorum</i> .....	36
Figura 3. Porcentaje de inhibición in vitro del extracto metanólico de <i>H. patens</i> contra <i>P. carotovorum</i> . ....	37
Figura 4. Crecimiento del patógeno sobre el extracto acuoso de <i>Argemone mexicana</i> (30000 ppm).....	39
Figura 5. Crecimiento del patógeno sobre el extracto metanólico de <i>Argemone mexicana</i> (30000 ppm). ....	39
Figura 6. Severidad de la pudrición blanda en tubérculos de papa.....	42

## RESUMEN

La papa es uno de los alimentos más consumidos a nivel mundial, por lo que se ha convertido en una de las hortalizas importantes en el mundo. Sin embargo, se han reportado enfermedades y desordenes fisiológicos que afectan a este cultivo y causan severos daños especialmente en los tubérculos, siendo *Pectobacterium carotovorum* uno de los más importantes en pos-cosecha y en la vida de anaquel. Por lo cual, el objetivo de esta investigación fue el control *in vitro* e *in vivo* de *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* con microorganismos de control biológico y de extractos vegetales. Para esto se evaluaron extractos acuosos y metanólicos de *Hamelia patens* y *Argemone mexicana* y microorganismos como *Bacillus amyloliquefaciens* y *Trichoderma harzinum*, bajo condiciones *in vitro* para el control de *Pectobacterium carotovorum* sobre la técnica antibiograma y cultivo dual en placa Petri, respectivamente. Se obtuvo el crecimiento del patógeno y de los antagonistas cada 24 h utilizando el software ImageJ.JS versión 0.5.8 para determinar el área de colonización, los resultados obtenidos fueron convertidos a porcentaje de inhibición para ser procesados por un análisis de varianza y prueba de Tukey al 0.05 de significancia utilizando el programa SAS 9.0. Así mismo, se determinó el control con extractos y antagonistas en tubérculos de papa evaluando la incidencia y severidad de la enfermedad obteniendo daños grado 5, 3 y 2 en una escala arbitraria, concluyendo que los extractos acuosos y metanólicos de *Hamelia patens* y la mezcla de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Trichoderma harzinum* tuvieron un efecto inhibitorio significativo sobre *Pectobacterium carotovorum*.

**Palabra clave:** pudrición blanda de la papa, antagonistas, extractos vegetales, incidencia de la enfermedad y severidad de la enfermedad.

## 1. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum L.*) es un tubérculo comestible, ocupa el 5° lugar a nivel mundial de los cultivos de mayor producción seguido del maíz, arroz, trigo y frijol, en el mundo se producen 385 millones de toneladas de papa, siendo China el principal productor y después la India, Estados Unidos, Rusia y Alemania. México ocupa el lugar 31° en la producción mundial de este importante tubérculo (Haro, 2019).

Se reporta que la papa es originaria de la gran Cuenca del Lago Titicaca, meseta del Collao, ubicada entre Perú y Bolivia, región donde se distribuye aproximadamente el 50 % de las especies de papas silvestres y ocho especies de papas cultivadas ( Pineda & Hernández, 2020).

Según las estadísticas del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2019), Sonora y Sinaloa son los principales productores de papa en el país; durante 2017, el volumen de sus cosechas les generó un ingreso en conjunto de 4 mil 685 millones de pesos. Con producciones menores, Veracruz y Nuevo León, obtuvieron más de mil millones de pesos cada uno por la comercialización de las cosechas de papa. En México las zonas con las mejores condiciones edafoclimáticas para la producción de papa se localizan sobre el Sistema Volcánico Transversal, donde destacan el Estado de México, Puebla y Veracruz.

A nivel mundial, se han reportado alrededor de 70 enfermedades y desordenes fisiológicos que afectan a este cultivo y causan severos daños especialmente en los tubérculos. Entre los síntomas de las enfermedades que afectan tubérculos se identifican agallas, manchas y pudriciones, principalmente; estos pueden ser ocasionados por hongos, bacterias, nematodos y virus. Por otra parte, las bacterias y hongos que ocasionan pudriciones o daños más severos en el peridermis de tubérculos, producen una amplia gama de enzimas como pectinasas, celulasas, xilanasas y proteasas, responsables de la maceración del tejido y muerte célula. Los síntomas incluyen ya sea pudriciones secas o blandas, decoloración del tubérculo y pudrición anular, y son debidas a diversos hongos como *Fusarium spp.*, *Verticillium spp*; bacterias, como *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp *atrosepticum*, *Ralstonia solanacearum*, entre otras (García - Ávila, 2018).

*P. carotovorum* es uno de los patógenos importantes de la papa, debido a que genera pérdidas económicas que han sido estimadas entre 50 y 100 millones de dólares anuales a nivel mundial. Esta enfermedad es reconocida como la más severa que ataca al tubérculo a nivel postcosecha específicamente durante el almacenamiento (Amaya - Guerrero *et al.*, 2021).

La pudrición blanda ha sido un constante problema en la producción de vegetales y particularmente en la producción de papa y que, si se desarrolla un programa efectivo para el manejo del patógeno, esto tendría un impacto significativo en la sostenibilidad y reducción de gastos en los sistemas de producción. Actualmente no hay métodos para eliminar de los tejidos afectados, a las bacterias que causan las pudriciones blandas lo que significa que los agricultores no tienen forma de curar plantas infectadas (Hernández *et al.*, 2019).

Con base a lo anteriormente expuesto y en vista del problema que representan las pudriciones blandas en la producción de papa, esta investigación tuvo como objetivo, el control *in vitro* e *in vivo* de *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* con microorganismos de control biológico y de extractos vegetales.



## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo general

Control *in vitro* e *in vivo* de *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* con microorganismos de control biológico y de extractos vegetales.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterización del agente causal de la pudrición blanda de la papa.
- Determinar el control *in vitro* con *Bacillus amyloliquefaciens*, *Trichoderma harzinum*, extractos acuosos y metanólicos de *Hamelia patens* y *Argemone mexicana* contra *P. carotovorum* subsp *carotovorum*.
- Determinar la efectividad de extractos vegetales y organismos de control biológico en tubérculos de *Solanum tuberosum* contra *P. carotovorum* subsp *carotovorum*.

## 1.2 Hipótesis

Al menos un tratamiento de control inhibirá el crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* en laboratorio y reducirá la severidad de la enfermedad en tubérculos de papa de forma significativa.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Origen del cultivo

Las papas se introdujeron en Europa en el siglo XVI. Utilizando genomas históricos, los autores muestran que las papas europeas estaban estrechamente relacionadas con las razas locales andinas y encuentran señales de mezcla con genotipos chilenos en Europa. Después de su introducción a Europa en el siglo XVI, las papas se adaptaron a una temporada de crecimiento más corta y a la formación de tubérculos bajo días largos (Gutaker, 2019).

Las papas fueron domesticadas por primera vez en los Andes centrales de América del Sur hace unos 10.000 años. Estas pertenecían a la especie diploide primitiva, *Solanum stenotomum*, derivada del prototipo silvestre, *S. leptophyes*. La papa tetraploide, *S. tuberosum*, surgió a través de la hibridación de *S. stenotomum* con una segunda especie diploide silvestre, *S. sparsipilum*. La evolución posterior tuvo lugar con al menos otras dos especies silvestres, *S. acaule* y *S. megistacrolobum*, que incorporaron genes de resistencia a las heladas al acervo genético cultivado y dieron como resultado una serie poliploide. Las papas silvestres comenzaron a evolucionar en México y algunas de ellas migraron a Sudamérica cuando se formó el puente terrestre en el Plioceno. Posteriormente se produjeron migraciones de retorno a México, formándose grupos de especies tetraploides y hexaploides. La evidencia de la evolución se basa en el cambio de la primitiva corola estrellada blanca a una forma avanzada de corola rotada en Sudamérica (Hawkes, 1988).

### 2.2 Clasificación taxonómica.

Según (Pineda & Hernández, 1996) indican que la taxonomía de la papa es:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Solanáceas

Género: *Solanum*

Especie: *tuberosum*

### **2.3 Morfología**

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una planta de naturaleza herbácea, compuesta por un sistema aéreo que incluye la inflorescencia, hojas compuestas, tallos y frutos; y un sistema subterráneo compuesto por raíces, estolones y tubérculos.

Las hojas son de tipo compuestas de 7 a 9 folíolos y es de estructura que sirve para captar y transformar la energía del sol en energía alimenticia (azúcares y almidón). La inflorescencia nace en el extremo terminal del tallo y el número de flores en cada una puede ir desde una hasta 30, siendo lo más usual entre 7 y 15. La flor es la estructura aérea que cumple funciones de reproducción sexual, desde el punto de vista agrícola tienen la función para el reconocimiento de variedades (Villanueva, 2017).

El fruto corresponde a una baya que normalmente es de color verde, dentro de ella se encuentra la semilla botánica, que llega a contener más de 200 semillas, según la fertilidad de cada cultivar. Las plantas que provienen de semilla botánica desarrollan raíces delgadas, de donde salen raíces laterales. Las plantas que crecen directamente del tubérculo semilla desarrollan raíces adventicias en los nudos del tallo y un sistema radical a una profundidad de 40 a 50 cm. Los tubérculos de la papa tienen un engrosamiento del estolón como consecuencia de la acumulación de reservas, constituyendo el principal órgano de reserva de la planta. Los tubérculos pueden variar en forma y tamaño. Una planta puede formar hasta 20 tubérculos (Martínez & Ojeda, 2023).

## 2.4 Importancia económica

El consumo de papa en México es de 17 kg per cápita al año, esto provoca que la producción nacional se vea desestimulada, y tenga lento crecimiento. En un análisis sobre la tendencia del consumo de la papa encontró que para el año 2025 el consumo se incrementará a 21 kg por lo que son pocas las expectativas de crecimiento del consumo, otros países como Perú consumen 74 kg por persona al año. Otro factor que afecta la producción nacional son los altos costos de producción del tubérculo, ya que es un cultivo con altos requerimientos de agroquímicos, además de la exigencia de contar con algún sistema de riego. La papa se consume en México de la siguiente manera: 56% en fresco, 29% se destina a la industria, y 15% se vuelve a reutilizar para la siembra del siguiente año. En su mayor parte la producción se dirige al mercado interno, 29 833 t se exportan y se importan 286 652 t (Méndez & Castellanos, 2018).

## 2.5 Problemática del cultivo

El almacenamiento es la etapa culmine del cultivo de papa antes de ser comercializado para consumo fresco, agroindustria o semilla. Cualquiera sea su destino final, el objetivo es llegar con la máxima calidad posible. Gran parte de esa calidad está dada por las enfermedades y condiciones ambientales que se puedan presentar en el almacenamiento. El alto nivel de turgencia que poseen los tubérculos y la liberación de agua, CO<sub>2</sub> y calor que producen como producto de su metabolismo, puede facilitar la proliferación de microorganismos si la bodega no cuenta con buenas condiciones de ventilación y regulación de temperatura. Sin embargo, se debe recordar que la mayoría de los patógenos que potencialmente pueden desarrollarse en almacenamiento, provienen del campo, por lo tanto, todas las labores de sanidad que se hayan realizado en campo y en el proceso de selección son claves para mantener en buenas condiciones los tubérculos (Acuña & Cádiz, 2011).

Diferentes enfermedades bacterianas han sido reportadas por atacar este cultivo, contribuyendo sustancialmente a que se generen pérdidas económicas para los productores. Entre las enfermedades que se destacan se encuentra la pudrición marrón causada por *Ralstonia solanacearum*, la necrosis bacteriana causada por *Clavibacter michiganensis* subsp *sepedonicus*, la costra de la patata causada por *Streptomyces scabies*

y la pudrición blanda, cuyo agente causal es *Pectobacterium carotovorum* (Amaya-Guerrero *et al.*, 2021).

## 2.6 Antecedentes de *Pectobacterium*

La podredumbre blanda bacteriana se describió por primera vez en el año 1901 en zanahorias y la bacteria fitopatógena aislada se denominó *Bacillus carotovorusen*. Un año después, la bacteria que causa la enfermedad de la pierna negra de la patata recibió el nombre de *Bacilo atrosepticus*. Estos dos patógenos se clasificaron como dos especies distintas en función de la patogenicidad y el origen de la planta huésped, fueron los primeros en sugerir que las bacterias patógenas de plantas peritricas deberían formar un nuevo género llamado *Erwinia* en honor al fitopatólogo estadounidense Erwin F. Smith en el informe preliminar del Comité de la Sociedad de Bacteriólogos Estadounidenses sobre caracterización y clasificación de tipos bacterianos publicado en 1917. La definición del género fue patógeno de plantas, crecimiento blanquecino y viscoso, que por lo general no produce indol y en ciertos medios de carbohidratos generalmente se forma ácido (Pasanen, 2020).

La taxonomía del género *Erwinia* es compleja y está constituida por varios grupos. El más relevante es el grupo *carotovora* que se caracteriza por incluir la especie *E. chrysanthemi* (Ech) y las subespecies *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) y *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca). De acuerdo (Hauben *et al.*, 1998) éstas han sido clasificadas en el antiguo género *Pectobacterium*, como *P. chrysanthemi*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, sin embargo, esta nomenclatura no ha sido ampliamente aceptada por los fitopatólogos.

Las especies del género *Erwinia* pueden dividirse en tres grupos filogenéticos según los resultados de las secuencias de ADNr 16S. El grupo I representa las verdaderas erwinias y comprende *E. amylovora*, *E. mallotivora*, *E. persicinus*, *E. psidii*, *E. rhapontici* y *E. tracheiphila*. Se propuso unir las especies del grupo II, *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *E. carotovora* subsp. *betavasculorum*, *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. carotovora* subsp. *odorifera*, *E. carotovora* subsp. *wasabiae*, *E. cacticida*, *E. chrysanthemi* y *E. cypripedii* en el género *Pectobacterium* respectivamente como *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* comb. nov., *P. carotovorum* subsp. *betavasculorum* comb. nov., *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* comb. nov., *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* comb. nov., *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* comb. nov., *P. cacticidum* comb. nov., *P.*

*chrysanthemi* y *P. cyripedii*. Las especies *E. alni*, *E. nigrifluens*, *E. paradisiaca*, *E. quercina*, *E. rubrifaciens* y *E. salicis*, que comprenden el grupo III, se están clasificando en un nuevo género *Brenneria gen. nov* (Hauben *et al.*, 1998).

