

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN FITOPATOLOGÍA**



**“IDENTIFICACIÓN Y CONTROL DEL AGENTE CAUSAL DE LA  
PUDRICIÓN HÚMEDA EN ALCACHOFA (*Cynara scolymus* L.) EN  
CHINCHA BAJA”.**

**Presentada por:**

**ANGELA JUANA REQUIS QUINTANILLA**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO  
MAGISTER SCIENTIAE EN FITOPATOLOGÍA**

**Lima - Perú**

**2020**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN FITOPATOLOGÍA**

**“IDENTIFICACIÓN Y CONTROL DEL AGENTE CAUSAL DE LA  
PUDRICIÓN HÚMEDA EN ALCACHOFA (*Cynara scolymus* L.) EN  
CHINCHA BAJA”.**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO  
MAGISTER SCIENTIAE EN FITOPATOLOGÍA**

**Presentada por:**

**ANGELA JUANA REQUIS QUINTANILLA**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

Dr. Jorge Escobedo Alvarez

**PRESIDENTE**

Dra. Leonor Mattos Calderón

**ASESOR**

Mg.Sc. Carlos Cadenas Giraldo

**MIEMBRO**

M.Sc. Andrés Casas Díaz

**MIEMBRO**

Dedico este trabajo a mis padres Irene Quintanilla y Florencio Requis, gracias por todo lo que me dieron. Lo que soy es gracias a ustedes, y porque siempre me alientan a ser mejor persona y mejor profesional.

A mi hermana Miriam Requis por acompañarme, ayudarme y ser mi fortaleza durante mis estudios de maestría.

A mi esposo Dan Mendoza quien me motivo a estudiar la maestría, porque siempre confía en mí y me brinda su apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Departamento de Fitopatología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), por facilitarme los equipos y ambientes para el desarrollo de la Investigación.

A la empresa Sylvestre S.A.C. y Neoagrum S.A.C., por apoyarme con el financiamiento del trabajo de Investigación.

A la empresa Agrícola Danper Perú, por permitirme realizar el trabajo de campo en sus instalaciones.

A la Dra. Leonor Mattos Calderón, por patrocinar esta investigación, por su tiempo y apoyo en el desarrollo del trabajo.

A los miembros del Jurado Mg. Sc. Carlos Cadenas Giraldo, M. Sc. Andrés Casas Díaz y Dr. Jorge Escobedo Alvarez. Por sus aportes para la mejora de esta investigación.

A mis amigos y compañeros de la maestría: Pamela, Iván, Anita, Mildreck, Juan José, Cledy, Heidi y María por su apoyo y consejos durante el desarrollo de ésta investigación.

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	9
ABSTRACT .....	10
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1 Alcachofa .....	3
2.2 Alcachofa en el Perú .....	3
2.4 Pudrición blanda en alcachofa .....	5
2.4.1 Síntoma.....	5
2.4.2 Epidemiología .....	5
2.4.3 Etiología .....	6
2.4.5 Parasitismo .....	6
2.5 Pectobacterium.....	7
2.6 <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i> .....	9
2.7 <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>odorifera</i> .....	10
2.8 <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>actinidiae</i> .....	12
2.9 Trichoderma.....	13
2.10 Productos a base de cobre .....	14
2.11 Productos a base de calcio .....	16
III. METODOLOGÍA.....	17
3.2 Ubicación.....	17
3.2.1 Identificación del síntoma y recolección de las muestras.....	17
3.2.2 Procesamiento de muestras, identificación fenotípica y molecular.....	17
3.2.3 Prueba de patogenicidad.....	17
3.2.4 Pruebas de control .....	17
3.3 Recolección de muestras.....	17
3.4 Procesamiento de muestras .....	18
3.5 Obtención de aislamientos puros .....	18
3.6 Prueba de patogenicidad .....	18
3.7 Identificación fenotípica .....	19
3.7.1 Crecimiento en medio Cristal Violeta Pectato (CVP).....	19
3.7.2 Tinción Gram.....	19
3.7.3 Degradación de láminas de papa .....	19
3.7.4 Prueba de catalasa.....	20
3.7.5 Prueba de oxidación y fermentación .....	20

3.7.6	Crecimiento a 27 y 37 °C .....	20
3.7.7	Crecimiento en 5% de cloruro de sodio (NaCl) .....	20
3.7.8	Sensibilidad a la erytromicina .....	21
3.7.9	Producción y reducción de sustancias a partir de sacarosa .....	21
3.8	Identificación molecular .....	21
3.8.1	Extracción de ADN .....	21
3.8.2	Calidad de ADN .....	21
3.8.3	PCR convencional para el primer general 16S .....	21
3.8.4	PCR convencional con el primer específico de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>atroseptica</i> .....	22
3.8.5	PCR convencional con el primer específico de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> .....	23
3.8.6	Secuenciamiento.....	24
3.8.7	Análisis filogenético.....	24
3.9	Control .....	25
3.9.1	Control <i>In vitro</i> .....	25
3.9.2	Control en Campo.....	26
3.10	Cosecha.....	27
IV.	RESULTADOS .....	28
4.2	Descripción de síntomas .....	28
4.2.1	Pudrición húmeda en el cuello.....	28
4.2.2	Pudrición húmeda en el cogollo .....	30
4.3	Obtención de aislamientos .....	31
4.4	Prueba de patogenicidad .....	31
4.5	Identificación fenotípica .....	33
4.5.1	Crecimiento en medio Cristal Violeta Pectato (CVP).....	33
4.5.2	Tinción Gram.....	34
4.5.3	Degradación de láminas de papa .....	34
4.5.4	Prueba de catalasa.....	35
4.5.5	Prueba de oxidación y fermentación .....	35
4.5.6	Crecimiento a 27 y 37 °C .....	36
4.5.7	Crecimiento en 5% de cloruro de sodio (NaCl) .....	36
4.5.8	Sensibilidad a la erytromicina .....	37
4.5.9	Producción y reducción de sustancias a partir de sacarosa .....	38
4.6	Identificación molecular .....	40
4.6.1	Extracción y calidad de ADN .....	40

4.6.2	PCR convencional para el primer general 16S .....	40
4.6.3	PCR convencional con los primers específicos de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>atroseptica</i> .....	41
4.6.4	PCR convencional con los primers específicos de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> .....	42
4.6.5	Secuenciamiento .....	43
4.6.6	Análisis filogenético .....	44
4.7	Prueba de control .....	45
4.7.1	Prueba de control <i>in vitro</i> .....	45
4.7.2	Prueba de control en campo.....	47
4.8	Cosecha.....	51
V.	CONCLUSIONES .....	58
VI.	RECOMENDACIONES .....	60
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61
VIII.	ANEXOS .....	70

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos y cantidades para PCR con el primer general 16S.....	22
Tabla 2. Programa para PCR con el primer general 16S.....	22
Tabla 3. Reactivos y cantidades para PCR con el primer específico para <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>atroseptica</i> .....	22
Tabla 4. Programa para PCR con el primer específico para <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>atroseptica</i> .....	23
Tabla 5. Reactivos y cantidades para PCR con el primer específico de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> .....	23
Tabla 6. Programa para PCR con el primer específico de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> .....	24
Tabla 7. Tratamientos para prueba de control <i>in vitro</i> .....	25
Tabla 8. Tratamientos para la prueba de control en campo.....	27
Tabla 9. Resultados de la prueba de patogenicidad en plantas de alcachofa, síntoma en el cogollo (CO) y en el cuello (CU). .....	32
Tabla 10. Resultados de las pruebas fenotípicas con los ocho aislamientos. ....	39
Tabla 11. Cuantificación de los productos de PCR.....	43
Tabla 12. Cobertura de las secuencias ( $QV \geq 20$ ) de los aislamientos.....	43
Tabla 13. Identificación de aislamientos .....	44
Tabla 14. Análisis de varianza para la prueba de medio envenenado .....	46
Tabla 15. Prueba de Tukey para la prueba de medio envenenado .....	46
Tabla 16. Análisis de Varianza para la prueba de control de la pudrición húmeda del cuello .....	47
Tabla 17. Comparación de Tukey para la prueba de control de la pudrición húmeda del cuello .....	48
Tabla 18. Análisis de varianza para la prueba de control de la pudrición húmeda del cogollo .....	49
Tabla 19. Comparación de Tukey para la prueba de control de la pudrición húmeda del cogollo .....	50
Tabla 20. Análisis de varianza del peso de capítulos por tratamiento.....	51
Tabla 21. Comparación de Tukey del peso de capítulos por tratamiento.....	52

Tabla 22. Rendimiento de alcachofa por tratamiento y por dosis de aplicación de <i>Trichoderma</i> (cepa T22).....	53
--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de alcachofa tumbada por la pudrición en el cuello.....	28
Figura 2. Pudrición blanda en las hojas basales y coloración negra de los peciolos.....	29
Figura 3. Planta de alcachofa cortada por la mitad, se evidencia la pudrición blanda a en el cuello. ....	29
Figura 4. Hojas tiernas con síntoma de pudrición húmeda.....	30
Figura 5. Pudricion húmeda en hojas no tan tiernas, descendiendo al cogollo de la planta. ....	30
Figura 6. Pudricion húmeda comprometiendo la formación del primer capítulo.....	31
Figura 7. Hojas tiernas con síntoma de necrosis acuosa en los bordes .....	32
Figura 8. Peciolos de hojas basales con síntoma de pudrición húmeda de color negro. ....	33
Figura 9. Corte a nivel de cuello con síntoma evidente de pudrición blanda.....	33
Figura 10. A y B placas con medio CVP donde se evidencia la formación de hoyos por el aislamiento CO1. ....	34
Figura 11. Tinción Gram-negativa del aislamiento CO1, cultivo de 24 horas (Aumento 100X).....	34
Figura 12. Lámina de papa inoculada con el aislamiento CO3, se muestra la pudrición blanda.....	35
Figura 13. A. Formación de burbujas respuesta positiva con el aislamiento CU1 B. Respuesta negativa con el aislamiento CO2.....	35
Figura 14. A. Respuesta positiva, cambio de color del medio con el aislamiento CO1.....	36
Figura 15. A. Crecimiento de colonias del aislamiento CU1 a 27 °C y B. No hubo crecimiento de colonias del aislamiento CU1 a 37 °C. ....	36
Figura 16. Tubos 1, 2 y 3 testigos, tubos 4, 5 y 6 medio con NaCl al 5% sembrado con aislamiento CU2 al séptimo día de incubación. ....	37
Figura 17. A. Formación de halo del aislamiento CO1. B. Crecimiento normal del aislamiento CU1. ....	37
Figura 18. A y B. Medio Sacarosa más reactivo Benedict´s con aislamiento CO1 y CU2 ambos con respuesta negativa.....	38
Figura 19. Calidad de ADN revelado mediante electroforesis. ....	40
Figura 20. Productos de PCR amplificados para el gen 16S rRNA .....	41

Figura 21. Evaluación de las muestras por PCR convencional con los primers ECA1F/ECA2R .....	41
Figura 22. Evaluación de las muestras por PCR convencional con los primers EXPCCF/EXPCCR .....	42
Figura 23. Árbol filogenético de las muestras aisladas. ....	45
Figura 24. Control <i>in vitro</i> del aislamiento CO1 .....	46
Figura 25. Prueba de enfrentamiento <i>Trichoderma</i> y aislamiento CO1 en medio PDA. ....	47
Figura 26. Número de plantas enfermas por tratamiento, prueba de control de la pudrición húmeda del cuello.....	49
Figura 27. Número de plantas enfermas por tratamiento, prueba de control de la pudrición húmeda del cogollo.....	51
Figura 28. Rendimiento de alcachofa por tratamiento hasta la octava cosecha .....	52
Figura 29. Peso de alcachofa por hectárea según la dosis de aplicación de <i>Trichoderma</i> . .	54

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Preparación de medio Cristal Violeta Pectato (CVP) .....	70
Anexo 2. Procedimiento de Tinción Gram .....	70
Anexo 3. Preparación de medio para la prueba de Oxidación y Fermentación.....	71
Anexo 4. Preparación de medio con 5% de NaCl .....	71
Anexo 5. Preparación de medio Sacarosa y reactivo Benedict's .....	72
Anexo 6. Extracción de ADN.....	73
Anexo 7. Calidad de ADN.....	74
Anexo 8. PCR convencional.....	76
Anexo 9. PCR convencional con primers específicos para <i>P. atrosepticum</i> .....	78
Anexo 10. PCR convencional con primers específicos para <i>P. carotovorum</i> .....	80
Anexo 11. Secuenciamiento de ADN.....	82
Anexo 12. Análisis filogenético .....	89

## RESUMEN

De la zona de Chíncha baja, se extrajeron muestras del cultivo de alcachofa, dos síntomas algo diferentes; en uno de ellos, se observaba pudrición húmeda a nivel del cuello, en la parte aérea había marchitez y tumbado de la planta, al realizar un corte en el cuello internamente había presencia de pudrición blanda de color verde claro a marrón oscuro; el otro síntoma, se caracterizaba por mostrar a nivel del cogollo una necrosis acuosa en el borde de las hojas tiernas y avanzaba de manera descendente hacia la parte central comprometiendo la formación del capítulo. Cinco aislamientos fueron positivos en la prueba de patogenicidad. Mediante pruebas fenotípicas como: tinción Gram, formación de cavidades en medio Cristal Violeta Pectato, catalasa, oxidación y fermentación y degradación de láminas de papa; se determinó que los aislamientos pertenecen a género *Pectobacterium*. Con las pruebas de sensibilidad a la erytromicina, crecimiento a 37°C, crecimiento en 5% de NaCl y degradación de sustancias a partir de sacarosa; se buscó determinar la subespecie de los aislamientos, sin embargo esto no se determinó, porque los resultados obtenidos no coincidieron con los resultados de otros autores. Para la prueba de identificación molecular se usó primers específicos para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y otro para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atroseptica*, al realizar la PCR con estos primers no hubo resultado, por lo que se usó un juego de primers general de la región 16S ARN, llegando a identificar a: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* (cuello y cogollo), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* (cogollo), y *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidae* (cuello). En la prueba de control *in vitro* los productos a base de cobre fueron los mejores, y en campo para la pudrición del cuello y cogollo los mejores resultados se obtuvieron con gluconato de cobre, proteinato de cobre, proteinato de calcio (solos o en combinación con el biocontrolador) y *Trichoderma* (cepa T22).

**Palabras Claves:** *Pectobacterium carotovorum*, *brasiliense*, *odoriferum*, *actinidae*. PCR, *Tichoderma*, cuello, cogollo.

## ABSTRACT

From the lower Chíncha area, samples of the artichoke culture were extracted, two somewhat different symptoms; in one of them, wet rot was observed at neck level, in the aerial part there was wilting and lying down of the plant, when making a cut in the neck internally there was presence of soft rot of light green to dark brown color; the other symptom was characterized by showing at the bud level an aqueous necrosis at the edge of the tender leaves and advanced downward towards the central part compromising the formation of the chapter. Five isolates were positive in the pathogenicity test. Through phenotypic tests such as Gram staining, hole formation in Crystal Violet Pectate medium, catalase, oxidation and fermentation and degradation of potato sheets, it was determined that the isolates belong to the *Pectobacterium* genus. With tests of sensitivity to erythromycin, growth at 37 ° C, growth in 5% NaCl and degradation of substances from sucrose; it was not possible to determine the subspecies of the isolates, because the results obtained did not coincide with the results of other authors. For the molecular identification test specific primers were used for *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and another for *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atroséptica*, when performing the PCR with these primers there was no result, so a set of general primers from the 16S RNA region was used, identifying: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* (neck and bud), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* (bud), and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidae* (neck). In the in vitro control test, copper-based products were the best, and in the field for neck and bud rot the best results were obtained with copper gluconate, copper proteinate, calcium proteinate (alone or in combination with the biocontroller) and *Trichoderma* (strain T22).

**Keywords:** *Pectobacterium carotovorum*, *brasiliense*, *odoriferum*, *actinidae*. PCR, *Tichoderma*, neck, bud.

## I. INTRODUCCIÓN

La alcachofa (*Cynara scolymus* L.) es originaria del área central y occidental del Mediterráneo y del Sur de Europa. Es considerada como uno de los productos hortícolas con mayor valor energético, rica en azúcares, proteínas, vitaminas A, B y C; con gran contenido de Calcio, Potasio y Hierro, también posee propiedades curativas (Jana *et al.* 2011; Catacora 2002; Serrano 2006). Los principales departamentos en el Perú en los que se siembra alcachofa son: Junín, La Libertad, Ica, Lima y Apurímac. Se cultiva principalmente para exportación, en conserva o fresco y una pequeña cantidad para consumo local. El mayor porcentaje de la producción se exporta a Estados Unidos y España que representan el 86.6%. En el primer semestre del 2016 las exportaciones de este cultivo sumaron 24.7 millones de dólares. (La República 2016; AGRODATAPERU 2016).

Al igual que otros cultivos, la alcachofa es atacada por diversos patógenos, ocasionando pérdidas económicas a los agricultores. La pudrición blanda o húmeda es producida por bacterias del género *Erwinia*; que al atacar el cuello provocan la marchitez y muerte de la planta (Gil 1999a; García 1999). El género *Erwinia* considera bacterias patógenas de plantas, que son Gram negativas, fermentativas, con flagelos peritricos y no esporulantes (Wislow 1920). Posteriormente se determinó que las bacterias pectinolíticas eran distintas a las especies del genero *Erwinia* por lo que sugirieron que estas deben pertenecer a un género separado en la familia enterobacteriaceae, por lo que proponen un nuevo género, el género *Pectobacterium* cuya especie tipo es *Pectobacterium carotovorum* (Jones) n. comb. (Waldee 1945; Brenner 1974). Se consideran cinco subespecies dentro del género: *atroseptica*, *betavascularum*, *carotovorum*, *odorífera* y *wasabiae* (De Boer y Kelman 2000). En el 2004 se identifica una nueva subespecie, *Erwinia carotovora* subsp. *brasiliensis*, considerada mucho más patógenas que *Erwinia Carotovora* subsp. *atroseptica* (Duarte *et al.* 2004). En el 2012 se reporta por primera vez a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidiae*, causando síntomas de muerte o tizón de las cañas jóvenes, a menudo con oxidación de color rojo oxido en kiwi (Koh *et al.* 2012).

Los métodos de control usados en el manejo de enfermedades dependen de los patógenos que se deseen controlar, por lo que la identificación del agente causal es importante. El control químico es el método más usado ya que existen diferentes productos en el mercado, sin embargo este método no es amigable con el medio ambiente. Una alternativa que se está impulsando en los últimos años es el control biológico, en el que se hace uso de organismos antagónicos a los patógenos (Achicanoy 2001; Cook y Baker 1983).

En el Perú no existe reporte de enfermedades bacterianas en alcachofa por lo que en el presente trabajo de investigación se planteó como objetivo general, identificar y controlar el patógeno causante de la pudrición húmeda en alcachofa (*Cynara scolimus* L.) en la zona de Chincha Baja- Ica. Y los siguientes objetivos específicos:

- Describir los síntomas característicos de la pudrición húmeda en el cultivo de alcachofa.
- Realizar la prueba de patogenicidad.
- Identificar al agente causal mediante características fenotípicas y prueba de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Determinar el efecto *in vitro* y en campo de productos químicos y/o biocontroladores contra el patógeno causante de la pudrición húmeda en el cultivo de alcachofa.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Alcachofa

Se considera que la especie de la que procede es *Cynara cardunculus* y por diferentes cruzamientos y mejoramiento genético se llegó a crear la especie hortícola *Cynara scolymus* L. La alcachofa es originaria del área central y occidental del Mediterráneo y del Sur de Europa. (Gil 1999b, Agricultura Forestry & Fisheries s.f. y Serrano 2006)

La planta de alcachofa pertenece a la familia compositae (Asterácea), es herbácea y perenne. El tallo presenta nervaduras longitudinales superficiales, en la primera etapa de crecimiento es pequeño con entrenudos cortos de donde salen las hojas, luego es erguido y ramificado. Las hojas son grandes con bordes lobulados y aserrados, pinnatinervadas y nervadura central gruesa, las hojas que acompañan a los capítulos son de menor tamaño y menos lobulados. La raíz es ramificada y alcanza gran profundidad. Los capítulos de alcachofa en estado comercial o inmaduros contienen gran cantidad de flores apretadas que se encuentran sobre un receptáculo carnoso, al madurar las brácteas se abren y las flores cambian de color blanco a violeta (Gil 1999b; IDIPS s.f.; Serrano 2006).

### 2.2 Alcachofa en el Perú

En el Perú se cultiva alcachofa en la costa y en la sierra, siendo los principales departamentos: La Libertad, Ica, Arequipa, Ancash, Lima, Apurímac, Cajamarca, entre otros. Se cultiva principalmente para exportación y un pequeño porcentaje para consumo local. La exportación de esta hortaliza se realiza en conserva, procesados y como producto congelado. Los principales países a los que se exportó el 2018 fueron: Estados Unidos 73%, España 17%, Alemania 3%, Francia 2%, otros 5%. Las empresas líderes en exportación de alcachofa en conserva son: Virú, Danper Trujillo, Danper Arequipa, Alsur Perú y Alsur Cusco. En el caso de alcachofa congelada la empresa líder es Gandules seguida de Virú, Danper e IQF (Koo 2018; Gestión 2017).

### 2.3 Enfermedades en el cultivo de alcachofa

El cultivo de alcachofa es afectado en sus diferentes etapas fenológicas por diversos patógenos; hongos, bacterias, virus y nematodos, estos le generan daños que se traducen en pérdidas económicas. La magnitud de los daños dependerá de las condiciones climáticas, etapa fenológica de la planta y cantidad de inóculo del patógeno. (Agrios 2005; Gil 1999b). Entre las enfermedades más importantes podemos mencionar: La chupadera (*Rhizoctonia* sp.) afecta principalmente a plántulas en almácigo, causando daño a la altura del cuello, esto impide el transporte de la savia en el interior de la planta ocasionándole la muerte. El daño es mayor en suelos con alta humedad y exceso de materia orgánica. La oidiosis (*Leveillula taurica*), el hongo forma una capa blanquecina generalmente en el envés de las hojas basales o las hojas más adultas, en el haz se observan manchas amarillas difusas que se necrosan por el centro y en infecciones avanzadas se puede ver micelio blanquecino. Pueden llegar a ocasionar muerte prematura y caída de hojas. Su diseminación es muy rápida y se ve favorecida por climas con baja humedad relativa y temperaturas altas. Llegando a afectar campos enteros. La podredumbre gris (*Botrytis cinerea*), las lesiones pueden aparecer en cualquier parte del capítulo, en poscosecha se inician a partir de la zona de corte del receptáculo, otras veces a partir de las grietas en el ápice de las brácteas externas. Cuando persisten las condiciones favorables se cubren de un polvillo blanco grisáceo. La enfermedad avanza hacia las brácteas internas y muchas veces se puede ver la presencia de esclerocios negros. Las esporas se reproducen con temperaturas relativamente frías y humedad relativa superior al 80%. La verticiliosis (*Verticillium dahliae*), en el campo la enfermedad se presenta en manchas que están irregularmente dispuestas. Los primeros síntomas se manifiestan en las hojas basales en las que se puede ver marchitamiento, seguido de amarillamiento y luego desecación que se inicia en el borde del limbo. Las hojas jóvenes muestran abarquillamiento y las plantas afectadas producen pocos capítulos. Los microesclerocios pueden sobrevivir por muchos años en el suelo. La infección puede permanecer inerte hasta que las condiciones adecuadas de temperatura se presenten. Los síntomas se evidencian cuando la temperatura baja. Pudrición blanca (*Sclerotinia sclerotiorum*) los primeros síntomas se pueden ver en los tallos y cuello, masas miceliales blancas con presencia de esclerocios en el interior del tallo que pueden llegar a matar a la planta; el hongo también daña la raíz. Se ve favorecida por alta humedad relativa y del suelo. Pudrición algodonosa (*Sclerotium rolfsii*), la infección inicia en la base del tallo y lo cubre con un micelio algodonoso que se extiende hasta suelo que rodea la planta, sobre el micelio se forman esclerocios redondos que primero son blancos

y luego de color marrón oscuro. Este proceso viene acompañado de una marchitez del brote afectado. Esta enfermedad se ve favorecida por climas cálidos y húmedos al inicio, luego por periodos secos. Virus bronceado del tomate (TSWV), los síntomas son anillos cloróticos concéntricos tanto en hojas como en los frutos, presencia de bronceado y necrosis. Es transmitido por pulgones, mosca blanca y otros vectores (Agrios 2005; IDIPS s.f.; Gil 1999a y García 1999).

## **2.4 Pudrición blanda en alcachofa**

### **2.4.1 Síntoma**

Las plantas enfermas muestran como síntoma secundario un amarillamiento progresivo y marchitez que se inicia en las hojas basales, seguido de un marchitamiento total de la planta. A nivel del cuello, en la medula hay presencia de pudrición blanda de color verde oscuro a marrón oscuro que se puede ver al realizar un corte (Vacari 2009; Cariddi y Bubici 2016; Soto y Puglia 2002; López 2010 y Gil 1999a).

### **2.4.2 Epidemiología**

No hay estudios específicos sobre la epidemiología de la pudrición blanda en alcachofa y mucho menos estudios realizados en nuestro país, por lo que se tomará como referencia estudios basados en la epidemiología de la pudrición blanda en papa y otros cultivos ocasionados por bacterias del género *Pectobacterium*.

