UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS DE TUBÉRCULOS DE PAPA (*Solanum tuberosum L.)* CON SÍNTOMAS DE PUDRICIÓN BLANDA, RECOLECTADAS EN TIERRAS ALTAS, (VOLCÁN) CHIRIQUÍ 2021

PRESENTADO POR:

KARLA YAJANIA FLORES CARRERA

4-806-1033

PROFESOR ASESOR:

LUIS GONZALÉZ

TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA CON ÉNFASIS EN MICROBIOLOGÍA

DAVID, CHIRIQUÍ

REPÚBLICA DE PANAMÁ

2022

E-T- 23/11/22 Bib RJyT- 47/14 Reg Koha obs 8va

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ BIBLIOTECA Dr. ROBERTO JAÉN Y JAÉN

AUTORIZACIÓN PARA LA INCORPORACIÓN DE TRABAJO AL REPOSITORIO JÄ DIMIKE DE LA UNACHI.

Yo, KARLA YAJANIA FLORES CARRERA , con cédula de identidad personal/ pasaporte 4-806-1033 , autorizo que mi trabajo (tesis, trabajo de grado, monografía, artículo, video, conferencia, libro, imagen, fotografía, audio, presentación u otro),titulado IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS DE TUBÉRCULOS DE PAPA (*Solanum tuberosum L.*) CON SÍNTOMAS DE PUDRICIÓN BLANDA, RECOLECTADAS EN TIERRAS ALTAS, (VOLCÁN) CHIRIQUÍ 2021 , sea incorporado al Repositorio JÄ DIMIKE de la Universidad Autónoma de Chiriquí, para fines educativos y no lucrativos, por lo que eximo de cualquier tipo de responsabilidad a la UNACHI y al REPOSITORIO JÄ DIMIKE con respecto a violaciones al Derecho de autor y propiedad intelectual, entre otras, y declaro que soy titular de los derechos de la obra arriba descrita, por lo cual asumo personalmente cualquier responsabilidad emanada de la publicación de la misma.

Firmo para constancia, hoy 06 de 06 de 2022

Nombre: KARLA YAJANIA FLORES CARRERA

Firma: Karla Flores

Cédula/Pasaporte: 4-806-1033

AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias a Dios por la vida, por mi salud, por todas las bendiciones que me ha dado, por cada sueño alcanzado, y las fuerzas que me ha dado para continuar.

Quiero agradecer a mis asesores de tesis, por el tiempo dedicado, sus conocimientos brindados, por el apoyo y consejos, los cuales me motivaron mejorar continuamente y alcanzar los resultados que buscaba.

A mi familia y seres queridos, que me animaron en cada momento para culminar este proyecto, me impulsaron a superarme y seguir adelante, le agradezco inmensamente su amor incondicional.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a:

A mis padres Thaira y Carlos quienes con su amor y paciencia me han permitido llegar a cumplir hoy una meta más, por apoyarme e inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación.

A Homiladys Miranda, por apoyarme en todas mis decisiones, ser una guía y siempre poder estar para mí, quien con sus palabras de aliento no me dejaban decaer para que siguiera adelante y siempre luchara por mis metas.

A mis abuelos que siempre me han apoyado y me han impulsado a seguir mis sueños.

A César Quiel quien ha sido mi pilar, me ha apoyado incondicionalmente en todo momento y aún más para la culminación de este trabajo.

Finalmente quiero agradecer a mi prima, mis amigas, por apoyarme y extender su mano en momentos difíciles, por el amor brindado cada día y por motivarme a culminar mi carrera.

Este logro está dedicado a ustedes.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos ii

Dedicatoria.....iii

Índice de cuadros vii

Índice de figuras viii

Resumen.....xi

Abstract xii

I. Introducción.....1

1.1Antecedentes.....1

II. Descripción del área de estudio.....5

III. Marco teórico.....6

3.2 Origen de la papa.....7

3.3 Clasificación taxonómica y descripción botánica de la especie.....8

3.4 Importancia de la papa.....9

3.5 Morfología de la planta.....11

3.6 Variedades de papa.....13

3.7 Desarrollo y crecimiento de la papa.....14

3.8 Bacterias patógenas de la papa.....16

3.8.1 Género *Ralstonia solanacearum*.....18

3.8.2 Genero *Pseudomonas spp*.....22

3.8.3 Genero *Burkholderia spp*.....24

3.8.4 Genero *Erwinia*.....28

3.9 Pruebas para la identificación de bacterias patógenas.....33

3.9.1 Pruebas morfológicas.....33

3.9.2Principales pruebas bioquímicas para la identificación bacteriana.....35

3.9.3 Medios de cultivo 37

3.9.4 Componentes del medio de cultivo.....37

3.9.5 Tipos de medios de cultivo.....39

3.9.6 Preparación de medios de cultivo.....40

3.9.7 Cultivo Puro.....42

3.9.8 Agar EMB (con Eosina y Azul de Metileno).....44

3.9.9 Agar Sangre.....45

3.9.10 Agar MacConkey.....47

IV. Materiales y métodos.....48

4.1 Colecta de material vegetal con sintomatología de marchitez bacteriana.....48

4.2 Obtención de aislamiento bacteriano..... 49

4.3 Métodos.....49

4.3.1 Tinción Gram..... 50

4.3.2 Actividad de la enzima catalasa..... 51

4.3.3 Producción de Indol.....51

4.3.4 Prueba de Citrato..... 52

4.3.5 Prueba de Rojo de Metilo (RM)..... 53

4.3.6 Prueba de Voges Proskauer (VP).....53

4.3.7 Prueba de SIM..... 53

4.3.8 Prueba de Lisina.....54

4.3.9 TSI..... 54

4.3.10 Prueba de Urea.....56

4.4 Agar Sangre..... 57

4.5 Agar Eosina y Azul de Metileno (EMB)..... 57

4.6 Agar MacConkey..... 58

4.7 MicroScan..... 59

V. Resultados y Discusión.....60

VI. Conclusiones.....69

VII. Recomendaciones.....70

VIII. Referencias Bibliográficas.....71

IX. Anexos.....88

X. Glosario.....108

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Características microbiológicas y bioquímicas de *R. solanacearum* (Chavarro y col., 2004). 21

Cuadro 2. Características bioquímicas y físicas de distintas especies de *Pseudomonas* (Forbes y col., 2009). 24

Cuadro 3. Pruebas bioquímicas para la diferenciación de *Burkholderia gladioli* (Henry y col., 2001). 27

Cuadro 4. Características fisiológicas y bioquímicas usadas para discriminar las *Enterobacteriaceae* más comunes de pudrición blanda (Pérombelon y van der Wolf, 2002; Baghaee-Ravari y col., 2011). 32

Cuadro 5. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias (MacFaddin, 2003). 36

Cuadro 6. Resultado de las pruebas bioquímicas realizadas a las muestras de papa (*Solanum tuberosum*). 65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Área de muestreo, presenta un clima frio, de 16 °C. (Flores, K.2022) 6

Figura 2. Partes de la planta de papa (Tomada de Gandarillas y Ortuño, 2009). 13

Figura 3. Etapas de desarrollo y crecimiento de la planta de papa (Tomada de Gandarillas y Ortuño, 2009). 16

Figura 4. Marchitez bacteriana de la papa (Ralstonia solanacearum). Plantas en campo mostrando síntomas de la enfermedad. (Tomada de Gandarillas y Ortuño, 2009). 19

Figura 5. Marchitez bacteriana de la papa (Ralstonia solanacearum). Decoloración y tejidos necróticos por pudrición secundaria. (Tomada de Gandarillas y Ortuño, 2009). 20

Figura 6. *Pectobacterium spp.*, provoca una pudrición blanda en los tubérculos de papa. (CENTA, El Salvador). 30

Figura 7. Tallo de planta de papa infectado por Pectobacterium spp. (pierna negra). (Flores, K. 2022). 31

Figura 8. Modelo de autoclave. (Flores, K. 2022). 42

Figura 9. Preparación de Agar EMB. (Flores, K. 2022). 45

Figura 10. Preparación de agar sangre. (Flores, K. 2022). 46

Figura 11. Preparación de agar MacConkey. (Flores, K. 2022). 48

Figura 12. Cultivo puro de las 12 muestras. De derecha a izquierda: 1. Muestra de papa, 2. Muestra de papa, 3. Muestra de papa, 4. Muestra de papa, 5. Muestra de

papa, 6. Muestra de papa, 7. Muestra de papa, 8. Muestra de hoja, 9. Muestra de hoja , 10. Muestra de papa, 11. Muestra de hoja, 12. Muestra de raíz. . (Flores, K.2022) ..50