*Erwinia carotovora* y *Pectobacterium carotovorum* tienen la misma cepa tipo y por lo tanto son sinónimos homotípicos. Por consiguiente, *Erwinia carotovora* debe considerarse como una especie auténtica del género *Pectobacterium* (Jones, 1901).

## **2.7 *Pectobacterium carotovorum***

*Pectobacterium carotovorum*, antiguamente *Erwinia carotovora* subsp *carotovora*, es una bacteria fitopatógena que causa la pudrición blanda. Esta enfermedad se presenta en regiones subtropicales y templadas en una amplia variedad de cultivos tales como zanahoria (*Daucus carota* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), pimiento (*Capsicum annuum* L.), chicoria (*Cichorium intybus* L.) y papa (*Solanum tuberosum* L.). En este último caso es una de las enfermedades postcosecha más severas en el mundo. La pudrición blanda puede ocurrir durante el almacenamiento de los tubérculos de papa, así como en el suelo antes de la cosecha, y por la utilización de tubérculos semillas contaminados que se deterioran después de la siembra (Reinoso *et al.*, 2006).

Según (Hauben & Swings, 2015) la clasificación taxonómica de *Pectobacterium carotovorum*:

Dominio: Bacterias

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Pectobacterium*

Especie: *carotovorum*

## 2.8 Caracterización de la bacteria

*P.carotovorum* es una bacteria pectinolítica Gram negativa, en forma de bacilo, que mide de 0.7 a 1.0 µm de ancho y de 1 a 2.5 µm de largo; no esporulada, motil y con flagelos peritricos; sus colonias muestran elevación convexa y son de color blanco cremoso; las células pueden aparecer de manera individual o en parejas. Dado que es una bacteria Gram negativa, su pared celular cuenta con una capa externa de lipopolisacárido (LPS) que contiene, dentro del polisacárido O, azúcares como la ramnosa, fructosa, glucosa y metilramnosa; no obstante, se ha encontrado que la composición química de este polisacárido O puede variar y ser específica para cada cero grupo y, por esa razón, la capa LPS es un determinante utilizado en la serotipificación de *P.carotovorum*. Por otro lado, se conoce que algunas estructuras celulares están involucradas en etapas tempranas de la infección y que contribuyen a su virulencia. Estas incluyen el pili, el flagelo, las capas de exopolisacáridos y las porinas, que son proteínas de canal que permiten la difusión pasiva de moléculas a través de la membrana. También ha sido reconocido recientemente que una mutación en el gen requerido para la síntesis de LPS puede afectar igualmente la virulencia de esa bacteria (Amaya-Guerrero *et al.*, 2021).

## 2.9 Agente causal

Las bacterias del género *Pectobacterium* son Gram negativas con forma de bastón, anaerobias facultativas, móviles con flagelo peritrico y pertenecen a la subdivisión  $\gamma$ -Proteobacteria, agrupada en la familia Enterobacteriaceae. Por mucho tiempo, fueron nombradas dentro del género *Erwinia*. Este agente patógeno se caracteriza por sintetizar una masiva cantidad de enzimas capaces de degradar componentes de la pared celular de su hospedero. Así, una vez que ingresa a la planta ya sea mediante heridas y/o aperturas naturales como las lenticelas, este se multiplica y comienza a producir pectinasas, celulasas, proteasas y xilanasas, que son las responsables de la maceración del tejido vegetal e indirectamente de su muerte celular, reportándose las pectinasas como las más importantes en la patogénesis (Acuña *et al.*, 2021).

## 2.10 Síntomas y signos

La infección temprana de los tubérculos-semilla después de la plantación puede resultar en el blanqueamiento (podredumbre o imposibilidad de que el tubérculo-semilla brote) si el tubérculo madre se pudre o si los brotes jóvenes se contaminan y mueren antes o justo

después de la emergencia. Durante el crecimiento de la planta de papa, las bacterias pueden propagarse desde el tubérculo-semilla hasta pudrir el tallo y también pueden ingresar a los tubérculos de la progenie a través de los estolones. Se pueden producir síntomas asociados al tubérculo como a la planta (en cualquier estado de desarrollo tal como lo mencionan (Van *et al.*, 2021).

Cuadro 1. Terminología de las enfermedades de *Solanum tuberosum* por la podredumbre blanda de *Erwinia catorovora* (Pérombelon & Kelman, 1987).

<b>TÉRMINO</b>	<b>EXPLICACIÓN</b>
<b>No Emergencia</b>	Resultados de la descomposición del tubérculo de la semilla o muerte temprana de los brotes bajo tierra.
<b>Esquirol</b>	La infección se origina en el tubérculo madre y se extiende al tallo; los síntomas son variables y van desde la podredumbre basal del tallo de color negro a marrón oscuro hasta el marchitamiento de las hojas y los tallos con o sin amarillamiento. La infección se limita a la parte basal de la planta o se extiende hasta la parte superior del tallo, y finalmente se asocia con un ahuecamiento del tallo.
<b>Marchitez</b>	El marchitamiento de los tallos y las hojas se produce a menudo en condiciones cálidas, pero sin déficit hídrico (estrés) y sin expresión de pudrición del tallo.
<b>Podredumbre del tallo aéreo</b>	Lesión de podredumbre de color canela, marrón a negro en el tallo que no se origina en el punto de unión al tubérculo de la semilla.
<b>Podredumbre apical del estolón</b>	Afecta principalmente a los tubérculos de la progenie de plantas que expresan síntomas de pierna negra; necrosis de color marrón a negro.
<b>Podredumbre blanda del tubérculo</b>	De color crema a tostado y consistencia suave y granular, con un color marrón que a menudo se desarrolla en los márgenes del tejido descompuesto; olor desagradable a menudo asociado al tejido descompuesto.



**Podredumbre lenticular** Manchas de color marrón a negro hundidas y podridas en los puntos donde las lenticelas se infectan. Pueden limitarse a síntomas duros y secos cuando la descomposición se detiene en las primeras etapas después de la infección de las lenticelas

---

### **2.11 Adaptabilidad.**

La maceración del tejido parenquimatoso por parte de *E. caratovora* depende en gran medida de las condiciones ambientales, pues se ha demostrado que las temperaturas cercanas a los 30°C favorecen el incremento en la velocidad de la enfermedad, además determina la especie que genera la infección y por otro lado la humedad debido a la saturación del suelo por el exceso de las lluvias o el riego que produce condiciones anaeróbicas favorece el crecimiento de la bacteria (Portela-Dussán *et al.*, 2013).

### **2.12 Diseminación de *Pectobacterium***

La infección de podredumbre blanda del tubérculo generalmente se origina en las lenticelas, el extremo del estolón o las heridas cuando las condiciones son húmedas y mojadas más tarde, la infección avanza dentro del tubérculo de la papa y la papa podrida se vuelve blanda y viscosa y, a veces, la masa bacteriana de la papa puede estallar fuera de la papa. En los tallos de la papa, los síntomas se ven como podredumbre y tallo negro, y durante el tiempo seco como hojas cloróticas y colgantes causadas por el flujo limitado de agua y nutrientes en el sistema vascular causado por la bacteria (Pérombelon & Kelman, 1980). El tubérculo madre enfermo puede causar una emergencia y un crecimiento deficientes de la papa. Los síntomas de la pierna negra comienzan desde el tubérculo madre y se extienden más tarde a la parte basal del tallo y más adentro del tallo de la planta de papa, donde la enfermedad es visible como lesiones negras y viscosas (Pasanen, 2020).

### 2.13 Ciclo de la enfermedad

La infección por esta bacteria inicia con el ingreso de la bacteria a la planta a través de una herida, como se presenta en la Figura 1, cuando inicia con la activación de sus mecanismos de virulencia; basados en su capacidad de secretar una variedad de enzimas, especialmente pectinasas, enzimas degradadoras de la pared celular de las plantas, sumado a una variedad de proteasas, endoglucanasas, poligalacturonasas, pectato liasas y xilanasas, convirtiendo a las especies de *Pectobacterium* como patógenos altamente necrotróficos en plantas. La degradación celular, conlleva a la muerte celular y por ende, al marchitamiento de la planta, especialmente de la parte aérea de la misma, y su posterior muerte (Castro & Acero, 2021).

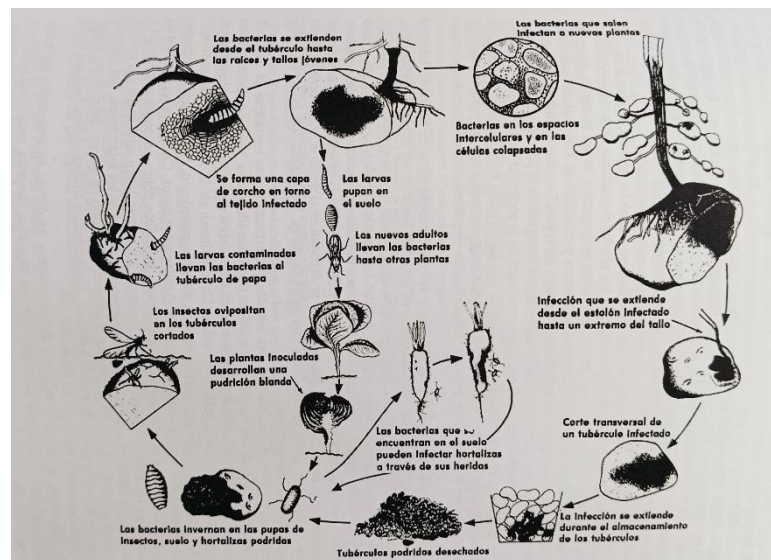


Figura 1. Ciclo de vida patológico de la pudrición blanda de las hortalizas producida por la bacteria *Erwinia* sp (Agrios, 1991).

### 2.14 Importancia del patógeno

*Pectobacterium carotovorum* es el agente causal de la pudrición blanda de la papa, la enfermedad poscosecha más relevante, disminuyendo el rendimiento y aumentando el costo de producción; además de que causan patologías diferentes dentro de un huésped y como consecuencia grandes pérdidas económicas para los productores y comerciantes (Escalona *et al.*, 2019).

## **2.15 Epidemiología**

Se considera que la principal fuente de inóculo en el cultivo es el tubérculo madre infectado, muchas veces en forma latente, aquí las bacterias se encuentran en las lenticelas y heridas o bien dentro del sistema vascular, expresándose solo si las condiciones ambientales favorecen su crecimiento y el desarrollo de la enfermedad. Este patógeno es de tipo anaerobio facultativo, por lo que, bajo condiciones inadecuadas de almacenamiento, la pudrición comenzará en zonas de condensación, donde se forma una lámina de agua, facilitando la activación de la bacteria, originándose la maceración y muerte celular del tejido vegetal gracias a la acción de sus enzimas degradadoras de pared celular (Charkowski, 2018).

El potencial para la Pudrición blanda está influenciado por el número y posición de las células bacterianas en las lenticelas, presencia y tipo de heridas, edad de los tubérculos, susceptibilidad del cultivar, niveles de calcio y potencial de agua de los tejidos. Además, estas bacterias pueden ser transportadas desde plantas enfermas mediante el vuelo de insectos, teniendo como consecuencia la diseminación a otros cultivos de papas. También pueden estar presentes en aerosoles producidos por el impacto de la lluvia sobre plantas enfermas y que son llevados por el viento a otras plantas produciendo infección en heridas expuestas (Acuña *et al.*, 2021).

## **2.16 Medidas de prevención**

Los patógenos que causan estas enfermedades ocurren donde quiera que se cultive papa. La gravedad de la enfermedad depende de las técnicas de manipulación de la papa semilla, la humedad y temperatura del suelo en el momento de la siembra, las condiciones ambientales, el cultivo, la condición fisiológica de la semilla, la densidad de inóculo inicial en el lote de semillas utilizado. (García, & González, 2019), menciona algunas medidas para controlar *P. carotovorum* es evitar plantar en suelos húmedos y fríos o suelos con tendencia a encharcarse. No excederse en el abono nitrogenado. Cosechar las papas con tiempo seco para facilitar el secado y la cicatrización de las heridas. Hacer rotaciones amplias de cultivo. Antes de la siembra o al cambiar de huerta desinfecte los utensilios, herramientas que entren en contacto con las papas.

## 2.17 Hongos antagonistas

### 2.17.1 *Trichoderma harzianum*

El biocontrol se define como el uso de organismos vivos para combatir plagas y patógenos agrícolas. Los hongos del género *Trichoderma* están presentes en el suelo, y debido a sus acciones antagonistas actúan como parásitos, que han demostrado su efectividad contra patógenos responsables de la infección de raíces y la incidencia de pudrición en las plantas. Estas acciones se pueden clasificar como: micoparasitismo (con la secreción de enzimas hidrolíticas que actúan sobre la pared celular del huésped), antibiosis (con la síntesis de metabolitos secundarios antimicrobiales), competencia por espacio o nutrientes (con la producción de metabolitos que interfieren con el desarrollo de plagas) y simbiosis (al favorecer el crecimiento y la inducción de resistencia a enfermedades y estreses abióticos en las plantas con las que conviven) (Matas *et al.*, 2023)

Un amplio repertorio de metabolitos biológicamente activos es utilizado por especies de *Trichoderma harzianum* para la exclusión de patógenos, incluida la competencia por espacio, nutrientes y producción de compuestos antibacterianos. En la búsqueda de productos con aplicaciones antimicrobianas, un total de 49 cepas fúngicas fueron aisladas, estas cepas se cultivaron en arroz fermentado y se obtuvieron sus respectivos extractos orgánicos macerados en acetato de etilo y metanol y se evaluaron contra cinco fitopatógenos de importancia agrícola. Estos patógenos incluyeron a la bacteria *Erwinia carotovora*, donde *Trichoderma* actuó como agente de control biológico y cuyas propiedades antagónicas se basaron en la activación de mecanismos muy diversos (Mesa-Venegas *et al.*, 2019).