Las bacterias que causan la podredumbre blanda sobreviven mayor tiempo en hospedantes voluntarios y restos de cosechas, la supervivencia en el suelo es por periodos cortos ya que esto depende de la temperatura, humedad y pH del suelo. La principal fuente de inóculo en el caso de las pudriciones blandas de la papa es el tubérculo semilla. Cuando el tubérculo semilla se pudre libera las bacterias al suelo y estas se diseminan por el agua para contaminar plantas aledañas, las bacterias ingresan por heridas o aberturas naturales, puede colonizar las raíces y posteriormente moverse por el sistema vascular. Una vez en los tallos las bacterias no necesariamente pueden causar pudrición, pueden sobrevivir en forma latente (Perombelon 1974; Perombelon y Hyman 1988 y Czajkowski *et al.* 2011).

La diseminación también puede darse por el aire, especialmente en días lluviosos, pueden ser transportadas por insectos los cuales permiten el avance de la infección de manera eficiente a largas distancias tanto en campo como almacenamiento. Las bacterias pueden vivir en todas las etapas de desarrollo del insecto. Otra forma es por equipos de pulverización contaminados. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atroseptica* también han sido encontradas en aguas superficiales en Escocia y en Colorado Estados Unidos, al igual que en el aire en campos lejanos en los que no había presencia de hospedantes (Agrios 2005; Czajkowski *et al.* 2011 y McCarter *et al.* 1984).

### **2.4.3 Etiología**

Un factor ambiental importante para el desarrollo de las enfermedades ocasionados por *Pectobacterium* es el nivel de agua en el suelo. La presencia de película de agua en la semilla induce condiciones anaeróbicas, favoreciendo la multiplicación bacteriana y el inicio de la pudrición. La anaerobiosis además afecta la respuesta de resistencia del huésped dependiente del oxígeno, lo que permite la multiplicación bacteriana sin obstáculos y la producción de enzimas que degradan la pared celular, lo que resulta en una lesión en descomposición (Perombelon *et al.* 1989b y Fuqua *et al.* 2001). Otra condición crítica en el desarrollo de la enfermedad es el nivel de contaminación de la semilla, como se demostró en el caso de *Pectobacterium atroseptica*, cuanto mayor sea la densidad bacteriana, más probable será que el patógeno predomine en la lesión incipiente y más pronto se inicia la pudrición (Bain *et al.* 1990).

### **2.4.5 Parasitismo**

Las bacterias del género *Pectobacterium* que ocasionan la pudrición blanda se caracterizan por ser patógenos oportunistas, que cambian de una fase latente asintomática a una fase virulenta en condiciones ambientales adecuadas. Pueden penetrar al hospedante por heridas o aberturas naturales. Cuando penetran, en las heridas se alimentan y reproducen en el líquido liberado por las células degradadas de la superficie herida (Agrios 2005). Se cree que la fase virulenta comienza bajo condiciones anaerobias cuando disminuyen los mecanismos de defensa de las plantas que dependen del oxígeno, lo que permite la multiplicación bacteriana y la inducción de enzimas que degradan la pared celular de las plantas (PCWDE), las bacterias deben alcanzar un quórum de  $10^7$  UFC/g de tejido vegetal, para poder inducir la formación de PCWDE (Perombelon 2002). Las comparaciones genómicas han permitido

demostrar que grandes cantidades de PCWDE, no son suficientes para la patogénesis, existen factores adicionales como; una amplia gama de moléculas pequeñas, capacidad para provocar muerte celular de la planta, adhesinas, capacidad para adaptarse a condiciones de bajo oxígeno, codificación de más de 30 genes de quimiotaxis distintos que se cree que detectan el jasmonato inducido por heridas, el sistema de secreción tipo III (T3SS), sistema de adquisición de hierro y moléculas que actúan como inhibidores de fitohormonas y pigmentos que actúan como reactivos (Nykyri *et al.* 2012 y Niemi 2017).

Las enzimas pectinolíticas degradan las sustancias pécticas de la lámina media y de la pared celular, produciendo la maceración de los tejidos, mientras las enzimas celulolíticas producen la degradación parcial y el ablandamiento de la celulosa de la pared celular. Producto del efecto de las enzimas el agua del protoplasto se difunde por los espacios intercelulares, por lo que las células se plasmolisan y mueren. Las bacterias continúan reproduciéndose e invadiendo tejidos. La licuefacción y exósmosis del agua de los protoplastos da como resultado el ablandamiento de los tejidos invadidos y transformación en una masa mucilaginosa (Agrios 2005).

## **2.5 Pectobacterium**

El nombre genérico *Erwinia* para bacterias patógenas de plantas fue propuesto por Winslow en 1917, donde consideró bacterias que formaban colonias blanquecinas, viscosas y que no producían indol. En 1920 se le da el nombre al género *Erwinia*, esta lleva el nombre del fitobacteriólogo Erwin F. Smith, que considera a las bacterias patógenas de plantas, Gram negativas, fermentativas, con flagelos peritricos y no esporulantes (Winslow 1920).

En 1945 en base a un estudio realizado con diversos aislamientos, se determina que las bacterias pectinolíticas son distintas de las especies de *Erwinia*, por lo tanto sugieren que las bacterias pectinolíticas constituyen una unidad taxonómica fácilmente reconocible, y debe ser un género separado en la familia enterobacteriaceae; por lo que proponen el nuevo género *Pectobacterium* “bacterias no formadoras de esporas, Gram negativas, con forma de bastón, móviles por medio de flagelos peritricos y no móviles. Crecen fácilmente en medios que contienen nitrógeno inorgánico y una fuente de carbono adecuada, reducen nitratos a nitritos”. En medios de peptona tamponada se produce una fermentación con ácido anaerogénico y microaerogénico a partir de una amplia gama de sustratos. Segregan una

protopectinasa activa capaz de producir un ablandamiento visible de la zanahoria cruda (u otro tejido vegetal carnoso) dentro de 48 horas o menos, Produce gelatinasa activa, leche de tornasol acidificada sin digestión. La especie tipo es *Pectobacterium carotovorum* (Jones) n. comb. Syn. *Bacillus carotovorus* Jones (Waldee 1945).

Se han propuesto gran cantidad de esquemas taxonómicos para los dos grupos de *Erwinias*, el verdadero y las *Erwinias* pectinolíticas que tienen como especie tipo a *Erwinia amylovora* y *Pectobacterium carotovorum* respectivamente. Existen muchas razones para mantener a estos dos géneros dentro de la familia Enterobacteriaceae. El concepto de dos géneros diferentes se fundamenta en patrones metabólicos exhibidos por *Erwinia* sensu stricto y *Pectobacterium*, diferencias en la producción de la enfermedad *Erwinia* (necrosis biliar, marchitez y seca), *Pectobacterium* (pudrición blanda), y muestran mayor relación con el ADN intragrupo basado en la técnica de hibridación de ADN y la cromatografía de hidroxapatita (Brenner 1974).

Hauben (1998), trabajó con 29 aislamientos y determinó las secuencias casi completas del 16S ADNr, el análisis de las secuencias de las Enterobacterias fitopatógenas indicó nuevas relaciones entre las diferentes especies, en su descripción menciona a *Erwinia*, *Pectobacterium* y el nuevo género *Brenneria*. Llegando a determinar que las especies del género *Erwinia* pueden dividirse en tres grupos: el grupo I que considera las verdaderas *Erwinias* y está compuesta por *E. amylovora*, *E. maliotivora*, *E. persicinus*, *E. psidii*, *E. rhapontici* y *E. tracheiphila*. En el grupo II propone que las *Erwinias* pasen a *Pectobacterium*. Describe al género *Pectobacterium* basándose en lo descrito anteriormente por Waldee (1945), así como los obtenidos por Verdonk (1992) y Rijckaert (1994); Son células en forma de bastón, Gram negativas, que miden de 0.5 a 1 por 1 a 3 µm. con extremos redondos, pueden presentarse solos o en parejas y algunas veces en cadenas, suelen ser móviles por medio de sus flagelos peritricos. Las cepas son catalasa positivos y oxidasa negativas, tienen metabolismo fermentativo y son aerobios facultativos, todas las cepas producen ácido de la fructosa, galactosa, glucosa, ribosa, sacarosa, ribosa entre otros pero no de adonitol, arabitol, lixosa, p-methylmanosido, sorbosa y almidón. Las cepas poseen enzimas pectinolíticas (excepto *Pectobacterium cypripeddii*), causando pudriciones blandas, necrosis y marchitamientos.

Existen cinco subespecies dentro del género *Pectobacterium*; *atroseptica*, *betavascularum*, *carotovorum*, *odorifera* y *wasabiae*, sin embargo de acuerdo a la distribución de genomoespecies *Pectobacterium* se divide en cuatro grupos, por lo que se propone que: *Pectobacterium atrosepticum* sp. Nov. (Cepa LMG tipo CFBP 2386=549T ICMP NCPPB 1526), *Pectobacterium betavascularum* sp. Nov. (CFBP tipo de cepa LMG 2122 = 2464 = 2795 = ICMP NCPPB 4226) y *Pectobacterium wasabiae* sp. Nov. (CFBP tipo de cepa LMG 3304 = 8404 = 3701 = ICMP NCPPB 9121), sean elevadas al nivel de especie. Y dos subespecies se mantienen: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. (Cepa de tipo CFBP 2046 = LMG 2404 = 312T ICMP NCPPB 5702) y *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odorifera* (tipo CFBP cepa LMG 5863 1878 = ICMP 11553 NCPPB 3839). Una sexta subespecie fue descrita en el 2004, cepas brasileñas que eran mucho más patogénicas que la subespecie *atroseptica* se trataba de *Erwinia carotovora* subsp. *brasiliensis* (Gardan *et al.* 2003 y Duarte *et al.* 2004).

## **2.6 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis***

*Erwinia carotovora* subsp. *brasiliensis* es una subespecie que es mucho más patogénicas que *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. En cuanto a las características fenotípicas de esta subespecie se menciona que; las cepas son pectinolíticas en medio Cristal Violeta Pectato (CVP), producen ácido a partir de  $\alpha$ -metil-glucosido y sustancias reductoras a partir de sacarosa, crecen a 37°C y no utilizan Tween-40 ni Tween-80 como fuente de carbono. El 12 a 38% de las cepas usan ácido D-galactónico, ácido D-gluconico, uridine y thymidine, mientras que todas las cepas de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* lo utilizan, el 69 a 75% de las cepas usan ácido D-galacturónico, ácido D-sacárido o ácido L-glutámico y ninguna cepa de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* lo usa. En términos bioquímicos las cepas brasileñas son similares a *Erwinia carotovora* subsp. *odorifera* pero difirieron en ser incapaces de utilizar D-arabitol, 3metilglucosa y timidina-5 (monofosfato). En pruebas de patogenicidad en tallos de papa se demostró que las cepas brasileñas mostraron el síntoma de pie negro al tercer día, mientras que los inoculados con *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* mostraron el síntoma al séptimo día (Duarte *et al.* 2004).

Después de la identificación de las cepas brasileñas, se ha vuelto a identificar como agente causal del pie negro en papa a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*, esto mediante pruebas bioquímicas, secuenciamiento parcial del 16S-23S rRNA, PCR-RFL de la

región 16S-23S rDNA. Estos estudios confirmaron que las que las cepas sudafricanas están estrechamente relacionadas a las cepas de Brasil (Van der Merwe *et al.* 2008).

En el 2016, en base a características fisiológicas, bioquímicas y prueba de PCR se identificó a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* como agente causal de la pudrición blanda del cultivo de alcachofa en Italia, siendo este el primer reporte de esta bacteria en ese país y en ese cultivo. Los aislamientos presentaron actividad pectinolítica positiva, crecieron a 37°C, fueron positivos a la respuesta de hipersensibilidad en hojas de tabaco y negativos a la reducción de sustancias a partir de sacarosa (Caridi and Bubici 2016)

Las especies y subespecies del género *Pectobacterium* son indistinguibles, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* crece a 37 °C diferenciándose de *Pectobacterium atrosepticum* y de *Pectobacterium carotovorum* por su capacidad de producir sustancias a partir de sacarosa y ácido de un metil glucosido y maltosa. Existen cepas de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* que no tienen la capacidad de producir sustancias reductoras a partir de sacarosa, por lo que se determinó de acuerdo al MLSA que *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* forma dos clados: clado I en la reconstrucción filogenética MLSA incluye todas las cepas de la subespecie aisladas de Brasil y Perú, y fenotípicamente se ajustan a los descritos por Duarte *et al* en el 2004, producen sustancias reductoras a partir de sacarosa y ácido de un metil glucósido, fueron aisladas solo de papa. Las cepas del Clado II son de distribución mundial y se aislaron de varios hospederos incluido papa (Nabhan *et al.* 2012).

## **2.7 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odorifera***

Fue reportada en 1992, se encontraron 11 cepas aisladas principalmente, pero no exclusivamente, de la podredumbre blanda en chicory (*Cichorium intybus* L), estos aislados se compararon con otras especies y subespecies de *Erwinia* y fueron considerados como atípicas, estas producían un olor típico parecido a la banana y al realizar diversas pruebas se determinó que era una nueva subespecie *Erwinia carotovora* subsp. *odorifera* subsp. nov., (O.Dor. if'er.a. L.fm. adj. Odorífera, trayendo olores, fragante). Son células Gram negativas, no formadoras de esporas, flagelos peritricos, forma de varilla recta, anaeróbico facultativo, no produce oxidasa, reduce nitratos a nitritos, crece en agar nutritivo, produce colonias de 2.5 mm de diámetro a las 48 horas a 25 °C en medio YPDA. Colonias circulares, grisáceas,

ligeramente abombadas y semitranslúcidas, crecen a 37°C, la dextrosa se fermenta sin la producción de gas, produce sustancias reductoras a partir de sacarosa. Producen compuestos volátiles aromatizantes, tales como el acetato de propilo, acetato de isobutilo, acetato de isoamilo y el acetato 2-actamilo, cuando son inoculadas en hojas (Gallois *et al.* 1992).

En el 2015, se analizaron las características fenotípicas y genéticas de 24 aislamientos de *Pectobacterium carotovorum* extraídos de alcachofas en el Valle del Sele al sur de Italia. 23 aislamientos fueron identificados como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y 1 (ISPaVe CA) como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum*. Ésta subespecie se aisló de una planta enferma de alcachofa, sin embargo ya antes fue aislada de chicoria, puerro, apio, perejil y Jacinto (Gallois *et al.* 1992), pero nunca antes había sido aislada de alcachofa. Ya que solo un aislamiento dio positivo para esta subespecie, en este estudio no se logró definir su papel. En las pruebas fenotípicas, ISPaVe CA mostró las siguientes características: fue positivo a las prueba de reducción de azúcar a partir de sacarosa, producción de ácido a partir de sorbitol, producción de ácido a partir de melibiosa, producción de ácido a partir de lactosa,  $\alpha$  metylglucoside, crecimiento a 36 °C, actividad pectinolítica, respuesta de hipersensibilidad en tabaco (Gallelli *et al.* 2015).

Aislamientos de *Pectobacterium* spp. recolectados de diferentes verduras, provenientes de Europa, América del Norte y del Sur, Asia y Africa fueron analizados, de los cuales 22 fueron identificados como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum*. Todos los aislados identificados como *P.c.* subsp. *odoriferum* fueron capaces de degradar papa y chicoria. En papa los síntomas más severos se presentaron a temperaturas entre 15 y 37°C, con una temperatura óptima de 28 °C, ningún aislamiento produjo síntoma a 10 °C. La maceración producida por *P.c.* subsp. *odoriferum* fue mayor comparado con *P. atrosepticum* y *P. c. subsp. carotovorum*. La putrefacción de papa fue ligeramente superior con las cepas aisladas de zanahoria, puerro, perejil y cebolla comparado con las cepas que fueron aisladas de chicoria. Las propiedades bioquímicas de ocho cepas aisladas de zanahoria, apio, puerro y cebolla procedentes de Polonia, dos cepas de perejil de Serbia y una cepa de chicoria de Suiza fueron idénticos a las características observadas en los aislamientos de *P.c.* subsp. *odoriferum* procedentes de Francia de chicoria, puerro y apio, a excepción de la falta de tolerancia a medio con 5% de Na Cl. Las cepas aisladas de chicoria podían crecer en medio con Na Cl al 5% mientras que las aisladas de otras verduras no. Este es el primer reporte en

el que se muestra que *P.c.* subsp. *odoriferum* puede causar pudrición blanda en diferentes verduras durante el almacenamiento (Warelton *et al.* 2014).

*P. c.* subsp. *odoriferum* fue aislado por primera vez en Europa occidental; Belgica, Francia, y Suiza (Gallois *et al.* 1992; Samson *et al.* 1980) y desde entonces ha sido reportado en Polonia y Sur de Europa (Gallelli *et al.* 2009), Africa (Yahiaoui-Zaidi *et al.* 2010), and Asia (Nazerian *et al.* 2011; Thapa *et al.* 2011; Lan *et al.* 2013). Aunque las cepas de *P. c.* subsp. *odoriferum* han sido aisladas de papa en Korea (Thapa *et al.* 2011) y Argelia (Yahiaoui - Zaidi *et al.* 2010), las publicaciones no indican cuando se observaron los síntomas en papa o la fecha precisa del aislamiento.

## **2.8 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidiae***

Esta subespecie fue reportada por primera vez en el año 2012, causando daño en el kiwi (*Actinidia chinensis*). El cancro bacteriano es una de las enfermedades más graves y devastadoras que puede acabar con un huerto infectado en corto tiempo, el agente causal de esta enfermedad es *Pseudomona syringae* pv. *actinidiae*. Los síntomas son la muerte o tizón de las cañas jóvenes, a menudo con exudación rojo óxido en cañas o troncos y manchas irregulares de color marrón oscuro rodeados de halos amarillentos en hojas, estos se evidencian a principios de primavera. Desde el 2006 se observaron síntomas de cancro bacteriano en tallos de *A. chinensis* cv. Hort16A en verano y otoño en Jeyu-Corea. Se obtuvieron 47 aislamientos de los síntomas en verano y otoño y se logró identificar a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidiae* como agente causal de los síntomas mencionados en verano y otoño. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidiae* (ac.tí.ni.di.ae. N.L. gen. N. actinidiae perteneciente a Actinidia, el nombre del género del kiwi, *A. chinensis*, de la que se aisló la cepa tipo). Causa síntomas similares a los de *P. syringae* pv. *Actinidiae*, pero sin manchas irregulares de color marrón oscuro en hojas. Las bacterias son gram negativas, anaerobias facultativas, forma de varilla corta, aproximadamente 0.9 – 1.0 x 2.4 µm en tamaño. Crece entre 4-40 °C, con una temperatura óptima de 25 °C. Las colonias son lisas, margen entero, convexas, opaco, amarillo pálido y tiene de 2-2.5 mm de diámetro en agar PS después de 5 días a 25 °C. El pH para el crecimiento está en un rango de 4.5 a 11. Las células son móviles por medio de flagelos peritricos, la cepa tipo es sensible a la kanamicina, amikacina, cloranfenicol, estreptomycin,

ácido nalidíxico, gentamicina, ampicilina, tetraciclina, rifampicina y novobiocina, pero resistente a la polimixina B, la penicilina, eritromicina y vancomicina (Koh *et al.* 2012)

El síntoma ocasionado por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidiae* aparece solo en condiciones de alta humedad en la temporada de verano, requiere temperaturas altas (30 a 32 °C), y a diferencia de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, no produce manchas en las hojas. Se secuenció el genoma de dos cepas que ayuden a identificar rasgos genéticos asociados con su capacidad inusual para producir cancros. El tamaño estimado del proyecto genómico para ICMP 19971 y ICMP 19972 fue de 4,891.911 y 4,886.946 pares de bases respectivamente, ambos genomas tienen un contenido de 51,53% GC. El número de Loci fueron identificados como comunes para las dos cepas y para otras bacterias que causan enfermedades en plantas leñosas, lo que sugiere que pueden ser necesarias para la patogenicidad de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidiae* (Visnovsky *et al.* 2017).

## 2.9 Trichoderma

Es un hongo de la clase Hyphomycetes, orden Moniliales y familia Moniliaceae. En su fase perfecta se ubica en la clase Ascomycetes, orden Hipocreales, género Hypocrea. A inicios el micelio es blanco, luego se torna de color verde claro a oscuro, algunas veces ralo y otras veces denso, forman anillos concéntricos durante su crecimiento. Los conidióforos son ramificados y de forma variada, hialinos, terminan en fialides que en general son ampuliformes a lageniformes, rectas, a veces sinuosas o en forma de gancho. Las conidias son hialinas unicelulares, haploides, la mayoría son elipsoidales, globosas a subglobosas, su pared está compuesta por quitina y glucanos y pueden ser lisas u ornamentadas con verrugas o proyecciones aladas. La mayoría de *Trichodermas* forman clamidosporas en sustratos naturales que pueden ser intercalares o terminales. (Barrera 2012; Villegas 2005; Infante *et al.* 2009).

Las especies que pertenecen al género *Trichoderma* son saprófitos que viven en el suelo, materia orgánica y árboles en descomposición, en algunas ocasiones pueden ser anaerobios facultativos, usando el metabolismo fermentativo. Se encuentran en diferentes zonas desde los polos hasta los trópicos, esta alta capacidad de sobrevivir está relacionada con su capacidad enzimática para degradar diversos sustratos (Villegas 2005; Infante *et al.* 2009; Rodríguez 1990; Katayama *et al.* 2001 y Samuels 1996).

Se conocen diferentes tipos de mecanismos de acción por los cuales *Trichoderma* reduce, inhibe la acción de los organismos fitopatógenos, siendo los más conocidos: competencia, micoparasitismo y antibiosis. También se pueden mencionar otros mecanismos como la secreción de enzimas, producción de compuestos inhibidores. Existen mecanismos que actúan de manera indirecta elicitando o induciendo mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos, induciendo la activación en la planta de compuestos relacionados con la resistencia, detoxificación de toxinas secretadas por patógenos. Además tienen la capacidad de crear un ambiente favorable para el desarrollo radicular de las plantas, un aumento a la tolerancia del estrés, solubilización y absorción de nutrientes inorgánico y estimulación de crecimiento vegetal (Infante 2009).

Rivera *et al.* (2015), comparó el efecto de *Trichoderma asperellum* y una mezcla de productos químicos (oxicloruro de cobre 61,1%, Ftalamida- Carboxin-Captan 40%, Ziram 76% y Tebuconazole 25%) para el control de *Sclerotium cepivorum* en ajo. Evaluó la concentración de esclerocios cada 30 días y luego del análisis de datos *Trichoderma* mostro una eficacia similar a la de los productos químicos usados. López (2017), probó el efecto de la aplicación de *Trichoderma* sp., combinado con la biofumigación y solarización, solo y con cada uno de ellos, y los comparo con la aplicación de un producto químico para el control de la podredumbre blanda ocasionada por *Sclerotinia* sp. Encontró que la menor incidencia y el mayor rendimiento de zanahorias se presentó con el producto químico y con *Trichoderma* sp. Mamani *et al.* (2012), del 2007 al 2010 trabajó con tres microorganismos benéficos para determinar su efecto en la productividad y en el control de *Helminthosporium solani*. Siendo *Trichoderma* el mejor tratamiento, mejorando el rendimiento de papa y reduciendo la incidencia de la enfermedad.

## **2.10 Productos a base de cobre**

Las enfermedades causadas por *Pectobacterium* se controlan mayormente usando material de siembra sano, practicas sanitarias preventivas y aspersiones de cobre. Los productos a base de cobre, se han usado ampliamente para reducir las pérdidas ocasionadas debido al ataque de patógenos del genero *Erwinia*, ya que puede llegar a afectar un gran porcentaje de las plantas en campo y frutos en poscosecha. Los compuestos a base de cobre reducen la propagación de estos patógenos (Coto y Wang 1995; Garza *et al.* 2002).

El sulfato de cobre pentahidratado, es la reacción de sulfato de cobre anhidro y agua, es un producto inorgánico que ofrece protección a las plantas desplazándose de manera sistémica en forma de iones  $\text{Cu}^{++}$ , también actúa por contacto con la población epifítica. Es un inductor de defensas naturales. El gluconato de cobre ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{CuO}$ ) es la sal de cobre del ácido D-glucónico, es un componente orgánico  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7$ , que surge de la oxidación de la glucosa. El ácido D-glucónico tiene propiedades antisépticas y quelatantes, quela iones metálicos como el cobre y forma complejos muy estables. El gluconato de cobre favorece la creación de sustancias naturales de autodefensa llamadas fenoles y fitoalexinas, el cobre al estar como gluconato puede ser absorbido por los pelos radiculares y la membrana semipermeable de las hojas, tiene una movilidad acropétala y basipétala. El Proteinato de cobre, es el producto resultante de la quelación de una sal soluble con una proteína, el cobre se encuentra complejoado con aminoácidos libres. Este producto se moviliza fácilmente en los tejidos internos, raíces, haces vasculares, tiene movimiento acropétalo y basipétalo. Los aminoácidos le brindan un efecto bioestimulante que ayuda a superar cualquier estrés y mejora las condiciones biológicas. (Coto y Wang 1995; Gringo 2015; Bono s.f.; Systemic s.f. y Promet Cu 2017)

Coto y Wang (1995), trabajaron con seis productos comerciales para el control de *Erwinia carotovora* en mango, obteniendo como mejores resultados los dos tratamientos a base de cobre; Sulfato de cobre pentahidratado (5.5% cobre metálico) y el caldo bordeles (20% cobre metálico), ambos lograron disminuir la incidencia de la bacteria de manera considerable comparada con el testigo. Guevara *et al.* (2002), trabajó de la misma manera que Coto y Wang con frutos de mango, probando cinco productos comerciales de los cuales el Cuprimicin 500 (2.19% sulfato de estreptomycin, 0.23% oxitetraciclina, 78.52% sulfato tribásico de cobre monohidratado) y el Phytol 27 (21.63% sulfato de cobre pentahidratado), fueron los mejores tratamientos con 16 y 30% de frutos infectados en grado 3, comparado con el 58% de frutos afectados en el testigo. Farfán y Hoyos-Carbajal (2010) trabajaron con 121 aislamientos bacterianos asociados a bacteriosis en pasifloras, probaron siete antibióticos y dos productos a base de cobre (oxicloruro y sulfato de cobre), con la metodología de incorporación en agar. Los resultados indicaron que existía sensibilidad a algunos antibióticos y que el sulfato de cobre a una concentración de 750 mg/L controló la totalidad de la población de bacterias, cosa que no ocurrió con el oxicloruro. Esto debido al uso excesivo de algunos productos.