Figura 13. Prueba de Catalasa. En los portaobjetos se observan burbujas en grandes y pequeñas cantidades, esto demuestra que son catalasa positiva.....51

Figura 14. Prueba de citrato. Las bacterias capaces de usar el citrato provocarán el cambio de color del medio de verde a azul intenso, por viraje del indicador de pH, azul de bromotimol, a la vez que se observa crecimiento en la superficie. En la prueba 1, 2 y 8 no se observó crecimiento. En las demás pruebas 3,4,5,6,7,9,10,11 y 12 se obtuvo un resultado positivo. 52

Figura 15. Prueba de TSI. A) Pico alcalino/fondo alcalino (pico rojo/fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares. B) Anaranjado/anaranjado (control, sin inocular). C) Pico alcalino /fondo ácido (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa. D) Pico ácido/fondo ácido (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa. E) El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico (H2S). D) La presencia de burbujas, o ruptura del medio de cultivo, indica que el microorganismo produce gas. Los resultados se muestran en el cuadro 8.....56

Figura 16. Vertido del agar sangre. (Flores, K.2022) 57

Figura 17. Preparación de agar EMB. El agar se vierte en los platos Petric, se deja reposar por 15 minutos, y se cultivan las muestras. (Flores, K.2022).....58

Figura 18. Vertido del agar MacConkey. (Flores, K.2022).....59

Figura 19. Prueba de MicroScan para la identificación bioquímica de las bacterias. (Flores, K.2022) **60**

Figura 20. Bacterias patógenas encontradas en la papa (*Solanum tuberosum)* **67**

RESUMEN

Una de las grandes limitantes en la producción de papa en nuestro país son los problemas fitosanitarios, donde las principales bacterias patógenas son causantes de daños lo cual reduce la calidad y apariencia, esto provoca el rechazo del consumidor y por ende grandes pérdidas económica. Por ello, el objetivo de este trabajo es caracterizar a nivel patológico y microbiológico las bacterias aisladas de tubérculos de papa cultivados en la provincia de Chiriquí, distrito de tierras altas. En esta investigación se realizaron muestreos de la papa (*Solanum tuberosum L.)* en el Distrito de Tierras Altas, tomando 12 muestras en total con sintomatología de marchitez o pudrición blanda. Las mismas fueron colectadas en época de verano, en Volcán se colecto en una finca ubicada en Alto Bambito. Se utilizó bolsas ziploc para la colecta de las papas con sintomatología de pudrición blanda y se transportaron al laboratorio de Microbiología de la Universidad Autónoma de Chiriquí, a una temperatura de 28 a 30 °C. En el laboratorio se realizaron diversos cultivos selectivos, luego de cada cultivo se aisló las muestras para su identificación. Se realizaron observaciones de la morfología de las bacterias, al pasar las 24 horas y se realizaron pruebas como: Tinción de Gram, TSI, Citrato, RM, VP, SIM, Urea, Lisina, Catalasa, Indol, para identificar las bacterias patógenas causantes de la pudrición blanda, con el fin de caracterizar y lograr la identificación de los aislados. En cuanto a los resultados se logró identificar bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriacae: Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes.*

Palabras claves: bacterias, patógenas, cultivos, pudrición, blanda, identificación, pruebas, sintomatología, fitopatógenas, muestreo.

ABSTRACT

One of the biggest issues on potato production in our country is phytosanitary problems, where the essential pathogenic bacteria are causing damage which reduces the quality and appearance, this causes consumer rejection for this reason farmers to have great economic losses. The principal reason for this work is to characterize at a pathological and microbiological level the bacteria isolated in potato tubers grown in Chiriqui, Tierras Altas district. In this research potato (*Solanum tuberosum L.)* samples were taken at the Tierras Altas district, taking 12 samples with soft and overblown symptoms. The samples were taken during the summer at Volcan on a farm located in Alto Bambito. Ziploc bags were used to collect potatoes with symptoms and then potatoes were transported to the Microbiology laboratory of the Universidad Autonoma de Chiriquí at a temperature of 28 to 30 °C.

In the laboratory some selective crops were performed, then the selective crops were isolated to identify microorganisms. After 24 hours of observation of the bacteria, morphology was made, and tests were executed. Tests like: Tincion de Gram, TSI, Citrato, RM, VP, SIM, Urea, Lisina, Catalasa, and Indol were used to identify pathogenic bacteria which cause soft putrescene, to characterize and achieve the identification of the isolates samples. Finally, we could identify bacteria family's *Enterobacteriacae* such as *Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes.*

Keywords: bacteria, pathogens, cultures, rot, soft, identification, testing, symptomatology, phytopathogenics, sampling.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La papa pertenece al género *Solanum* dentro de la familia de las solanáceas donde también se encuentran el tomate (*Lycopersicon esculentum*), el ají (*Capsicum spp.*), la petunia (*Petunia spp.*), el tamarillo (*Cyphomandra spp.),* el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y otras especies con bayas venenosas (Hawkes, 1990). Solo una parte reducida del género *Solanum* se encuentra conformado por especies que forman tubérculos o son tuberizantes, a las que se denomina papa (Ponce, 2013).

La papa es una planta dicotiledónea herbácea anual, autógama, con flores pentámeras de diversos colores. Los frutos son bayas de forma redonda como un pequeño tomate con 200 a 300 semillas. Los tallos son herbáceos, angulares, generalmente de color verde o rojo púrpura. Las hojas adultas son compuestas, pero las primeras hojas provenientes del tubérculo pueden ser simples. Los estomas son más numerosos en la superficie inferior de las hojas. Las raíces y estolones se desarrollan a partir del tallo subterráneo, entre el tubérculo-semilla y la superficie del suelo (Gandarillas y Ortuño, 2009).

Probablemente es la planta cultivable con la mayor incidencia de enfermedades, superando a cualquier otro cultivo. Si se consideran las principales enfermedades de la papa, las menores y aquellas de etiología desconocida, sobrepasaría a 100 enfermedades (Notario, 2009). De las enfermedades bacterianas de mayor impacto mundial que atacan el cultivo de la papa, han sido reportadas en Venezuela, en orden

de relevancia, la marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*, pierna negra y pudrición blanda causadas por *Pectobacterium sp*., pudrición anular causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, y la sarna común causada por *Streptomyces scabies* (CIP, 1995). Además, se ha reportado que este cultivo es susceptible a *Burkholderia gladioli* causante de pudrición blanda (Fonseca 2014).

En la papa cultivada en el estado Mérida las bacterias de mayor relevancia que han sido reportadas son *Ralstonia solanacearum* y *Erwinia sp*. Estas bacterias presentan un serio peligro para la comunidad del rubro, ya que producen infección latente en tubérculos, semillas y además, tienen la capacidad de sobrevivir en el suelo dependiendo del manejo del cultivo, las condiciones edafoclimáticas y las especies o sub especies involucradas (García, 2000).

1.2 Definición del problema

La papa (*Solanum tuberosum L.),* es un alimento versátil y tiene un gran contenido de carbohidratos, recién cosechada, contiene un 80 % de agua y un 20 % de materia seca. Entre el 60 % y el 80 % de esta materia seca es almidón (Contreras, 2008). Representa uno de los tubérculos más importantes para la alimentación de gran parte de la población en todo el mundo. El cultivo se adapta a temperaturas relativamente bajas, con una producción máxima cuando la temperatura media está entre los 15 y 21 °C (Rubio y Kirk, 2008). Sin embargo, en los cultivos se ocasionaron problemas de más de 40 plagas, como son los insectos, nematodos, virus, bacterias y hongos (FAOSTAT, 2016). Un ejemplo de ese problema fue el causado por hongos en 1844-1845, cuando un moho patógeno, el tizón tardío, arrasó los cultivos de papa en toda la Europa continental, desde Bélgica hasta Rusia lo que condujo a una hambruna que

mató a un millón de personas (Inostroza, 2009). En el caso de Panamá, las enfermedades y pérdidas de los cultivos de papa son causadas por bacterias que afectan, principalmente, a los tubérculos durante su almacenamiento provocando las pudriciones blandas y, el pie negro que son lesiones de color pardo oscuras en los tallos de papa que aparecen durante el desarrollo del cultivo en el campo (Fiers et al., 2012). Por esta razón, es conveniente buscar medidas de prevención ante los problemas que conllevan las bacterias fitopatógenas en los cultivos y producción de este tubérculo ya que los daños ocasionados pueden ser totales o parciales, comprometiendo la rentabilidad final del cultivo (Méndez & Inostroza, 2009). Estos problemas ocasionados por bacterias fitopatógenas como las pudriciones blandas y, el pie negro, previamente mencionados, originan grandes pérdidas económicas en la agricultura, al disminuir tanto la cantidad, como la calidad de los productos cosechados, y por lo tanto su valor comercial que afecta al productor ya que en Panamá no se cuenta con un sistema de detección temprana ante estos microorganismos patógenos para prevenir estos problemas.