### 2.17.2 *Bacillus amyloliquefaciens*.

Por otro lado, las esporas producidas por *Bacillus* hacen que éstos sean armas versátiles para el control de microorganismos fitopatógenos, ya que estas estructuras de resistencia permiten su almacenamiento, incluso a temperatura ambiente, por largos periodos de tiempo. Además de su capacidad de producir esporas, estos microorganismos se destacan porque algunas de sus cepas pueden emplearse como alternativa de control biológico ya que logran una rápida colonización y replicación, teniendo una alta capacidad de sobrevivir en ambientes hostiles y tienen la habilidad de sintetizar diversos compuestos antimicrobianos (Rico-Jiménez *et al.*, 2021).

## 2.18 Extractos vegetales

El empleo de extractos vegetales para el control de plagas, enfermedades en el marco de una agricultura sostenible constituye una alternativa prometedora, debido a su efectividad, bajo costo y no ser contaminantes del ambiente. Alrededor de 3.000 compuestos naturales de origen vegetal han sido reportados mostrando actividad bactericida, fungicida, insecticida, repelente y nematocida (Celis *et al.*, 2009).

### 2.18.1 *Hamelia patens*

#### 2.18.1.1 Descripción de botánica

*Hamelia patens* (Rubiaceae) es un arbusto ampliamente distribuido en áreas tropicales del continente americano. Puede alcanzar los tres metros de altura, da frutos rojos y posee flores color naranja brillante, por lo que se le ha llamado comúnmente como “coralillo,” o “hierba coral.” Un gran número de aplicaciones medicinales son conocidas para esta planta (Jiménez-Suárez *et al.*, 2012).

#### 2.18.1.2 Taxonomía de *H. patens*

(Martinez Cano de Haase, 2016).

Filo: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Rubiaceae

Familia: Rubiaceae

Género: *Hamelia*

Especie: *patens* Jacq.

#### 2.18.1.3 Origen y distribución

La especie *Hamelia patens* jacq en honor al autor francés de libros sobre árboles y arbustos Henri Louis du Hamel (1700 - 1781) descrito científicamente en 1760 y el nombre específico *patens*, que quiere decir extendido. Usado en la producción de una bebida fermentada en México y El Salvador, se encuentra en diversos tipos de hábitat de

preferencia en climas tropicales, en zonas conservadas y perturbadas. Se puede encontrar desde La Florida (EEUU), pasando por Centroamérica, Perú y hasta Argentina desde los 50 hasta 1800 m.s.n.m (Caballero, 2022).

#### 2.18.1.4 Composición fitoquímica del extracto

En estudios fitoquímicos de *H. patens* se identificaron diferentes metabolitos secundarios como esteroides, saponinas, alcaloides, flavonoides y polifenoles. Sin embargo, el perfil fitoquímico de las plantas depende de numerosos factores como el genotipo, la edad fisiológica de la planta, el tipo de órgano, las condiciones edafoclimáticas (en interacción con el genotipo), el momento del corte y el procesamiento de la muestra (Fontanills *et al.*, 2018).

#### 2.18.2 *Argemone mexicana*

##### 2.18.2.1 Descripción botánica

Es una maleza anual que crece en terrenos baldíos, a orilla de carretera, conocida como amapola mexicana, cardo santo o chicalote, puede llegar a medir hasta 150 cm de altura, su tallo es ramificado oblongo en sección transversal y generalmente muy espinoso, exuda un jugo amarillo cuando se corta, tiene vistosas flores amarillas de 2,5–5 cm de diámetro, las hojas son parecidas a cardos y alternas, sin pedúnculos (pecíolos), dentadas (aserradas) y los márgenes espinosos, las venas de color blanco grisáceo se destacan sobre la superficie de la hoja superior de color verde azulado, la fruta es una cápsula espinosa, alargada o con forma de ovoide, las semillas son muy numerosas, casi esféricas, cubiertas por una fina red de venas, de color negro pardusco y de aproximadamente 1 mm de diámetro (Hernández-Soto *et al.*, 2022).

##### 2.18.2.2 Taxonomía de *A. mexicana*

(Díaz, 2016).

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Papaverales

Familia: Papaveraceae

Género: *Argemone*

Especie: *mexicana* L.

#### 2.18.2.3 Origen y distribución

Es una hierba medicinal originaria de México, que se encuentra en el centro y sur de América; ha sido utilizada en la medicina tradicional india Ayurveda durante más de 5.000 años para tratar una variedad de enfermedades. La distribución de esta familia es notable en regiones templadas (Ruiz, 2016).

#### 2.18.2.4 Composición fitoquímica del extracto

*A. mexicana* reporta la presencia de alcaloides de tipo bencilisoquinolina (BIA), estos alcaloides se acumulan en raíces y semillas maduras. Ha sido estudiada por su actividad antimicrobiana, actividad anticancerígena, actividad antioxidante in vitro, actividad antidiabética, actividad antiinflamatoria y analgésica (Carbajal-Gutiérrez, 2024).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Localización del Experimento

La identificación del patógeno, así como la preparación de los extractos se llevaron a cabo en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) unidad Saltillo.

#### 3.2 Recolecta del material

Se recolectaron plantas de *H. patens* y *Argemone mexicana*. La planta *H. patens* fue procedente de la localidad Cinco Señores, Ajalpan, Puebla. La recolecta de las hojas se realizó en el mes marzo de 2024, se seleccionaron ramas adultas con hojas y flores que no presentaban daño por enfermedades o insectos, las muestras fueron secadas al aire libre durante 5 días, estas fueron depositadas en bolsas de papel para ser trasladadas a la (UAAAN), Saltillo. Por otro lado, *Argemone mexicana* fue recolectada en el mes de abril de 2024, en San Cristóbal Tepeteopan, Tehuacán, Puebla, se seleccionaron ramas adultas con hojas que no presentaban daños, estas fueron trasladadas a la Universidad para colocarlas en la estufa de secado a 40°C, hasta que perdieron por completo la humedad.

El fitopatógeno se colectó de tubérculos de papa de establecimientos comerciales de la zona centro de Saltillo, para posteriormente ser trasportados al Departamento de Parasitología para el aislamiento.

#### 3.3 Aislamiento del fitopatógeno

Según la metodología de (Schaad *et al.*, 2001). el inóculo de la bacteria se obtuvo bajo condiciones de asepsia; primeramente, los tubérculos de papa se lavaron repetidas veces para eliminar los restos de tierra. Los tubérculos fueron seccionados en dos partes con el fin de que las lesiones fueran visibles, una vez cortada se tomó una muestra del signo evidente del patógeno aproximadamente .2 gr, en seguida se maceró la muestra en una bolsa de maceración de doble malla. Del macerado se realizaron diluciones distribuidos en 6 tubos de ensaye con 9 mL de agua destilada estéril. Del macerado se extrajo 1 mL y se agregó en el primer tubo, posteriormente se tomó 1mL de la muestra del primer tubo y se transfirió al segundo tubo y así sucesivamente hasta la última dilución. De estos tubos se seleccionaron los últimos 4 para hacer una siembra, de cada tubo se sembraron en 2 cajas Petri de medio PDA agregando en el centro de la caja 100 microlitros de la muestra



del tubo con ayuda de una micropipeta, realizando una siembra de dispersión con una varilla de vidrio, obteniendo así 16 cajas del aislamiento del microorganismo.

### 3.3.1 Purificación del fitopatógeno

Para la purificación se procedió a realizar una siembra seriada empleando un asa bacteriológica, tomando una pequeña cantidad de la muestra inicial y realizando transferencias sucesivas en cajas Petri con medio PDA, en 5 repeticiones. Las cajas Petri se incubaron a  $26 \pm 2^\circ \text{C}$  hasta su utilización.

### 3.4 Caracterización del fitopatógeno

Para determinar la caracterización morfológica de *Pectobacterium carotovorum* se llevó a cabo pruebas bioquímicas; con identificación preliminar y de lectura inmediata, pruebas rápidas, con lectura en menos de 6h y pruebas lentas, con lectura de 18 a 48h. El siguiente cuadro se observa en la cepa de estudio joven de 24 h los resultados de los aislamientos que se realizaron.

Cuadro 2. Pruebas bioquímicas para la caracterización morfológica de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*) (Schaad *et al.*, 2001).

<b>Prueba Bioquímica</b>	<b>Resultado Esperado</b>
Tinción de Gram	-
R YU	+
Oxidasa	-
Catalasa	+
Prueba de NaCL al 5%	+
Prueba O/F	anaerobia facultativa
Producción de indol	-
Producción de acetoin	-
Pudrición de papa	+
Hidrolisis de gelatina	+
Producción de H <sub>2</sub> S	+

Producción de ácido para carbohidratos:

Lactosa	+
Maltosa	Variable
Sorbitol	+
Producción de ureasa	+

---

3.4.1 Evaluación de las características fenotípicas, bioquímicas y moleculares de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*) (Goszczyńska *et al.*, 2000).

#### 3.4.1.1 Tinción de Gram

Se colocó una pequeña gota de agua esterilizada en un portaobjetos limpio y se tomó una muestra de cultivo joven de la bacteria con ayuda de un asa bacteriológica y se extendió sobre el portaobjetos. Posteriormente se fijó con calor, evitando que se sobrecaliente, luego se agregó en el portaobjetos cristal violeta, se dejó reposar por 60 segundos, este se enjuagó con agua corriente y se escurrió el exceso de agua, para luego añadirle yodo Lugol y se dejó reposar durante 60 segundos. Se lavó con etanol al 95 % durante 30 segundos y se enjuagó con agua, para después teñir con colorante de contraste safranina durante 45 segundos, se enjuagó con agua y se secó. Por último, se llevó a observación en microscopio óptico y se examinó con un aumento de 100X utilizando aceite de inmersión.

#### 3.4.1.2 Prueba de R Y U

Se preparó una solución acuosa de KOH al 3%. Posteriormente se colocó una pequeña gota de la solución acuosa en un portaobjetos limpio y se tomó una muestra del cultivo joven de la bacteria con ayuda de un asa bacteriológica, la bacteria se extendió sobre la gota del portaobjetos y se levantó el asa para observar la consistencia.

#### 3.4.1.3 Prueba de Oxidasa

Los pasos que se realizaron, primeramente, se utilizó el inóculo de 24 hr. Se tomó con un asa bacteriológica una pequeña porción de la bacteria y se frotó sobre una placa de Test oxidasa (BD BBL™ DrySlide™) que contiene el compuesto N,n,n,n-tetrametil-p-

fenilendiamina dihidrocloruro. El resultado se interpretó al cabo de 10-30 seg. La reacción positiva indica un color azul-violeta intenso antes de 10 segundos.

#### 3.4.1.4 Prueba de Catalasa

Para esta prueba se utilizó un cultivo joven de 24 h y peróxido de hidrogeno al 3.5% ( $H_2O_2$ ). Se mezcló una pequeña cantidad de la bacteria con una gota de  $H_2O_2$  sobre un portaobjetos limpio, hasta detectar la formación de burbujas.

#### 3.4.1.5 Tolerancia de NaCl al 5%

Se preparó un caldo YS con los siguientes reactivos: fosfato de amonio ( $NH_4H_2 PO_4$ ), Sulfato de Potasio dibásico ( $K_2HPO_4$ ), Sulfato de Magnesio ( $MgSO_4 \times H_2O$ ), Cloruro de Sodio (NaCl) y Extracto de levadura, estos se disolvieron homogéneamente en un matraz de 125 mL) y se llevó a esterilización en autoclave. Se vertió en tubos de ensaye, posteriormente se inoculó del patógeno con un asa bacteriológica. Se incubaron a  $27^\circ C$  y se mantuvieron en observación durante 24 y 48h. Reacción positiva turbiedad del medio.

#### 3.4.1.6 Prueba de Fermentación/oxidación

Se preparó el medio Hugh y Leifson con los siguientes reactivos: Peptona de caseína, Cloruro de sodio (NaCl), Fosfato de potasio ( $KH_2PO_4$ ), agar y Azul de bromotimol (solución acuosa al 1%), estos se disolvieron homogéneamente en un matraz de 125 mL, se ajustó el pH de 7.1 y se esterilizo a  $121^\circ C$  por 20 min. Se preparó una solución acuosa de glucosa al 10% y se esterilizó por filtración agregando al matraz con el medio basal. Posteriormente, se vertió en tubos de ensaye de 4.0 mL y se dejó solidificar. Se incubó durante 48 horas. Después, se inocularon 2 tubos con el fitopatógeno; a uno se le agregó un volumen de aceite mineral triple estéril hasta una profundidad de aproximadamente 5 mm y el otro se dejó sin aceite, un tercer tubo como testigo para contrastar los resultados esperados. Se incubaron a  $27^\circ C$  y se mantuvieron en observación durante 24 y 48h.

#### 3.4.1.7 Producción de indol

Se preparó el medio con Triptona y L-triptófano, se dispensó el medio en tubos de ensaye (10 mL por tubo) y se llevó a esterilización en autoclave, se dejó enfriar y se agregó el reactivo de Kovac (p-Dimetilaminobenzaldehido, Alcohol amílico y HCl),

posteriormente se inoculó la bacteria de un cultivo joven en los tubos con ayuda de un asa bacteriológica y se incubó a 22 °C.

#### 3.4.1.8 Producción de acetoin

Se inoculó el caldo de sales de levadura + glucosa y se incubó en un agitador rotatorio durante 5 días. Después del tiempo de agitación se agregaron 0.6 mL de a-naftol al 5 % y se homogenizo durante 5 segundos. Posteriormente se agregaron 0.2 mL de KOH al 40 %, se agitó vigorosamente y se dejó reposar. Se observó después de 30 minutos a 2 h.

#### 3.4.1.9 Prueba de Pudrición de papa

Los tubérculos se lavaron con agua corriente para eliminar cualquier impureza, enseguida, en un vaso de precipitado de 250 mL se agregó el 90 % de agua estéril con hipoclorito de sodio al 10%, de tal manera que todo el tubérculo quedara sumergido durante 5 minutos; se secó y fue cortado en rodajas de 7-8 mm de grosor.