## 2.11 Productos a base de calcio

La nutrición de la planta cumple un rol importante en la resistencia a enfermedades, la deficiencia de nutrientes muchas veces da como resultado una mayor susceptibilidad al ataque de enfermedades. El calcio juega un papel muy importante en la resistencia de la planta contra bacterias. Un alto contenido de calcio se relaciona con una mayor resistencia a patógenos bacterianos, incluida la pierna negra ocasionada por *Erwinia* spp. Los iones de calcio mejoran la estructura y la integridad de los componentes de la pared celular de las plantas, lo que da como resultado una pared celular más resistente al ataque de enzimas que provocan la maceración de tejidos (Berry *et al.* 1988; Czajkowski *et al.* 2011; Bain *et al.* 1996 y Bartz *et al.* 1992). Agregar yeso ( $\text{CaSO}_4$ ) a los suelos para inducir resistencia de los tallos y tubérculos a *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, retrasa significativamente la descomposición de los tubérculos madres y aumenta el contenido de calcio de la corteza de los tubérculos hijas haciéndolas más resistentes (Bain *et al.* 1996). La gravedad de la pudrición blanda producida por *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* también fue reducida significativamente por la infiltración de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  aumentando este el contenido de calcio de la cáscara y médula. El  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{Si}^{++}$  también redujeron la severidad de descomposición, pero fueron menos efectivos que el  $\text{Ca}^{++}$  (Raymond y McGuire 1984).

### **III. METODOLOGÍA**

#### **3.2 Ubicación**

##### **3.2.1 Identificación del síntoma y recolección de las muestras**

La identificación del síntoma característico de la pudrición blanda y la recolección de muestras de las plantas de alcachofa (variedad Imperial Condor), se realizó en cuatro fundos de la empresa Danper Perú, ubicadas en cuatro zonas de Chincha Baja (Alto Larán, Hoja Redonda, San Fernandito y Pedregal), entre los meses de abril a septiembre del 2017 y de abril a julio del 2018.

##### **3.2.2 Procesamiento de muestras, identificación fenotípica y molecular**

Las muestras fueron procesadas e identificadas mediante pruebas fenotípicas en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). La extracción de ADN y prueba de PCR se realizó en el laboratorio de la empresa UMBRELLA, el producto de PCR se mandó a secuenciar a la empresa coreana Macrogen Inc.

##### **3.2.3 Prueba de patogenicidad**

La prueba de patogenicidad se realizó en el tinglado de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

##### **3.2.4 Pruebas de control**

La prueba de control *in vitro* se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la UNALM, y la prueba de control en Campo en el Fundo San Fernandito de la empresa Danper Perú en la zona de Chincha Baja.

#### **3.3 Recolección de muestras**

Las muestras se recolectaron teniendo en cuenta el síntoma de pudrición blanda, se evaluó toda la planta. La recolección se realizó durante todas las fases fenológicas del cultivo, para

obtener muestras del cuello y del cogollo de la planta. Una vez identificado el síntoma, se cortó la parte dañada con una navaja, se cubrió con papel toalla y se colocó en una bolsa de papel previamente codificada teniendo en consideración la parte de la planta de donde se obtuvo la muestra, zona de muestreo y fecha. Las bolsas de papel se colocaron en una caja de tecnoport que contenía gel refrigerante.

### **3.4 Procesamiento de muestras**

Todas las muestras fueron procesadas el mismo día de su recolección. En el laboratorio las muestras se lavaron con agua de caño a chorro continuo sin frotar con la mano, se enjuagó tres veces con agua destilada estéril; con la ayuda de un bisturí se sacaron trozos de tejido de la zona de avance del síntoma y se pusieron en un mortero estéril, se trituraron y se dejó reposar por cinco minutos. Con un asa de Kolle se tomó una película de suspensión y se sembró mediante el método del estriado en una placa Petri conteniendo medio Agar Nutritivo (AN) plaqueadas 24 horas antes, las placas se sellaron, codificaron e incubaron por 48 horas a 27 °C.

### **3.5 Obtención de aislamientos puros**

Transcurridas las 48 horas se evaluaron las placas con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Se observaron colonias de diferentes formas y tamaños, por lo que con un asa de Kolle se tomó una Unidad Formadora de Colonia (UFC) y se puso en un tubo eppendorf con agua destilada biesterilizada, de este tubo se obtuvo una película de suspensión (agua-bacteria), que se sembró en AN y se incubó a 27 °C por 48 horas, realizándose este procedimiento hasta obtener colonias axénicas.

### **3.6 Prueba de patogenicidad**

Se cultivó plantas de alcachofa de la variedad Imperial Cóndor en bolsas de polietileno de 30x40 cm, con suelo estéril. Las plantas se cuidaron durante cinco meses, en los que se realizó labores similares a las de campo (riego, fertilización, control fitosanitario y aplicación de ácido giberélico). Se usó una suspensión bacteriana de  $10^6$  UFC que se determinó por espectrofotometría (Espectrofotómetro Multi-Volumenes marca Epoch) a una Densidad Óptica (DO) de 600 nm. Un día antes de la inoculación se aplicó ácido giberélico a todas las plantas. Se inoculó 1 ml. de suspensión bacteriana con una jeringa de tuberculina. Para la inoculación a nivel del cuello se le generó una herida de 0.5 cm de profundidad con

un punzón de 2 mm de diámetro. Para la inoculación en el cogollo, previamente se asperjó agua estéril. Se trabajó con ocho plantas por aislamiento (cuatro para inoculación al cuello y cuatro para el cogollo) y ocho testigos en los que se inoculó con agua destilada estéril. Se acondicionó un área que cubra todas las plantas con polietileno para mantener la humedad (el suelo tenía humedad permanente y durante el día en la parte aérea de las plantas se asperjó agua cada dos horas), luego de 96 horas se retiró la cubierta de polietileno.

### **3.7 Identificación fenotípica**

Se realizaron las siguientes pruebas:

#### **3.7.1 Crecimiento en medio Cristal Violeta Pectato (CVP)**

Para esta prueba se preparó medio CVP (Anexo 1), el medio se plaqueo 24 horas antes de la siembra. Se toma una pequeña muestra con un asa de Kolle tocando suavemente la superficie de la colonia (se usaron colonias crecidas en medio AN e incubados a 28 °C por 48 horas) y se sembró en cinco puntos en la superficie del medio CVP, se trabajó con tres placas para cada aislamiento. Las placas se incubaron a 28 °C por 24 horas.

#### **3.7.2 Tinción Gram**

Para la tinción Gram se usó colonias desarrolladas en medio Agar Nutritivo e incubadas durante 24 horas a 28 °C (Anexo 2).

#### **3.7.3 Degradación de láminas de papa**

Se usó tubérculos sin manchas ni brotes, se lavaron con agua de caño y se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 10 minutos, se enjuagó con agua destilada estéril y se dejó secar. Una vez secos los tubérculos se cortaron en láminas de 1 cm. de espesor y se colocaron en placas Petri estériles, en el centro de la lámina con un sacabocado se realizó un hoyo de 5 mm. de diámetro y 5 mm. de profundidad, con un asa y aguja de Kolle se colocó en el hoyo una pequeña cantidad de masa bacteriana (incubada a 28 °C durante 48 horas en medio AN). Una vez inoculadas las láminas de papa se colocaron en cámaras húmedas estériles preparadas previamente, estas se incubaron a 28 °C por 48 horas. Se trabajó con cinco láminas de papa por aislamiento.

### **3.7.4 Prueba de catalasa**

En esta prueba se usó agua oxigenada (3.00 g. de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/100 ml. de agua purificada). Se colocó una gota de agua oxigenada en un porta objeto limpio y estéril, con un mondadiente de madera estéril se tomó una masa bacteriana (cultivada en medio AN e incubada a 28 °C durante 48 horas) y se colocó sobre la gota de agua oxigenada.

### **3.7.5 Prueba de oxidación y fermentación**

Para esta prueba se preparó el medio O/F (Oxidación/Fermentación) de acuerdo a lo indicado por Perombelon & Van Der Wolf en el 2002 (Anexo 3). Se agregó 3 ml de medio O/F en cada tubo, se esterilizó a 120 °C durante 20 minutos. Cuando el medio solidificó se procedió a la inoculación, con un asa y aguja de Kolle se tomó una masa bacteriana (incubada durante 48 horas a 28 °C en medio AN), y se introdujo en el medio hasta la base del tubo. Se trabajó con 10 tubos por aislamiento, a cinco se les agregó vaselina líquida estéril y a los otros cinco no, los 10 tubos se taparon con algodón y parafilm y se incubaron a 28 °C por 48 horas.

### **3.7.6 Crecimiento a 27 y 37 °C**

Para la prueba de crecimiento a dos temperaturas se preparó una suspensión bacteriana de 10<sup>6</sup> UFC, que se determinó por espectrofotometría (Espectrofotómetro Multi-Volúmenes marca Epoch) a una Densidad óptica (DO) de 600 nm. Se tomó 0.1 ml de suspensión y se colocó en las placas que tenían medio AN preparadas 24 horas antes, con un triángulo de Drigalsky se distribuyó la suspensión sobre la superficie. Se sembró 10 placas para cada aislamiento y se incubó cinco placas a 37 °C y cinco placas a 27 °C.

### **3.7.7 Crecimiento en 5% de cloruro de sodio (NaCl)**

Para esta prueba se preparó un medio líquido (Anexo 4) de acuerdo a lo indicado por Perombelon & Van Der Wolf en el 2002. Se colocó 3 ml del medio en cada tubo y se esterilizó a 120 °C por 15 minutos. Se sembró una masa de colonias incubadas a 28 °C durante 48 horas. Después de la siembra se realizó la lectura de la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro. Se incubó en agitación a 28 °C por siete días y cada día se realizó la lectura de la DO. Se sembró cinco tubos por aislamiento.

### **3.7.8 Sensibilidad a la erytromicina**

Para esta prueba se usó discos de Erytromycina de 15 mg. (marca BIORAD). Se preparó una suspensión bacteriana (20 colonias/5 ml de agua destilada biesterilizada). La suspensión se sembró en medio agar nutritivo (preparado 24 horas antes), con un hisopo estéril se sembró el aislamiento en la placa, cubriendo toda la superficie del medio. Una vez realizada la siembra se procedió a colocar los discos de erytromicina en cuatro partes de la placa, se sellaron y se incubaron por 48 horas a 27 °C. Se usó una placa por aislamiento.

### **3.7.9 Producción y reducción de sustancias a partir de sacarosa**

Se preparó medio Sacarosa y reactivo Benedict's (Anexo 5), de acuerdo a lo indicado por Perombelon & Van Der Wolf en el 2002. Se tomó una masa bacteriana (incubada durante 48 horas a 28 °C en medio AN), se sembró en el medio sacarosa (3 ml/tubo) y se incubó a 28 °C por 48 horas. Luego de las 48 horas se agregó reactivo Benedict's (3ml/tubo) y se puso en baño María por 10 minutos.

## **3.8 Identificación molecular**

### **3.8.1 Extracción de ADN**

Se usó el Kit de extracción de ADN genómico GeneJET Genomic y el Kit DNA Purification (código: K0721, marca: ThermoScientific). El procedimiento y los materiales se detallan en el Anexo 6.

### **3.8.2 Calidad de ADN**

Se determinó la calidad de ADN para todas las muestras. Se realizó la corrida de electroforesis a 110V por 20 minutos y se colocó el gel de electroforesis sobre el transiluminador de luz azul para observar las bandas de ADN (Anexo 7).

### **3.8.3 PCR convencional para el primer general 16S**

Se realizó PCR usando los primers universales para 16S ARN, forward: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y reverse: 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (marca: IDTDNA), con los reactivos que se muestran en la Tabla N° 01 y el programa de la Tabla N° 02. El procedimiento y los materiales se detallan en el Anexo 8.

**Tabla 1. Reactivos y cantidades para PCR con el primer general 16S**

Reactivos	Volumen para 1X (uL)
Buffer PCR 1X	2.5
dNTP (2mM)	2.0
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1.25
Taq Platinum (5U/uL)	0.1
Primer 1492R (10 uM)	2.0
Agua (H <sub>2</sub> O)	10.15
ADN	5.0
TOTAL	25.0

**Tabla 2. Programa para PCR con el primer general 16S**

Procedimiento	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	94°C	2 minuto	1
Denaturación	94°C	1 minuto	
Annealing	55°C	1.5 minutos	35
Amplificación	72°C	1 minuto	
Amplificación final	72°C	3 minutos	1
Storage	4°C	∞	

Al término de la reacción de PCR, los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 2% (voltaje: 110V, Tiempo: 55 minutos) y un transiluminador de luz azul.

### 3.8.4 PCR convencional con el primer específico de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atroseptica*

Se usó los Cebadores o primers específicos ECA1F y ECA2R, forward: ECA1F (5'-CGGCATCATAAAAACG-3') y reverse: ECA2R (5'-GCACACTTCATCCAGCGA-3') (marca: Macrogen Inc). Los reactivos que se usaron se muestra en la Tabla N° 03 y se usó el programa de la Tabla N° 04. El procedimiento y los materiales se detallan en el Anexo 9.

**Tabla 3. Reactivos y cantidades para PCR con el primer específico para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atroseptica***

Reactivo	Volumen para 1X (uL)
Buffer PCR 1X	3.0
dNTP (2mM)	1.5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1.25
Taq Platinum (5U/uL)	0.1
Primer ECA1F (10 uM)	1.0
Primer ECA2R (10 uM)	1.0
Agua (H <sub>2</sub> O)	12.15
ADN	5.0
TOTAL	25.0

**Tabla 4. Programa para PCR con el primer específico para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atroseptica***

<b>Procedimiento</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Denaturación inicial	95°C	5 minuto	1
Denaturación	94°C	30 seg.	35
Annealing	62°C	45 seg.	
Amplificación	72°C	45 seg.	
Amplificación final	72°C	8 minutos	1
Storage	4°C	∞	

Al término de la reacción de PCR, los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 2% (voltaje: 110V, Tiempo: 55 minutos) en un transiluminador de luz azul.

### **3.8.5 PCR convencional con el primer específico de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum***

Se usó los Cebadores o primers específicos EXPCCF y EXPCCR, forward: EXPCCF (5'-GAACTTCGCACCGCCGACCTTCTA-3') y reverse: EXPCCR (5'-GCCGTAATTGCCTACCTGCTTAAG-3') (marca: Macrogen Inc.). Los reactivos que se usaron se muestra en la Tabla N° 05 y se usó el programa de la Tabla N° 06. El procedimiento y los materiales se detallan en el Anexo 10.

**Tabla 5. Reactivos y cantidades para PCR con el primer específico de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum***

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen para 1X (uL)</b>
Buffer PCR 1X	2.5
dNTP (2mM)	2.0
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1.25
Taq Platinum (5U/uL)	0.1
Primer EXPCCF (10 uM)	1.0
Primer EXPCCR (10 uM)	1.0
Agua (H <sub>2</sub> O)	12.15
ADN	5.0
TOTAL	25.0

**Tabla 6. Programa para PCR con el primer específico de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum***

<b>Procedimiento</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Denaturación inicial	94°C	4 minuto	1
Denaturación	94°C	1 minuto	
Annealing	60°C	1 minutos	35
Amplificación	72°C	2 minuto	
Amplificación final	72°C	7 minutos	1
Storage	4°C	∞	

Al término de la reacción de PCR, los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 2% (voltaje: 110V, Tiempo: 55 minutos) en un transiluminador de luz azul.

### **3.8.6 Secuenciamiento**

Los productos amplificados fueron cuantificados en el equipo ADN Qubit específicamente para ADN de doble cadena. Los productos de PCR se enviaron a secuenciar a la empresa coreana MacroGen Inc. (Anexo 11). El resultado del secuenciamiento se consideró óptimo cuando el valor de calidad fue mayor a 20 ( $QV \geq 20$ ). Para la identificación de especie las secuencias ensambladas debían de superar como mínimo los 800 pares de bases. El ensamblaje de las secuencias de ADN se realizó con el software BioEdit y fueron analizadas con el software BlastN. Se consideró identificada cuando la similaridad se ubicó por encima del 99%, la cobertura cercana a 100% y el e-value (valor estadístico) igual a 0 .

### **3.8.7 Análisis filogenético**

Se buscó y colectó secuencias de 16S rRNA de cepas bacterianas iguales a las identificadas, y otras que pertenecen al mismo género y de otros géneros distantes. Se realizó un alineamiento múltiple con el software bioinformático MUSCLE y MEGA 6.0. Luego se realizó un análisis filogenético con el algoritmo de reconstrucción filogenético Neighbor joining y la medida de distancia genética con el método Kimura-2 parameter. La construcción del árbol filogenético se realizó con un bootstrap de 1000 para el soporte estadístico (Anexo 12).

### 3.9 Control

#### 3.9.1 Control *In vitro*

Para la prueba de control *in vitro* se trabajó con el aislamiento CO1. Se usó tres fuentes de cobre, dos fuentes de calcio y un controlador biológico (Tabla N° 07).

**Tabla 7. Tratamientos para prueba de control *in vitro***

<b>Trat.</b>	<b>Ingrediente activo</b>	<b>Tienda Comercial</b>	<b>Dosis</b>
<b>T1</b>	Proteinato de cobre	Química Suiza	0.35 L./Cil.
<b>T2</b>	Sulfato de cobre pentahidratado	Sylvestre	0.5 L./Cil.
<b>T3</b>	Gluconato de cobre	Novalty	0.5 L./Cil.
<b>T4</b>	Nitrato de calcio (foliar)	Yara	2 gr./L.
<b>T5</b>	Nitrato de calcio (Suelo)	Yara	2 gr./L.
<b>T6</b>	Proteinato de calcio	Novalty	0.5 L./Cil.
<b>T7</b>	<i>Trichoderma</i> sp. (Cepa T22)	Sylvestre	1 gr./100 ml.
<b>T0</b>	Testigo	-	-

Se realizó dos pruebas: Prueba de medio envenenado y Prueba de enfrentamiento.

#### **a. Prueba de medio envenenado**

Para esta prueba se usó siete matraces y en cada uno se preparó 250 ml de medio AN (se esterilizó a 120 °C por 30 minutos). Luego de la esterilización al estar el medio a una temperatura de 50 °C se agregó el producto químico, se mezcló y se procedió a plaquear. Se preparó una suspensión bacteriana de 10<sup>6</sup> UFC (DO=0.199 a 600 nm de longitud de onda). Se dejó secar las placas por tres horas y se procedió a sembrar con 0.1 ml. de la suspensión bacteriana, con un triángulo de Drigalsky se dispersó la suspensión en toda la placa (cinco placas por tratamiento). Se incubó a 28 °C por 48 horas.

#### **b. Prueba de enfrentamiento**

Esta prueba se realizó en dos medios; el medio AN y PDA (Papa Dextrosa Agar). Se preparó 250 ml de cada medio (se esterilizó a 120 °C por 30 minutos). Con un plumón se dividió la placa en dos partes iguales, en una parte se colocó un disco del cultivo de *Trichoderma* Cepa T22 (cultivo de 96 horas) activado del producto comercial. En la otra parte de la placa, con un asa de Kolle se tomó suspensión bacteriana (10<sup>2</sup> UFC) y se trazó una línea. Se incubó a 28 °C por 96 horas. Se trabajó con cinco placas para cada medio de cultivo.

### **3.9.2 Control en campo**

Se trabajó con 28 tratamientos (Tabla N° 08) y cuatro bloques. Los productos usados se aplicaron de la siguiente manera: Se realizó dos aplicaciones en drench de la Cepa T22 de *Trichoderma*; La primera, en los hoyos que se realizaron un día antes del trasplante de los plantines de alcachofa variedad Imperial Condor, en horas de la tarde (cuando el sol ya se había ocultado). El trasplante se realizó el 24 de abril del 2018. La segunda aplicación se realizó 15 días después de la primera. Tres aplicaciones de Nitrato de calcio al suelo; La primera 13 días antes de la primera aplicación del ácido giberélico (19 de junio), la segunda 13 días antes del segundo giberélico (02 julio) y la tercera 14 días antes del tercer giberélico (17 de julio). El Nitrato de calcio foliar se aplicó siete veces, tres aplicaciones antes del primer giberélico (con intervalos de tres días), dos aplicaciones antes del segundo giberélico y otras dos aplicaciones, antes del tercer giberélico (las cuatro últimas con intervalos de siete días). El Proteinato de Calcio se aplicó cinco veces, la primera aplicación siete días antes del primer giberélico y las demás cada siete días hasta el tercer giberélico. Se realizaron tres aplicaciones con tres productos a base de cobre: Proteinato de cobre, Sulfato de cobre pentahidratado y Gluconato de cobre; estos se aplicaron cuatro días antes de la aplicación del giberélico. Se trabajó con 10 plantas por tratamiento.

**Tabla 8. Tratamientos para la prueba de control en campo**

Suelo	Trat.	Productos comerciales	Dosis
Campo común Sin Biocontrolador (Suelo)	T1	Proteinato de Cu (Foliar)	0.35 L./Cil.
	T2	Sulfato de Cobre Pentahidratado (Foliar)	0.5 L./Cil.
	T3	Gluconato de Cu (Foliar)	0.5 L./Cil.
	T4	Nitrato de Ca (Foliar)	2 gr./L.
	T5	Nitrato de Ca (suelo)	1 gr./0.5L.
	T6	Proteinato de Ca (Foliar)	0.5 L./Cil.
	T7	Testigo Absoluto	-
<i>Trichoderma</i> sp. (Cepa T22) 0.5 L./Ha. (Suelo)	T8	Proteinato de Cu (Foliar)	0.35 L./Cil.
	T9	Sulfato de Cobre Pentahidratado (Foliar)	0.5 L./Cil.
	T10	Gluconato de Cu (Foliar)	0.5 L./Cil.
	T11	Nitrato de Ca (Foliar)	2 gr./L.
	T12	Nitrato de Ca (suelo)	1 gr./0.5L.
	T13	Proteinato de Ca (Foliar)	0.5 L./Cil.
	T14	Solo <i>Trichoderma</i> sp. (Cepa T22)	0.5 L./Ha.
<i>Trichoderma</i> sp. (Cepa T22) 1.0 L./Ha. (Suelo)	T15	Proteinato de Cu	0.35 L./Cil.
	T16	Sulfato de Cobre Pentahidratado	0.5 L./Cil.
	T17	Gluconato de Cu	0.5 L./Cil.
	T18	Nitrato de Ca foliar	2 gr./L.
	T19	Nitrato de Ca suelo	1 gr./0.5L.
	T20	Proteinato de Ca	0.5 L./Cil.
	T21	Solo <i>Trichoderma</i> sp. (Cepa T22)	1.0 L./Ha
<i>Trichoderma</i> sp. (Cepa T22) 2.0 L./Ha. (Suelo)	T22	Proteinato de Cu	0.35 L./Cil.
	T23	Sulfato de Cobre Pentahidratado	0.5 L./Cil.
	T24	Gluconato de Cu	0.5 L./Cil.
	T25	Nitrato de Ca foliar	2 gr./L.
	T26	Nitrato de Ca suelo	2 gr./L.
	T27	Proteinato de Ca	0.5 L./Cil.
	T28	Solo <i>Trichoderma</i> sp. (Cepa T22)	2.0 L./Ha

### 3.10 Cosecha

Se cosecho cinco plantas por cada tratamiento en tres bloques, las plantas se marcaron y en las ocho cosechas se evaluó el calibre, peso y número de capítulos por planta.

## IV. RESULTADOS

### 4.2 Descripción de síntomas

Se identificó el síntoma de pudrición húmeda en dos partes:

#### 4.2.1 Pudrición húmeda en el cuello

En el campo se presentan plantas tumbadas muertas (Figura 1), con una distribución desuniforme, la mayoría de las veces sin síntoma visible, en algunos casos si las condiciones son favorables (humedad alta del suelo y lluvias) en las hojas basales se puede observar una pudrición húmeda de color negro y consistencia blanda (Figura 2). Las plantas tumbadas se presentan en mayor cantidad después de las aplicaciones del ácido giberélico y en días muy calurosos. El síntoma es progresivo, inicia con un decaimiento de las hojas basales, a veces acompañado por un amarillamiento y termina con el tumbado de la planta. Al extraer la planta y hacer un corte en el cuello se puede ver la pudrición blanda y húmeda de color crema a marrón claro, que después de unos minutos se torna de color marrón oscuro (Figura 3).