1.3 Justificación e importancia

En Panamá, se produce anualmente 65 mil quintales de papas (MIDA, 2017). Sus elevados rendimientos por unidad de superficie y su ciclo vegetativo relativamente corto, hacen que este cultivo sea más atractivo para los productores (Álvarez, 2002). En condiciones ambientales ideales, una planta de papa sana crecería llevando a cabo todas sus funciones fisiológicas en las cinco etapas de desarrollo; sin embargo, en condiciones reales nunca se logra una planta perfectamente sana, por la interferencia de varios factores, como los ambientales, las enfermedades, los insectos, plaga,

bacterias y los nemátodos (Gandarillas y Ortuño, 2009).Por esta razón en Panamá es muy importante conocer cuáles son estas bacterias fitopatógenas y qué mecanismo de control se pueden utilizar, como medicamentos y bactericidas que no causen daños a los cultivos, que no tenga consecuencias secundarias para así asegurar la vida del consumidor y prevenir perdidas en los cultivos. Las bacterias fitopatógenas de la papa afectan el rendimiento y la calidad de las cosechas, estas dañan hojas, tallos o tubérculos; alteran el crecimiento de las plantas; causan pudriciones o malformación y afectan la apariencia comercial y calidad culinaria de los tubérculos (Bayona, 2013). Además, es uno de los cultivos más consumidos e importantes para la alimentación de gran parte de la población debido a que proporciona un valioso aporte de vitaminas, minerales, proteínas, aminoácidos esenciales y carbohidratos (Buckenhüskes, 2005). Teniendo en cuenta los numerables aportes nutricionales de la papa y las afecciones que puede tener por microorganismos durante todo el proceso de cultivo y cosecha, que afecten su morfología y valor nutricional. Por tal razón, deseamos aislar e identificar los patógenos más importantes de la papa, en nuestro país y poder evitar las constantes pérdidas económicas de nuestros productores.

1.4 Objetivos:

1.4.1 Objetivos generales:

Determinar bacterias fitopatógenas en el cultivo de papa en tierras altas de la provincia de Chiriquí, mediante pruebas microbiológicas.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Aislar e identificar a las especies bacterianas relacionadas con patologías reconocibles en planta de papa utilizando técnicas microbiológicas.
2. Describir la fitopatología causada por las bacterias aisladas de la papa.

3. Reconocer los factores que promueven la reproducción y desarrollo de las bacterias presentes en la papa de acuerdo con revisión de la literatura.

II. DESCRIPCIÓN DEL AREA DE ESTUDIO

La investigación se llevó a cabo, en el corregimiento de Paso Ancho, distrito de Tierras Altas, provincia de Chiriquí, específicamente en Alto Bambito a una altitud de 2,287 msnm y sus coordenadas son 8°50´12.1´´N 82°35´20.8´´W

En las tierras altas la temperatura decrece y reina el llamado "Tropical de la altura o de alta sabana", en donde las temperaturas son templadas, no calurosas menores de 18 °C durante todo el año, pero existe una estación seca (enero – abril) bastante seca y que coincide con el invierno astronómico (Castillero, E).

Figura 1. Área de muestreo, presenta un clima frio, de 16 °C. (Flores, K.2022)

III. MARCO TEÓRICO

La papa era producida y consumida por los habitantes de los Andes mucho antes de la llegada de los europeos al continente americano (Lutaladio y Castaldi, 2009). El término "papa" viene de la lengua quechua y era la palabra usada por los incas para referirse a este tubérculo. En 1570 las primeras papas fueron llevadas a Europa y aunque inicialmente fueron vistas con recelo y desconfianza (se creía que los tubérculos eran venenosos o usados para la hechicería), ya para los años 1700 la planta se cultivaba en todo el continente.

3.2 Origen de la papa

La papa se cultiva desde hace ocho mil años y su lugar de origen ha sido muy discutido. En este momento hay certeza que proviene de la región andina, probablemente de Perú, y, también, de la isla Chiloé, ubicada al sur de Chile. En el siglo XVI, los colonizadores españoles introducen la papa en Europa. A partir de ese momento el cultivo de papa se expande por el hemisferio norte durante la Revolución Industrial, hasta llegar a convertirse en un alimento fundamental para los mineros y obreros, cuyas largas jornadas laborales requerían gran aporte de energía (Borba, 2008). Las especies afines silvestres y cultivadas a la papa *Solanum tuberosum ssp tuberosum* se distribuyen desde el sureste de Norteamérica, pasando por toda América Central y Suramérica, marcadamente la zona occidental, hasta llegar a latitudes más allá de los 50 ° Sur. A lo largo de toda la cordillera andina, encontramos una gran variabilidad de especies y entre ellas 226 son silvestres y sólo ocho cultivadas (Contreras, 2008). La papa es un cultivo originalmente adaptado a temperaturas relativamente bajas, con una producción máxima cuando la temperatura media diaria está entre los 15 y 21 °C (Rubio y Kirk, 2008).

Los investigadores del Centro Internacional de la Papa (CIP) en el 2012, afirman que la historia de este cultivo comenzó hace unos 8.000 años, cerca del lago Titicaca, ubicado a 3.800 metros sobre el nivel del mar, en la cordillera de los Andes, en la frontera entre Bolivia y Perú. Desde entonces, la papa, en todas sus formas, ha sido por excelencia el "alimento del pueblo", y ha desempeñado un papel central en el comercio de todos los países de esta región.

Se considera que el cultivo de la papa se inició en la República de Panamá en la década de 1930. Las primeras actividades las realizaron en el área de Boquete; se extendieron después a Cerro Punta.

La producción se incrementó en el decenio de 1950 cuando se inició la importación de semillas mejoradas a través de sectores gubernamentales encargados de organizar y dirigir la actividad agrícola en el País. Las primeras semillas importadas procedían de Canadá y Brasil. A partir de 1991, se produjeron grandes cambios en la política económica mundial, los cuales se reflejan en la política económica del Gobierno de Panamá con los lineamientos fijados por la Organización Mundial del Comercio OMC. En la actualidad las cooperativas proporcionaban a los cultivadores, semillas, abono, pesticidas y créditos para la producción y unificar los intereses del grupo de productores de papa. Estas cooperativas compraban la papa a los productores para luego comercializar por medio de los intermediarios, lo cual favorecía a los agricultores que no podían colocar directamente sus productos en el mercado.

3.3 Clasificación taxonómica y descripción botánica de la especie

El cultivo de papa que tiene mayor importancia económica, industrial y alimenticia a nivel mundial es *Solanum tuberosum.,* dicho nombre científico fue usado por primera vez por el botánico suizo Gaspar Bahin en 1959 (Ramos, 1991). Actualmente la clasificación taxonómica de la papa es la siguiente:

Reino: Vegetal

División: *Magnoliophyta*

Subdivisión: *Angiospermae*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Asteridae*

Orden: *Solanales*

Familia: *Solanaceae*

Subfamilia: *Solanoideae*

Género: *Solanum*

Especie: *Solanum tuberosum L.*

Subespecies: *S. tuberosum subsp. Andigena*

S. tuberosum subsp. Tuberosum

La especie *Solanum tuberosum* se divide en dos subespecies: *tuberosum* y *andigena*. La subespecie *tuberosum* es la papa más cultivada en el mundo especialmente en Norte América y Europa, mientras el cultivo de la subespecie *andigena*, ocurre en el Centro y Sur América (Perilla y col., 2002).

La subespecie *tuberosum* presenta período vegetativo corto, de tres a cuatro meses, adaptación a días largos, escasa floración, poca producción de bayas, período corto de reposo del tubérculo y bajo porcentaje de almidón y de biomasa seca. La subespecie *andígena* presenta período vegetativo de cinco a siete meses, adaptación a días cortos, floración abundante y producción de bayas, período largo de reposo del tubérculo, y alto porcentaje de almidón (Roa y col, 2010).