Cada rodaja se mantuvo en cámara húmeda sobre una sanita estéril cortada en una circunferencia que cubría la placa de Petri. En el centro de cada rebanada se realizó una herida donde se inoculó el patógeno con ayuda de un asa bacteriológica, dejando un testigo para contrastar. Se incubó durante 24 horas para observar los signos y síntomas.

#### 3.4.1.10 Prueba de Hidrolisis de gelatina

El medio de cultivo contenía Peptona, Cloruro de sodio (NaCl), Extracto de carne, Gelatina, Agar y Agua, se mezclaron calentando gradualmente para la integración homogénea, después se esterilizo durante 20 minutos a 120 °C. Finalmente, se dispense en tubos de ensaye hasta solidificar, la bacteria de 24h de edad fue inoculada con ayuda de un asa bacteriológica incubando a 25°C por 24 horas.

#### 3.4.1.11 Prueba de Producción de H<sub>2</sub>S

Se preparó el medio que contenía fosfato de amonio (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>), Sulfato de Potasio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), Sulfato de Magnesio (MgSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O), Cloruro de Sodio NaCl, Extracto de levadura y en vez de peptona se agregó cisteína, estos reactivos se disolvieron y se dispensaron 5mL en tubos de ensaye, luego se sometieron a esterilización en autoclave.

Posteriormente se inoculó con ayuda de un asa bacteriológica antes de que se solidificara, después se cortaron tiras de papel filtro de 1x10 cm, estas se sumergieron en una solución de acetato de plomo al 5%, se suspendió una tira de acetato de plomo sobre el medio (la tira estaba sujeta por una tapa). Al final se incubó durante 14 días.

#### 3.4.1.12 Prueba de Producción de ácido para carbohidratos

Se preparó el medio en tres matraces de 100 mL donde se agregaron fosfato de amonio ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ), Sulfato de Potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), Sulfato de Magnesio ( $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ), Extracto de levadura, Purpura de bomocresol (1.5 % en etanol) y Agar, respectivamente. Se ajustó el pH a 6.8 con ayuda de un potenciómetro, para después llevarlo a esterilización en autoclave, se esperó a que se enfriara a 50° C.

Se preparó la fuente de carbono (Lactosa, Maltosa y Sorbitol) añadiendo 1 gr en cada 5 mL de agua estéril y se pasó por membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  para su esterilización, se mezcló y se vertió en los diferentes tubos inclinándolos para la solidificación. La inoculación del patógeno fue con ayuda de un asa bacteriológica incubando a 27° C por 24h.

#### 3.4.1.13 Prueba de Producción de ureasa

Se preparó medio de fosfato de amonio ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ), fosfato de potasio dibásico  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , sulfato de magnesio  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , Cloruro de sodio (NaCl), Extracto de levadura, rojo de cresol y agua, se mezclaron, dispensándolos en matraces de 125 mL para su esterilización. Posteriormente se inoculó el patógeno con ayuda de un asa bacteriológica.

### **3.5 Obtención de los Extractos Vegetales de *Hamelia patens* y de *Argemone mexicana***

Se obtuvieron plantas secas de *H. patens* y de *Argemone mexicana*, estas se llevaron al Laboratorio de Fitopatología donde se pulverizaron en una licuadora (WARING COMMERCIAL Laboratory BLENDER, MODEL 31BL91) hasta obtener un polvo fino, el polvo se mantuvo en recipientes de plástico y se guardaron en lugar oscuro para protegerlos de la luz, para su posterior utilización (Rodríguez, 2022).

Se prepararon extractos a base de metanol (Met-OH) y agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Para la obtención de los extractos se pesaron 150 gr del polvo de las hojas pulverizadas y se agregaron 350 mL del solvente (0.4 g de materia seca/mL de solvente) en matraces Erlenmeyer de 500 mL

sellados con aluminio. Se mantuvieron en agitación constante durante 240h en ausencia de luz en una placa termoagitadora (CORNING, STIRRER/HOTPLATE) a 26° C.

Después del tiempo de agitación, los extractos se filtraron con gasa estéril de algodón y posteriormente se pasó por papel filtro Whatman número 2, finalmente se llevó a centrifugación durante 15 minutos a 4000 rpm en una (DYNAC II CENTRIFUGE). El resultado del sobrenadante se colectó en matraces de Erlenmeyer de 200 mL, finalmente se utilizó una membrana filtrante Milipore de 0.22 µm para filtrar la solución, con el fin de retener contaminantes y garantizar la pureza de la muestra y se mantuvieron 4°C hasta su utilización.

### **3.6 Actividad inhibitoria de los extractos contra *Pectobacterium carotovorum***

#### **3.6.1 Inhibición in vitro de *Pectobacterium carotovorum* con extractos crudos de *H. patens* y *A. mexicana*.**

El efecto inhibitorio se evaluó por la técnica antibiograma. Se utilizaron extractos a base de metanol y agua. Se cortaron discos de papel filtro Whatman número 2, estas se esterilizaron, posteriormente se ajustó la turbidez de la suspensión bacteriana en un tubo de ensaye, para que correspondiera a un valor de  $1 \times 10^8$  ufc en la escala de McFarland. Los discos de papel filtro ya esterilizados, se sumergieron en la suspensión, se dispusieron 5 discos en puntos equidistantes sobre la superficie del medio PDA en la caja Petri. Las cajas inoculadas se incubaron a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  por 48h.

Se evaluaron 9 concentraciones desde 2.5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm y 5000 ppm de cada extracto crudo de *H. patens* acuoso y metanólico, con 4 repeticiones para cada concentración. Para el caso de *Argemone mexicana* a base de metanol y agua se evaluaron en las siguientes concentraciones 25 ppm, 50 ppm, 100ppm, 125ppm, 1000ppm, 5000ppm, 10000 ppm, 20000 ppm y 30000 ppm con 4 repeticiones para cada concentración también. En el crecimiento del halo, se tomaron imágenes de las placas de cultivo, estas fueron importadas en el software ImageJ.JS versión 0.5.8 para evaluar la inhibición del crecimiento bacteriano, permitiendo la medición precisa de las zonas de inhibición alrededor de los discos impregnados con la bacteria. Los resultados obtenidos del crecimiento del halo fueron transformados a porcentaje de inhibición de acuerdo con la expresión matemática:  $\%I = C - T/C * 100$ ; donde: %I es el porcentaje de inhibición del crecimiento del halo, C crecimiento

micelial del testigo y T crecimiento micelial del tratamiento con el extracto. Se determinó la CI<sub>50</sub> y CI<sub>90</sub>.

El experimento se distribuyó en un diseño completamente al azar. La unidad experimental fue de 5 repeticiones en 7 tratamientos. El análisis de varianza se realizó con el programa SAS versión 9.0 para Windows.

### 3.6.2 Inhibición in vitro de *Pectobacterium carotovorum* con *Trichoderma harzianum* y *Bacillus amyloliquefaciens*.

El efecto inhibitorio se evaluó mediante pruebas duales. Se utilizaron dos cepas de *Trichoderma harzianum* y otra de *Bacillus amyloliquefaciens*, tomados de la colección de microorganismos del Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología. Se preparó medio de cultivo PDA para la prueba, una vez lista la placa de PDA se dividió en dos partes iguales, utilizando una línea imaginaria para asegurar que ambas secciones sean del mismo tamaño, se sembró un disco de 1 cm de diámetro de *Trichoderma harzianum* en la parte derecha de la placa Petri. En el caso de la bacteria se colocó una estría con ayuda de un asa bacteriológica en la parte izquierda de la caja Petri de tal manera que sean equidistantes. El crecimiento de ambos microorganismos se determinó cada 24 h. Sin embargo, la prueba dual para evaluar la interacción entre *B. amyloliquefaciens* y *P. carotovorum* se realizó una estría de cada uno de los microorganismos en la misma caja Petri, asegurando que estuvieran separados para observar su crecimiento y posibles efectos de inhibición. También se realizaron evaluaciones a intervalos de 24hr.

## 3.7 Control de *P. carotovorum* con microorganismos antagonistas y extractos vegetales en papa

### 3.7.1 Preparación de los antagonistas para el ensayo en tubérculos de papa

Se utilizaron dos cepas, una de *Trichoderma harzianum* y otra de *Bacillus amyloliquefaciens*, tomados del Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología. Se cultivaron en matraces Erlenmeyer con medio de cultivo caldo papa dextrosa adicionado con extracto de levadura. Se inoculó con un explante de micelio y conidios de 48 horas de edad de la cepa de *Trichoderma* y una asada para el caso de *Bacillus*. Los cultivos se dejaron por 7 días en ausencia de luz. Una vez listas se licuo en

una licuadora (WARING COMMERCIAL Laboratory BLENDER, MODEL 31BL91) hasta obtener una mezcla homogénea. Los extractos se mantuvieron en oscuridad a 4°C para su conservación hasta su utilización. Los extractos de las plantas en estudio fueron a base de agua y metanol, tomando en cuenta los resultados de la evaluación *in vitro*.

Se evaluaron 2 cepas de antagonistas, dos extractos vegetales, un testigo absoluto y un testigo inoculado con el fitopatógeno, cada unidad experimental se replicó 5 veces. El experimento fue distribuido en un diseño completamente al azar. Los tratamientos se reportan en el Cuadro 3, de acuerdo a su concentración / dosis.

Cuadro 3. Concentración / Dosis de los microorganismos antagonistas y extractos vegetales

Clave Tratamiento	Designación del Tratamiento	Concentración / Dosis
Test	Testigo absoluto	-----
HP- H <sub>2</sub> O	<i>H. patens</i> – Agua	1.44 mL/L
HP-MetOH	<i>H. patens</i> – Metanol	1.44mL/L
Ba	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1x10 <sup>8</sup> ufc/mL
Ba+Th	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	1x10 <sup>8</sup> ufc/mL y 1x10 <sup>8</sup> conidios/mL
Th	<i>Trichoderma harzianum</i>	1x10 <sup>8</sup> conidios/mL
FP	Testigo inoculado	1x10 <sup>8</sup> ufc/mL

### 3.8 Establecimiento del experimento para la evaluación del control de la pudrición blanda de la papa

Se utilizaron 35 tubérculos de papa de variedad Orquesta, se obtuvieron en establecimientos comerciales de la zona centro de Saltillo, para posteriormente ser transportados al Departamento de Parasitología. El tamaño de los tubérculos osciló de 6 a 8 cm de longitud, estos se lavaron con agua de la llave para quitar los restos de tierra o impurezas, una vez secos se procedió a realizar un orificio en la región del estolón con ayuda de un sacabocados de 0.5 cm de diámetro perforándolo aproximadamente 2 cm de profundidad.



Los tubérculos del testigo absoluto se separaron del resto de los tratamientos para evitar la contaminación cruzada, los tratamientos de los antagonistas y extractos se prepararon en un volumen de 150 mL, los tubérculos fueron sumergidos durante 30 segundos y posteriormente se mantuvieron en sanitas estériles para su secado.

Posteriormente la suspensión bacteriana se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^8$  ufc en la escala de McFarland, seguidamente a cada tubérculo se inoculó 1 mL de la suspensión bacteriana dentro del orificio, se esperó que el fitopatógeno se impregnara en la herida y posteriormente se colocó el explante extraído en la región del estolón para el sellado.

Se elaboraron cámaras húmedas utilizando bolsas de plástico de 1 kg, colocando vasos de unicel de 6 Oz en su interior que se cortaron en la parte superior para acomodar los tubérculos inoculados orientando la región del estolón hacia arriba, en la parte inferior del vaso se colocaron 2 sanitas húmedas estériles, las bolsas de plástico se sujetaron con ayuda de una liga para evitar pérdida de humedad y evitar la contaminación por insectos. Cada 24 horas se humedecían las sanitas para crear un microclima que le ayudara al desarrollo de la bacteria

Se mantuvo en incubación durante 5 días revisando el progreso de la enfermedad cada 24h. Después del periodo de incubación los tubérculos fueron seccionados simétricamente con el fin de que las lesiones fueran visibles desde el interior y evaluar la incidencia y severidad de la enfermedad de cada tratamiento.

### **3.9 Evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad en tubérculos de papa**

#### 3.9.1 Incidencia de la enfermedad

Para determinar este parámetro se utilizaron tubérculos que tenían los síntomas visibles de la bacteria fitopatógena. La siguiente fórmula establece la forma para determinar la incidencia de tubérculos enfermos.

$$Incidencia = \frac{\text{Número de tubérculos enfermos}}{\text{Número de tubérculos evaluados}} \times 100$$

Los resultados obtenidos de la incidencia de los tubérculos fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de separación de medias con la prueba de Tukey al 0.05 de

significancia para detectar significancia entre tratamientos. Se utilizó el software SAS versión 9.0 para Windows.

### 3.9.2 Severidad de la enfermedad

La severidad se determinó utilizando una escala arbitraria de 6 clases (Cuadro 4), asignando valores de daño según la escala propuesta por Montanelli *et al.* (1995) modificada por Fonseca (2014), de acuerdo a la sintomatología observada. Los resultados de severidad de la enfermedad fueron analizados por estadística no paramétrica para detectar significancia entre tratamientos, utilizando la prueba de Kruskal Wallis en el programa SAS versión 9.0 para Windows.

En la prueba de Kruskal Wallis se realizó una prueba de hipótesis en la cual  $H_0$  quiere decir que todos los tratamientos tienen la misma distribución y por lo tanto se indica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos contra  $H_a$  (Hipótesis alternativa). Todos los tratamientos indican que tienen diferente distribución, al menos 2 tratamientos son diferentes.

Cuadro 4. Escala para evaluar la severidad de la pudrición blanda de la papa Montanelli *et al.* (1995) modificada por Fonseca (2014).

<b>Escala</b>	<b>Severidad (% de daño)</b>
0	0
1	1 - 24
2	25
3	26 - 50
4	51 - 75
5	76 - 100

Tanto la incidencia como la severidad fueron expresados como eficacia o control de la enfermedad utilizando la fórmula de Abbott (Abbott, 1925), considerando como eficacia media a baja valores de 50% a 70%.