**Figura 1. Planta de alcachofa tumbada por la pudrición en el cuello.**



**Figura 2. Pudrición blanda en las hojas basales y coloración negra de los peciolo.**



**Figura 3. Planta de alcachofa cortada por la mitad, se evidencia la pudrición blanda en el cuello.**

#### **4.2.2 Pudrición húmeda en el cogollo**

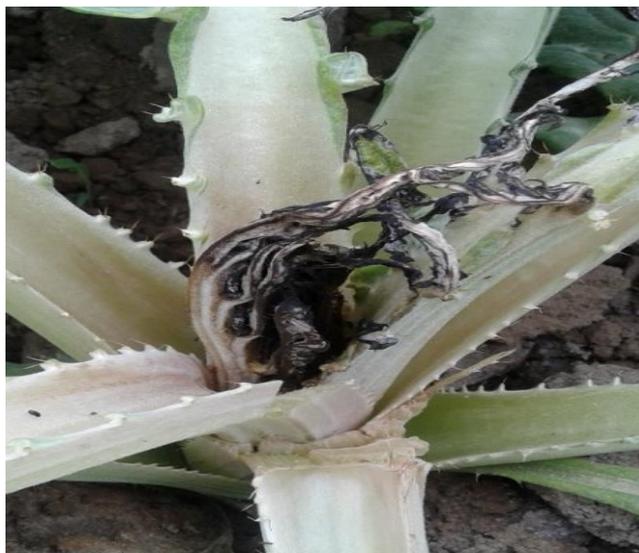
Esta pudrición se puede ver mayormente en las hojas tiernas del cogollo (Figura 4), pero también se presenta en las hojas no tan tiernas (Figura 5). El síntoma a este nivel se manifiesta con mayor frecuencia en los meses de mayo a julio, meses en los que hay presencia de precipitaciones y garuas, también después de las aplicaciones del ácido giberélico. Este síntoma, puede presentarse en todas las plantas del campo. Inicia en el borde de las hojas jóvenes como manchas necróticas acuosas, avanza de manera descendente hasta llegar al cogollo de la planta llegando a comprometer la formación del primer capítulo (Figura 6), y puede matar a la planta.



**Figura 4. Hojas tiernas con síntoma de pudrición húmeda**



**Figura 5. Pudricion húmeda en hojas no tan tiernas descendiendo al cogollo de la planta.**



**Figura 6. Pudrición húmeda comprometiendo la formación del primer capítulo.**

#### **4.3 Obtención de aislamientos**

Se obtuvo ocho aislamientos, cuyas características morfológicas se asemejan a las descritas para las colonias del género *Pectobacterium*. En medio agar nutritivo las colonias son circulares lisas, margen entero, de color blanco a cremoso, ligeramente elevadas, convexas y semitranslúcidas. De los ocho aislamientos cuatro se obtuvieron del cuello (CU1, CU2, CU3 y CU4), y cuatro del cogollo (CO1, CO2, CO3 y CO4).

#### **4.4 Prueba de patogenicidad**

La prueba de patogenicidad se realizó con los ocho aislamientos: CU1, CU2, CU3, CU4, CO1, CO2, CO3 y CO4. En esta prueba solo se evaluó la incidencia de la enfermedad (presencia o ausencia del síntoma).

En la inoculación al cogollo los primeros síntomas se evidenciaron después de las 48 horas. En los bordes de las hojas tiernas del cogollo se manifestó una ligera necrosis acuosa de color negro. Después de cuatro días los aislamientos CO3, CU2, CU3 y CU4, llegaron a dañar aproximadamente el 40 por ciento de las hojas tiernas del cogollo, y solo el aislamiento CO1, llegó a dañar todo el cogollo.

La pudrición en el cuello se evaluó cinco días después de la inoculación. Tres de cuatro plantas inoculadas con el aislamiento CO1 y dos de cuatro plantas inoculadas con el

aislamiento CU2 se tumbaron antes de ser extraídas. Al realizar el corte en el cuello de las plantas de alcachofa, las inoculadas con los aislamientos CO1, CO3, CU2 y CU3 mostraron pudrición avanzada del cuello (50 por ciento aproximadamente). Mientras que en las plantas inoculadas con el aislamiento CU4 la pudrición fue leve (20 por ciento aproximadamente).

**Tabla 9. Resultados de la prueba de patogenicidad en plantas de alcachofa, síntoma en el cogollo (CO) y en el cuello (CU).**

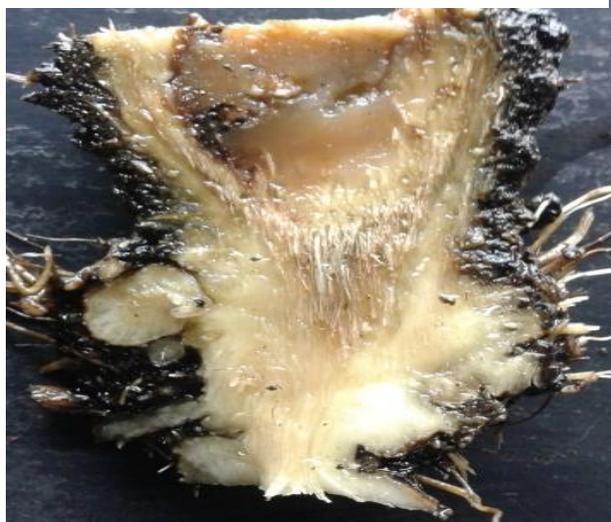
Aislamientos	Prueba de Patogenicidad	
	Cuello	Cogollo
CO1	+	+
CO2	-	-
CO3	+	+
CO4	-	-
CU1	-	-
CU2	+	+
CU3	+	+
CU4	+	+



**Figura 7. Hojas tiernas con síntoma de necrosis acuosa en los bordes**



**Figura 8. Peciolos de hojas basales con síntoma de pudrición húmeda de color negro.**

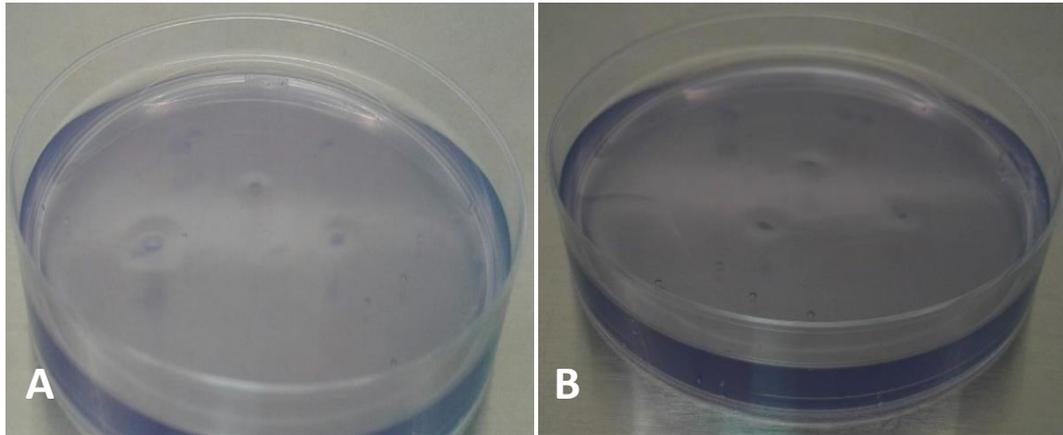


**Figura 9. Corte a nivel de cuello con síntoma evidente de pudrición blanda.**

## **4.5 Identificación fenotípica**

### **4.5.1 Crecimiento en medio Cristal Violeta Pectato (CVP)**

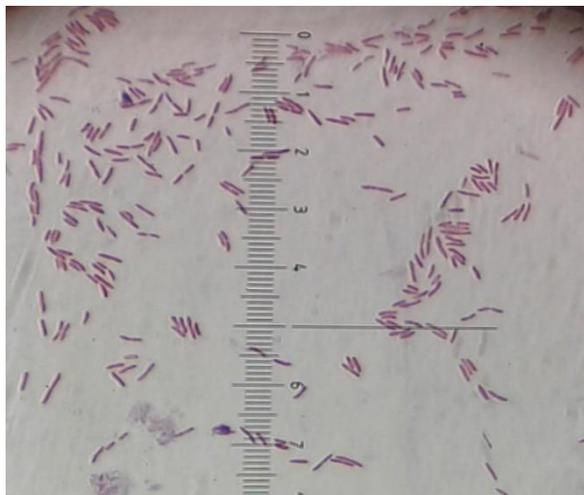
Este medio se usó para determinar si las bacterias pertenecían al género *Pectobacterium* y también como medio selectivo. Los ocho aislamientos se sembraron en este medio y se evaluó la formación de hoyos o cavidades (Figura 10). Considerándose positiva (+) la presencia de hoyos y negativa (-) la ausencia. Los aislamientos CO1, CO3, CO4, CU2, CU3 y CU4 fueron positivos y los aislamientos CO2 y CU1 fueron negativos. (Tabla N° 10)



**Figura 10. A y B placas con medio CVP donde se evidencia la formación de hoyos por el aislamiento CO1.**

#### **4.5.2 Tinción Gram**

Los ocho aislamientos mostraron una coloración rosado-grosella (Figura 11), característico de las bacterias Gram-negativas (Tabla N° 10).



**Figura 11. Tinción Gram-negativa del aislamiento CO1, cultivo de 24 horas (Aumento 100X)**

#### **4.5.3 Degradación de láminas de papa**

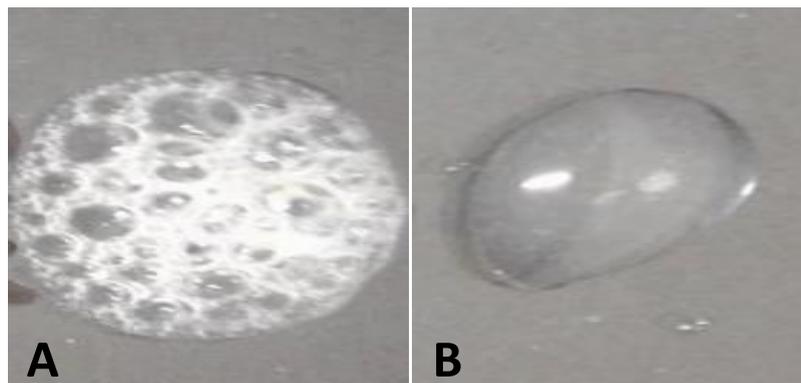
En esta prueba los aislamientos CO1, CO3, CU2, CU3 y CU4 degradaron las láminas de papa, por efecto de las enzimas pectinolíticas de los aislamientos (Figura 12). Mientras que, los aislamientos CO2, CO4 y CU1 fueron negativos (Tabla N° 10).



**Figura 12. Lámina de papa inoculada con el aislamiento CO3, se muestra la pudrición blanda.**

#### **4.5.4 Prueba de catalasa**

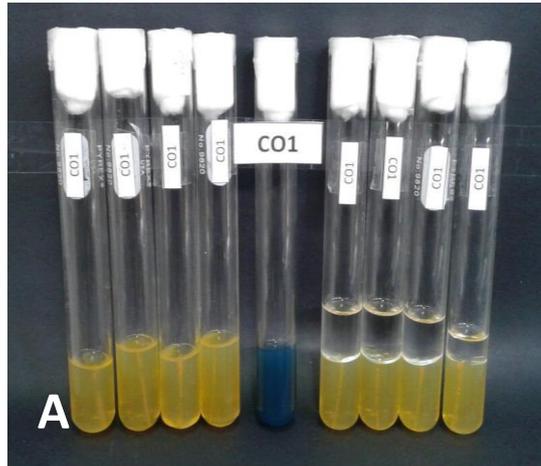
En esta prueba los aislamientos CO1, CO3, CO4, CU1, CU2, CU3 y CU4 fueron positivos, los aislamientos en contacto con el peróxido de hidrógeno formaron burbujas (la enzima catalasa separa el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno por lo que hay formación de burbujas), Solo el aislamiento CO2 fue negativo (Tabla N° 10), no formó burbujas (Figura 13).



**Figura 13. A. Formación de burbujas respuesta positiva con el aislamiento CU1 B. Respuesta negativa con el aislamiento CO2.**

#### **4.5.5 Prueba de oxidación y fermentación**

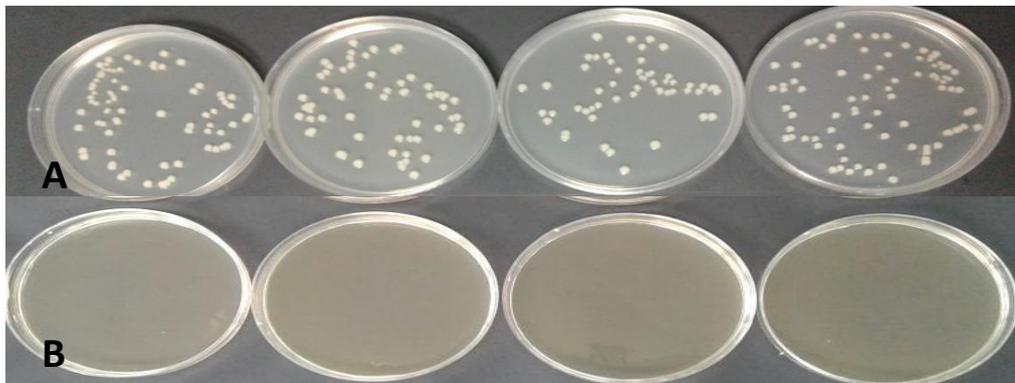
Los aislamientos CO1, CO3, CO4, CU2, CU3 y CU4 fueron positivos (Figura 14), lograron cambiar el color del medio de azul a amarillo, en condición aerobia (oxidación) y anaerobia (fermentación). Los aislamientos CO2 y CU1 fueron negativos en esta prueba (Tabla N° 10).



**Figura 14. A. Respuesta positiva, cambio de color del medio con el aislamiento CO1.**

#### **4.5.6 Crecimiento a 27 y 37 °C**

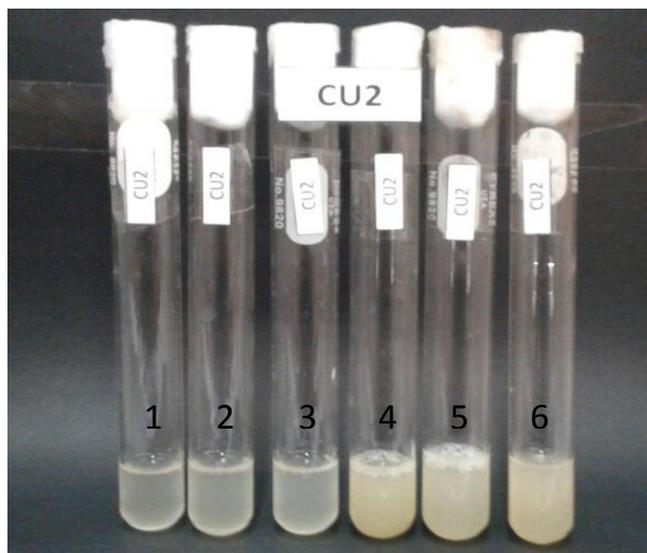
En esta prueba los ocho aislamientos crecieron a 27 °C y solo seis aislamientos crecieron a 37 °C: CO1, CO3, CO4, CU2, CU3 y CU4; mientras que, el CO2 y CU1 no crecieron a dicha temperatura (Tabla N° 10).



**Figura 15. A. Crecimiento de colonias del aislamiento CU1 a 27 °C y B. No hubo crecimiento de colonias del aislamiento CU1 a 37 °C.**

#### **4.5.7 Crecimiento en 5% de cloruro de sodio (NaCl)**

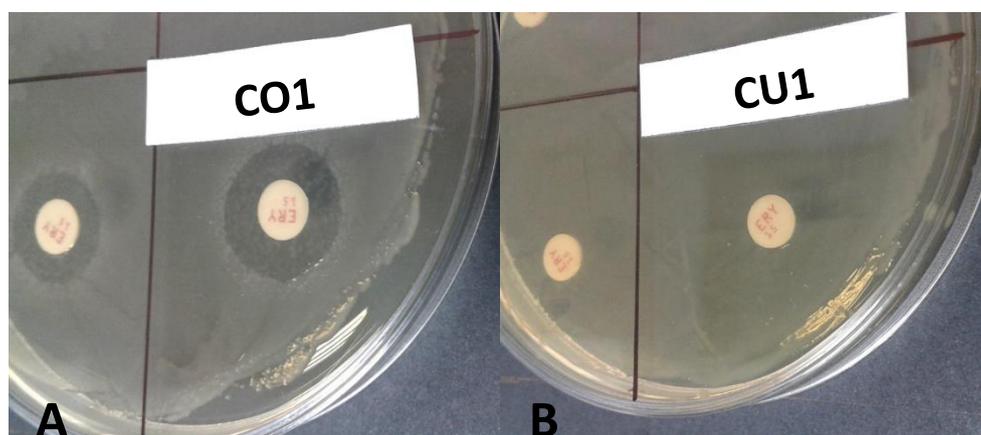
Los ocho aislamientos crecieron en el medio con 5% de NaCl (Figura 16), fueron positivos (Tabla N° 10).



**Figura 16. Tubos 1, 2 y 3 testigos, tubos 4, 5 y 6 medio con NaCl al 5% sembrado con aislamiento CU2 al séptimo día de incubación.**

#### **4.5.8 Sensibilidad a la erytromicina**

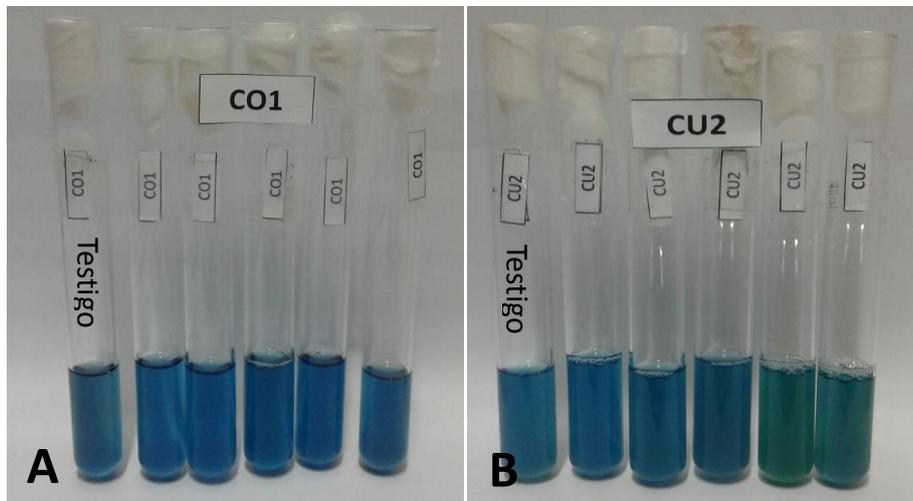
Esta es una de las pruebas que se usa para determinar las subespecies del género *Pectobacterium*. Los aislamientos CO1, CO3, CU2 y CU3 fueron positivos, detuvieron el crecimiento de la bacteria por efecto del antibiótico, formando un halo de crecimiento alrededor del disco; mientras que, los aislamientos CO2, CO4, CU1 y CU4 fueron negativos (Tabla N° 10). En la Figura 17 se puede observar las reacciones de los aislamientos en prueba.



**Figura 17. A. Formación de halo del aislamiento CO1. B. Crecimiento normal del aislamiento CU1.**

#### 4.5.9 Producción y reducción de sustancias a partir de sacarosa

Los ocho aislamientos dieron un resultado negativo (Tabla N° 10), el color azul del medio (Figura 18) no viró al color amarillo después del baño María, no hubo reducción de sustancias a partir de la sacarosa.



**Figura 18. A y B. Medio sacarosa más reactivo Benedict's con aislamiento CO1 y CU2 ambos con respuesta negativa.**

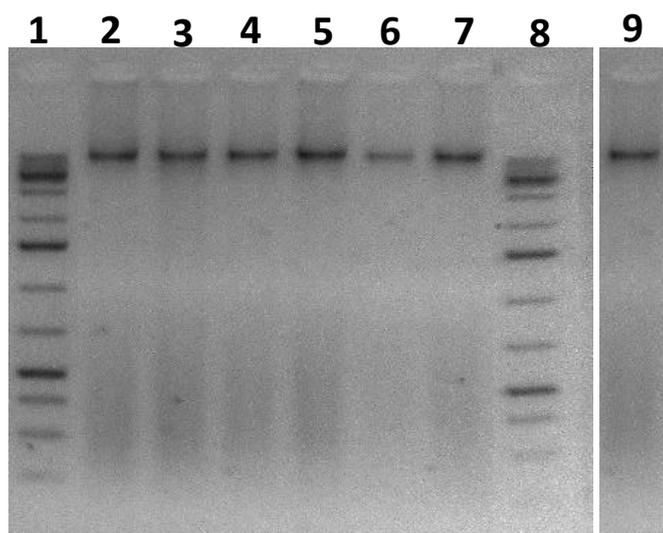


## 4.6 Identificación molecular

Con esta prueba se llegó a identificar los seis aislamientos: CO1, CO3, CO4, CU1, CU2 y CU4 a nivel de género, especie y subespecie.

### 4.6.1 Extracción y calidad de ADN

Se logró extraer el ADN de los siete aislamientos de manera exitosa, por lo que se observó la presencia de bandas de ADN en el gel de agarosa al 1%. Observándose bandas de ADN con más de 20,000 pares de bases (Figura 19).



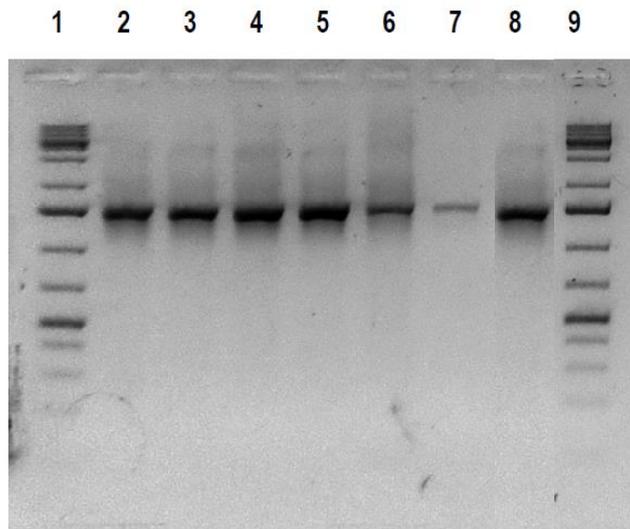
**Figura 19. Calidad de ADN revelado mediante electroforesis**

Leyenda:

- |                                      |                                      |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1- Marcador de peso molecular de 1Kb | 2- ADN de la muestra JC01            |
| 3- ADN de la muestra JC03            | 4- ADN de la muestra JC04            |
| 5- ADN de la muestra JCU1            | 6- ADN de la muestra JCU2            |
| 7- ADN de la muestra JCU4            | 8- Marcador de peso molecular de 1Kb |
| 9- ADN de la muestra JCU3            |                                      |

### 4.6.2 PCR convencional para el primer general 16S

Con el primer general 16S ARN (forward 27R y reverse 1492R), si hubo producto amplificado para los siete aislamientos (Figura 20).



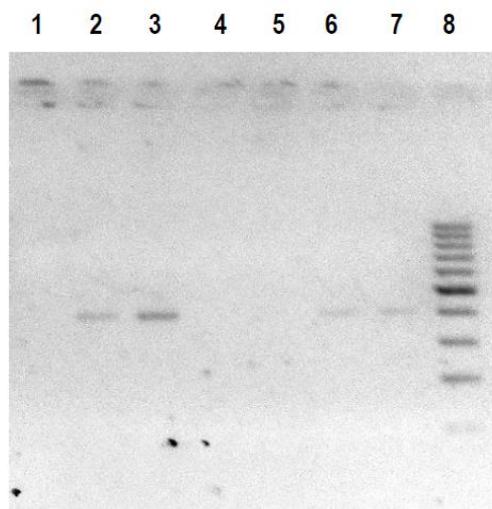
**Figura 20. Productos de PCR amplificados para el gen 16S rRNA**

Leyenda:

- |                    |                |
|--------------------|----------------|
| 1. Marcador de 1Kb | 2. Muestra CO1 |
| 3. Muestra CO3     | 4. Muestra CO4 |
| 5. Muestra CU1     | 6. Muestra CU2 |
| 7. Muestra CU4     | 8. Muestra CU3 |
| 9. Marcador de 1Kb |                |

#### **4.6.3 PCR convencional con los primers específicos de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atroseptica***

En la Figura 21 se puede ver una banda de amplificación tenue de los aislamientos CO1, CO3, CU2 y CU4, que indicaría que los aislamientos son de la subespecie *atroseptica*, sin embargo el número de pares de bases que amplificó no correspondió a esta subespecie.



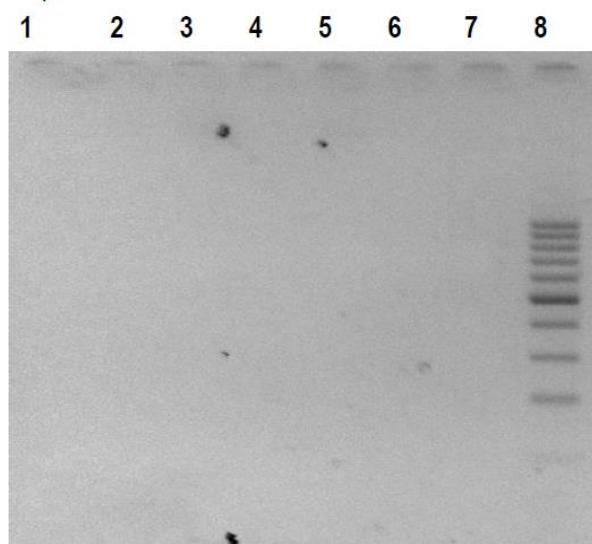
**Figura 21. Evaluación de las muestras por PCR convencional con los primers ECA1F/ECA2R**

Leyenda:

- 1- Control negativo
- 2- Muestra CO1 evaluada con los primers ECA1F/ECA2R
- 3- Muestra CO3 evaluada con los primers ECA1F/ECA2R
- 4- Muestra CO4 evaluada con los primers ECA1F/ECA2R
- 5- Muestra CU1 evaluada con los primers ECA1F/ECA2R
- 6- Muestra CU2 evaluada con los primers ECA1F/ECA2R
- 7- Muestra CU4 evaluada con los primers ECA1F/ECA2R
- 8- Marcador de Peso molecular de 100pb.