3.4 Importancia de la papa

La papa es el cuarto cultivo alimenticio más importante del mundo después del maíz, el arroz y el trigo. Hasta inicios de la década de los 90s, casi la totalidad de las papas se

producían y consumían en Europa, América del Norte y en los países de la antigua Unión Soviética. Hoy, se cultivan papas en 19 millones de hectáreas de tierras agrícolas en 149 de los 167 países del mundo (MPPAT, 2003).

En el 2010, la producción mundial de papa fue de 324.420.782 toneladas (FAOSTAT, 2013). Entre los principales productores mundiales de papa se encuentran China, Rusia; India, Estados Unidos, y finalmente ocupando el quinto lugar encontramos a Ucrania (FAOSTAT, 2013). A nivel de Sudamérica, Perú produce el 26,6 % del total del cultivo, por lo que, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, lo ubica como el mayor productor de esta parte del globo, superando a Brasil (25,1 %), Colombia (14,8 %) y Argentina (14,0 %). Aunque, en el ámbito mundial la producción peruana representa solo el 1,2 %, bastante alejada de los grandes productores mencionados antes (FAOSTAT, 2013).

En Panamá la producción del cultivo de papa, uno de los rubros más consumidos a nivel nacional, tuvo un aumento del 83.9 %, con una tasa de crecimiento del 16.5 %, detalla un informe elaborado por la dirección de Agricultura del Ministerio de Desarrollo Agropecuario, por el cierre agrícola 2020-2021.

De acuerdo a la entidad, este producto ha generado 15.9 millones de balboas en la distribución de bienes y servicios agropecuarios, pese a las importaciones del producto industrializado y fresco. La provincia occidental de Chiriquí aporta el 99.9 % de la producción nacional y la comarca Ngäbe Buglé contribuye con el 1 % a la demanda del rubro. La producción total en el último ciclo agrícola fue de 712.294 quintales, siendo la

provincia de Chiriquí la máxima productora con 711,990 quintales cosechados y la Comarca Gnobe Buglé con 304 quintales.

Como alimento, la papa adquiere importancia debido al contenido de sustancias nutritivas, ya que produce alrededor de 80 Kcal/100 g de peso fresco y tiene cerca del 2 % de proteínas (peso del producto fresco), el contenido más elevado de proteínas de la familia de los cultivos de raíces y tubérculos. En promedio, el valor biológico de la proteína de papa es superior que el de la mayoría de las fuentes vegetales (Trujillo, 2004).

El contenido vitamínico de la papa es similar al de otras hortalizas: 100 g de papa hervida suministran cerca del 10 % de la cantidad total diaria recomendada para adultos de tiamina, niacina, ácido ascórbico, de cinco al 10 % de ácido fólico, y cerca de la mitad de la ingesta diaria recomendada de vitamina C. Además, la papa es una fuente de minerales tales como: hierro, fósforo, magnesio y potasio. Todo lo anterior muestra que la contribución de la papa a la dieta diaria no es solamente de energía, sino además de proteínas, vitaminas y minerales (Trujillo, 2004).

3.5 Morfología de la planta

La papa (*Solanum tuberosum L.*) es una planta herbácea, tuberosa, perenne, de tallo erecto que puede medir hasta 1 metro de altura. Las hojas en su madurez son compuestas imparipinadas, y se disponen de forma helicoidal a lo largo del tallo. Sus inflorescencias son cimosas, con flores púrpuras o blancuzcas de tres a cuatro cm de diámetro, cinco sépalos y cinco pétalos unidos, ovario súpero. Los tallos aéreos son herbáceos, suculentos y pueden alcanzar de cero punto seis a un m de longitud. El sistema radical es fibroso, ramificado y extendido superficialmente, pudiendo penetrar hasta 0,8 m de profundidad.

Los tubérculos son tallos modificados y constituyen los principales órganos de almacenamiento de la planta. Un tubérculo tiene dos extremos: el basal, ligado al estolón, llamado talón, y el extremo opuesto que se llama extremo apical o distal. Los ojos se distribuyen sobre la superficie del tubérculo siguiendo un espiral, se concentran hacia el extremo apical y están ubicados en las axilas de hojas escamosas llamadas cejas (Moreno, 2012).

Morfológicamente, los ojos del tubérculo corresponden a los nudos de los tallos, las cejas representan las hojas y las yemas de los ojos representan las yemas axilares. Los tubérculos pueden presentar una forma alargada, redondeada y oblonga, y su color puede ser blanco, amarillo, violeta, rojizo, entre otros (Poehlman y Allen, 2003). Además, los tubérculos, tienen de dos a diez ojos, dependiendo de la variedad y después de un periodo de reposo, brotan para producir nuevas plantas. Por esta característica, los tubérculos son usados como semillas (Alva, 2014).

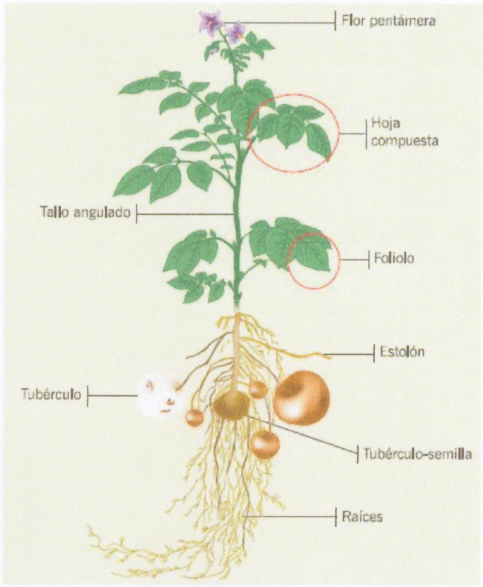


Figura 2. Partes de la planta de papa (Tomada de Gandarillas y Ortuño, 2009).

3.6 Variedades de papa

Un aspecto importante para considerar es la disponibilidad de cultivares o variedades para la multiplicación de la papa. Según Romero (2007), se considera que una variedad es elegible cuando por sus características agronómicas y tecnológicas, reúne las condiciones necesarias como para ser plantada en el país, de manera que satisfaga las necesidades económicas del agricultor, así como las de la industria nacional.

De acuerdo con el CIP en el 2012, existen 226 especies silvestres distribuidas en 10.000 km de longitud, desde el suroeste de Estados Unidos hasta el sur de Chile, con la mayoría de las especies concentradas en Perú y Bolivia.

Estas especies, no comestibles, son los antepasados originales de las papas cultivadas hoy en día. Los tubérculos silvestres son más pequeños que las papas cultivadas y poseen una

gran variedad de formas y colores. Según Romero (2007), en Panamá los productores de papa siembran las variedades "Granola", procedente de Alemania y "Arbolona Negra", procedente del estado Mérida, y en menor proporción, se cultivan otras variedades tales como Caribay, Diacol capiro, Monserrate, Atlantic, Kennebec, Alpha, entre otras.

La variedad "Granola", perteneciente al grupo *S. tuberosum subsp..tuberosum*, es de alta preferencia en el mercado. En Panamá es comercializada ampliamente, aun en la actualidad pese a su susceptibilidad a muchas enfermedades. La planta desarrolla tres a cinco tallos y posee hojas medianas de color verde pálido. En los primeros 15 a 20 días presenta una formación lenta del follaje, que luego acelera su tasa de crecimiento cubriendo bien el terreno. Los tubérculos de esta variedad se adaptan a zonas medias y altas de cultivo en nuestro país, pueden demorar de tres a cuatro meses para poder ser cosechados, son de tamaño mediano a grande, forma ovalada, piel de color amarilla y pulpa amarilla clara (Salas y col., 2000). También, Alva (2014) y Marín (2015), demostraron que esta variedad es susceptible a *Phytophthora infestans*. Además, Fonseca en el 2014, demuestra que esta variedad es susceptible a las bacterias *Burkholderia gladioli, Ralstonia solanacearum y Pectobacterium carotovorum*, causantes de pudrición blanda en tubérculos.

3.7 Desarrollo y crecimiento de la papa.

El crecimiento de la papa se divide en cinco etapas (Figura 2):

Etapa de Crecimiento I: Desarrollo de brotes:

- Los brotes se desarrollan del tubérculo semilla y crecen hacia arriba para emerger del suelo.

- Las raíces se desarrollan de la base de los brotes en emergencia.

Etapa de Crecimiento II: Crecimiento Vegetativo:

- Las hojas y los tallos se desarrollan a partir de los nódulos de los brotes que han emergido.
- Las raíces y estolones se desarrollan de los nódulos que se encuentran en crecimiento en el suelo.

Etapa de Crecimiento III: Inicio de Formación de los Tubérculos:

- Los tubérculos se forman en las puntas de los estolones, pero no presentan un crecimiento apreciable.
- En varios cultivares el final de este estado coincide con la primera floración.