En la cual:

$$Eficiencia (\%) = \frac{C - T}{C} \times 100$$

C = Incidencia o severidad (%) en el testigo absoluto

T = Incidencia o severidad (%) en el tubérculo evaluado

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 Aislamiento e identificación macroscópica del agente causante de la pudrición blanda de la papa.**

Se obtuvieron cepas de bacterias aisladas de tubérculos de papa con signos y síntomas de color crema a tostado con consistencia suave y granular, con olor desagradable. Las características consideradas para la identificación de *P. carotovorum* fueron observadas colonias a las 24 h con aspecto blanquecino o beige, ligeramente cremoso, sin forma definida, convexa, con lesiones suaves, líquidas y brillantes, olor penetrante debido a la producción de enzimas como las pectinasas, estas características corresponden a las reportadas por (Schaad *et al.*, 2001).

### **4.2 Caracterización morfológica y bioquímica de *P. carotovorum* de la papa.**

Se realizaron pruebas preliminares, bioquímicas y fisiológicas para caracterizar el aislamiento bacteriano y confirmar su identidad como *Pectobacterium carotovorum*. En el cuadro 5, se observan los resultados obtenidos de las pruebas realizadas al patógeno.

Cuadro 5. Resultados de las pruebas realizadas para la caracterización de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*) (Schaad *et al.*, 2001).

<b>Prueba Bioquímica</b>	<b>Resultado Obtenido</b>
Tinción de Gram	-
RYU	+
Oxidasa	-
Catalasa	+
Prueba de NaCL al 5%	+
Prueba O/F	anaerobia facultativa
Producción de indol	-
Producción de acetoin	-
Pudrición de papa	+
Hidrolisis de gelatina	+
Producción de H <sub>2</sub> S	+
Producción de ácido para carbohidratos:	
Lactosa	+
Maltosa	Variable
Sorbitol	+
Producción de ureasa	+

#### 4.2.1 Resultados de la tinción de Gram

En el microscopio óptico se examinó que la bacteria tomaba un color rosado a rojizo, observando bacilos largos, esto nos indica que es una bacteria Gram Negativa debido a que tiene una pared celular más delgada y una membrana externa que carece de peptidoglicano. Fernandes, (2016) mencionó que la coloración de las bacterias Gram negativas presenta una capa de peptidoglicano delgada que no permite contener el complejo cristal violeta/yodo, se escapa y se pierde la coloración, permitiendo que entre la safranina y se colorean las células de rojo.

#### 4.2.2 Resultados de la prueba de RYU

Para la corroboración de la tinción de Gram, al extender la bacteria sobre el portaobjetos y levantar el asa para observar la consistencia, se obtuvo una reacción positiva en la cual se formó un hilo mucoso bacteriano. Lo anterior ocurre porque la bacteria tiene una pared celular delgada que carece de peptidoglicano y una membrana, por lo que, al aplicar KOH desintegra la pared celular, liberando el material genético (ADN) que se encuentra en el interior de la célula. La Dirección General de Sanidad Vegetal y el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, (2013) reportan, que si la suspensión se torna viscosa (solubilidad positiva) y al separar el asa del portaobjetos permite la formación de un pequeño filamento, esta reacción corresponde con las bacterias Gram (-), caso contrario ocurre cuando el asa se levanta libremente y ello es característico de las bacterias Gram (+).

#### 4.2.3 Resultados de la patogenicidad de la bacteria (pudrición de papa)

Después de las 24 y 48h postinoculación se observaron los signos y síntomas de la bacteria en las rodajas donde fueron inoculadas, teniendo un aspecto blanquecino o beige, ligeramente cremoso con un olor desagradable, comparado con el testigo que no presentó los síntomas característicos de la pudrición blanda. A lo cual Torres- Bojórquez *et al.* (2016) evaluaron la inoculación en rodajas de papa, este da como resultado una reacción positiva, también mencionan que la pudrición de papa es una prueba importante para determinar la patogenicidad de una bacteria y ubicarla dentro de un grupo específico por la capacidad de causar pudrición por la acción de enzimas pectolíticas que maceran el tejido parenquimatoso, alterando la integridad estructural del hospedante.

#### 4.2.4 Resultados de la prueba de Oxidasa

El resultado se interpretó al cabo de 10-30 seg. Para una reacción positiva se debe manifestar un color azul-violeta intenso antes de 10 segundos, sin embargo, para el caso de *Pectobacterium* el resultado fue negativo, ya que no produjo un cambio de color al añadir la muestra sobre la placa de Test oxidasa, lo que indica que la bacteria no produce la enzima citocromo-oxidasa. Al respecto Apolinario, (2018) menciona que la prueba oxidasa es usada en microbiología para determinar si una bacteria produce alguna de las citocromo C oxidases; en el caso de los géneros *Pectobacterium* y *Dickeya* (Erwinias) todas las especies son oxidases negativas, debido a que los individuos anaerobios carecen

de la actividad oxidasa, no pueden vivir en presencia de oxígeno atmosférico y no poseen sistema de citocromo oxidasa.

#### 4.2.5 Resultados de la prueba Catalasa

Al reaccionar la bacteria con una gota de  $H_2O_2$  sobre el portaobjetos, se observó la liberación de burbujas, lo que indicó que la prueba es positiva para la enzima catalasa; descomponiendo el peróxido de hidrógeno, dando lugar a la formación de oxígeno molecular. En este contexto, Aguilar *et al.* (2021) reporta que la prueba de la catalasa para el género *Pectobacterium* se obtiene una reacción positiva, en sus resultados obtuvo que en aislamientos estudiados sobre *Pectobacterium* todos los aislados bacterianos tuvieron una reacción positiva a la prueba de la catalasa, produciendo una reacción efervescente al agregar alícuotas de peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ).

#### 4.2.6 Resultados de la prueba de Tolerancia de NaCl al 5%

Los aislamientos de *Pectobacterium* crecieron en el medio con 5% de NaCl, por lo que el resultado es positivo ya que se observaba un color amarillo y turbidez en el medio. Requis, (2020), menciona que existen pruebas fenotípicas y culturales que sirven para diferenciar las subespecies del género *Pectobacterium*, estas pruebas pueden ser el crecimiento en 5% de Cloruro de Sodio (NaCl), donde realizó ocho aislamientos NaCl y como resultado fueron positivos.

#### 4.2.7 Resultados de la prueba de Fermentación/oxidación

Después de que los tubos inoculados con la bacteria se mantuvieron en observación durante 48 horas, se obtuvieron los siguientes resultados: en el tubo del testigo no se observó cambio de color, sin embargo, en los tubos con presencia y ausencia de oxígeno, se observó un viraje en el color tornándose de azul a amarillo debido a que la bacteria metabolizó la fuente de hidratos de carbono y en esta reacción se obtiene un metabolismo ácido que hace cambiar el pH de 7.1 a 7.2 indicando una reacción positiva para crecimiento anaeróbico facultativo. García-Estrada *et al.* (2000) realizaron un aislamiento de 2 cepas (A y B) y caracterizaron si pertenecía al género *Erwinia*, los resultados fueron diferentes en cada una, una de las pruebas fue la de Fermentación / oxidación donde los metabolismos fermentativos oxidativos se identificaron los tubos de color amarillo y el color azul correspondía a los testigos y como resultado en la cepa A el metabolismo de la

glucosa se caracterizó por ser oxidativo fermentativo. Las características señaladas permitieron ubicar a la bacteria dentro del género *Erwinia*.

#### 4.2.8 Resultados de la prueba producción de indol

Para la obtención de resultados en esta prueba se esperó 48 horas para la evaluación, obteniéndose que la reacción fue negativa al no originar anillos de color rojo o rojo-violeta. Por consiguiente, esto es un indicativo que la bacteria tiene la capacidad de desdoblar el indol de la molécula de triptófano. Apolinario, (2018) analizó los resultados obtenidos mediante pruebas bioquímicas, pudo encontrar que el aislado problema es indol positivo en el caso de *Dickeya*. Mientras que ninguna de las especies de *Pectobacterium* es positiva para esta prueba.

Tolga *et al.* (2019) realizó ciertas pruebas bioquímicas para *P. carotovorum subps. carotovorum*. Uno de los resultados mostró que *P. carotovorum subps. carotovorum* dio negativo para indol. La formación de un anillo rojo en la parte superior de los tubos indica una reacción positiva (formación de indol). La presencia de un anillo amarillento indica que no se produjo formación de indol (prueba de indol negativa). El color se debe a los pirroles presentes en el indol.

#### 4.2.9 Resultados de la prueba de producción de acetoin

Para esta prueba el tiempo de la reacción fue de 2 h después de agregar KOH al 40 %, arrojando un resultado negativo al no haber aparición de un color carmesí a rubí en la parte superior de la mezcla lo que indica que la glucosa es fermentada por la vía butanodiólica. Por lo tanto, Claus, (1989) reportó que si la prueba es positiva se desarrolla un color rojo (de cualquier intensidad) en el líquido. (Si el líquido no contiene suficiente oxígeno, el color rojo será más intenso en la superficie donde la concentración de oxígeno disuelto es más alta).

#### 4.2.10 Resultados de la prueba de hidrolisis de gelatina

Se obtuvieron a partir de las 24 h, observando una licuefacción de la gelatina indicando una reacción positiva debido a que *P. carotovorum* tiene la capacidad de producir enzimas proteolíticas que desdoblan la gelatina. Barrios, (2015) reportó que las bacterias con hidrolisis de gelatina positiva, tienen la capacidad de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) que licuan gelatina. Por otra parte, Victoria & Barros, (1969) realizaron un

experimento con *E. carotovorum* haciendo pruebas con hidrólisis de gelatina, donde presentaron un crecimiento filiforme, con una licuación a los 2-3 días.

#### 4.2.11 Resultados de la prueba producción de H<sub>2</sub>S

Después de 14 días de incubación de los cultivos bacterianos, al observarse un cambio de color en los tubos inoculados con el patógeno se declaró positiva esta reacción. Las tiras de papel filtro dentro de los tubos y en contacto con el medio tornaron de blanco a negro, debido a que la bacteria en estudio produce enzimas que solubilizan aminoácidos que contienen azufre (cisteína en el medio) y obteniendo como producto de la reacción el ácido sulfhídrico, este ácido reacciona con metales como es el acetato de plomo dando una coloración oscura al medio de cultivo lo cual se observó en este ensayo. Al respecto, Villa, (2006), menciona que las bacterias sulfatorreductoras (BSR) son anaerobias estrictas, que tienen la habilidad de usar el sulfato como aceptor final de electrones para la oxidación de hidrógeno y de varios compuestos orgánicos. Dentro de las BSR se encuentra las bacterias sulfatorreductoras que son capaces de oxidar completamente los sustratos orgánicos incluyendo el acetato produciendo C<sub>2</sub>O: y H<sub>2</sub>S como productos finales También puede ocurrir la oxidación de acetato por bacterias sulfatorreductoras utilizadoras de acetato y oxidación de hidrógeno molecular por BSR hidrogenotróficas.

#### 4.2.12 Resultados de la prueba de producción de ácido a partir de carbohidratos:

Después de 7 días de incubación, se observó un color amarillo a lila en los carbohidratos de Maltosa, Sorbitol y Lactosa. La bacteria se reprodujo en el medio y metabolizó el carbohidrato, esto generó un cambio en el pH y el medio se acidificó, debido al pH del purpura de bromocresol. Luna-Rodríguez *et al.* (2009) realizó una investigación de Enterobacterias fenotípicamente afines a *P. chrysanthemi* y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* causantes asociados de pudriciones blandas en *Cucurbita pepo* donde evaluó pruebas bioquímicas entre aislamientos afines de *Pectobacterium*, uno de ellos fue la producción de ácido a partir de lactosa, que contribuyó a la clasificación de la variación en los aislamientos.



#### 4.2.13 Resultados de la prueba de producción de ureasa

Después de 5 días de incubación de las siembras bacterianas, se pudo observar un cambio en la coloración del medio tornándose de rojo cereza a magenta, obteniéndose una reacción positiva lo que indica actividad de la enzima ureasa; las cepas de *Pectobacterium* producen ureasa, lo cual se manifiesta por la alcalinización del medio al hidrolizarse la urea. Barrio, (2015) reportó que las bacterias tienen la capacidad de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción del enzima ureasa. El nitrógeno es disociado como amoníaco. La ureasa actúa a nivel de los puentes C-N teniendo una reacción negativa.

#### 4.2.14 Inhibición in vitro del extracto acuoso de *Hamelia patens* contra *Pectobacterium carotovorum*

De acuerdo al análisis de varianza del porcentaje de inhibición del extracto acuoso de *Hamelia patens* en el control *in vitro* de *P. carotovorum* se detectó alta diferencia significativa ( $P < 0.0001$ ) (Cuadro 8. De Anexos).

En la Figura 2, se aprecia que el crecimiento del patógeno se inhibió alrededor del 50% a partir de 2.5 ppm y hasta las 25 ppm, sin embargo, a partir de 50 ppm hasta 5000 ppm en comparación con el testigo se obtuvo crecimiento nulo al inhibirse por completo la bacteria. Se obtuvo la  $CI_{50}$  y la  $CI_{90}$  del extracto, siendo 2.51 ppm y 883 ppm, respectivamente. (Fontanills *et al.*, 2018) mencionaron que los extractos de *H. patens* contienen diferentes compuestos bioactivos como terpenos, flavonoides, taninos, esteroides, cumarinas y polifenoles, los cuales poseen diferentes actividades biológicas lo que hace que el extracto etanólico de sus hojas tenga actividad microbiana sobre *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

Por otra parte, Flores-Bernardo, (2023) reportó que la inhibición del hongo *Lasiodiplodia theobromae* a las diferentes dosis del extracto acuoso de *H. patens* tuvo una significancia de  $p = 0.001$ , donde los tratamientos de 10, 8 y 6 litros tuvieron un efecto fungistático de 17 a 22% de control.