#### 4.6.4 PCR convencional con los primers específicos de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

No hubo producto de PCR con ninguno de los seis aislamientos (Figura 22), por lo que se descartó la presencia de esta subespecie.



**Figura 22. Evaluación de las muestras por PCR convencional con los primers EXPCCF/EXPCCR**

Leyenda:

1. Control negativo
2. Muestra CO1 evaluada con los primers EXPCCF/EXPCCR
3. Muestra CO3 evaluada con los primers EXPCCF/EXPCCR
4. Muestra CO4 evaluada con los primers EXPCCF/EXPCCR
5. Muestra CU1 evaluada con los primers EXPCCF/EXPCCR
6. Muestra CU2 evaluada con los primers EXPCCF/EXPCCR
7. Muestra CU4 evaluada con los primers EXPCCF/EXPCCR
8. Marcador de peso molecular de 100 pb.

#### 4.6.5 Secuenciamiento

Se secuenció los productos de PCR de los siete aislamientos con el primer 16S rRNA y la muestra CO3 con los primers ECA1F/ECA2R, cuyos valores de calidad fueron mayor a 20 ng/uL (Tabla N°11).

**Tabla 11. Cuantificación de los productos de PCR**

Muestra	Cuantificación (ng/uL)
CO1-16S	65 ng/uL
CO3-16S	75 ng/uL
CO4-16S	72 ng/uL
CU1-16S	81 ng/uL
CU2-16S	76 ng/uL
CU3-16S	71 ng/uL
CU4-16S	36 ng/uL
CO3-16S	25 ng/uL

Las muestras evaluadas tuvieron una cobertura mayor 1100 pb (Tabla N°12)

**Tabla 12. Cobertura de las secuencias (QV≥20) de los aislamientos.**

Muestra	Tamaño en pb (Qv ≥ 20)
CO1 – 16S	1150
CO3 – 16S	1230
CO4 – 16S	1381
CU1 – 16S	1407
CU2 – 16S	1383
CU3 – 16S	1340
CU4 – 16S	1082
CO3 – ECA	238

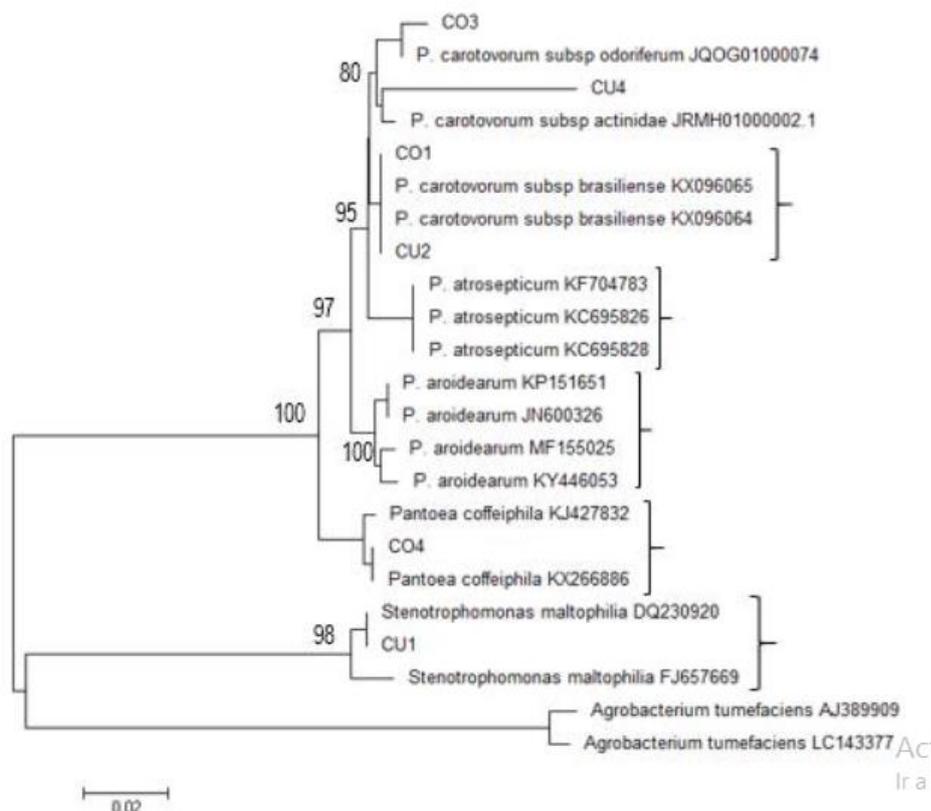
La identificación molecular obtuvo significancia estadística, todos los productos de PCR lograron ser identificados (Tabla N° 13). El producto de PCR con los primers ECA amplificó un producto inespecífico y con el secuenciamiento se logró evidenciar que el producto inespecífico pertenece al género *Pectobacterium*.

**Tabla 13. Identificación de aislamientos**

<b>Nombre</b>	<b>Cobertura</b>	<b>e-value</b>	<b>Similaridad (%)</b>	<b>Identificación</b>
<b>CO1- 16S</b>	78.40%	0	99.56	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp <i>brasiliense</i>
<b>CO3 – 16S</b>	92.50%	6.00E-100	99.56	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp <i>odoriferum</i>
<b>CO4 – 16S</b>	94.20%	0	98.98	<i>Pantoea coffeiphila</i>
<b>CU1 – 16S</b>	95.60%	0	99.93	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<b>CU2 – 16S</b>	94.50%	0	99.35	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp <i>brasiliense</i>
<b>CU3 – 16S</b>	94.30%	0	99.63	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp <i>brasiliense</i>
<b>CU4 – 16S</b>	98.70%	0	99.99	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp <i>actinidae</i>
<b>ECA</b>	----	0	100%	<i>Pectobacterium carotovorum/atrosepticum</i>

#### **4.6.6 Análisis filogenético**

El análisis filogenético realizado mostró las relaciones evolutivas de las cepas aisladas, todos los nodos filogenéticos tuvieron resultados robustos. Se ubicaron secuencias de 16S rRNA modelo para las especies: *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*, *P. carotovorum* subsp. *actinidae*, *Pantoea coffeiphila* y *Stenotrophomona maltophilia*. El soporte estadístico del árbol filogenético fue robusto (Figura 23).



**Figura 23. Árbol filogenético de las muestras aisladas.**

#### 4.7 Prueba de control

##### 4.7.1 Prueba de control *in vitro*

Se trabajó con el aislamiento CO1.

##### a. Prueba de medio envenenado

De acuerdo al análisis de varianza (Tabla N° 14), el nivel de significancia es menor a 0.05, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna, lo que nos indica que por lo menos uno de los tratamientos es diferente. En la prueba de Tukey (Tabla N° 15), podemos ver que el tratamiento T0 (testigo) es el que presentó mayor cantidad de UFC, seguido de los tratamientos; T4 (Nitrato de calcio foliar 2 gr/L.), T5 (Nitrato de calcio al suelo 1gr/L.) y T6 (Proteinato de calcio 500ml/cil.). Por otra parte, los que presentaron el mejor control fueron los tratamientos a base de cobre; T1 (Proteinato de Cobre), T2 (Sulfato de Cobre pentahidratado) y T3 (Gluconato de Cobre), en los que no hubo crecimiento de colonias (Figura 24).

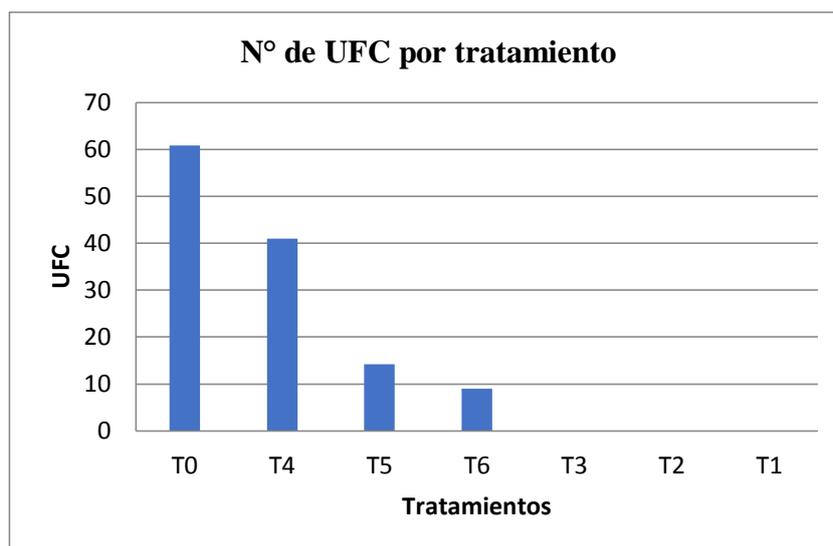
**Tabla 14. Análisis de varianza para la prueba de medio envenenado**

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Valor-F	Valor-P
<b>Trat.</b>	6	17140	2856.78	135.21	0.000
<b>Error</b>	28	591.6	21.13		
<b>Total</b>	34	17732.3			

**CV=6.8%**

**Tabla 15. Prueba de Tukey para la prueba de medio envenenado**

Tratamientos	N°	Media	Agrupamiento
T0 Testigo	5	60.8	A
T4 Nitrato Ca foliar	5	41	B
T5 Nitrato Ca suelo	5	14.2	C
T6 Proteinato de Ca	5	9	C D
T3 Gluconato Cu	5	0	D
T2 Sulfato Cu pentahidratado	5	0	D
T1 Proteinato Cu	5	0	D



**Figura 24. Control *in vitro* del aislamiento CO1**

**b. Prueba de enfrentamiento**

Se evaluó el crecimiento del biocontrolador *Trichoderma* (Cepa T22), en los medios PDA y AN. En el medio PDA el crecimiento promedio diario fue de 2.3 cm., la bacteria y el biocontrolador entraron en contacto dos días después de la siembra, al tercer día *Trichoderma* creció sobre la bacteria y al cuarto día el biocontrolador llenó la placa (Figura

25). En el medio AN el crecimiento promedio diario de *Trichoderma* fue de 1.7 cm., la bacteria y el biocontrolador entraron en contacto al tercer día y al quinto día llenó la placa.



**Figura 25. Prueba de enfrentamiento *Trichoderma* y aislamiento CO1 en medio PDA.**

#### 4.7.2 Prueba de control en campo

Se evaluó la incidencia de la pudrición blanda a nivel del cuello y del cogollo.

##### a. Control de la pudrición blanda del cuello

De acuerdo al análisis de varianza (Tabla N° 16), sí existe diferencia significativa entre los tratamientos (valor de  $P=0.004$ ), pero no existe diferencia significativa entre bloques (valor de  $P=0.180$ ). En la prueba de Tukey (Tabla N° 17), podemos ver que el tratamiento T7 (testigo), es el que presentó mayor número de plantas enfermas y los tratamientos: T3 (Gluconato de Cu), T28 (*Trichoderma* 2.0 L./Ha), T27 (Proteinato de Ca+ *Trichoderma* 2L/Ha), T22 (Proteinato de Cu+ *Trichoderma* 2L/Ha), T17 (Gluconato de Cu+ *Trichoderma* 1L/Ha), T14 (*Trichoderma* 1L/Ha), T10 (Gluconato de Cu+ *Trichoderma* 0.5L/Ha) y T21 (*Trichoderma* 1L/Ha), fueron los que presentaron un mejor control o menor número de plantas enfermas (Figura 26).

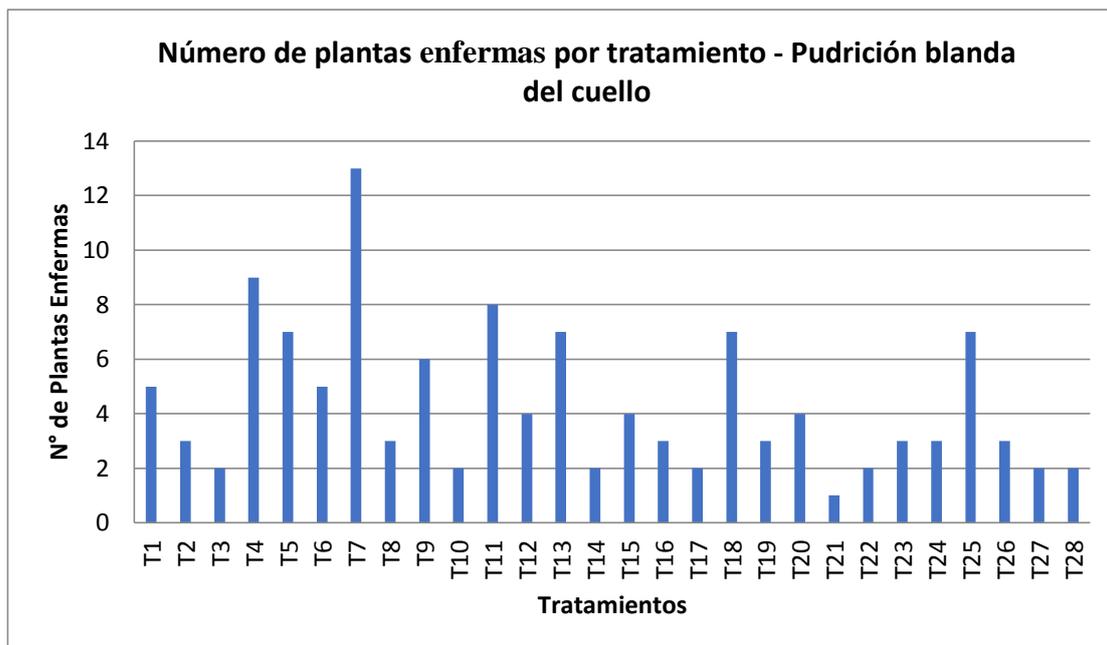
**Tabla 16. Análisis de Varianza para la prueba de control de la pudrición húmeda del cuello**

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Valor-F	Valor-P
Bloque	3	5.506	1.835	1.66	0.180
Trat.	27	51.11	1.8929	2.15	0.004
Error	84	74.00	0.8810		
Total	111	125.11			

**CV= 29.6%**

**Tabla 17. Comparación de Tukey para la prueba de control de la pudrición húmeda del cuello**

	<b>Tratamientos</b>	<b>N°</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupamiento</b>	
<b>T7</b>	Testigo	4	3.25	A	
<b>T11</b>	Nitrato Ca Foliar + Trichoderma 0.5 L/Ha	4	2	A	B
<b>T5</b>	Nitrato Ca Suelo	4	1.75	A	B
<b>T25</b>	Nitrato Ca Foliar + Trichoderma 2 L/Ha	4	1.75	A	B
<b>T18</b>	Nitrato Ca Foliar + Trichoderma 1 L/Ha	4	1.75	A	B
<b>T13</b>	Proteinato Ca + Trichoderma 0.5 L/Ha	4	1.75	A	B
<b>T9</b>	Sulfato de Cu Pentahidratado + Trichoderma 0.5 L/Ha	4	1	A	B
<b>T6</b>	Proteinato de Ca	4	1.25	A	B
<b>T1</b>	Proteinato de Cu	4	1.25	A	B
<b>T20</b>	Proteinato Ca + Trichoderma 1 L/Ha	4	1	A	B
<b>T15</b>	Proteinato de Cu + Trichoderma 1 L/Ha	4	1	A	B
<b>T12</b>	Nitrato Ca Suelo + Trichoderma 0.5 L/Ha	4	0.75	A	B
<b>T8</b>	Proteinato de Cu + Trichoderma 0.5 L/Ha	4	0.75	A	B
<b>T26</b>	Nitrato Ca Suelo + Trichoderma 2 L/Ha	4	0.75	A	B
<b>T24</b>	Gluconato de Cu + Trichoderma 2 L/Ha	4	0.75	A	B
<b>T23</b>	Sulfato de Cu Pentahidratado + Trichoderma 2 L/Ha	4	0.75	A	B
<b>T2</b>	Sulfato de Cu Pentahidratado	4	0.75	A	B
<b>T19</b>	Nitrato Ca Suelo + Trichoderma 1 L/Ha	4	0.75	A	B
<b>T16</b>	Sulfato de Cu Pentahidratado + Trichoderma 1 L/Ha	4	0.75	A	B
<b>T3</b>	Gluconato de Cu	4	0.5	B	
<b>T28</b>	Trichoderma 2.0 L./Ha	4	0.5	B	
<b>T27</b>	Proteinato de Ca+ Trichoderma 2L/Ha	4	0.5	B	
<b>T22</b>	Proteinato de Cu+ Trichoderma 2L/Ha	4	0.5	B	
<b>T17</b>	Gluconato de Cu+ Trichoderma 1L/Ha	4	0.5	B	
<b>T14</b>	Trichoderma 1L/Ha	4	0.5	B	
<b>T10</b>	Gluconato de Cu+ Trichoderma 0.5L/Ha	4	0.5	B	
<b>T21</b>	Trichoderma 1L/Ha	4	0.5	B	



**Figura 26. Número de plantas enfermas por tratamiento, prueba de control de la pudrición húmeda del cuello**

**b. Control de la pudrición blanda del cogollo**

De acuerdo al análisis de varianza (Tabla N° 18), existe diferencia significativa entre tratamientos y entre bloques (para tratamientos  $P=0.000$  y para bloques  $P=0.013$ ). En el cuadro comparativo de Tukey (Tabla N° 19), se puede observar que el tratamiento T7 (testigo) es el que presentó el mayor número de plantas enfermas. No hubo diferencia entre los demás tratamientos, pero se puede resaltar que los tratamientos: T27 (Proteinato de Ca + *Trichoderma* 2L/Ha), T26 (Nitrato Ca Suelo + *Trichoderma* 2 L/Ha), T24 (Gluconato de Cu + *Trichoderma* 2 L/Ha), T10 (Gluconato de Cu + *Trichoderma* 0.5L/Ha) y T9 (Sulfato de Cu Pentahidratado + *Trichoderma* 0.5 L/Ha), fueron los que presentaron un menor número de plantas enfermas (Figura 27).

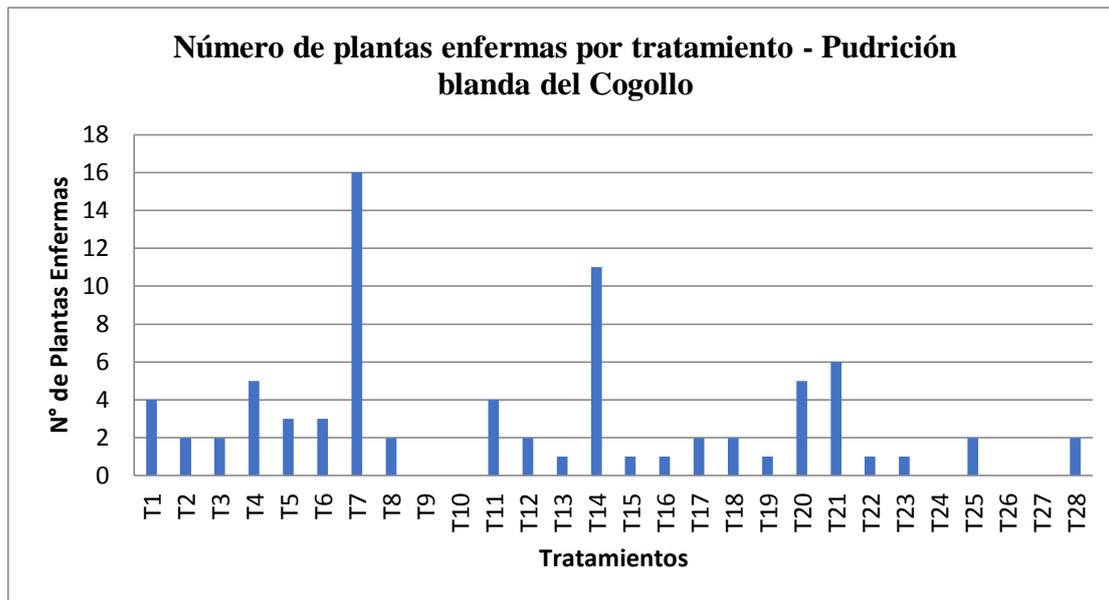
**Tabla 18. Análisis de varianza para la prueba de control de la pudrición húmeda del cogollo**

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Valor-F	Valor-P
<b>Bloque</b>	3	5.384	1.7946	3.84	0.013
<b>Trat.</b>	27	82.027	3.0380	6.50	0.000
<b>Error</b>	81	37.866	0.4675		
<b>Total</b>	111	125.277			

**CV=30.6%**

**Tabla 19. Comparación de Tukey para la prueba de control de la pudrición húmeda del cogollo**

	<b>Tratamientos</b>	<b>N°</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupamiento</b>	
<b>T7</b>	Testigo	4	4	A	
<b>T14</b>	Trichoderma 1L/Ha	4	2.75	A	B
<b>T21</b>	Trichoderma 1L/Ha	4	1.5	B	C
<b>T20</b>	Proteinato Ca + Trichoderma 1 L/Ha	4	1.25	B	C
<b>T4</b>	Nitrato de Ca Foliar	4	1.25	B	C
<b>T11</b>	Nitrato Ca Foliar + Trichoderma 0.5 L/Ha	4	1	B	C
<b>T1</b>	Proteinato de Cu	4	1	B	C
<b>T6</b>	Proteinato de Ca	4	0.75	C	
<b>T5</b>	Nitrato Ca Suelo	4	0.75	C	
<b>T28</b>	Trichoderma 2.0 L./Ha	4	0.5	C	
<b>T25</b>	Nitrato Ca Foliar + Trichoderma 2 L/Ha	4	0.5	C	
<b>T18</b>	Nitrato Ca Foliar + Trichoderma 1 L/Ha	4	0.5	C	
<b>T17</b>	Gluconato de Cu+ Trichoderma 1L/Ha	4	0.5	C	
<b>T12</b>	Nitrato Ca Suelo + Trichoderma 0.5 L/Ha	4	0.5	C	
<b>T8</b>	Proteinato de Cu + Trichoderma 0.5 L/Ha	4	0.5	C	
<b>T3</b>	Gluconato de Cu	4	0.5	C	
<b>T2</b>	Sulfato de Cu Pentahidratado	4	0.5	C	
<b>T23</b>	Sulfato de Cu Pentahidratado + Trichoderma 2 L/Ha	4	0.25	C	
<b>T22</b>	Proteinato de Cu+ Trichoderma 2L/Ha	4	0.25	C	
<b>T19</b>	Nitrato Ca Suelo + Trichoderma 1 L/Ha	4	0.25	C	
<b>T16</b>	Sulfato de Cu Pentahidratado + Trichoderma 1 L/Ha	4	0.25	C	
<b>T15</b>	Proteinato de Cu + Trichoderma 1 L/Ha	4	0.25	C	
<b>T13</b>	Proteinato Ca + Trichoderma 0.5 L/Ha	4	0.25	C	
<b>T27</b>	Proteinato de Ca+ Trichoderma 2L/Ha	4	0	C	
<b>T26</b>	Nitrato Ca Suelo + Trichoderma 2 L/Ha	4	0	C	
<b>T24</b>	Gluconato de Cu + Trichoderma 2 L/Ha	4	0	C	
<b>T10</b>	Gluconato de Cu+ Trichoderma 0.5L/Ha	4	0	C	
<b>T9</b>	Sulfato de Cu Pentahidratado + Trichoderma 0.5 L/Ha	4	0	C	



**Figura 27. Número de plantas enfermas por tratamiento, prueba de control de la pudrición húmeda del cogollo**

#### 4.8 Cosecha

Se realizaron ocho cosechas en las siguientes fechas: 23, 27 y 31 de agosto, 05, 08, 12, 15 y 20 de septiembre del 2018. Se cosecharon capítulos de calibre 5.5 cm. a mas, los capítulos se contabilizaron y pesaron. De acuerdo al análisis de varianza (Tabla N° 20), existe diferencia significativa entre tratamientos y entre bloques. El tratamiento T25 (Nitrato de Ca Foliar + *Trichoderma* 2.0 L/Ha) presentó el mayor peso de capítulos (Tabla N° 21) y el tratamiento T17 (Gluconato de Cu + *Trichoderma* 1.0 L/Ha.) obtuvo el menor peso de capítulos. Los demás tratamientos mostraron resultados similares, (Figura 28).