Etapa de Crecimiento IV: Llenado del Tubérculo:

- Las células del tubérculo se expanden con la acumulación de agua, nutrientes y carbohidratos.
- Los tubérculos se constituyen en el mayor almacén de carbohidratos y nutrientes.

Etapa de Crecimiento V: Maduración:

- El follaje amarillea y se caen las hojas, la fotosíntesis se reduce, el crecimiento de los tubérculos se detiene y el follaje muere.

El contenido de materia seca alcanza su punto máximo y la piel del tubérculo se fija (Gandarillas y Ortuño, 2009).

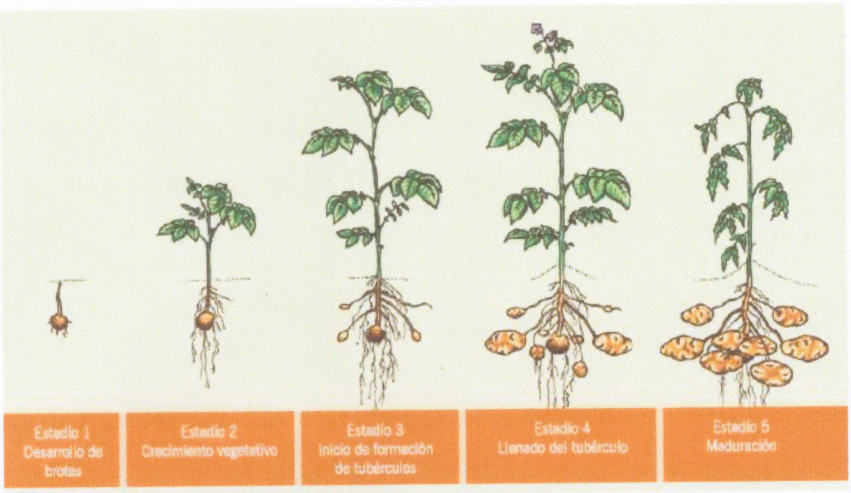


Figura 3. Etapas de desarrollo y crecimiento de la planta de papa (Tomada de Gandarillas y Ortuño, 2009).

En condiciones ambientales ideales, una planta de papa sana crecería llevando a cabo todas sus funciones fisiológicas en las cinco etapas de desarrollo; sin embargo, en condiciones reales nunca se logra una planta perfectamente sana, por la interferencia de varios factores, como los ambientales, las enfermedades, los insectos-plaga y los nemátodos (Gandarillas y Ortuño, 2009).

3.8 Bacterias patógenas de la papa

Las bacterias asociadas a las plantas pueden ser benéficas o dañinas. Todas las superficies vegetales tienen microbios sobre ellas (epífitos), y algunos microbios viven dentro de las plantas (endófitos). Algunos son residentes y otros transitorios. Las bacterias se encuentran entre los microorganismos que colonizan a las plantas en forma sucesiva a medida que éstas maduran. El cultivo de papa es afectado por numerosos microorganismos que, en determinadas condiciones, causan daño económico. Las bacterias patógenas de la papa afectan el rendimiento y la calidad de las cosechas, estas

dañan hojas, tallos o tubérculos; alteran el crecimiento de las plantas; causan pudriciones o malformación y afectan la apariencia comercial y calidad culinaria de los tubérculos. Las bacterias pueden entrar a la planta a través de aberturas naturales tales como estomas, hidatodos o lenticelas y también por heridas en hojas, tallos o raíces, o ser introducidas por ciertos insectos fitófagos. El inóculo llevado por la lluvia que es arrastrada por el viento puede ser muy efectivo. En inoculaciones artificiales, las bacterias suelen introducirse en las plantas por heridas, aerosoles aplicados con presión para imitar las lluvias llevadas por el viento, infiltración por vacío, o por inmersión de las semillas en el inóculo (Vidaver y Lambrecht, 2004).

La pudrición blanda es una patología que se ha estudiado considerablemente en el cultivo de la papa. Se caracteriza por la maceración del tejido parenquimatoso, que termina en una pudrición húmeda. El olor desagradable que frecuentemente acompaña a la pudrición es causado por organismos secundarios, los cuales son particularmente activos a temperaturas superiores a los 25 °C. La pudrición puede iniciarse en las heridas y propagarse rápidamente por el tejido afectado, en muchos casos, al momento de la cosecha, los tejidos aparentemente sanos ya están infectados latentemente, estos no muestran síntomas, pero llevan bacterias en la superficie (Elphistone, 1987). Dado que las bacterias pertenecientes a los géneros *Ralstonia, Burkholderia y Erwinia* son las principales causantes de podredumbre en papa, en este trabajo se hará énfasis en la descripción y características de este género (Bayona, 2013).

3.8.1 Género *Ralstonia solanacearum*

La marchitez bacteriana ocasionada por *Ralstonia solanacearum* (Sinónimo: *Pseudomonas solanacearum*) es una enfermedad vascular. *Ralstonia solanacearum* pertenece a la subdivisión β de las proteobacterias (Poueymiro y Genin, 2009). Después de la infección, la bacteria coloniza la corteza y, posteriormente, los vasos xilemáticos propagándose por toda la planta. Las masas bacterianas interrumpen el flujo de agua desde las raíces a las hojas, resultando en la marchitez de la planta. La severidad de la enfermedad depende del tipo, temperatura y humedad del suelo (lo cual influye en el desarrollo del microorganismo), los hospedantes susceptibles y la virulencia de las cepas. Las altas temperaturas (30 -35 °C) y humedad son los principales factores asociados con la alta incidencia y severidad de la marchitez bacteriana (González y col., 2009).

Los síntomas de la marchitez bacteriana de la papa son similares a aquellos causados por la falta de agua o a otros tipos de marchitez patológica, pero comúnmente la marchitez bacteriana es unilateral, afectando los foliolos de un lado de una hoja, las hojas de un tallo, o un tallo en sí y otro no (Figura 3), (French, 1984). Al inicio de la infección se observa un marchitamiento de las hojas, que pueden aparecer marchitas en las horas más calurosas del día, aunque la planta parece recuperarse durante la noche. A medida que la infección progresa, se aprecia clorosis y posteriormente necrosis de las hojas. En el tallo, las lesiones suelen empezar en la base, pudiendo producir un oscurecimiento de los haces vasculares. Al cortar un tallo afectado se suele ver en el tejido vascular un exudado mucoso, constituido por una gran cantidad de bacterias (Cambra y Palacio-Bielsa, 2005).

Figura 4. Marchitez bacteriana de la papa (*Ralstonia solanacearum*). Plantas en campo mostrando síntomas de la enfermedad. (Tomada de Gandarillas y Ortuño, 2009).

Sin embargo, puede suceder que no se manifiesten ni la decoloraci6n, ni la clorosis o necrosis del follaje. Los síntomas subterráneos más conspicuos se encuentran en los tubérculos. Los ojos del tubérculo exudan bacteria y a este exudado se adhiere el suelo. En algunos casos, la zona de los ojos o del estolón se decolora. Cuando se parten los tubérculos, en pocos minutos de los haces vasculares afectados sale un exudado formando "perlas" (Figura 4). Los tubérculos afectados retienen inicialmente su consistencia y adquieren un leve olor característico, luego se van descomponiendo como consecuencia de infecciones secundarias y pueden adquirir mayor coloración, además de pudrición blanda y fétida (French, 1984).

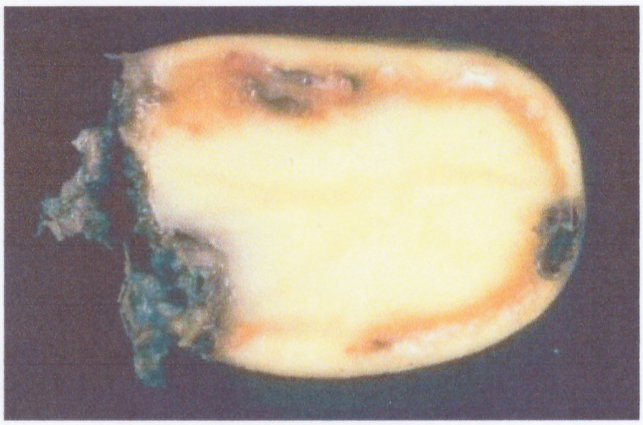


Figura 5. Marchitez bacteriana de la papa (*Ralstonia solanacearum).* Decoloración y tejidos necróticos por pudrición secundaria. (Tomada de Gandarillas y Ortuño, 2009).