Sin embargo, Gómez, (2023) evaluó el efecto antifúngico del extracto acuoso de *H. patens* sobre el crecimiento de *R. solani* a diferentes concentraciones de 11 428.57, 14 285.71, 21 428.57, 35 714.28 ppm, 50 000 ppm y 71 428.57 ppm donde se observaron resultados del 46% de inhibición contra el hongo en las dos primeras concentraciones,

seguido de 73.9, 74.7%, 90.6% y una inhibición total contra *R. solani* para la concentración más alta, respectivamente.

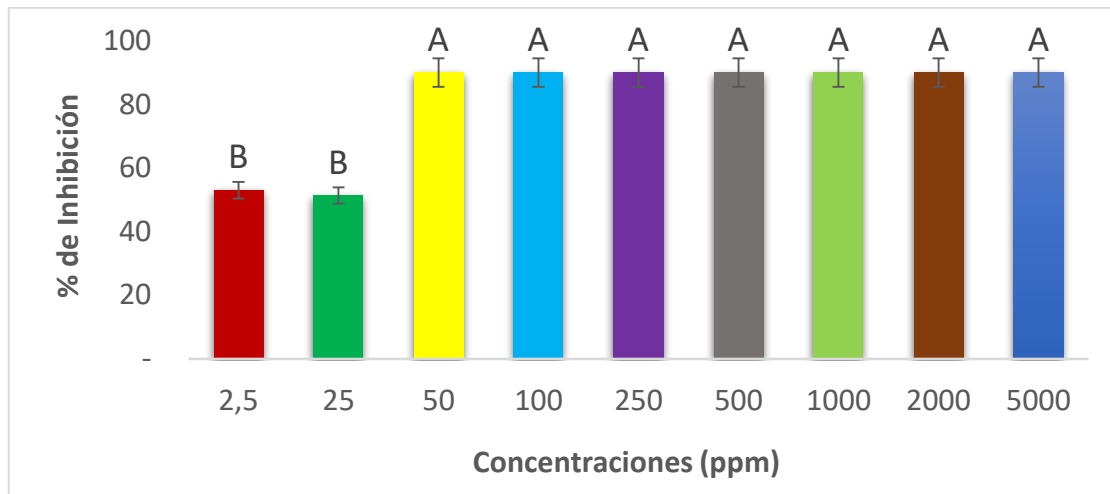


Figura 2. Porcentaje de inhibición *in vitro* del extracto acuoso de *H. patens* contra *P. carotovorum*.

#### 4.3 Inhibición *in vitro* del extracto metanólico de *Hamelia patens* contra *Pectobacterium carotovorum*

Por otro lado, el porcentaje de inhibición del extracto metanólico de *H. patens* en el control *in vitro* de *P. carotovorum* conforme al análisis de varianza se determinó una alta diferencia significativa ( $P < 0.0001$ ) (Cuadro 9. De Anexos). Todas las concentraciones evaluadas inhibieron el crecimiento de *P. carotovorum* en diferentes niveles de control, en la Figura 3, se puede apreciar que las concentraciones a partir de 50ppm y hasta las 5000 ppm no presentaron crecimiento, sin embargo, las concentraciones de 2.5 ppm y 25 ppm fueron muy cercanas al testigo. Al respecto, Velasco-López, (2023) reportó el efecto antifúngico de *H. patens* contra *Botrytis cinerea*, donde el extracto metanólico alcanzó una inhibición del 100% a partir de 50,000 ppm y mostró un menor porcentaje de inhibición en 11,428.57 ppm donde se obtuvo un 39.16%.

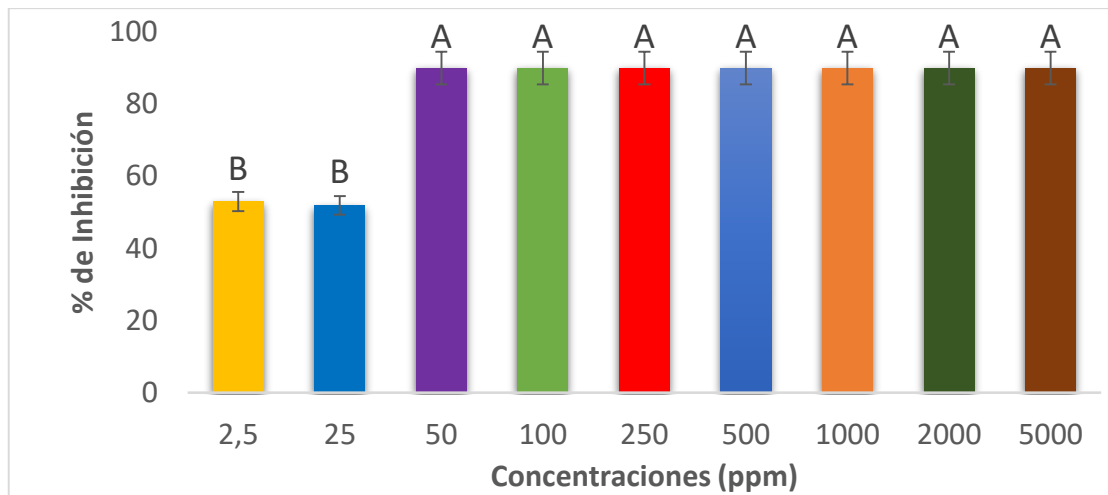


Figura 3. Porcentaje de inhibición *in vitro* del extracto metanólico de *H. patens* contra *P. carotovorum*.

Por otro lado, Calderón, (2023) evaluó el crecimiento micelial *in vitro* de *Alternaria alternata* en presencia de los extractos concentrados de *H. patens* a una dosis de 2 L/ha en el cual se obtuvo un comportamiento en la promoción del crecimiento micelial resultando superior al crecimiento del testigo, resultados diferentes a los encontrados en esta investigación.

Por otra parte, Gómez, (2023) evaluó el control con extractos de *H. patens* contra el hongo *Rhizoctonia solani* en donde se obtuvo diferencia en el crecimiento micelial a las diferentes concentraciones. Comparando todos los tratamientos con el testigo, el efecto del extracto metanólico tuvo un porcentaje de inhibición favorable en el control del hongo.

#### **4.4 Comparación de la eficiencia de extracto acuoso y metanólico de *Hamelia patens* contra *Pectobacterium carotovorum***

De acuerdo al porcentaje de inhibición, ambos tratamientos se determinaron eficientes y similares por lo que *Hamelia patens* en ambos solventes puede ser capaz de extraer compuestos bioactivos, como flavoides, alcaloides, terpenoides o fenoles. En la Figura 2 y 3 se reporta que el porcentaje de inhibición *in vitro* de ambos extractos se comportaron algo similares, donde las concentraciones 2.5 ppm y 25 ppm hubo un crecimiento de 50% aproximadamente del patógeno, sin embargo, podemos constatar que hubo el 100% inhibición en concentraciones desde 50 ppm hasta 5000 ppm.

#### **4.5 Efecto inhibitorio del extracto acuoso y metanólico de *Argemone mexicana* contra *Pectobacterium carotovorum***

En la Figura 4 y 5, se aprecian el crecimiento del patógeno a partir de las 48 horas de en presencia del extracto acuoso crudo y metanólico de *Argemone mexicana*. Se puede observar que el máximo crecimiento del patógeno sucedió a partir de 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 125 ppm, 1000 ppm, 5000 ppm, 10000 ppm, 20000 ppm y 30000 ppm, todas las concentraciones en comparación con el testigo presentan un similar crecimiento. Como resultado los valores de las concentraciones efectivas en el extracto a base de agua y metanol sobre el crecimiento de *P. carotovorum* no se logró observar la inhibición esperada, por lo que estos tratamientos se descartaron para ser evaluados en tubérculos de papa. Al respecto, Enyiukwu & Awurum, (2013) mencionan que los metabolitos secundarios constituyen el armamento de las plantas contra plagas y patógenos, estos complejos se pueden encontrar en extractos acuosos. Por otro lado, al someter los extractos a ciertas temperaturas puede afectar propiedades importantes de los metabolitos, los cuales pueden degradarse y perder un efecto inhibitorio sobre el crecimiento en patógenos.

Hernández-Soto *et al.* (2022) reportaron que el extracto acuoso de *Argemone mexicana* a 2000 ppm, inhiben al 27% el crecimiento *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*.

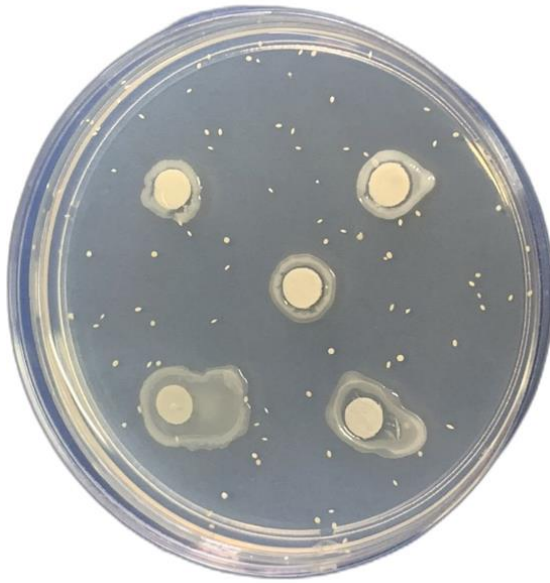


Figura 4. Crecimiento del patógeno sobre el extracto acuoso de *Argemone mexicana* (30000 ppm).

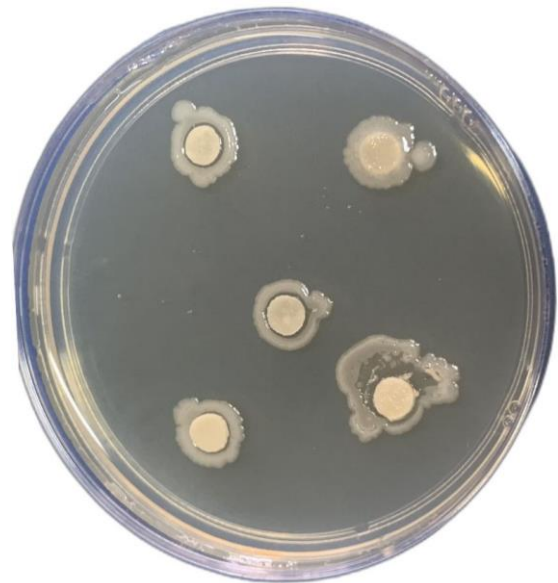


Figura 5. Crecimiento del patógeno sobre el extracto metanólico de *Argemone mexicana* (30000 ppm).

#### 4.6 Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus amyloliquefaciens* sobre *P. carotovorum*

##### 4.6.1 *Trichoderma harzianum*

El resultado de las pruebas duales, se observó que *Trichoderma harzianum* mostró una inhibición completa sobre el crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* en el medio PDA, con una zona de inhibición de aproximadamente 61.80 mm sobre las colonias de *P. carotovorum*. No se observó ningún crecimiento de la bacteria cerca del hongo y como resultado se creó una fuerte interacción antagonista de *T. harzianum* creciendo totalmente sobre la bacteria fitopatógena.

Con relación a los resultados reportados por Umaña-Castro, (2019) determinó que *Trichoderma* es un agente de biocontrol sobre cepas de *P. carotovorum* en piña donde el experimento *in vitro* mostró que *Trichoderma* spp tuvieron un efecto antagónico sobre *P. carotovorum*. En comparación con un testigo, los aislamientos que ejercieron una mayor actividad antagónica fueron *T. spirale*, *T. asperellum*, *T. koningiopsis* y *T. reesei*. Todas las cepas mostraron ser promisorias impidiendo el desarrollo por completo del patógeno.

Abd-El-Khair *et al.* (2021) mostraron que los filtrados culturales de *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *P. fluorescens*, *T. harzianum*, *T. viride* y *T. virens* reducen la incidencia de la enfermedad de podredumbre blanda en rodajas de papa cuando se inocularon con cepas patógenas, a saber, *Pcc 3*, *Pcc 4* y *Pcc 5*, al mismo tiempo de la inoculación y 2 h antes o después de la inoculación. Los resultados revelaron que *T. harzianum* cuando se aplicó 2 h antes de la inoculación del patógeno, no se registró pudrición blanda con las cepas *Pcc 4* y *Pcc 5* en rodajas de papa inoculadas, mientras que *Pcc 3* pudo producir síntomas de pudrición altamente activos

#### 4.6.2 *Bacillus amyloliquefaciens*

En la prueba dual realizada con *Bacillus amyloliquefaciens* se obtuvo una inhibición eficiente sobre el crecimiento de *Pectobacterium carotovorum*, evidenciada por una zona de inhibición de 64.42 mm alrededor de las colonias de *Bacillus*. No se observaron cambios significativos en el área de colonización de *Pectobacterium*.

Al respecto Villareal-Delgado, (2017) menciona que estudios moleculares han revelado que un porcentaje significativo del genoma de cepas del género *Bacillus* está relacionado con la producción de metabolitos secundarios asociados al control de fitopatógenos, una de las principales es el 8.5 % del genoma de las cepas *B. amyloliquefaciens*. Esto justifica el amplio uso de cepas de este género bacteriano como ACB para el control de enfermedades que afectan los cultivos agrícolas.

### **4.7 Control de la pudrición blanda de la papa con extractos vegetales y microorganismos antagonistas.**

#### 4.7.1 Efecto de control de los extractos y antagonistas sobre la incidencia y severidad de la enfermedad.

En los distintos tratamientos se observó una marcada diferencia significativa ( $P=0.02$ ) en la incidencia y severidad de la pudrición blanda en comparación con el testigo. Respecto a la severidad observada en los tratamientos, los tubérculos inoculados con *P. carotovorum* sin ningún tratamiento se ubicaron en la clase (5) de la escala de Montanelli *et al.* (1995) modificada por Fonseca (2014) con una pudrición blanda y un 100% de incidencia, siendo este el más alto de todos. Por otro lado, los tubérculos inoculados con

el fitopatógeno y tratados con *B. amyloliquefaciens* y *T. harzianum* mostraron una pudrición ligeramente blanda y un 40% de incidencia, ubicados en el número (3) de esta misma escala. Sin embargo, los extractos acuosos y metanólicos de *H. patens*, así como la combinación de *B. amyloliquefaciens* + *T. harzianum* demostraron control significativo del patógeno, presentando una baja severidad, teniendo semejanza en la ubicación de la escala número (1) mostrando un aspecto duro al tacto.