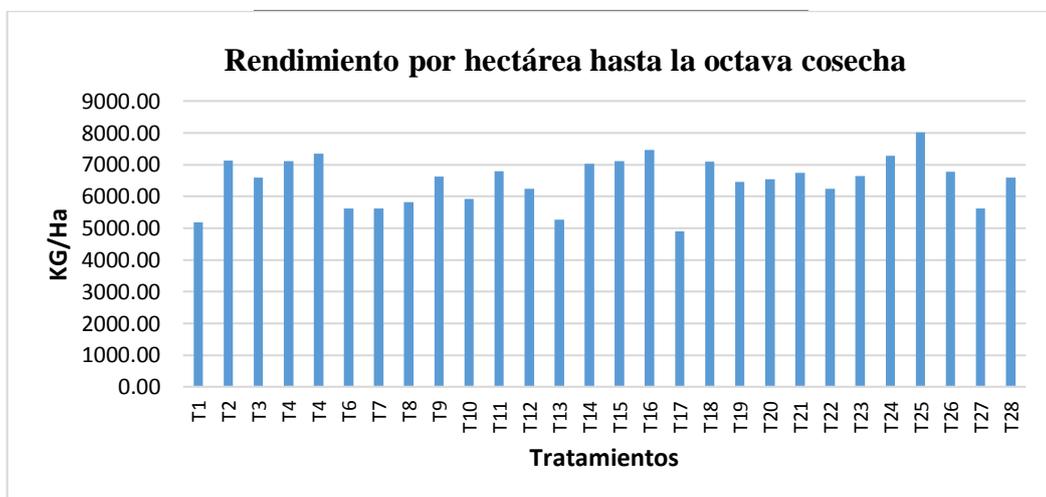
**Tabla 20. Análisis de varianza del peso de capítulos por tratamiento**

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Valor-F	Valor-P
<b>Bloque</b>	2	8529929	4264964	4.47	0.016
<b>Trat.</b>	27	49303868	1826069	1.92	0.021
<b>Error</b>	54	51482392	953378		
<b>Total</b>	83	109316189			

CV=15%

**Tabla 21. Comparación de Tukey del peso de capítulos por tratamiento**

Trat.	N°	Media	Agrupamiento	
25	3	8246	A	
16	3	7470	A	B
5	3	7347	A	B
24	3	7270	A	B
2	3	7123	A	B
15	3	7105	A	B
4	3	7104	A	B
18	3	7087	A	B
14	3	7027	A	B
11	3	6794	A	B
26	3	6778	A	B
21	3	6747	A	B
23	3	6649	A	B
9	3	6625	A	B
3	3	6590	A	B
28	3	6585	A	B
20	3	6539	A	B
19	3	6451	A	B
22	3	6243	A	B
12	3	6234	A	B
10	3	5928	A	B
8	3	5816	A	B
6	3	5616	A	B
27	3	5614	A	B
7	3	5611	A	B
13	3	5267	A	B
1	3	5189	A	B
17	3	4893		B

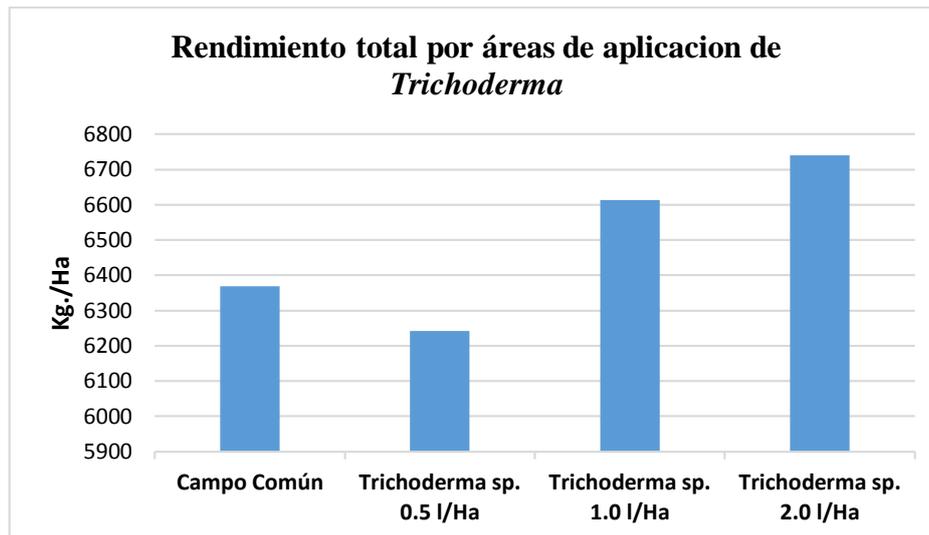


**Figura 28. Rendimiento de alcachofa por tratamiento hasta la octava cosecha**

De acuerdo al comparativo de rendimiento por dosis de aplicación de *Trichoderma* (Tabla N° 22), el área donde se aplicó *Trichoderma* a 2.0 L/Ha fue el que presentó el mayor rendimiento con 6740.9 Kg/Ha hasta la octava cosecha, y el área sin *Trichoderma* tuvo un rendimiento de 6368.5 Kg/Ha, presentado una diferencia de 372.4 Kg entre las dos áreas (Figura 29),

**Tabla 22. Rendimiento de alcachofa por tratamiento y por dosis de aplicación de *Trichoderma* (cepa T22).**

<b>Campo</b>	<b>Trat.</b>	<b>Kg/Ha</b>	<b>Total</b>
<b>Campo Común</b>	T1	5189.1	
	T2	7122.52	
	T3	6589.78	
	T4	7103.96	
	T4	7347.32	
	T6	5615.59	
	T7	5611.05	<b>6368.474</b>
<b><i>Trichoderma</i> sp. 0.5 l/Ha</b>	T8	5816.47	
	T9	6625.01	
	T10	5928.08	
	T11	6794.13	
	T12	6234.5	
	T13	5267.13	
	T14	7026.88	<b>6241.742</b>
<b><i>Trichoderma</i> sp. 1.0 l/Ha</b>	T15	7105.41	
	T16	7470.41	
	T17	4892.59	
	T18	7087.48	
	T19	6451.41	
	T20	6539.41	
	T21	6746.78	<b>6613.355</b>
<b><i>Trichoderma</i> sp. 2.0 l/Ha</b>	T22	6242.83	
	T23	6648.87	
	T24	7270.43	
	T25	8046.92	
	T26	6778.41	
	T27	5613.7	
	T28	6585.05	<b>6740.887</b>



**Figura 29. Peso de alcachofa por hectárea según la dosis de aplicación de *Trichoderma*.**

## Discusión

Las bacterias del género *Pectobacterium* (antes *Erwinia*), son conocidas a nivel mundial por los daños que ocasionan principalmente en el cultivo de papa, pero existen diferentes especies y subespecies que causan daños en diversos cultivos. La pudrición blanda o húmeda del cuello de la alcachofa, es una enfermedad que se presenta en casi todos los campos en los que se cultiva, se ha atribuido esta enfermedad a *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Soto y Puglia 2002; López 2010; Gil; 1999a). En el Perú la pudrición a nivel del cuello en el cultivo de alcachofa, es una enfermedad importante y se menciona que el agente causal es *Erwinia carotovora carotovora*. (Vacari 2009).

Cariddi y Bubici (2016), identifican a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*, como agente causal de la pudrición blanda en alcachofa, siendo este el primer reporte en el que se identifica a esta subespecie causando daños en los cultivos de alcachofa de Italia. Las plantas enfermas muestran un amarillamiento progresivo y marchitez de las hojas basales, luego un marchitamiento total de la planta acompañado de podredumbre blanda de color verde oscuro a marrón oscuro de la medula, que se puede ver al realizar un corte en esa zona. Los síntomas descritos coinciden con los síntomas que mostraron las plantas de alcachofa en los campos de Chincha (Figura 1). *Erwinia carotovora* subsp. *brasiliensis*, fue reportada por primera vez en el cultivo de papa produciendo la enfermedad del pie negro (Duarte et al. 2004).

Los cinco aislamientos patogénicos con los que se trabajó fueron positivos a las pruebas de degradación de láminas de papa, catalasa y oxidación y fermentación, por lo que se determinó que pertenecían al género *Pectobacterium*. (Perombelon and Van Der Wolf. 2002). 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), crecimiento a 37°C, sensibilidad a la erytromicina y producción de sustancias a partir de sacarosa. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* se diferencia de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atroseptica* principalmente por su incapacidad de producir sustancias reductoras a partir de sacarosa y su capacidad de crecer a 37°C (Perombelon and Van Der Wolf. 2002). Los cinco aislamientos crecieron a 37 °C en medio AN, pero ninguno de los cinco aislamientos tuvo la capacidad de producir sustancias reductoras a partir de sacarosa.

Se realizó PCR con dos juegos de primers específicos el ECA1F y ECA2R (De Boer and Ward 1995; Duarte et al 2004; Cariddi y Bubici 2016; Baghaee *et al* 2010), usado para identificar a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atroseptica*, sin embargo no hubo producto de PCR, por lo que se descartó la presencia de esta subespecie. Al realizar la PCR usando el primer específico EXPCCF y EXPCCR para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Cariddi y Bubici 2016; Baghaee et al 2010; Kang et al. 2003), tampoco hubo producto de PCR, por lo que se tuvo que usar el juego de primers general 27F y 1492R, llegando a identificar luego del secuenciamiento los cinco aislamientos; *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (CO1, CU2 y CU3), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* (CO3), y (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidiae* (CU4). Coincidiendo con Cariddi y Bubici (2016), que indicaron que el agente causal de la pudrición blanda en alcachofa es *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*. Sin embargo las características descritas para esta subespecie no coincidieron con los resultados que obtuvimos. Tres de las cepas italianas de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (*Pcb*) y la cepa tipo de *Pcb* no tenían la capacidad de producir sustancias reductoras a partir de sacarosa por lo que fueron negativas, pero dos de sus aislamientos si fueron positivos para esta prueba.

Duarte *et al.* (2004), de sus dieciséis aislamientos de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*, el 100% tuvo la capacidad de producir sustancias reductoras a partir de sacarosa.

De acuerdo al análisis filogenético basado en MLSA, la subespecie *brasiliensis* se dividió en dos clados; el clado I comprende cepas aisladas de Perú y Brasil y el clado II cepas de Asia, América del Norte y Europa, donde las cepas del clado I tienen la capacidad de reducir sustancias reductoras a partir de sacarosa y las del clado II no (Nabhan et al. 2012). Podríamos decir que nuestros aislamientos pertenecen al Clado II de acuerdo a esta característica fenotípica y teniendo en cuenta que el centro de origen de la alcachofa es Europa. La cepa de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* también fue negativa en la prueba de reducción de sustancias a partir de sacarosa, sin embargo Gallois et al. (1992), menciona que de sus once aislamientos de *E. carotovora* subsp. *odorifera*, el 100% fue positiva para esta prueba, de la misma manera lo reporta Duarte et al. (2004).

La subespecie *odorifera* ha sido identificada en diferentes cultivos, pero en el año 2015 se llega a identificar por primera vez a *Pectobacterium carotovorum* subsp *odoriferum* en un aislamiento extraído de una planta enferma de alcachofa. Se trabajó con 24 aislamientos del Valle del Sele al Sur de Italia, 23 fueron identificados como *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovoum* y 1 (ISPaVe CA) como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum*. Al encontrar solo un aislamiento no se llegó a determinar por completo el papel de esta subespecie en la pudrición de la alcachofa (Gallelli et al. 2015).

Los tres aislamientos de *P.c.* subsp. *brasiliensis* y *P.c.* subsp. *odoriferum* fueron positivos a la prueba de sensibilidad a la erytromicina, no coincidiendo con lo mencionado por Baghaee et al. (2010), donde de sus seis cepas de referencia, cinco fueron negativos a esta prueba entre los que se encontraba *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* (Pco). Además, Duarte et al. (2004) al trabajar con un aislamiento *E. carotovora* subsp. *odorifera* strain 1878, también encontró que ésta era negativa a esta prueba (son resistentes), difiriendo con el resultado que obtuvimos con el aislamiento de *P.c.* subsp. *odoriferum*. Cariddi y Bubici (2016) y Duarte et al. (2004), mencionan que los aislamientos de *P.c.* subsp. *brasiliensis* encontrados en papa y alcachofa respectivamente son resistentes a la erytromicina. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actidinae* no fue sensible a esta prueba lo que coincide con el resultado obtenido por Koh et al. (2012). Nuestros resultados indican que la cantidad de pruebas fenotípicas que usamos no fueron suficientes para determinar de manera clara y precisa las subespecies del género *Pectobacterium* a la cual pertenecían los aislamientos.

No se encontró información sobre la pudrición húmeda del cogollo de alcachofa (Figura 2), si bien esta sintomatología se ha manifestado desde el 2015, su incidencia ha ido aumentando. En el agave se han reportado síntomas de pudrición blanda a nivel del cogollo, aunque los cultivos son distintos la sintomatología descrita y la forma en la que se presenta se parece mucho a la pudrición blanda del cogollo en alcachofa. El agave presenta lesiones necróticas acuosas en las hojas que inician en la espina apical, las lesiones avanzan hacia el centro de la hoja y al centro del cogollo, causan pudrición descendente que llega hasta la piña y puede causar la muerte. Se ha identificado a *Pectobacterium carotovorum* como agente causal (Velez *et al.* 1996; Castro 2003).

El control de la pudrición húmeda se realiza principalmente usando material de siembra sano, prácticas sanitarias y aspersiones de cobre. El cobre cumple una función muy importante en la eliminación de bacterias por lo que es ampliamente usado y ha dado muy buenos resultados en el control de bacterias del género *Pectobacterium*, se han realizado varios trabajos (Coto y Wang 1995; Guevara *et al.* 2002). En el ensayo para la pudrición del cuello y cogollo los mejores resultados se obtuvieron con el gluconato de cobre, proteinato de cobre, proteinato de calcio (solos o en combinación a diferentes dosis del biocontrolador) y *Trichoderma* (cepa T22). El calcio cumple un rol importante en la resistencia de las plantas contra enfermedades bacterianas, ya que los iones de calcio mejoran la estructura y la integridad de la pared celular de las plantas, haciéndolas más resistentes (Berry *et al.* 1988; Czajkowski *et al.* 2011). Esto se ha comprobado en varios trabajos como el de Bain *et al.* (1996), al agregar yeso (CaSO<sub>4</sub>) al suelo retrasó significativamente la descomposición de los tubérculos de papa por *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*; mientras que, Rojas *et al.* (2009), demostró que existe una relación inversamente proporcional y significativa, por lo que a mayor grosor de la pared celular menor la incidencia de la pudrición blanca ocasiona por *Sclerotium cepivorum*. Son conocidos los beneficios de usar *Trichoderma* para el control de plagas sin embargo este es un microorganismo que no solo actúa como biocontrolador, sino también mejora el rendimiento de los cultivos (Rojas 2012; Rivera *et al.* 2015; López 2017). Los resultados obtenidos demuestran que los tratamientos con *Trichoderma* (cepa T22), presentaron un mayor rendimiento comparado con el testigo. Los tratamientos con la dosis de 2 L/Ha obtuvo 372 Kg/Ha más que los tratamiento sin biocontrolador. Rojas (2012), determinó en tres campañas seguidas que la aplicación de *Trichoderma* sp. aumenta el rendimiento de las papas nativas.

## V. CONCLUSIONES

1. Se llegó a identificar pudrición húmeda a nivel del cuello y del cogollo. En el cuello el síntoma característico fue el marchitamiento seguido del tumbado total de la planta, en la base presencia de pudrición acuosa de color verde claro a marrón. En el cogollo las hojas jóvenes presentaron manchas necróticas acuosas de avance descendente hasta llegar al cogollo comprometiendo la formación del capítulo.
2. Fenotípicamente no se pudo determinar las subespecies a las que pertenecían los aislamientos obtenidos.
3. De acuerdo a la prueba de patogenicidad de los ocho aislamientos obtenidos cinco resultaron patogénicos, tanto en el cuello como en el cogollo de las plantas inoculadas.
4. Mediante la prueba molecular se llegó a identificar el género, especie y subespecie a la que pertenecen los aislamientos. Se identificó a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* como agente causal de la pudrición del cuello y cogollo, *Pectobacterium carotovorum* subsp *odoriferum* como agente causal de la pudrición húmeda en el cogollo y *Pectobacterium carotovorum* subsp *actinidae* como agente causal de la pudrición húmeda en el cuello.
5. En la prueba de control *in vitro* los mejores tratamientos fueron los productos a base de cobre, no permitieron ningún desarrollo de los aislamientos sembrados.
6. En la prueba de control de la pudrición en el cuello los mejores tratamiento fueron: T3 (Gluconato de Cu), T10 (Gluconato de Cu+ Trichoderma 0.5L/Ha), T14 (Trichoderma 0.5 L/Ha), T17 (Gluconato de Cu+ Trichoderma 1L/Ha) T21(Trichoderma 1L/Ha), T22 (Proteinato de Cu+ Trichoderma 2L/Ha), T27 (Proteinato de Ca+ Trichoderma 2L/Ha), T28 (Trichoderma 2.0 L./Ha).

7. En la prueba para el control de la pudrición a nivel del cogollo los mejores tratamientos fueron: T9 (Sulfato de Cu pentahidratado + Trichoderma 0.5 L./Ha), T10 (Gluconato de Cu+ Trichoderma 0.5 L./Ha), T24 (Gluconato de Cu+ Trichoderma 2.0 L./Ha), T26 (Nitrato de Ca suelo + Trichoderma 2.0 L./Ha), T27 (Proteinato de Ca + Trichoderma 2.0 L./Ha).

## VI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda hacer mayores investigaciones sobre las tres subespecies del género *Pectobacterium* determinadas encontradas en este experimento.
2. Hacer más muestreos de los síntomas de pudrición húmeda ocasionada por bacterias en el cultivo de alcachofa en la zona de Chíncha e incluir otras regiones del país para determinar las subespecies presentes.
3. Realizar más trabajos de identificación de bacterias que ocasionan pudrición húmeda o pie negro en papa y en otros cultivos de importancia económica.
4. Realizar pruebas de control similares haciendo uso de los productos a base de cobre y calcio, para determinar cantidad y momento adecuado de aplicación que dependerá del cultivo.
5. Realizar más ensayos de control en alcachofa haciendo uso de *Trichoderma*, especialmente de la cepa T22 para comprobar el efecto en el rendimiento.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Achicanoy, H. 2001. Estrategias Integradas para el Control de Enfermedades de las Plantas. Rev. Fac. Agr. Medellin, Colombia. Vol.54. p. 1251-1273. Consultado 17 marzo 2017. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article>
2. Agrios, G. 2005. Plant pathology. 5 Ed. Amsterdam: Elsevier. p. 7, 18, 33, 283.
3. AGRODATAPERU. 2016. Alcachofas Conservas Perú Exportacion Enero 2016. Consultado 18 marzo 2017. Disponible en: <https://www.agrodataperu.com/2016/02/alcachofas-conservas-peru-exportación-enero-2016.html>.
4. Agricultura Forestry & Fisheries. s.f. Globe atichoke *CYNARA SCOLYMUS*. SOUTH AFRICA. p. 7. Consultado 12 marzo 2017. Disponible en: <http://www.nda.agric.za/docs/Brochures/Artichoke2011.pdf>
5. Artavia, S; Uribe, L; Saborío, F; Arauz, LF. y Castro, L. 2010. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ABONOS ORGÁNICOS EN LA SUPRESION DE *Pythium myriotylum* EN PLANTAS DE TIQUISQUE (*Xanthosoma sagittifolium*). Agronomía Costarricense 34(1). Costa Rica. p. 17-29. Consultado 05 marzo 2017. Disponible en <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/download/6696/6385>.
6. Bain, R.; Perombelon, M.; Tsrer, L. and Nachmias, A. 1990. Blackleg development and tuber yield in relation to numbers of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on seed potatoes. Plant Pathology. 39 p. 125–33.
7. Bain, R.: Millard, P and Perombelon, M. 1996. The resistance of potato plants to *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in relation to their calcium and magnesium content. Reino Unido, Potato Research 39, p. 185 – 193.
8. Baker, KF. y Cook, RJ. 1974. Biological Control of Pathogens. W. H. Greeman & Co. San Francisco, Estados Unidos, p. 433.
9. Barrera, V.A. 2012. El género *Hypocrea* Fr. (Hypocreales, Ascomycota) en la Argentina. Estudio de la variabilidad molecular de su estado anamórfico *Trichoderma*. Tesis para optar el grado de doctor. Argentina. p. 241.

10. Bartz, J & Kelman, A. 1985. Effect of air-drying on soft rot potential of potato tubers inoculated by immersion in suspensions of *Erwinia carotovora*. Florida, Estados Unidos. *Phytopathology*. 69, 128–31.
11. Bartz, J.; Locascio, S. and Weingartner, D. 1992. Calcium and potassium fertilization of potatoes grown in North Florida. Effect on the bacterial soft rot potential in the tubers. Estados Unidos. *American Potato Journal*. 69: 39-50.
12. Berry, S; Madumadu, G y Uddin, M. 1988. Effect of calcium and nitrogen nutrition on bacterial canker disease of tomato. *Plant and Soil*. p. 112, 113.
13. Bratsch, A. 2014. Specialty Crop Profile: Globe artichoke. Virginia Cooperative Extension, Publication 438-108. Virginia, US. p. 6. Consultado 15 marzo 2017. Disponible en: <https://www.pubs.ext.vt.edu/438/438-108/438-108.html>.
14. Brenner, D. J.; Fanning, G.R.; Steigerwalt, A.G. 1973. Desoxyribonucleic Acid Relatedness Among *Erwiniae* and Other *Enterobacteriaceae*: The Gall, Wilts, and Dry-Necrosis Organisms (Genus *Erwinia* Winslow et al., sensu stricto). Estados Unidos, *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 24, N° 2. p. 197-204.
15. Bono, C. s.f. GLUCONATO DE COBRE. Asociación Española de Fabricantes de Agronutrientes. Revisado el 10 de Noviembre del 2019. Disponible en: <https://aefa-agronutrientes.org/gluconato-de-cobre>.
16. Cabrera Capitán, F. 2007. Real Academia Sevillana de Ciencias – Memoria 2007, Materia orgánica del suelo: papel de las enmiendas orgánicas. España, p. 279. Consultado 07 marzo 2017. Disponible en: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/28751/3/Materia%20org%C3%A1nica.pdf>.
17. Caridi, C. y Bubici, G. 2016. First report of bacterial pith soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* on artichoke in Italy. Edizioni ETS Pisa. Italia, *Journal of Plant Pathology*. p. 563-569.
18. Catacora, E. 2002. Almacigos y métodos de propagación en alcachofa - INIA - Donoso Huaraz, Perú. p. 10-14.
19. Challco, S. 2014. Control Biológico y Químico de *Sclerotium rolfsii* Sacc en el Cultivo de Alcachofa (*Cynara Scolymus* L.). Tesis Ing. Agrónomo. Lima, Perú, UNALM. 78 p.
20. Cook, R.J and Bakr, K. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. Minnesota, Estados Unidos, The American Phytopathological society. p. 539.

21. Coto, B. y Wang, A. 1995. Evaluacion de cinco tratamientos quimicos para el combate de la bacteriosis (*Erwinia* sp.) en frutos de mango variedad Tommy Atkins, en turrubares, Costa Rica, Rev. Agronomía Costarricense. 19(1): 15-20.
22. Czajkowski, R.; Perombelon, M.; Van Veen, J. and Van de Wolf, J. 2011. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species. Estados Unidos, Plant Pathology 60, 999–1013..
23. De Boer, S.H. and Ward, L.J. (1995) PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. Phytopathology 85, 854–858.
24. Duarte, V.; De Boer, S.H.; Ward, L. J. and de Oliveira, A.M.R. 2004. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. Journal of Applied Microbiology. Vol. 96. P. 535-545. Brazil.
25. Farfán, L. y Hoyos-Carbajal, L. 2010. Sensibilidad a antibióticos cúpricos de bacterias fitopatógenos asociadas a bacteriosis en pasifloras. México, Revista Mexicana de Fitopatología. p. 92.
26. Fernández, A.; García, C.; Saéz, J. y Valdezate, S. 2010. Métodos de Identificación Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica. España. p. 3-14. Consultado 07 Septiembre 2017 Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>.
27. French, E. y Herbert, T. 1980. Métodos de Investigación Fitopatológica. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Costa Rica. p.142-153.
28. Fuqua, C.; Parsek, M. and Greenberg, E. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl homoserine lactone quorum sensing. Estados Unidos, Annual Review of Genetics 35, 439–68.
29. Gallelli, A; Galli, M; De Simone, D; Zaccardelli, M y Loreti, S. 2009. Phenotypic and genetic variability of *Pectobacterium carotovorum* isolated from artichoke in the SELE VALLEY. Edizioni ETS Pisa. Italia, Journal of Plant Pathology. Vol 91, N°3. p. 757-761.
30. Gallois, A.; Samson, R.; Ageron, E. and Grimont, P.A.D. 1992. *Erwinia carotovora* subsp. *odorifera* subsp. nov., Associated with Odorous Soft Rot of Chicory (*Cichorium intybus* L.) International Journal of Systematic Bacteriology. Francia. Vol. 4.N°. 4. p. 582-588.
31. García, M. 1999. Plagas, enfermedades y fisiopatías del cultivo de la alcachofa, En la comunidad Valenciana. Ed. Generalitat Valenciana. España. p. 28-31. Consultado 10

- marzo 2017. Disponible en: [http://www.ivia.gva.es/documents/161862582/161863558/plagas %20enfermedades+y+fisiopat%C3%ADas+del+cultivo+de+la+alcachofa/5b07b799-0805-49a3-a27f-e4e550680036](http://www.ivia.gva.es/documents/161862582/161863558/plagas%20enfermedades+y+fisiopat%C3%ADas+del+cultivo+de+la+alcachofa/5b07b799-0805-49a3-a27f-e4e550680036).
32. Gardan, L.; Gouy, C.; Christen, R. and Samson, R. 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. Nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. Francia. International Journal of systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 53. p. 381-391.
  33. Gestión 10-12-17. Revisado el 15 de Octubre del 2018. Disponible en: <https://gestion.pe/economia/peru-primer-exportador-alcachofa-ee-uu-seguido-espana-222367>.
  34. Gil, R. 1999a. Plagas, Enfermedades y Accidentes de la Alcachofa. Hojas Divulgadoras N° 2098 HD. p. 23-33.
  35. Gil, R. 1999b. El Cultivo de Alcachofa Variedades de Semilla. Madrid, España, Hojas Divulgadoras N° 2097 HD. p. 3-6.
  36. Guevara, Y.; Maselli, A.; Mireles, M.; Figueroa, R.; Marcano, M. y Rondon, A. 2002. Evaluación de Cuatro Productos para el Control de la Bacteriosis (*Erwinia* spp.) en Frutos de Mango (*Mangifera indica* L.). México. Revista Mexicana de Fitopatología. Vol.20 N°1.
  37. Garza, J.; Blom, T.; Brown, W and Allen, W. 2002. Pre- and post-plant applications of copper-based compounds to control *Erwinia* soft rot of calla lilies. Canada, J. Plant Pathol. 24: 274–280.
  38. Gringo. 2015. Ficha Técnica Gringo Silvestre. p. 2. Perú.
  39. Hauben, L.; Moore E.R.B.; Vauterin, L.; Steenacker, M.; Mergaert, J.; Verdonck, L. and Swings, J. 1998. Phylogenetic Position of Phytopathogens within the Enterobacteriaceae. Alemania, Systematic and Applied Microbiology. Vol. 21. p. 384-397.
  40. Howarth, FG. 2003. Environmental impacts of classical biological control. Annual Review of Entomology 36: 485–509.
  41. Infante, D.; Martínez, B.; González, N. y Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Cuba, Revista de Protección Vegetal. Vol 24 N°1 p. 14-21.
  42. IDIPS (Instituto de Investigación y Promoción Social). S.f. Manual del cultivo de alcachofa. Perú. p. 7-9.