Ralstonia solanacearum es una bacteria gramnegativa, bacilos de cero punto cinco a cero punto siete por uno punto cinco a dos punto cinco µm, oxidasa y catalasa positiva, capaz de acumular poli-β-hidroxiburato (PHB) y reducir nitratos. Las bacterias de esta especie son incapaces de crecer a 40 °C, crecen poco o nada en NaCl 2 %. Los cultivos son negativos para la prueba de arginina dehidrolasa, licuefacción de gelatina e hidrólisis de esculina o almidón. Las colonias son no fluorescentes. Al contrario de las especies de *Burkholderia*, a los ácidos grasos celulares de las especies de *Ralstonia* les faltan los lípidos ornitina OL-1 y OL-2, menos del uno por ciento del ácido graso total es C19:0 ácido ciclopropanóico (Schaad y col., 2001), sus características más importantes las resume Chavarro y col. (2004).

Cuadro 1. Características microbiológicas y bioquímicas de *R. solanacearum* (Chavarro y col., 2004).

Prueba	**Reacción**
Coloración de Gram	-
Granulos de Poly-β-hidroxiburato	+
Prueba de KOH 3%	+
Oxidación de Glucosa	+
Oxidasa	+
Catalasa	+
Tolerancia a soluciones de NaCl al 0.5%	-
Tolerancia a soluciones de NaCl al 2%	-
Tolerancia a soluciones de NaCl al 4%	-
Prueba de Catalasa	+
Prueba de Hidrolisis	-
Citrato	+
Hidrólisis del Almidón	-
Reducción de Nitratos	+

Arginia dehidrolasa	+/-
Utilización de Arginina	-

3.8.2 Genero *Pseudomonas spp.*

El género *Pseudomonas* fue descrito por Migula (1894) y ha sido utilizado para nombrar un amplio grupo de cepas bacterianas gramnegativas no entéricas, en general aeróbicas, no fermentativas, móviles (por uno o varios flagelos) y el contenido en el ADN de G+C se encuentra en el rango de 58-71 %. Las especies pertenecientes a este género son organismos oportunistas conocidos por estar presentes en el suelo y agua, algunos de estos son patógenos nosocomiales, aunque también existen especies patógenas de plantas. Una de las principales características que presenta este género es la facilidad para colonizar las raíces de las plantas. Los exudados que las plantas liberan por las raíces son ricos en carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos, los cuales son utilizados por las bacterias como fuente de alimento (Zuno-Floriano y col., 2009; Lloria y col., 2009; Schaad y col., 2001).

Una vez que las bacterias colonizan las raíces, pueden penetrar el tejido vegetal; en algunos casos, debido a la producción de enzimas celulíticas y pectolíticas, mismas que contribuyen a la degradación de las paredes celulares. La penetración también puede realizarse a través de las fisuras que se forman durante la emisión de las raíces secundarias, o a través de las heridas que se producen cuando la raíz se va desarrollando (Lodewyckx y col., 2002; Germaine y col., 2004). De acuerdo con Schaad y col. (2001), algunas *Pseudomonas* fitopatógenas pueden causar una variedad de reacciones en el

hospedero como clorosis, decoloración y erupción del tejido, pudrición, necrosis, entre otras; las especies de dicho género asociadas a estas enfermedades en plantas suelen ser los patovares de *Pseudomonas syringae, P. marginalis y P. viridiflava.*

Las *Pseudomonas* se caracterizan por una gran diversidad metabólica y son capaces de utilizar una amplia gama de fuentes de carbono. Por consiguiente, son importantes como organismos de bioremediación, donde desempeñan un papel importante en la descomposición, la biodegradación, y los ciclos del carbono y del nitrógeno (Carrasco, 2007).

La taxonomía del género ha sido controversial por años, debido que varias bacterias que inicialmente estaban incluidas en el género de *Pseudomonas* han sido reclasificadas en otros géneros o especies de una clase distinta de Proteobacteria a lo largo de los años, a medida que las técnicas de caracterización y clasificación de microorganismos han mejorado (Peix y col., 2009).

Cuadro 2. Características bioquímicas y físicas de distintas especies de *Pseudomonas* (Forbes y col., 2009).

Organismos	Crecimiento a 42°C	Reducción de Nitrato	Licuefacción de la gelatina	Arginina dehidrolasa	Lisina descarboxilasa
P. aeruginosa	+	+	V	+	+
P. fluorescens	-	-	+	+	+
P. mendocina	+	+	-	+	+
P. monteilii	-	-	-	+	+
P. putida	-	-	-	-	+
P. stutzeri	V	+	-	-	-
P. veronii	-	+	V	+	+

V, resultado variable.

3.8.3 Genero *Burkholderia spp.*

El género *Burkholderia* fue creado por Yabuuchi y col. (1992) para adaptar el antiguo grupo ARNr II *Pseudomonas*, excluyendo *Pseudomonas pickettii* y *Pseudomonas solanacearum*, que se transfirieron al género *Ralstonia* (Yabuuchi y col. 1995). Tradicionalmente, las especies de *Burkholderia* se conocen como patógenos de plantas y son bacterias del suelo con dos excepciones importantes, *B. mallei* y *B. pseudomallei*, que son patógenos primarios para humanos y animales (Coenye y Vandamme, 2003).

Como se señaló anteriormente, varias especies del género *Bukholderia* pueden inducir enfermedades en las plantas. Por ejemplo, *B. cepacia* puede causar la podredumbre de la cebolla (*Burkholder*, 1950), pero se conoce que es capaz de infectar otras plantas. Otra especie fitopatógena, *Burkholderia caryophylli*, induce la marchitez bacteriana en varias especies de plantas. *Burkholderia gladioli* induce la pudrición blanda bacteriana en cebollas, el pardeamiento de la cubierta foliar y la pudrición del grano en el arroz, y enfermedades en las hojas y el cormo en especies de gladiolo e iris, también puede infectar otras plantas, de la cual el patovar *B. gladioli pv. gladioli*, aislado en la rizósfera de papa, está listado como especie cuarentenaria para la exportación e importación de material vegetal hacia Venezuela, lo que sugiere que los patovares de *B. gladioli* tienen diferentes rangos de hospederos. Otras dos especies de *Burkholderia* fitopatógenas conocidas son *Burkholderia glumae* y *Burkholderia andropónis. Burkholderia glumae* produce pudrición de plántulas y síntomas de marchitez en tomate, ajonjolí (*Sesamum indicum* L.), perilla (*Perilla frutescens*), berenjena y ají picante, así como en otras 20 especies de plantas (Compant y col., 2008; Fonseca, 2014).

Según Schaad y col. (2001), los síntomas de enfermedades en plantas producidos por *Burkholderia* incluyen pudrición, marchitamiento, y necrosis severa dependiendo de la planta hospedera. Muchas especies pueden encontrarse asociadas con pudriciones de plantas. Son bacilos de cero punto cinco a uno por uno punto cinco a cuatro µm, gramnegativos, catalasa positivos y capaces de acumular poli-β-hidroxiburato (PHB). La mayoría son aerobios estrictos y no producen pigmentos fluorescentes. Los miembros de este grupo muestran un alto grado de diversidad de actividades catabólicas y propiedades biológicas. Es de importancia resaltar que la identificación de las especies del género

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ
BIBLIOTECA Dr. ROBERTO JAÉN Y JAÉN

Burkholderia es una tarea laboriosa y compleja que demanda laboratorios con personal entrenado. Para una correcta identificación es necesario emplear medios de cultivo diferenciales, sistemas automatizados y ensayos bioquímicos complementarios. Con frecuencia debe recurrirse a métodos moleculares, de alto costo pero de mayor sensibilidad y especificidad, como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), tipificación de secuencias de ADN, ribotipificación o una combinación de estas técnicas, debido a que los sistemas de identificación comerciales no son capaces de diferenciar entre las distintas especies dentro del complejo y a menudo fallan en separar estos patógenos de otras especies o géneros relacionados; por lo tanto, es difícil la identificación de esta especie mediante técnicas convencionales (Fonseca, 2014).

Las características fisiológicas más relevantes de esta especie se encuentran en el cuadro 5.

Cuadro 3. Pruebas bioquímicas para la diferenciación de *Burkholderia gladioli* (Henry y col., 2001).