Al respecto Hernández *et al.* (2019) realizaron diferentes tratamientos para el control de la pudrición blanda, los tratamientos fueron ejercidos por productos provenientes de plantas, por ejemplo, extractos de *Ricinus communis*, aceite de *Malaleuca alternifolia*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*, teniendo un efecto reductor de la incidencia de la pudrición blanda en un 57.14% y una eficiencia de control de 62.5%.

Cuadro 6. Incidencia y severidad de *P. carotovorum* en tubérculos de papa variedad Orquesta.

Tratamiento	Incidencia de la enfermedad (%)	Severidad de la enfermedad <sup>1</sup>
Test	0.0	
HP- H <sub>2</sub> O	20	1
HP-MetOH	20	1
Ba	40	3
Ba+Th	20	1
Th	40	3
FP	100	5

<sup>1</sup>Resultados obtenidos de la severidad de la enfermedad, ubicados en la escala de Montanelli *et al.* (1995) modificada por Fonseca (2014).

En la Figura 6, se reportan los resultados del grado de daño de *Pectobacterium carotovorum* sobre tubérculos de papa. El análisis detectó diferencia significativa y la prueba de hipótesis manifiesta que al menos 2 tratamientos son diferentes respecto al resto, lo que la prueba de Kruskal Wallis determina que  $Pr > \chi^2 0.0034$ . Se puede observar que tanto los extractos vegetales, así como los microorganismos antagonistas controlaron significativamente a *P. carotovorum*. Se puede presumir que estos tratamientos podrían ser evaluados en condiciones de invernadero y obtener resultados favorables de control.

Al respecto Hernández *et al.* (2019) realizaron un experimento *in vitro* e *in vivo*, de alternativas de control sobre *P. carotovorum* uno de los patógenos involucrados en la pudrición blanda de la papa en Venezuela, donde analizó la varianza mediante la prueba de Kruskal-Wallis, para los halos de inhibición *in vitro* producidos por productos comerciales, para los halos de inhibición producidos por bacterias antagonistas, extractos vegetales y efectos de tratamientos sobre la pudrición blanda por *Pectobacterium carotovorum*.

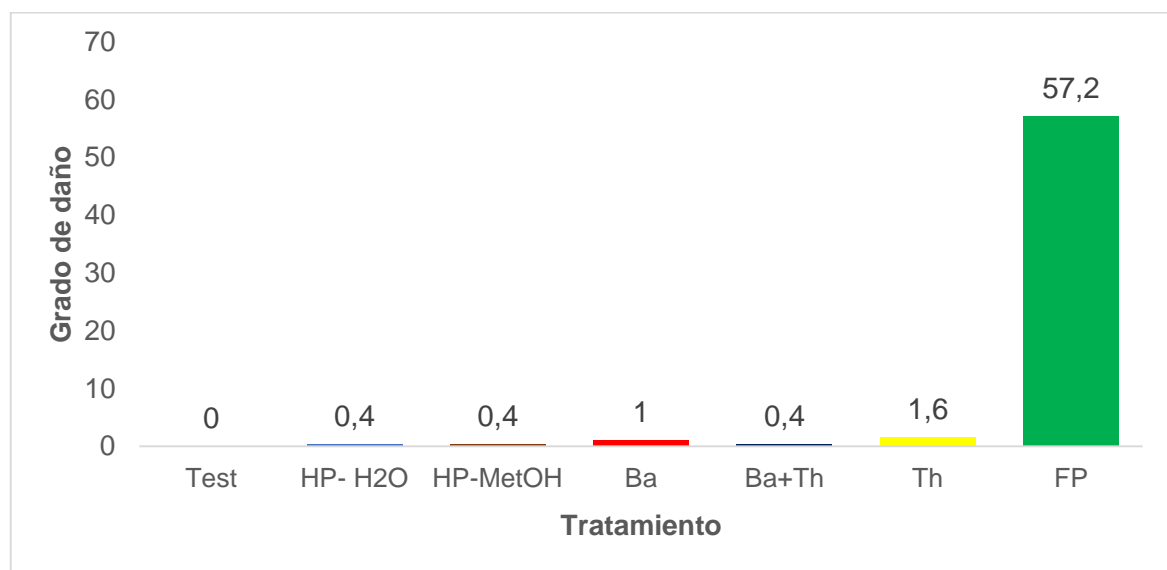


Figura 6. Severidad de la pudrición blanda en tubérculos de papa.

En el Cuadro 7, se puede observar que tanto los microorganismos antagonistas, así como los extractos vegetales ejercieron arriba de 95% de control sobre la pudrición blanda de la papa en condiciones controladas. Sin embargo, se sugiere hacer más evaluaciones en diferentes ambientes para poder determinar el potencial de estos tratamientos. Al respecto Steglinska (2022), evaluaron la actividad antimicrobiana de 22 extractos de plantas a base de agua, 22 extractos de agua-glicol y 3 extractos de dióxido de carbono utilizando el método de difusión en agar contra 10 fitopatógenos de la papa, incluyendo entre ellos a *P. carotovorum*. Se seleccionó el extracto acuso de ajo como el más eficaz en la inhibición del crecimiento de fitopatógenos, tanto *in vitro* como *in situ*, con valores de la concentración mínima inhibitoria que oscilaron entre 6.3 y 25 mg/mL. Se determinó que el 5-hidroxiacetilfurfural era el componente principal de este extracto (33.24).



Cuadro 7. Eficiencia técnica de tratamientos en el control de *Pectobacterium carotovorum* ajustado de acuerdo a (Abbott, 1925).

Tratamiento	(%) de efectividad
HP- H <sub>2</sub> O	99
HP-MetOH	99
Ba	98
Ba+Th	99
Th	97

Por su parte, Hernández-Lauzardo *et al.* (2007), reportaron que el uso de microorganismos antagonistas para controlar las enfermedades en postcosecha planteando dos enfoques importantes, que consisten en la estimulación y el manejo de los antagonistas presentes sobre la superficie del fruto, y en la introducción artificial de antagonistas contra los patógenos.

En otro contexto, Baños *et al.* (2004), realizaron estudios en frutos de papaya almacenados a 25 °C, evidenciando que los extractos de ajo y de eucalipto redujeron la severidad de la antracnosis en 45 y 41.7 %, respectivamente.

## 5. CONCLUSIONES

Bajo condiciones *in vitro*, el extracto acuoso y metanólico de *Hamelia patens* presentó un efecto inhibitorio significativo al inhibir el crecimiento de *Pectobacterium catorovorum* subsp *carotovorum*.

Las cepas de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus amyloliquefaciens* mostraron un efecto significativo inhibiendo el crecimiento de *P. carotovorum* en laboratorio.

Los extractos vegetales acuosos y metanólicos de *H. patens*, así como *Trichoderma harzianum* y *Bacillus amyloliquefaciens* redujeron la incidencia y la severidad de la pudrición blanda de la papa en tubérculos.

## 6. LITERATURA CITADA

- Abd-El-Khair, H., Abdel-Gaied, TG., Mikhail, MS., Abdel-Alim AI., & El – Nasr, HI. S. (2021). Control biológico de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, agente causal de la podredumbre blanda bacteriana en hortalizas, pruebas *in vitro* e *in vivo*. Bull Natl Res Cent 45, 37 p.
- Abbott, WS. (1925). A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. Journal of Economic Entomology, 18(2): 265–267 p.
- Acuña, I., Sandoval, C., & Sepúlveda, C. (2021). Enfermedades de la papa: Plataforma de evaluación de riesgo sanitario. INIA, Chile. <http://enfermedadespapa.inia.cl>.
- Acuña, B. I., & Cádiz, M. F. (2011). Principales enfermedades de la papa en el almacenamiento y su manejo. Informativo Instituto de Investigaciones Agropecuarias, 4. Obtenido de <https://tizon.inia.cl/assets/boletines/83-principales%20enfermedades%20de%20la%20papa%20en%20el%20almacenamiento%20y%20su%20manejo.pdf>
- Agrios, G. N. (1991). Fitopatología. 2ª Ed. Limusa, S.A. de C.V., México, D.F. 579 p.
- Aguilar-Ancota, R., Ruiz, W. R., Morales-Pizarro, A., Rafael-Rutte, R., Tirado-Lara, J., Saucedo Bazalar, M., Tuesta-Albán, C., Apaza-Apaza, S., & Teodor, K.T. (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 p.
- 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).
- Apolinario, G. (2018). Identificación bioquímica y molecular de bacterias patógenas aisladas de plantas de papa (*Solanum tuberosum*) cultivadas en Chirgua, Edo. Carabobo, Venezuela. (Tesis de Licenciatura en Biología). Universidad Central de Venezuela.

- Baños, P. E., E. Zavaleta, M. M., T. Colinas., I. Luna R., & J. A. Gutiérrez A. (2004) Control Biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz.) Penz. y Sacc.] en papaya maradol roja (*Carica papaya* L.) y fisiología postcosecha de frutos infectados. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22, 198-205 p.
- Barrios, D. A. (2015). Identificación de bacterias patógenas aisladas de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) con síntomas de pudrición blanda, colectadas en Sanare, Estado Lara. (Tesis de Licenciada en Biología, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias, Escuela de Biología). Recuperado de <http://saber.ucv.ve/bitstream/10872/13474/1/Tesis%20Raiza%20revisada>. 30 p.
- Caballero, M. (2022). Efecto antimicótico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Hamelia patens* Jacq. frente a la cepa de *Candida albicans*, (Tesis para optar el título profesional de químico farmacéutico). Repositorio de la Facultad de Ciencias de la Salud Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, obtenido de <https://repositorio.uma.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12970/784/TESIS>, 4 p.
- Castro, M. A. S., & Acero, G. J. (2021). Control alternativo de *Fusarium oxysporum* Schltdl y *Pectobacterium carotovorum* (Jones) Waldee *et al.*, mediante el uso de aceites esenciales como una alternativa biológica. *Revista Environment & Technology*, 2(1) 96-121 p. <https://doi.org/10.56205/ret.2-1.6>
- Celis, A., Mendoza, C., Pachon, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, E. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia *Piperaceae*. *Agronomía Colombiana*, 26(1) 97-106 p.
- Charkowski, A.O. (2018). La cara cambiante de las enfermedades bacterianas de pudrición blanda. *Revisión Anual de Fitopatología*, 56:269-88.
- Carbajal-Gutiérrez, Y. (2024). Contenido de flavonoides totales, hierro y calcio en hojas y flores de *Argemone mexicana* L. “cardo santo”, Ayacucho, (Para optar el título profesional de: Bióloga, Especialidad: Microbiología, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga). Recuperado de <https://repositorio.unsch.edu.pe/server/api/core/bitstreams/56e26446-d1bb-4ac4-8127-b9ad8470b356/content>. 18 p.

- Calderón, J. L. (2023). Bioprotección de *Solanum lycopersicum* L. contra *Alternaria alternata* (Fr). Keissl. asociado a tizón temprano en Invernadero. Tesis de Licenciatura, Universidad Agraria Antonio Narro, 30 p.
- Claus, G.W. (1989). Understanding microbes: A laboratory textbook for microbiology. United States of America: W.H. Freeman and Company.
- Díaz, M. H. (2016). Actividad antiinflamatoria y antioxidante del extracto hidroalcohólico del látex de *Argemone mexicana* (“Cardo santo”). (Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutica). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 12 p.
- Dirección General de Sanidad Vegetal - Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (DGSV-CNRF). (2013). Protocolo de Diagnóstico de *Ralstonia solanacearum* (Smith,1896) Yabuuchi *et al* 1995. Marchitez bacteriana de la papa. Estandarizado en proceso de revisión. SAGARPA -SENASICA, 11 p.
- Escalona, Y. ( 2019). Prevalencia de patógenos bacterianos en cultivos hortícolas a cielo abierto del municipio Jiménez, Estado Lara y evaluación de control alternativo mediante uso de extracto etanólico de *Lippia origanoides*. Revista de la Universidad del Zulia (26), 58-81 p.
- Enyiukwu, D.N., & Awurum, A.N. (2013). Principios fungitóxicos y actividad antifúngica de extractos de *Carica papaya* y *Piper guineense* sobre *Colletotrichum destructivum*. Journal of Biological Science, 7, 29-36 p.
- Fernandes, M. (2016). Identificación de aislados bacterianos patogénicos obtenidos de hojas de papa (*Solanum tuberosum* L.) colectadas en el valle del río Mucujún, Estado Mérida. (Tesis de Licenciatura en Biología). Universidad Central de Venezuela 5-10 p.
- Flores-Bernardo, IA. (2023). Biocontrol *in vitro* de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon e Maubl. (Botryosphaeriales: Botryosphaeriaceae) del mango *Mangifera indica* L (Sapindales: Anacardiaceae). Tesis de Licenciatura, Universidad Agraria Antonio Narro, 33 p.