43. Jana, C.; Gutiérrez, R. y Alfaro, V. 2011. Propagación de alcachofas. Un aspecto clave en la producción. La Serena, Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Centro Regional de Investigación Intihuasi. Boletín N° 222. 45 p.
44. Jaramillo, EE. 2014. Control biológico y químico de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary en alcachofa (*Cynara scolymus* L.) en condiciones de laboratorio e invernadero. Tesis Mag. Sc. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina. 74 p.
45. Johnson, D.A.; Dung, J.K.S.; Cummings, T.F. and Schroeder, B.K. 2011. Development and suppression of aerial stem rot in commercial potato fields. *Plant Disease*. p. 95: 285–291.
46. Kang, H.W.; Kwon, S.W. and Go, S.J. 2003. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *Carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Korea, Plant Pathology*. **52**, 127–133.
47. Katayama, T.; Miyagawa, K.; Kodama, T.; Oikawa, S. 2001. Trichorzin HA V, a member of the peptaibol family, stimulates intracellular cAMP formation in cells expressing the calcitonin receptor. *Biol Pharm. Bull.* Vol. 24, p.1420-1422.
48. Koh, YJ.; Kim, GH.; Lee, YS.; Sohn, SH.; Koh, HS.; Kwon, S.; Heu, S. and Jung, JS. 2012. *New Zealand, Journal of Crop and Horticultural Science*. Vol. 40, N°4. p. 269-279.
49. Koike, S; Gladders, P. y Paulus, A. 2007. *Vegetable Diseases*. Manson Publishing Ltd. London, Reino Unido. p. 399-403.
50. Koo, W. 2018. AGRODATAPERU 23 de Noviembre del 2018 <https://www.agrodataperu.com/2017/03/alcachofas-conservas-peru-exportacion-2017-febrero.html>.
51. La Republica. 01 de agosto de 2016. Exportaciones de alcachofa suman US\$ 24.7 millones en el primer semestre. Consultado 18 marzo 2017. Disponible en: <http://larepublica.pe/impresa/economia/790299-exportaciones-de-alcachofa-suman-us-247-millones-en-el-primer-semestre>.
52. Lelliott, R.A. and Dickey, R.S. 1984. Genus VII. *Erwinia*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Estados Unidos, Williams and Wilkins. p. 469-476.
53. Lewis, JA. and Papavizas, GC. 1974. Survival and Multiplication of Soil Borne Plant Pathogens as Affected by Plant Tissue Amendments. In: *Biology and Control of Soil-Borne Plant Pathogens*. APS. p. 84-89.

54. López, M. 2010. Patógenos de Plantas Descritos en España. 2 ed. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. España. p. 274.
55. Maloy, O. 2005. Manejo de Enfermedades en Plantas. Trads. Ureta, J.; Santamaria, L. Washinton, Estados Unidos. Consultado 10 marzo. 2017. Disponible en: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/pages/plantDiseasemanagementspanish.aspx>.
56. McCarter-Zorner, N.; Franc, G. and Harrison, M.; Michaud, J.; Quin, C.; Sells, A. and Graham, D. 1984. Soft rot *Erwinia* bacteria in surface and underground waters in southern Scotland and in Colorado, United States. *Journal of Applied Microbiology*. 57, 95–105.
57. Mc Govern RJ.; Horst, RK. ; Dickey, RS. 1985. Effect of nutrition on susceptibility of *Chrysanthemum morifolium* to *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Disease* 69, 1086–8.
58. Mc Guire, R & Kelman, A. 1984. Reduced severity of *Erwinia* soft rot in potato tubers with increased calcium content. *Phytopathology*. p. 74.
59. Mc Ritchie, J. 1983. Southern blight of ajuga. Depart. Agric. & Consumer Serv. Division of Plant Industry. *Plant Pathology circular* 252. 2 p.
60. Nabhan, S.; De Boer, S.H.; Maiss, E. and Wydra, K. 2012. Taxonomic relatedness between *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* subsp. nov. Alemania., *Journal of Applied Microbiology*. 113: 904-913.
61. Niemi, O.; Laine, P.; Koskinen, P.; Pasanen, M.; Pennanen, V.; Harjunpää, H.; Nykyri, J.; Holm, L.; Paulin, L.; Auvinen, P.; Tapio Palva, E. and Pirhonen, M. 2017. Genome sequence of the model plant pathogen *Pectobacterium carotovorum* SCC1. Estados Unidos, *Standards in Genomic Sciences*. p.8.
62. Nykyri, J.; Niemi, O.; Koskinen, P.; Nokso-Koivisto, J.; Pasanen, M.; Broberg, M.; Plyusnin, I.; Toronen, P.; Holm, L.; Pirhonen, M. and Palva, T. 2012. Revised Phylogeny and Novel Horizontally Acquired Virulence Determinants of the Model Soft Rot Phytopathogen *Pectobacterium wasabiae* SCC3193. Estados Unidos, *PLOS Pathogens*. Vol. 8. p. 19.
63. Park, SK. 1969. Studies in the relationship between Ca nutrient and soft rot disease in Chinese cabbage. Research Report to Rural Development Administration, Suwon, Korea. Vol. 12, 63–70.
64. Perombelon, M.1974. The role of the seed tuber in the contamination by *Erwinia carotovora* of potato crops in Scotland. *Potato Research* 17, 187–99.

65. Perombelon, M.; Zutra, D.; Hyman, L. and Burnett, E. 1989. Factors affecting potato blackleg development. In: Tjamos EC, Beckmann CH, eds. Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on the Interaction of Genetic and Environmental Factors in the Development of Vascular Wilt Diseases of Plants, Cape Sounion, Greece. Berlin, Germany. Reino Unido, Springer-Verlag, 421–31.
66. Perombelon, M. and Hyman, L. 1988. Effect of latent infection by *Erwinia* on yield. Reino Unido, Scottish Crop Research Institute Annual Report. Dundee, 12p.
67. Perombelon, M. 2002. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: an overview of pathogenesis. Reino Unido, Plant Pathol 51: 1–12.
68. Perombelon, M. and Van Der Wolf. J. 2002. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual. Reino Unido. p. 82.
69. Platero, M. y Tejerina, G. 1976. Calcium nutrition in *Phaseolus vulgaris* in relation to its resistance to *Erwinia carotovora*. Journal of Phytopathology 85, 314–9.
70. Promet Cu. 2017. Ficha Técnica Proteinato de cobre QSI. Perú. 3p.
71. Raymond, G. and McGuirre, R. 1984. Reduced Severity of *Erwinia* Soft Rot in Potato Tubers with Increased Calcium Content. Phytopathology. p.7. Estados Unidos.
72. Robles, F. 2001. La alcachofa: Nueva alternativa para la agricultura Peruana. Perú, COFIDE. 44 p.
73. Rodríguez, I. 1990. Efecto antagónico de ocho aislamientos de *Trichoderma* contra *Fusarium moniliforme* (Booth) y *Fusarium subglutinans* (Booth). Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo Universidad Agraria de La Habana. Cuba. 120p.
74. Rodríguez, R.; Aguilar, CN.; Ayala, LA.; Rocha, JC.; Padilla, V. y Espinoza, TC. 2009. DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS MEDIANTE METODOS MOLECULARES. México, Rev. de Divulgación Científica, Universidad Autónoma de Coahuila. 13 p.
75. Rojas, V.; Ulacio; D.; Sanabria, E. y Jimenez, M.A. 2009. Efecto del calcio, *Trichoderma* y brócoli en la pared y área celular del ajo para el control de la pudrición blanca. Venezuela, Bol. Centro Invest. Biol. 43(2): 183-195.
76. Samson, R.; Legendre, J. B.; Christen, R.; Saux, M. F.; Achouak, W. and Gardan, L. 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four

- novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zea* sp. nov. Francia, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 55. p. 1415-1427.
77. Samuels, Gary. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Gran Bretaña, Mycol. Res. Vol. 100 (8), p. 923-925.
  78. Serrano, Z. 2006. La alcachofa. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca. España. p. 19-26.
  79. Skerman, V.B.D.; McGowan, V. and Sneath, P.H.A. 1980. Estados Unidos. , Int. J. Syst. Bacteriol. Vol. 30 p. 225-420.
  80. Smith, R.; Baameur, A.; Bari, M.; Cahn, M.; Giraud, D.; Natwick, E. y Takele, E. 2008. Artichoke production in California. Vegetables Crops. California, Estados Unidos. 6 p. Consulta 11 marzo 2017. Disponible en: <http://anrcatalog.ucanr.edu/pdf/7221.pdf>.
  81. Systemic. s.f. Ficha Técnica Systemic-Novalty. Revisado el 14 de Septiembre del 2019. Disponible en: <http://novaltyperu.com/producto/detalle/18/7#.XdWoqdVKjIU>.
  82. Soto, JA. y Puglia, MC. 2002. Podredumbre Radical Bacteriana del Alcaucil en Mendoza (Argentina). Argentina, Rev. Facultad de Ciencias Agrarias. 2v, p. 35-41. Consultado 13 marzo 2017. Disponible en: [http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos\\_digitales/2828/sotoagrarias2-34-02.pdf](http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/2828/sotoagrarias2-34-02.pdf).
  83. Suparyono, J.K. 1989. Influence of host resistance and growth stage at the time of inoculation on Stewart's wilt and Goss' wilt development and sweetcorn hybrid yield. Plant Disease. 73: 339-345.
  84. Tsao, PH. y Oster, JJ. 1981. Relation of Ammonia and Nitrous Acid to Suppression of Phytophthora in Soil Amended with Nitrogenous Organic Substances. SC, Phytopathology 71. p. 53.
  85. Vacari, C. 2009. Enfermedades de la Alcachofa Causadas por Hongos en el Perú. Tesis Ing. Agrónomo. Lima, Perú. p. 39.
  86. Van der Merwe, J.J.; Coutinho, T.A.; Korsten, L. and van der Waals, J.E. 2010. Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliensis causing blackleg on potatoes in South Africa. European. South Africa, Journal of Plant pathology. Vol. 126. p. 175-185.
  87. Vélez, G.C.; Álvarez de la C. y Rodríguez, G.B. 1996. Aislamiento de *Erwinia* del grupo *carotovora* como patógeno de Agave tequilana. Resumen XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, Guadalajara, Jal. México. p.65-68.

88. Ventura, M. 2007. Identificación de Bacterias Fitopatogenas en el Cultivo de Papaya (*Carica papaya*) en las Fincas el Pantanal y el Subín, Ubicadas en el Departamento el Pitén, Guatemala. Tesis para optar el título de Química Bióloga. Gutemala.p.54.
89. Villegas, M.A. 2005. *Trichoderma* Pers. Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. Orius Biotecnología. Colombia. Consultado el 15 de enero del 2019. Disponible en: [http:// www.oriusbiotecnologia.com/site/index.php?id=20,66,0,0,1,0](http://www.oriusbiotecnologia.com/site/index.php?id=20,66,0,0,1,0).
90. Visnovsky, SB.; Panda, P.; Taylor, R. and Pitman, AR. 2017. Draft Genome Sequences of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actiniadae* ICMP 19971 and ICMP 19972, Two Strains Isolated from *Actinidia chinensis* with Symptoms of Summer Canker in South Korea. American Society for South Korea. p.30
91. Waldee, E. 1942. Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria, Retrospective Theses and Dissertation. Estados Unidos, Plant pathogens. 129 p.
92. Waleron, M.; Waleron, K. and Lojkowska, E. 2014. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* causing soft rot of stored vegetables. Eur J Plant pathol. Vol. 139. p. 457-469.
93. Winslow, E.E.A; Broadhurts, J.; Buchanan, R.E.; Krumwiede, C.; Rogers, L.A. and Smith, G.H. 1917. The families and genera of the bacteria. Preliminary report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. The Journal of Bacteriology. Vol. N° 2. p. 505-566
94. Winslow, E.E.A.; Broadhurts, J.; Buchanan, R.E.; Krumwiede, C.; Rogers, L.A. and Smith, G.H. 1920. The families and genera of the bacteria. Final report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. The Journal of Bacteriology. Vol. N° 3. p. 191-229.

## VIII. ANEXOS

### Anexo 1. Preparación de medio Cristal Violeta Pectato (CVP)

**Solución A:** En un vaso de 200 ml, se agregó 100 ml de agua destilada. Se puso a calentar y se agregó 2.7 ml (0.5gr de  $\text{CaCl}_2$  en 5 ml de agua destilada) de una solución acuosa  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 10%, 0.4 g de  $\text{NaNO}_3$ , 1.0 g de citrato de trisódico  $2\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g tryptona (Oxoid), 0.16 ml de una solución acuosa de 10 % de dodecyl sulfato de sodio (se disolvió 0.2 gr en 2 ml de agua destilada), 0.4ml de una solución acuosa de 0.07% de cristal violeta.

**Solución B:** En otro vaso de 200 ml se agregó 100 ml de agua destilada en vidrio mas 2.8 g de polipectato de sodio, se licuo en el horno de microondas, se agito y calentó en el agitador magnético hasta que todo el polipectato quedo disuelto. Se agregó 1.2 g de agar granulado, se enfrió y se ajustó el pH a 7.0 usando HCl 25 N y KCl 3 M.

Se esterilizó por media hora en la autoclave a 121 °C, se dejó enfriar y cuando estaban a temperatura óptima para el plaqueo se mezcló la solución A y B en la cámara de flujo laminar y se plaquearon inmediatamente.

Se preparó de acuerdo al procedimiento del Ing. César Briburg.

### Anexo 2. Procedimiento de Tinción Gram

Para la tinción Gram se usó: porta objetos, agua destilada, piseta, asa y aguja de Kolle, mechero, Cristal violeta, lugol, alcohol acetone y safranina.

Se siguió el siguiente procedimiento:

- Colocar una pequeña gota de agua destilada en el portaobjeto.
- Con la aguja de Kolle se tomar una pequeña masa de colonias y se colocarla en la gota de agua y mezclar.
- Secar la muestra en el mechero teniendo mucho cuidado.
- Una vez seco, cubrir la muestra con una gota de Cristal violeta y dejar por un minuto.

- Se lavar con agua destilada de una piseta, sin que el chorro caiga directamente en la muestra.
- Luego agregar lugol cubriendo toda la muestra y dejar reposar por un minuto.
- Transcurrido el tiempo se lavar con agua destilada.
- Cubrir la muestra con alcohol acetona por 20 segundos y luego se lavar con agua destilada.
- Por ultimo se colocar safranina cubriendo toda la muestra por 40 segundos, se lavar con agua destilada y se dejar secar.

### **Anexo 3. Preparación de medio para la prueba de Oxidación y Fermentación**

#### **Reactivos para la preparación del medio O/F:**

Bacto peptona	2.0 g
NaCl	5.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3 g
Azul de Bromothymol	0.03 g
Agar	10.0 g
Glucosa	10.0 g.
<b>Agua destilada</b>	<b>1000 ml</b>

#### **Procedimiento:**

- En un vaso con el agua destilada incorporar todos los reactivos (menos la glucosa), disolver y derretir en microondas.
- Una vez disueltos, agregar la glucosa y mezclar.
- Ajustar el pH a 7.0.
- Colocar 3 cm de la preparación en cada tubo.
- Esterilizar a 120 °C durante 20 minutos.
- Dejar enfriar y proceder a sembrar.

### **Anexo 4. Preparación de medio con 5% de NaCl**

#### **Reactivos:**

Bacto peptone (Oxoid, L37)	10 g
NaCl	50 g
Agua destilada	1000 ml

**Procedimiento:**

- En un vaso colocar el agua destilada, agregar la peptona y el NaCl.
- En un microondas disolver.
- Ajustar el pH a 7.3.
- Vertir 4 cm del medio en cada tubo.
- Esterilizar a 120 °C durante 15 minutos.

**Anexo 5. Preparación de medio Sacarosa y reactivo Benedict's****Medio Sacarosa****Reactivos:**

Bacto peptone	10.0 g
NaCl	5.0 g
Agua destilada	1000 ml

**Procedimiento:**

- En un vaso poner el agua destilada y agregar los reactivos.
- Dissolver en el microondas.
- Ajustar el pH a 7.3.
- Vertir 3ml de medio en cada tubo.
- Esterilizar al 120 °C durante 20 minutos.

**Reactivo Benedict's****Reactivos:**

Citrato de Sodio	10.0 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O	5.0 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	17.3 G
Agua destilada	1000 ml

**Procedimiento:**

- Disolver las dos primeras sales en 800 ml de agua destilada.

- Con papel filtro numero uno, filtrar la mezcla.
- Agregar la tercera sal y agregar agua destilada hasta completar los 1000 ml.
- Almacenar en botella oscura y cubrir con papel aluminio.

## **Anexo 6. Extracción de ADN**

### **Materiales y Reactivos:**

- Kit para extracción de AND genómico GeneJET Genomic DNA Purification Kit (código: K0721, marca: ThermoScientific)
- Micropipetas de 1mL, 0.1 mL, 0.01mL (marca: Axygen)
- Tips (Puntas) con filtro estéril libre de DNAsa y RNAsas para micropipetas (marca: Axygen).
- Rack porta-microtubo, capacidad 96 microtubos.
- Microtubos de 1.5 mL (código: MTC-150-C, marca: Axygen)
- Microcentrífuga (modelo: 5430, marca: Eppendorf)
- Termomixer incubar para microtubos (marca: Eppendorf)
- Cabina de Flujo Laminar A2 Tipo II (modelo: Logic, marca: Labconco)
- Vortex (marca: USA Scientific)

### **Procedimiento:**

- Se colectó 01 mL de cultivo bacteriano joven en un tubo de 1.5mL estéril, luego se centrifugó a 800 g (800 gravedades) por 10 minutos. Se trasvasó el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5mL estéril y eliminó el pellet.
- Se centrifugó a 8,000 g (8,000 gravedades) por 15 minutos, luego se eliminó el sobrenadante y se eluyó el pellet en 0.2mL de PBS (Phosphate buffer saline).
- Se añadió 0.18 mL de Digestion solution y 0.02 mL de Proteinasa K Solution, se homogenizó con vortex suave.
- Se incubó la mezcla a 56°C por 40 minutos con agitación a 600 rpm (revoluciones por minuto).
- Luego se añadió 0.02 mL de RNasa A Solution, se homogenizó con vortex suave e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente sin agitación.

- Se añadió 0.2 mL de Lysis Solution a la muestra. Se homogenizó suavemente por 30 segundos.
- Se añadió 0.4 mL de Etanol 50% y se homogenizó por vortex.
- Se transfirió toda la mezcla a una columna de purificación insertada en un microtubo de colector de 2 mL. Se centrifugó la columna a 6,000 g (6,000 gravedades) por 1 minuto. Luego se descartó el tubo colector conteniendo el líquido de desecho y se transfirió la columna de purificación a un nuevo microtubo colector de 2 mL.
- Se añadió 0.5 mL de Wash Buffer I (incluye etanol absoluto), y se centrifugó a 8,000 g (8,000 gravedades). Luego se descartó el tubo colector conteniendo el líquido de desecho y se transfirió la columna de purificación a un nuevo microtubo colector de 2 mL.
- Se añadió 0.5 mL de Wash Buffer II (incluye etanol absoluto), y se centrifugó a 20,000 g (20,000 gravedades) por 3 minutos. Luego se descartó el tubo colector conteniendo el líquido de desecho y se transfirió la columna de purificación a un microtubo de 1.5 mL.
- Se añadió 0.1 mL de Elution buffer en el centro de columna de purificación, se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 8,000 g (8,000 gravedades) por 1 minuto.
- Se descartó la columna de purificación, y se almacenó el ADN extraído a -20°C.

## **Anexo 7. Calidad de ADN**

Se evaluó la calidad del ADN extraído de las 08 muestras según su peso molecular.

Calidad del ADN según su peso molecular

### **Reactivos y Materiales:**

- Agua destilada
- Agarosa para electroforesis (código: CSL-AG500, marca: Cleaver Scientific)
- Buffer TAE 1X
- Parafina
- Reactivo para visualización de bandas de ADN SYBR safe DNA gel stain (código: #S33102, marca: ThermoScientific)

- Reactivo para carga de muestra en gel de agarosa 6X DNA Loading Dye (código: #R0611, marca: ThermoScientific)
- Marcador de peso molecular de 1Kb (kilobase) (código: #SM0311, marca: ThermoScientific)
- Micropipeta de 0.01 mL (marca: Axygen)
- Tips con filtro estériles (marca: Axygen)
- Matraz de 250 mL de pirex (marca: Brand)
- Balanza analítica (marca: Sartorius)
- Transiluminador de luz azul (marca: Invitrogen)
- Horno microondas (marca: Thomas)
- Fuente de poder para corrida electroforética (marca: BIORAD)
- 2.1.1.15. Sistema horizontal para electroforesis (modelo: MSChoice, marca: Cleaver Scientific) (incluye bandeja y peine para electroforesis)

**Procedimiento:**

- Se pesó 0.60 gramos de agarosa y se añadió en 55 mL de buffer TAE 1X en un matraz.
- Se diluyó y licuó la agarosa en un horno microondas por 2 minutos, se añadió 0.003 mL de SYBR safe DNA gel stain y se homogenizó.
- Luego se dispensó la agarosa licuada en la bandeja del sistema horizontal para electroforesis, se colocó el peine para electroforesis y se dejó solidificar por 10 minutos.
- Luego se colocó la agarosa solidificada con la bandeja dentro del sistema horizontal de electroforesis y se retiró el peine de electroforesis.
- Se agregó buffer TAE 1X hasta que cubra el gel de agarosa.
- Luego se cortó una lámina de parafina y se colocó sobre la mesa de trabajo para la preparación de muestras.
- Se cogió 0.005 mL de ADN extraído y se mezcló con 0.002 mL de 6X DNA Loading Dye. La mezcla se dispensó en un pocillo del gel de agarosa.
- Se colocaron las 08 muestras de ADN extraído y a los extremos se colocaron 0.005 mL de marcador de peso molecular de ADN de 1kb.
- Luego se realizó la corrida de electroforesis a 110V por 20 minutos.

- Luego de terminar la corrida se colocó el gel de electroforesis sobre el transiluminador de luz azul para observación de las bandas de ADN.

## **Anexo 8. PCR convencional**

PCR convencional con primers universales de 16S rRNA

### **Reactivos y Materiales**

- Agua de PCR grado molecular libre de ADNasa y ARNasa UltraPure™ DNAsa/RNAsa-Free Distilled Water (código: 10977015, marca: Invitrogen).
- Solución de nucleótidos dNTP set (código: 10297018, marca: Invitrogen)
- Microtubos de 0.6 mL (código: MCT-060-C, marca: Axygen)
- Microtubos de 0.2 mL (código: PCR-02-C-1u, marca: Axygen)
- Micropipetas de 10 uL, 100 uL (marca: Axygen)
- Tips con filtro libres de ADNsa/ARNsa (marca: Axygen)
- Rack frío para tubos de PCR (código: Z606634, marca: Eppendorf)
- Cabina de PCR (código: CSL-UVCAB, marca: CleaverScientific)
- Cebadores o primers universales para 16S ARN, forward: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y reverse: 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (marca: IDTDNA).
- Kit para PCR convencional Taq Platinum (código: 10966030, marca: Invitrogen)
- Equipo termociclador (modelo: PeqLab, marca: PeqStar)
- Minivortex (código: 358-VM-03GUA, marca: Crystal)
- Minicentrífuga (código: 19486580, Richmond Scientific)

### **Procedimiento:**

- Se colocó los materiales de PCR (microtubos de 0.2 mL, 0.6mL, micropipetas, tips con filtro) dentro de la cabina de PCR y se esterilizó por UV por 15 minutos.
- Luego, se preparó la siguiente mezcla de reacción de PCR en un microtubo de 0.6 mL para 6 muestras por duplicado, añadiendo un control negativo (13 microtubos de 0.2mL):

Tabla N° 01. Reactivos y Cantidades para PCR

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen para 1X (uL)</b>
Buffer PCR 1X	2.5
dNTP (2mM)	2.0
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1.25
Taq Platinum (5U/uL)	0.1
Primer 1492R (10 uM)	2.0
Agua (H <sub>2</sub> O)	10.15
ADN	5.0
<b>TOTAL</b>	<b>25.0</b>

- La mezcla de reacción de PCR preparada en el microtubo de 0.6 mL se dispensó en los microtubos de 0.2 mL un volumen de 20 uL.
- Luego se añadió al control negativo agua grado molecular.
- Posteriormente se rotuló cada microtubo de 0.2mL y se dispensó 5 uL de cada muestra.
- Luego se colocaron los microtubos en el equipo termociclador PeqLab, se seleccionó el siguiente programa:

Tabla N° 02. Programa para PCR

<b>Procedimiento</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Denaturación inicial	94°C	2 minuto	1
Denaturación	94°C	1 minuto	
Annealing	55°C	1.5 minutos	35
Amplificación	72°C	1 minuto	
Amplificación final	72°C	3 minutos	1
Storage	4°C	∞	

- Luego se dio inició a la PCR por una duración de 2:05 minutos.
- Al término de la reacción de PCR, los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 2% (voltaje: 110V, Tiempo: 55 minutos) en un transiluminador de luz azul.