Prueba	**Porcentaje**
Oxidación de :	
Glucosa	100
Maltosa	0
Lactosa	0
Xylosa	96
Sacarosa	0
Lisina descarboxilasa	0
Crecimiento a 42°C	4
PNPG o ONPPG	100
Oxidasa	0
Reducción de nitratos	33
Licuefacción de gelatina	70
Hidrolisis de esculina	11
Crecimiento en MacConkey	96
Pigmento marrón	33
Pigmento amarillo	44
Alfa hemolisis	22
Beta hemolisis	22
BCSA	18

3.8.4 Genero *Erwinia*

Los síntomas de pierna negra y pudrición blanda pueden ser causados por las bacterias *Pectobacterium carotovorum subsp. atrosepticum (*Sinónimo*: Erwinia carotovora subsp. atroseptica), Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum (*Sinónimo*: Erwinia carotovora subsp. carotovora) y Dickeya chrysanthemi (*Sinónimo*: Erwinia carotovora subsp. chrysanthemi).* Mientras que *P. carotovorum subsp. atrosepticum* es un patógeno exclusivo de papa, los dos restantes pueden afectar a un amplio rango de plantas huéspedes (Cambra y Palacio-Bielsa, 2005). Las bacterias pertenecientes al género *Dickeya* y *Pectobacterium* son patógenas de cultivos muy importantes. Estas especies han sido incluidas entre las 10 bacterias patógenas de plantas más importantes, basándose en su impacto económico y científico. Actualmente el género *Dickeya* está conformado por siete especies genómicas, incluyendo *Dickeya chrysanthemi* y *D. solani*; esta última también patógena de papa (Potrykus y col., 2016).

Dickeya sp. Se reportó por primera vez en plantas de papa en los Países Bajos en la década de 1970 y desde entonces se ha detectado en muchos otros países europeos. Sin embargo, desde 2004-2005 un nuevo patógeno, con el nombre propuesto *D. solani*, se ha extendido por toda Europa a través del comercio de tubérculos-semillas y está causando pérdidas económicas cada vez mayores. Aunque los síntomas de la enfermedad a menudo son indistinguibles de los que produce *Pectobacterium spp.* (Figura 5); *Dickeya spp.* puede iniciar la enfermedad a partir de niveles de inoculación más bajos, pues tienen una mayor capacidad de diseminación a través del tejido vascular de la planta, son considerablemente más agresivas y tienen temperaturas óptimas más altas para el

desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, también parecen ser menos resistentes que *Pectobacterium spp*., en el suelo y otros ambientes fuera de la planta (Toth y col., 2011).

3.8.4.1 Patogénesis de la pudrición blanda del tubérculo causada por *Erwinia.*

Las bacterias se localizan intercelularmente, en lenticelas y en heridas, usualmente más allá de la capa de felodermis, y posiblemente, en menor medida, en el sistema vascular (xilema). Para la multiplicación de las *Erwinias* en el tejido del tubérculo, el principal factor ambiental que determina la descomposición es la presencia de agua en los tubérculos, lo que desencadena una cascada de eventos. Una película de agua sobre los tubérculos conduce rápidamente, según la temperatura, a la anaerobiosis dentro de los tubérculos. El oxígeno dentro de los tubérculos, una vez agotado por la respiración del tejido, no se renueva por difusión desde el aire debido a la película de agua.

La anaerobiosis afecta los sistemas de resistencia del huésped dependientes del oxígeno (fitoalexinas, fenólicos, radicales libres, entre otros). También inhibe la lignificación y suberización de la pared celular, que ofrecen protección contra la degradación por enzimas pectolíticas (Pérombelon, 2002).

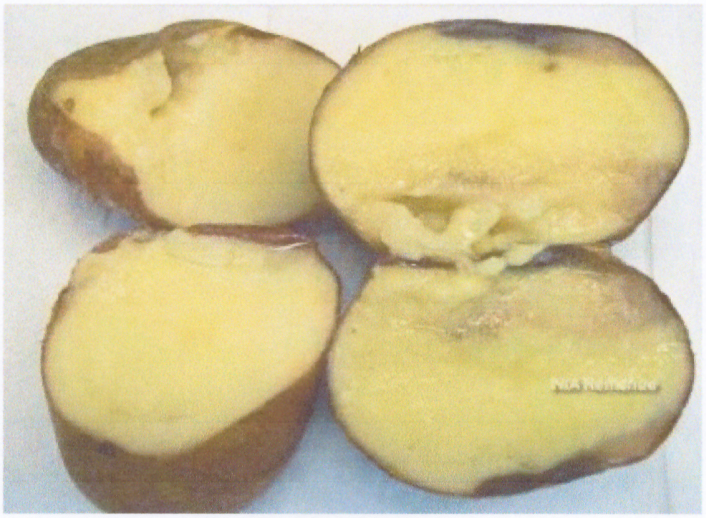


Figura 6. *Pectobacterium spp*., provoca una pudrición blanda en los tubérculos de papa. (CENTA, El Salvador).

3.8.4.2 Patogénesis de la pierna negra

A diferencia de la pudrición blanda de los tubérculos, las enfermedades del tallo generalmente se desarrollan bajo condiciones aeróbicas. La pierna negra se desarrolla cuando un gran número de bacterias invade los tallos después de la multiplicación en los tubérculos madre podridos. La enfermedad no se desarrolla en plantas cultivadas sin tubérculos o en plantas cultivadas a partir de semillas libres del patógeno *Erwinia*, aunque el suelo se encuentre muy contaminado. El factor más importante para el desarrollo de la pierna negra es el nivel de agua del suelo (lluvia / riego), pues si se prolonga, induce el desarrollo de las condiciones anaeróbicas en los tubérculos de la madre, favoreciendo la multiplicación bacteriana y el inicio de la descomposición.

Los primeros estudios histopatológicos de pierna negra realizados por Artschwager (1920), muestran una lignificación extensa de los tejidos vasculares y el desarrollo de

esclerótidos en la corteza del tallo y la médula y la formación de cristales proteicos en las células foliares como resultado de la infección. Sin embargo, estos cambios tienden a aumentar la resistencia de las plantas a la infección, ya que la lignificación es un mecanismo de resistencia efectivo al restringir la degradación de la pared celular por las enzimas pectolíticas. Además, se desarrolla más rápido y más extensamente en cultivares resistentes que en cultivares susceptibles. Los síntomas de pierna negra generalmente se desarrollan en brotes jóvenes antes de la lignificación o más arriba en tallos más viejos por encima de la base de madera (Figura 6), (Pérombelon, 2002).

Figura 7. Tallo de planta de papa infectado por *Pectobacterium spp.* (pierna negra). (Flores, K. 2022).

Las bacterias de los géneros *Pectobacterium* y *Dickeya* corresponden a bacilos gramnegativos flagelados, anaerobias facultativas, catalasa positiva, oxidasa negativa, fermentadoras de glucosa, reductoras de nitrato y utilizan L-arabinosa, D-glucosa, Lactosa, no producen urea y son indol negativas. Los miembros del género *Dickeya* son positivos a la producción de indol, fosfatasa y sensibles a eritromicina y trehalosa

negativas, a diferencia de *Pectobacterium* como indica la tabla 5; siendo estas pruebas importantes para la diferenciación de estos dos géneros (Czajkowski y col., 2015; Dada o lu y Kotan, 2017).

Cuadro 4. Características fisiológicas y bioquímicas usadas para discriminar las *Enterobacteriaceae* más comunes de pudrición blanda (Pérombelon y van der Wolf, 2002; Baghaee-Ravari y col., 2011).

Prueba	**Pba**	**Pcc**	**Pwa**	**Pcb**	***Dickeya spp.***
Crecimiento en agar nutritivo a 37°C	-	+	+/-	+	+
Sensibilidad a eritromicina	-	-	-	-	+
Indol	-	-	-	-	+
Fosfatasa	-	-	-	-	+
Producción de ácido por lactosa	+	+	-	+	+
Producción de ácido por trehalosa	+	+	+	+	-

Pba: *Pectobacterium atrosepticum,* Pcc: *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum,* Pwa*: Pectobacterium wasabiae* , Pcb: *Pectobacterium carotovorum subsp. Brasiliense.*

3.9 Pruebas para la identificación de bacterias patógenas

Dentro de los distintos tipos bacterianos existen particularidades que dan lugar a respuestas diferentes en los patrones de comportamiento metabólico, fisiológico y morfológico de los miembros de cada grupo. Tales diferencias nos permiten agrupar a los microorganismos en familias, géneros y especies.

Para realizar el diagnóstico de bacterias patógenas es importante la observación de la sintomatología en campo y la información general del cultivo, ya que es una clave para reconocer de manera preliminar el agente etiológico de la enfermedad. Posteriormente se realizan pruebas bioquímicas que ayudan a diferenciar de un género predominante a otro (Schaad y col., 2001).