- Fontanills, R. Y., Valdivia-Ávila, A.L., Camacho, C. C., Matos T. M., Sosa del Castillo, M., & Pérez, H. Y. (2018). Composición fitoquímica y actividad antibacteriana de extractos de hoja de *Hamelia patens* Jacq. *Biotecnología Vegetal*, 18(1), 37-45 p.
- Fonseca I. 2014. Identificación bioquímica y molecular de *Burkholderia gladioli* y análisis de su interacción con plantas de *Solanum tuberosum*. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- García-Ávila, C.J., Valenzuela-Tirado, GA., Anastasio, F., Ruiz-Galván, I., Moreno-Velázquez, M., Hernández-Macías, B., López-Buenfil, J.A., Bravo-Pérez, D., Pineda-Ríos, J.M., Quezada-Salinas, A., & Ávila-Quezada, G. (2018). Organisms associated with damage to post-harvest potato tubers. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2): 308-320 p.
- García-Estrada, R. S., Juárez, R. C., Carrillo, F. JA., Allende, M.R., Márquez, Z.I., Rangel, M., & Dolores, M. (2000). Marchitez bacteriana en Chile Bell causada por *Erwinia carotovora* subsp *carotovora*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18 (2) 120- 124 p.
- García, T. E., & González, P.S. (2019). Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades en cultivos de papas. 3ª ed. México: Cabildo Insular de Tenerife, 12 p.
- Gómez, H. F. (2023). Extractos Botánicos para el Control de la Costra Negra de la Papa *Rhizoctonia solani* en Papa *Solanum tuberosum* L. Tesis de Licenciatura, Universidad Agraria Antonio Narro, 36 p.
- Goszczyńska, T., Serfontein, J.J., & Serfontein, S. (2000). Introduction to practical phytobacteriology; a manual for phytobacteriology.
- Gutaker, R. W. A. (2019). Orígenes y adaptación de las patatas europeas reconstruidos a partir de genomas históricos. *Nature Ecology & Evolution*, 3, 1093-1101 p.
- Hauben, L., Moore, ER., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaertm, J., Verdonck, L., & Swings, J. (1998) Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Syst Appl Microbiol*, 21(3): 384-97 p.
- Hauben, L., & Swings, J. (2015). *Erwinia*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–19 p.

- Haro, L. F. (28 de abril de 2019). Importancia de la producción de Papa en México. *El Sol de Mexico*. Obtenido de <https://www.elsoldemexico.com.mx/analisis/importancia-de-la-produccion-de-papa-en-mexico-3433659.html>
- Hawkes, J. G. (1988). La evolución de las patatas cultivadas y sus parientes silvestres que producen tubérculos. *Die Evolution Kulturpflanze*, 36, 189-208 p.
- Hernández-Lauzardo, AN., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, MG & Hernández-Rodríguez, A. (2007). Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades, postcosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:74 p.
- Hernandez-Soto, I. Juárez, M. A., Campos M. R., Aguirre, Á. G., & Hernández F, AD.(2022). Metabolitos secundarios de Argemone mexicana para el control de hongos fitopatógenos. Publicación semestral, *Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP*, 8(15), 6-10 p.
- Hernández, Y., Mejías, R., Madriz P., Paiva, B., & Rodulfo, P. (2019). Alternativas de control de *P. carotovorum* Jones, causante de la pudrición blanda de la papa. *Revista Facultad de Agronomía*, 45: 20-31 p.
- Jiménez-Suárez, V., Reyes-Munguía, A., Pérez-Berúmen, C., & Alvarado-Sánchez, B. (2012). Separación cromatográfica del extracto de *Hamelia Patens*. *Revista Académica de Investigación* (11), 2-10 p.
- Jones, L. R. (1901). Podredumbre blanda de la zanahoria y otras verduras causada por *Bacillus carotovorus*. Informe de la estación experimental agrícola de Vermont., 13, 299 p.
- Luna-Rodríguez, M., Toledo-González, A., & Iglesias-Andreu, L.G. (2009). Identificación de enterobacterias causantes de pudriciones blandas en *Cucurbita pepo* L. en Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27:64-68 p.
- Martínez, C. A., & Ojeda, N. F. (2023). Morfología de la planta de papa (*Solanum tuberosum* L.). Punta Arenas, Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Ficha Técnica INIA Kampenaike. N° 215.
- Martínez Cano de Haase. (2016). Obtención y caracterización de extracto etanólico de *Hamelia patens* Jacq. para aplicación tópica. (Maestría multidisciplinaria en

- producción y uso de plantas medicinales). Repositorio de Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, 10 p.
- Matas-Baca, M. A., Flores-Córdova, M. A., Pérez-Álvarez, S., Rodríguez-Roque, M. J., Salas-Salazar, N. A., Soto-Caballero, M. C., & Sánchez-Chávez, E. (2023). *Trichoderma* fungi as an agricultural biological control in Mexico. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 29(3), 79-114 p.
- Méndez, G. M., & Castellanos, S. JA. (2018). Costos de producción y rentabilidad del cultivo de la papa en Zacapoaxtla, Puebla. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(8). 1652 p.
- Mesa-Venegas, A.M., Marín A., & Calle-Osorno. (2019). Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Revista Actualidades Biológicas*, 41(111): 32-44 p.
- Montanelli C., Chiari, A., Stefanini, F., Nascari, G. 1995. Evaluation of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato under controlled conditions. *Euhytica*, 81: 35-43 p.
- Pasanen, M. (2020). Caracterización de *Pectobacterium* tensiones que causan blandura podredumbre y pata negra de la papa en Finlandia. (Tesis académica de la Facultad de Agronomía y Silvicultura) Universidad de Helsinki, 8-10 p.
- Pérombelon M., & Kelman A. (1987). Blackleg and other potato diseases caused by soft rot Erwinias: Proposal for revision of terminology. *Plant Disease*, 71(3) 293-294 p.
- Pineda, C. R., & Hernández, C. E. (1996). Genética y mejoramiento de la papa. *Comunicaciones y Asociados Ltda*, págs. 57-69. Obtenido de <https://www.sidalc.net/search/Record/dig-bac-20.500.12324>
- Portela-Dussán, D. D., Chaparro-Giraldo, A., & López-Pazos, S. A. (2013). *Bacillus thuringiensis*: en el manejo del agente de la pudrición blanda de la papa *Erwinia carotovora*. *Nova*, 11(20), 39-44 p.
- Reinoso, P. Y., Romero, C. L., García, S. A., Gutiérrez, P. J., & Álvarez-Rivera, V.P. (2006). Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus*



- antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, 10 (3), 187-191 p.
- Requis Q. AJ. (2020). Identificación y control del agente causal de la pudrición húmeda en Alcachofa (*Cynara scolymus* L.) en Chíncha Baja. (Tesis grado de Maestro Magister Scientiae en Fitopatología), Universidad Nacional Agraria la Molina, 7-14 p.
- Rico-Jiménez, M., Muñoz-Mira, S., Krell, T., & Matilla, M.A. (2021). Relevancia de la quimiotaxis bacteriana para la colonización e infección de plantas. Alianzas y Tendencias BUAP, 6 (24):143-172 p.
- Rodríguez, N.M.C. (2022). Actividad Inhibitoria *in vitro* de extractos de *Hamelia patens* Jacq (*Rubiaceae*) sobre *Rhizoctonia solani* Kühn (Ceratobasidiaceae). Tesis de Licenciatura, Universidad Agraria Antonio Narro, 29 p.
- Ruiz, B. MA. (2019). Caracterización fotoquímica y efecto antibacteriano *in vitro* de *Argemone mexicana* L. contra bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. Tesis de doctorado en Ciencias Biomédicas. Universidad Nacional de Trujillo Escuela de Posgrado Unidad de Posgrado en Ciencias Médicas, 34 p.
- Torres-Bojórquez, A.I., Cervantes-Díaz, L., Núñez-Ramírez, f., Morales-Maza, A., & Samaniego-Gámez, B. Y. (2016). Primer reporte de *Pectobacterium* spp. asociada a *Opuntia ficus* en Baja California, México. IDESIA (Chile), 34 (4),69- 71.
- Tolga, K. C., Kiliç, S. M., Uçar, S., Canca, E., & Dikbaş, N. (2019). Isolation of *Pectobacterium carotovorum*, identification with 16s rRNA, phytase activity and characterization of the bacteria. Obtenido de <https://doi.org/10.21203/rs.2.18716/v1>.
- Steglińska, A., Bekhter, A., Wawrzyniak, P., Kunicka-Styczyńska, A., Jastrzabek, K., Fidler, M., Śmigielski, K., & Gutarowska, B. (2000). Actividades antimicrobianas de extractos de plantas contra *Solanum tuberosum* L. Fitopatógenos-Moléculas ,27, 2-20 p. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/moléculas27051579>.
- Schaad, N.W., Jones, J.B., & Chun, W. (2001). Plant pathogenic bacteria. 3ª Ed. APS PRESS.

- SIAP (Servicio de información Agrícola y Pesquera). (2019). La papa, el cuarto cultivo de mayor producción en el mundo. Obtenido de <https://www.gob.mx/siap/articulos/la-papa-el-cuarto-cultivo-de-mayor-produccion-en-el-mundo>.
- Umaña-Castro, J., Orozco-Cayasso, S., Umaña-Castro, R., & Molina-Bravo, R. (2019). Identificación molecular y características fisiológicas de aislamientos de *Trichoderma* para el biocontrol de dos patógenos en la piña. *Revista de Ciencias Ambientales*, 53(1) 125-142 p.
- Van, G. F., Van der Wolf, J. M., & Toth, I. K. (Eds.). (2021). Plant diseases caused by *Dickeya* and *Pectobacterium* species. [http doi:10.1007/978-3-030-61459-1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-61459-1)
- Villarreal-Delgado MF., Villa-Rodríguez ED., Cira-Chávez, LA., Estrada-Alvarado MI., Parra-Cota FI., & De los Santos-Villalobos S. (2017). The genus *Bacillus* as biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 95-130 p.
- Velasco-López L. A. (2023). Alternativas biológicas para el control *in vitro* del moho gris *Botrytis cinerea* de la fresa *Fragaria x ananassa* Dutch. Tesis de Licenciatura, Universidad Agraria Antonio Narro, 36 p.
- Victoria, J. I. & Barros, O. (1969). Etiología de una nueva enfermedad del plátano (*Musa paradisiaca* L.) Y prueba de susceptibilidad de variedades del género *Musa*. *Acta Agronómica*, 19 (2), 89–104 p.
- Villa G, D.K. (2006). Arranque de un reactor de lecho fluidificado inverso (LFI) para producción biológica de H<sub>2</sub>S. Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, 7 p.
- Villanueva R. O. (2017). Manual del cultivo de papa para pequeños productores en la sierra norte del Perú. 1ª ed. Perú. Asociación Pataz, 7-8 p.

## 7. ANEXOS

Cuadro 8. Varianza del extracto acuoso de *Hamelia patens* contra el crecimiento de *Pectobacterium carotovorum*. subsp. *carotovorum*

Fuente	DF	suma de cuadros	cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	8	8913.383189	114.172899	316.08	<.0001
Tratamiento	8	8913.383189	114.172899	316.08	
Error	27	95.174775	3.524992		
Total correcto	35	9008.557964			

R-cuadrado: 0.989435

Coefficiente de Variación: 2.301080

Media: 81.59194

Cuadro 9. Varianza del extracto metanólico de *Hamelia patens* contra el crecimiento de *Pectobacterium carotovorum*. subsp. *carotovorum*

Fuente	DF	suma de cuadros	cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	8	8775.065300	1096.883163	256.83	<.0001
Tratamiento	8	8775.065300	1096.883163		
Error	27	115.314775	4.270918		
Total correcto	35	8890.380075			

R-cuadrado: 0.987029

Coefficiente de Variación: 2.530891

Media: 81.65583

Cuadro 10. Varianza de la incidencia de los tratamientos contra la pudrición blanda de la papa.

Fuente	DF	suma de cuadros	cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	6	30857.14286	5142.85714	3.00	0.0216
Tratamiento	6	30857.14286	5142.85714	3.00	
Error	28	48000.00000	1714.28571		
Total correcto	34	78857.14286			

R-cuadrado: 0.391304

Coefficiente de Variación: 120.7615

Media: 34.28571

Cuadro 11. Análisis probit del extracto acuoso de *Hamelia patens* contra el crecimiento de *Pectobacterium carotovorum*. subsp. *carotovorum*

Parámetro	DF	Estimación	Error estándar	95% Limite de confianza		Chi-cuadrado	Pr>ChiSq
Intercepto	1	-0.0560	0.2954	-0.6349	0.5229	0.44	0.8497
Dosis logarítmica	1	0.4540	0.1316	0.1960	0.7120	11.90	0.0006

Cuadro 12. Historia de interacción para el estimador del parámetro extracto acuoso de *Hamelia patens* contra el crecimiento de *Pectobacterium carotovorum*. subsp. *carotovorum*

Interacción	Contracción	Probabilidad log	Interceptación	Long 10 (dosis)
0	0	-623.83246	0	0
1	0	-397.86381	0.08777194	0.307739505
2	0	-388.89482	-0.039202071	0.439175516
3	0	-388.8199	-0.055799187	0.45384961
4	0	-388.81989	-0.055971192	0.454000618
5	0	-388.81989	-0.055971192	0.454000618

Cuadro 13. Análisis Probit del extracto metanólico de *Hamelia patens* contra el crecimiento de *Pectobacterium carotovorum*. subsp. *carotovorum*

Parámetro	DF	Estimación	Error estándar	95% Limite de confianza	Chi-cuadrado	Pr>ChiSq
Intercepto	1	-0.0504	0.2918	-0.6224 0.5216	0.03	0.8630
Dosis logarítmica	1	0.4525	0.1300	0.1976 0.7073	12.11	0.0005

Cuadro 14. Historia de interacción para el estimador del parámetro extracto metanólico de *Hamelia patens* contra el crecimiento de *Pectobacterium carotovorum*. subsp. *carotovorum*

Interacción	Contracción	Probabilidad log	Interceptación	Long 10 (dosis)
0	0	-623.83246	0	0
1	0	-397.32344	0.0927707903	0.3062655692
2	0	-388.33128	-0.033571405	0.4376119564
3	0	-388.25594	-0.050186995	0.4523205937
4	0	-388.25593	-0.050359909	0.4524725308
5	0	-388.25593	-0.050359909	0.4524725308

Cuadro 15. Prueba de Kruskal-Wallis para determinar la severidad de *Pectobacterium carotovorum*. subsp. *carotovorum*

Tratamiento	N	Suma de puntuaciones	Bajo Ho	Estándar bajo Ho	Puntuación media
Trat1	5	60.0	90.0	17.919639	12.00
Trat2	5	74.0	90.0	17.919639	14.80
Trat3	5	74.0	90.0	17.919639	14.80

Trat4	5	91.0	90.0	17.919639	18.20
Trat5	5	74.0	90.0	17.919639	14.80
Trat6	5	92.0	90.0	17.919639	18.40
Trat7	5	165.0	90.0	17.919639	33.00

---

Chi-cuadrado: 19.4804

DF:6

Pr > Chi-cuadrado: 0.0034