## **Anexo 9. PCR convencional con primers específicos para *P. atrosepticum***

### **Reactivos y Materiales**

- Agua de PCR grado molecular libre de ADNasa y ARNasa UltraPure™ DNAsa/RNAsa-Free Distilled Water (código: 10977015, marca: Invitrogen).
- Solución de nucleótidos dNTP set (código: 10297018, marca: Invitrogen)
- Microtubos de 0.6 mL (código: MCT-060-C, marca: Axygen)
- Microtubos de 0.2 mL (código: PCR-02-C-1u, marca: Axygen)
- Micropipetas de 10 uL, 100 uL (marca: Axygen)
- Tips con filtro libres de ADNsa/ARNsa (marca: Axygen)
- Rack frío para tubos de PCR (código: Z606634, marca: Eppendorf)
- Cabina de PCR (código: CSL-UVCAB, marca: CleaverScientific)
- Cebadores o primers específicos ECA1F y ECA2R, forward: ECA1F (5'-CGGCATCATAAAAACG-3') y reverse: ECA2R (5'-GCACACTTCATCCAGCGA-3') (marca: MacroGen Inc).
- Kit para PCR convencional Taq Platinum (código: 10966030, marca: Invitrogen)
- Equipo termociclador (modelo: PeqLab, marca: PeqStar)
- Minivortex (código: 358-VM-03GUA, marca: Crystal)
- Minicentrífuga (código: 19486580, Richmond Scientific)

### **Procedimiento:**

- Se colocó los materiales de PCR (microtubos de 0.2 mL, 0.6mL, micropipetas, tips con filtro) dentro de la cabina de PCR y se esterilizó por UV por 15 minutos.
- Luego, se preparó la siguiente mezcla de reacción de PCR en un microtubo de 0.6 mL para 6 muestras por duplicado, añadiendo un control negativo (microtubos de 0.2mL):

Tabla N° 03. Reactivos y Cantidades para PCR

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen para 1X (uL)</b>
Buffer PCR 1X	3.0
dNTP (2mM)	1.5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1.25
Taq Platinum (5U/uL)	0.1
Primer ECA1F (10 uM)	1.0
Primer ECA2R (10 uM)	1.0
Agua (H <sub>2</sub> O)	12.15
ADN	5.0
<b>TOTAL</b>	<b>25.0</b>

- La mezcla de reacción de PCR preparada en el microtubo de 0.6 mL se dispensó en los microtubos de 0.2 mL un volumen de 20 uL.
- Luego se añadió al control negativo 5 uL agua grado molecular.
- Posteriormente se rotuló cada microtubo de 0.2mL y se dispensó 5 uL de cada muestra.
- Luego se colocaron los microtubos en el equipo termociclador PeqLab, se seleccionó el siguiente programa:

Tabla N° 04. Programa para PCR

<b>Procedimiento</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Denaturación inicial	95°C	5 minuto	1
Denaturación	94°C	30 seg.	35
Annealing	62°C	45 seg.	
Amplificación	72°C	45 seg.	
Amplificación final	72°C	8 minutos	1
Storage	4°C	∞	

- Luego se dio inicio a la PCR por una duración de 1:30 minutos.
- Al término de la reacción de PCR, los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 2% (voltaje: 110V, Tiempo: 55 minutos) en un transiluminador de luz azul.

## **Anexo 10. PCR convencional con primers específicos para *P. carotovorum***

### **Reactivos y Materiales**

- Agua de PCR grado molecular libre de ADNasa y ARNasa UltraPure™ DNAsa/RNAsa-Free Distilled Water (código: 10977015, marca: Invitrogen).
- Solución de nucleótidos dNTP set (código: 10297018, marca: Invitrogen)
- Microtubos de 0.6 mL (código: MCT-060-C, marca: Axygen)
- Microtubos de 0.2 mL (código: PCR-02-C-1u, marca: Axygen)
- Micropipetas de 10 uL, 100 uL (marca: Axygen)
- Tips con filtro libres de ADNsa/ARNsa (marca: Axygen)
- Rack frío para tubos de PCR (código: Z606634, marca: Eppendorf)
- Cabina de PCR (código: CSL-UVCAB, marca: CleaverScientific)
- Cebadores o primers específicos EXPCCF y EXPCCR, forward: EXPCCF (5'-GAACTTCGCACCGCCGACCTTCTA-3') y reverse: EXPCCR (5'-GCCGTAATTGCCTACCTGCTTAAG-3') (marca: MacroGen Inc.).
- Kit para PCR convencional Taq Platinum (código: 10966030, marca: Invitrogen)
- Equipo termociclador (modelo: PeqLab, marca: PeqStar)
- Minivortex (código: 358-VM-03GUA, marca: Crystal)
- Minicentrífuga (código: 19486580, Richmond Scientific)

### **Procedimiento:**

- Se colocó los materiales de PCR (microtubos de 0.2 mL, 0.6mL, micropipetas, tips con filtro) dentro de la cabina de PCR y se esterilizó por UV por 15 minutos.
- Luego, se preparó la siguiente mezcla de reacción de PCR en un microtubo de 0.6 mL para 6 muestras por duplicado, añadiendo un control negativo (microtubos de 0.2mL):

Tabla N°05. Cuantificación de los productos de PCR.

<b>Muestra</b>	<b>Cuantificación (ng/uL)</b>
<b>CO1-16S</b>	65 ng/uL
<b>CO3-16S</b>	75 ng/uL
<b>CO4-16S</b>	72 ng/uL
<b>CU1-16S</b>	81 ng/uL
<b>CU2-16S</b>	76 ng/uL
<b>CU4-16S</b>	36 ng/uL
<b>CO3-16S</b>	25 ng/uL

- La mezcla de reacción de PCR preparada en el microtubo de 0.6 mL se dispensó en los microtubos de 0.2 mL un volumen de 20 uL.
- Luego se añadió al control negativo 5 uL agua grado molecular.
- Posteriormente se rotuló cada microtubo de 0.2mL y se dispensó 5 uL de cada muestra.
- Luego se colocaron los microtubos en el equipo termociclador PeqLab, se seleccionó el siguiente programa:

Tabla N° 06. Cobertura de las secuencias ( $QV \geq 20$ ) de los aislamientos.

<b>Muestra</b>	<b>Tamaño en pb (<math>Qv \geq 20</math>)</b>
<b>CO1 – 16S</b>	1150
<b>CO3 – 16S</b>	1230
<b>CO4 – 16S</b>	1381
<b>CU1 – 16S</b>	1407
<b>CU2 – 16S</b>	1383
<b>CU4 – 16S</b>	1082
<b>CO3 – ECA</b>	238

- Luego se dio inicio a la PCR por una duración de 3:10 minutos.

- Al término de la reacción de PCR, los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 2% (voltaje: 110V, Tiempo: 55 minutos) en un transiluminador de luz azul.

## **Anexo 11. Secuenciamiento de ADN**

### **Reactivos y Materiales**

Microtubos de 0.5mL (código: PCR-02-C-1u, marca: Axygen)

- Micropipetas de 10 uL (marca: Axygen)
- Tips con filtro estériles para micropipetas de 10 uL (marca: Axygen)
- Reactivo para cuantificación en el Equipo Qubit dsADN BR (código: Q32850, marca: Invitrogen)
- Equipo para cuantificación de ADN Qubit® (marca: Invitrogen)

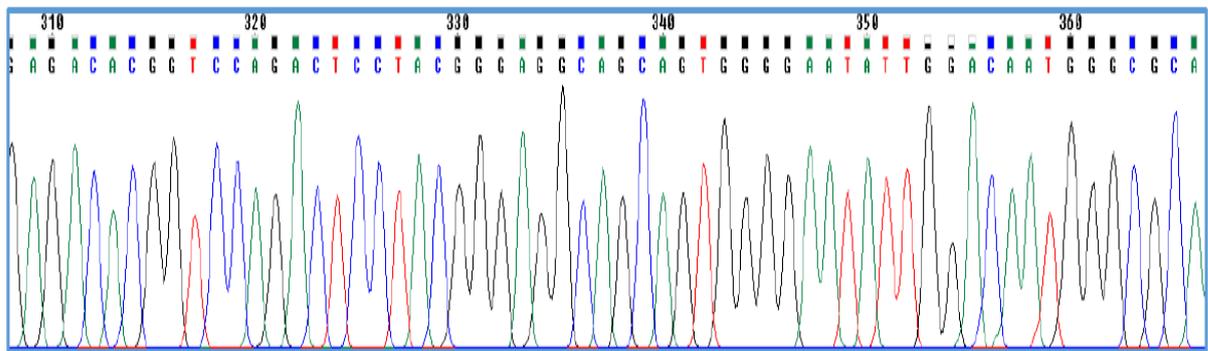
### **Procedimiento:**

- Los productos amplificados fueron cuantificados en el equipo ADN Qubit específicamente para ADN de doble cadena.
- En un microtubo de 0.5mL se mezcló 99 uL del reactivo Qubit dsADN BR y 1 uL de muestra.
- Se realizó el experimento para todos los productos de PCR que se enviaron a secuenciar.
- Se registró la cuantificación de ADN
- Posteriormente, cuando la cuantificación superó los 20ng/uL en cada microtubo, los productos de PCR se enviaron a secuenciar a la empresa koreana Macrogen Inc.
- El secuenciamiento de ADN del gen 16S rRNA fue realizado con los primers externos 27F y 1492 R, y primers internos 907R y 785F.
- El secuenciamiento de ADN específico para *P. atrosepticum* fue realizado con los primers ECA1F/ECA2R.
- El resultado de secuenciamiento se consideró óptimo cuando el valor de Calidad es mayor a 20 ( $QV \geq 20$ ).
- El ensamblaje de las secuencias de ADN se realizó con el software BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)

- La secuencia ensamblada como mínimo supero los 800 pares de bases para poder realizar la identificación de especie.
- La secuencia ensamblada fue analizada con el software BlastN ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)) para la identificación de especie.
- Se consideró identificada cuando la similaridad se ubicó por encima del 99%, la cobertura cercana a 100% y el e-value (valor estadístico) de 0.

Las muestras ensambladas fueron las siguientes

- CO1 – 16S

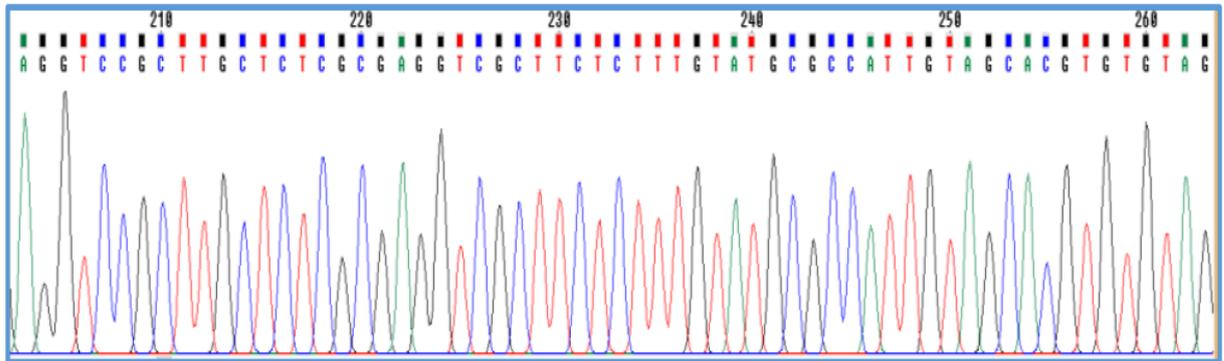


Cantidad 1150 pb

```
GCCTCTCGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATG
GCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTG
GAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC
ACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCG
GGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCAGTAAGGTTAATAACCTTATT
GATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTGAACTGGGCGTAAAGCGCA
CGCAGGCGGTCTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACT
GCATTCAAAACTGACAGGCTAGAGACTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTT
TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCC
CCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
AGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTT
GAGGCGTGGCTTCCGAAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGC
CGCAAGGTTAAAAC TCA AATGAATTGACGGGGGCCGGCACAAGCGGTGGAGC
ATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCACA
GAATTCGGCAGAGATGCCTTAGTGCCTTCGGGAAC TGTGAGACAGGTGCTGCA
TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTCGGTTCGGGAAC TCAAAGGAGACTGC
```

CGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTAC  
 GAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAGCGACCTCG  
 CGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAA  
 CTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCA

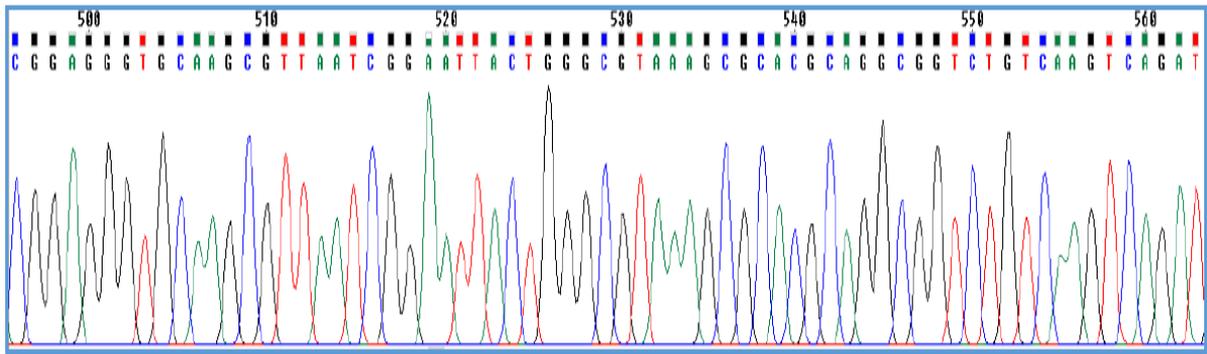
- CO3 – 16S



Cantidad 1230 pb.

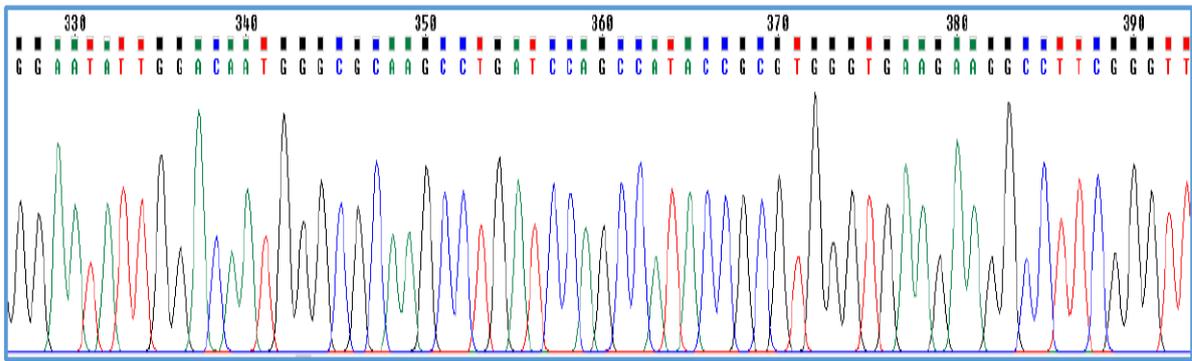
AAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATT  
 CCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGAGTACGACGTACTTTA  
 TGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATACGCCATTGTAGCA  
 CGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTC  
 CTCCGGTTTATACCGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGACCGAATCGCTGGTAAC  
 AAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTCACAACACG  
 AGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACTCAGCT  
 ATCTCTAGCTAATTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCAT  
 CGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAG  
 TTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGATTTAACGCGTTAGCTCCGG  
 AAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAATCGACATCGTTTACAGCGTGGAC  
 TACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGT  
 CTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATT  
 TCACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGTCAGTT  
 TTGAATGCAGTTCCCAGGTTAAGCCCGGGATTTACATCCAACAAACAGAC  
 CGCCTGCGTGCGCTTTACGCCAGTCATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTA  
 TTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCGGCGAGTAACGTC  
 AATCAGCCGTGCTATTAACACGACTGCCTTCCTCCTCGGTGAAAGTGCTTTACA  
 ACCCGAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCAT  
 TGTGCAATATTCCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTT  
 CCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCGGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAG  
 CCATTACCTACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGCACATCTGATGGCGAGAGG  
 CCCGAAGGTCCCCCTCTTTGCTCTTGCGAGGTTATGCGGTATTAGCTACCGT

- CO4 – 16S



GAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGC  
TTGCTCTTGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCC  
GATGGAGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTTCG  
GACCAAAGTGGGGACCTTCGGGCCTCACGCCATCGGATGTGCCAGATGGGA  
TTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCT  
GAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGG  
AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGC  
CGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAG  
GCGATACGGTTAATAACCGTGTTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGG  
CTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA  
ATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCAGATGTGAAATCC  
CCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGA  
GGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAAT  
ACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAG  
CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGT  
CGACTTGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGT  
CGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGG  
GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACC  
TTACCTGGCCTTGACATCCACAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGG  
AACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTG  
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTTCGGTC  
GGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACG  
TCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCA  
TACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCGT  
AGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT  
CGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC  
GTCACACCA

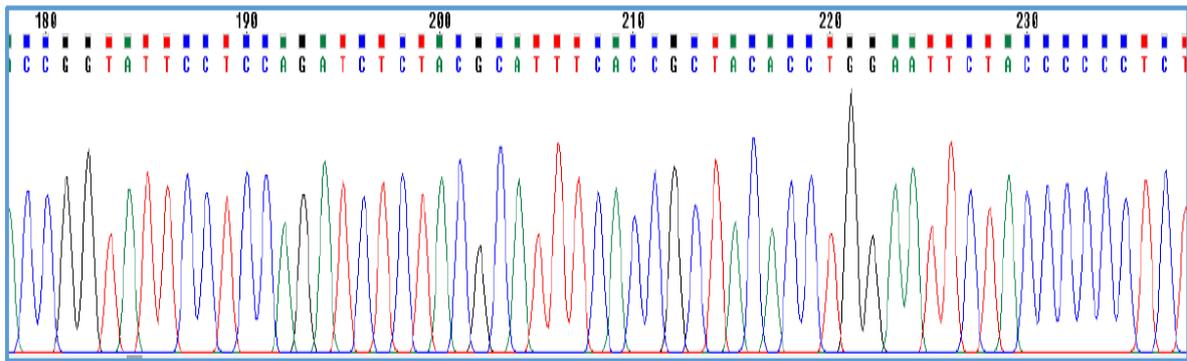
- CU1 – 16S



Cantidad: 1407 pb.

TCAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCAC  
AGGAGAGCTTGCTCTCTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCG  
GAATCTACTTTTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCAT  
ACGACCTACGGGTGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGC GCGATTGAATGAGC  
CGATGTCGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCG  
TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGT GAGACACGGTCCAGAC  
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCC  
AGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCCCTTTTGTGG  
GAAAGAAATCCAGCTGGCTAATACCCGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAAT  
AAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGC  
GTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTCGTTTAAAGTCCGTT  
GTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAACTGCAGTGGATACTGGGCGACTAGAG  
TGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGT GAAATGCGTAGAGATCA  
GGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGG  
CACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTA  
AACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAAC  
GCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAA  
TTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTT AATTCGATGCAACGC  
GAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGT  
GCCTTCGGGAACTCGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTG  
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTTGCCAG  
CACGTAATGGTGGGAACTCTAAGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG  
TGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTACT  
ACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAGCCGGCGACGGTAAGCCAATCCCAGA  
AACCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAA  
TCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT  
ACACACCGCCCGTCAACCATGGGAGTTTGTTC

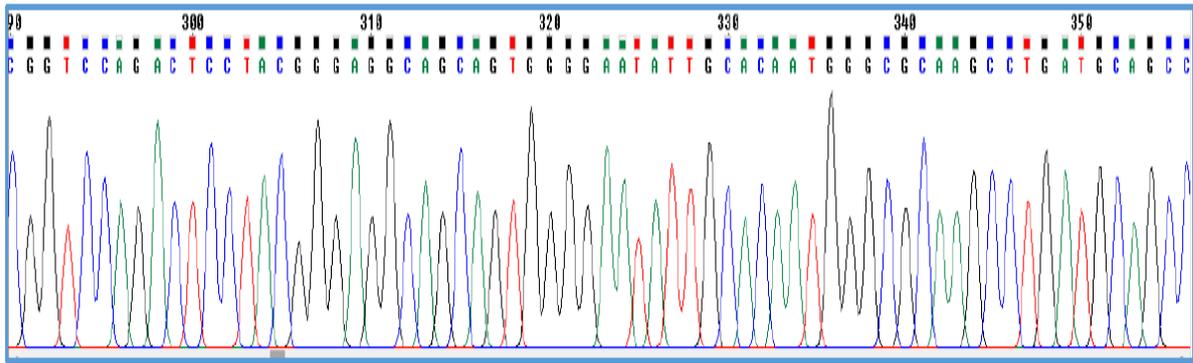
- CU2 – 16S



Cantidad: 1383 pb

GGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAAGAGCTTGCTCTTTG  
GGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGG  
GGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACCTCGCAAGAGCAA  
GAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTA  
GTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGA  
TGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC  
AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTG  
TGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCCGTGA  
GGTTAATAACCTTATCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTC  
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATGACTG  
GCGGTAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCT  
TAACCTGGGAACTGCATTCAAAGTGAAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGT  
AGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTG  
GCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG  
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTG  
GAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAATCGACCGC  
CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAGTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGC  
ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTA  
CTCTTGACATCCAGAGAATTTGCTAGAGATAGCTTAGTGCCTTCGGGAACTCTG  
AGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAG  
TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTTCGGTTCGGGAACT  
CAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC  
ATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAAAG  
AGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTCGTAGTCCGG  
ATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGAT  
CAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACAC  
CATGGGAGTGGG

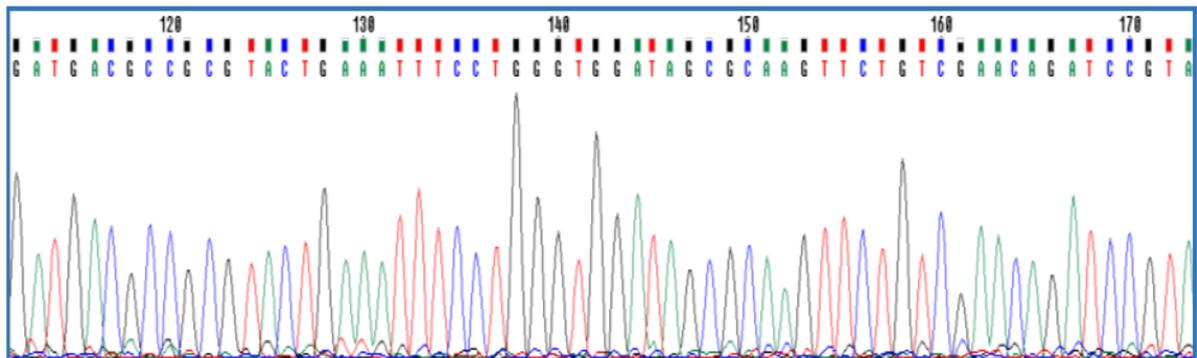
- CU4 – 16S



Cantidad: 1082 pb

AGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGGCGTCGATGTGCCAGATAGGGATTAGCTAG  
TAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGAT  
GACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGT  
GAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTGAGG  
TTAATAACCTCATCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCG  
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGC AAGCGTTAATCGGAATGACTGG  
GCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTT  
AACCTGGGAACTGCATTCAAACTGACAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTA  
GAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGC  
GAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGC  
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTTAACGATGTCGATTTGGAG  
GTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAATCGACCGCCTGG  
GGGAGTACGGCCGCAAGGGGTTAAACTCAATGAATTTTGACGGGGCCCGCACA  
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAGAACCTTACCTACTCTT  
GACATCCACAGAATTCGTAGAGATACCTTAAGTGCCTTCGGAACCTGTGAGAC  
AGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAATGTTGGGTTAAGTCCCGC  
ACGAGCGCACCCCTTATCCTTTGTTGCACCGATTTCGTTCGGAACCTCAAGAGACTGC  
CGTGAATAATCCGAGAAGTGGGATGACGTCAGTCTCATGGCCTTACAGTAGGC  
TACACCTGCTACATGCGTTAACAGAAAACGACTCCGGAAGCAGCGACTCCAAG  
TACGTCTATCCGATGGATCGCATC

- CO3 – ECA



Cantidad: 238 pb

```
TCTACTCTTCTGGATCTTCGACAGAGAACTCACTACAGAGGAATTCGCCGAGG
AAGAGCGCAATATGATCAGCGGCGTGCTGACGTTAGCCTCGCGTTCGCTGCGT
AGCGTGATGACGCCGCGTACTGAAATTTCTGGGTGGATAGCGCAAGTTCTGT
CGAACAGATCCGTATGCAATTGCTGGATACGCCTCACAGCCTGTTCCCAATCTG
TCGTGGCTCGCTGGATGAAGTGTGC
```

## **Anexo 12. Análisis filogenético**

### **Materiales:**

- Computadora portátil
- Software bioinformático MEGA 6.0 (<https://www.megasoftware.net/>)
- Software bioinformático MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>)

### **Procedimiento:**

- Se realizó la búsqueda y colecta de secuencias de 16S rRNA de cepas bacterianas iguales a las identificadas, y otras que pertenezcan al mismo género y de otros géneros distantes.
- Se realizó un alineamiento mutiple con el software bioinformático MUSCLE y MEGA 6.0.
- Luego se realizó un análisis filogenético con el algoritmo de reconstrucción filogenético Neighbor joining y la medida de distancia genética con el método Kimura-2 parameter. La construcción del árbol filogenético se realizó con un bootstrap de 1000 para el soporte estadístico