3.9.1 Pruebas morfológicas

Son todas aquellas características estudiadas a través de la observación visual bajo lupas estereoscópicas y microscopio óptico de colonias formadas sobre medios nutritivos de rutina, enriquecidos o diferenciales (Sánchez, 2011).

Rivera (2014), describe que, para la lectura, interpretación e identificación de los cultivos de crecimiento bacteriano en medios sólidos, primero se debe seguir un estudio cualitativo que comprenda los siguientes parámetros:

- Tamaño: puntiforme, pequeño, mediano, grande, extendidas en velo, invadiendo toda la superficie del medio.

- Forma: circular, alargada, irregular, filamentosa, rizoide, fusiforme.
- Bordes: enteros, dentados, lobulados, rizoides.
- Superficie: lisa, rugosa.
- Levantamiento: plana, convexa, acuminada, umbilical.
- Consistencia: mucoide, friable, seca, viscosa
- Transparencia: transparente, traslúcida, opaca
- Color: blanco, amarillo, gris, verde, rojo, etc.

La identificación morfológica de las bacterias se logra examinando un frotis bacteriano en una lámina sometida a un proceso de tinción diferencial. Estos criterios morfológicos encabezan las primeras etapas del proceso de identificación bacteriana. Entre los tipos de tinciones más utilizados, se encuentra la tinción Gram, las bacterias, teñidas se clasifican como Gram positivas o Gram negativas.

La diferencia esencial entre esos dos tipos de células está en su resistencia a la decoloración; la cual se debe probablemente al hecho de que en el caso de bacterias Gram negativas, la mezcla de alcohol/acetona es un solvente lipídico y disuelve la membrana exterior de la pared de la célula (y también puede dañar la membrana citoplásmica a la que se une peptidoglicano). La delgada capa de peptidoglicano es incapaz de retener el complejo cristal violeta-yodo y la célula se decolora. Las células Gram positivas, a causa de sus paredes celulares más espesas (tienen más peptidoglicano y menos lípido), no son permeables al disolvente, provocando que el complejo cristal violeta-yodo quede atrapado dentro de la pared celular. Después de la decoloración, las células Gram positivas son todavía azules, pero las Gram negativas son incoloras. Para poner de manifiesto las células Gram negativas se utiliza una coloración de contraste, habitualmente es un

colorante de color rojo, como la safranina o la fucsina básica. Después de la coloración de contraste las células Gram negativas son rojas, mientras que las Gram positivas permanecen violetas (Notario, 2009).

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias. Algunas de estas pruebas evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre segundos y pocas horas. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48 horas; este tipo de pruebas detectan componentes metabólicos o determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras su cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar. Los productos terminales de la acción enzimática son detectados a través de indicadores de pH o por la aparición de pigmentos que hacen virar el color del medio.

Hay distintos tipos de medios de cultivo y en cada uno de estos una serie de componentes básicos como sustrato, indicadores de pH, nutrientes e inhibidores.

3.9.2 Principales pruebas bioquímicas para la identificación bacteriana

Las principales pruebas bioquímicas que se emplean para la identificación de bacterias se resumen en el cuadro 5.

Cuadro 5. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias (MacFaddin, 2003).

Prueba	Fundamento
KOH	Identificación de bacterias gramnegativas.
Catalasa	Comprobar la presencia de la enzima catalasa.
Crecimiento a 37 °C	Crecimiento en placas con agar nutritivo a 41°C. El agar nutritivo es un medio rico que contiene todos los requerimientos nutricionales para el crecimiento de cualquier bacteria
Citrato	Determinar si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo, provocando alcalinidad.
Motilidad	Determinar si un organismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen motilidad por medio de sus flagelos, que se encuentran principalmente entre los bacilos; sin embargo, algunas formas de cocos son móviles
Oxidasa	Determinar la presencia de las enzimas oxidasa.
MacConkey	Fermentación de la lactosa.
Indol	Determinar la capacidad de un microorganismo para separar indol a partir de triptófano.

3.9.3 Medios de cultivo

Para permitir el crecimiento de microorganismos en el laboratorio, es necesario aportarles un medio con nutrientes y condiciones fisicoquímicas adecuadas para su desarrollo. El medio de cultivo es aquel que contiene agua y una serie de nutrientes, necesarios para su metabolismo. Normalmente se utilizan placas de Petri con agar más nutrientes específicos (según el microorganismo que se desea aislar), aunque también existen medios de cultivo en tubo.

En la figura aparece un medio de cultivo sólido en placa de Petri y, en el fondo, medios de cultivo en tubo. Sobre la placa de agar se puede apreciar crecimiento microbiano (áreas de color rosa intenso). En la placa, las zonas de crecimiento aisladas son masas de células que han crecido a partir de una célula original y se denominan colonias.

No todos los microorganismos son cultivables en el laboratorio, pero sí una enorme cantidad de ellos.

Podría hablarse de cultivos bacteriológicos porque en la mayoría de los casos lo que se cultiva en el laboratorio son bacterias, pero también lo pueden hacer otro tipo de microorganismos, como es el caso de los hongos. Debido a esto, es mejor hablar de cultivo de microorganismos. La gran diversidad metabólica que tiene este conjunto de organismos explica la amplia gama de medios de cultivo que existen en el mercado.

3.9.4 Componentes del medio de cultivo

De una forma muy general, se puede decir que los medios de cultivo se componen de:

- Una fuente de carbono. Normalmente son azúcares sencillos como, por ejemplo, glucosa, lactosa, etc., pero existen también algunos organismos que usan CO_2 (en este caso serían autótrofos, al igual que las plantas).
- Una fuente de nitrógeno. Se suelen usar proteínas parcialmente hidrolizadas, peptonas.
- Otros componentes, como Na+, K+, vitaminas, etc.
- Amortiguadores de pH (soluciones tampón o buffer). Son sustancias que ayudan a mantener el pH del medio de cultivo dentro de un rango adecuado para el crecimiento de los microorganismos. Por ejemplo, suelen usarse como tampones los fosfatos disódicos (Na_2HPO_4) o monosódicos (NaH_2PO_4).

Existen preparados comerciales (infusiones o extractos) obtenidos a partir de tejidos animales como cerebro, corazón o hígado. Y a veces se usan también fluidos corporales como la sangre animal. Todos estos productos contienen los componentes básicos necesarios para el crecimiento de microorganismos.

Es importante tener en cuenta que hay ciertos tipos de microorganismos con requerimientos especiales para su desarrollo, que se añadirán al medio en caso necesario.

Un componente importante que permite elaborar medios de cultivo sólidos es el agar, un polisacárido procedente de algas marinas que tiene la particularidad de fundirse en torno a 100 ºC y gelificar alrededor de 40 ° C. Si se tiene en cuenta que los microorganismos cultivados en clínica crecen en torno a 37 ° C, es necesario que el agente gelificante se mantenga sólido a esa temperatura. Otra ventaja que ha hecho del agar el gelificante más

adecuado en el cultivo de microorganismos es el escaso número de organismos que tienen capacidad para degradarlo.

3.9.5 Tipos de medios de cultivo

Según la proporción de agar, existen tres tipos:

- Líquidos (caldos). No contiene ningún agente gelificante, por lo que los microorganismos crecen por todo el medio. El crecimiento en este tipo de medios es más rápido puesto que la movilidad permite acceder de una forma más fácil a los nutrientes.
- Sólidos. Tienen una proporción de agar de, aproximadamente, el un porciento. El crecimiento se desarrolla en la superficie del medio. Estos medios pueden depositarse en placas de Petri o en tubos de ensayo.
- Semisólidos. Son aquellos que contienen una proporción de agar inferior al 0,5%. Se utilizan para pruebas bioquímicas y de movilidad.

En microbiología diagnóstica existen cuatro tipos, según su utilidad:

- Nutritivos. Permiten el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, por ser muy generales. Como ejemplo de este tipo de medios están el agua de peptona y el caldo de tripticasa-soja.
- De enriquecimiento. Contienen componentes adicionales (además de los básicos) para permitir el desarrollo de microorganismos exigentes, que no crecerían en un medio general.
- Selectivos. Presentan algún componente que impide el desarrollo de microorganismos no deseados. Esto hace que el microorganismo que se desea

cultivar lo haga con mayor facilidad. Por ejemplo, el agar MacConkey contiene cristal violeta, que inhibe el crecimiento de bacterias grampositivas y hongos, facilitando el desarrollo de bacterias gramnegativas.

- Diferenciales. Contienen sustancias que ponen de manifiesto alguna característica de la especie o grupo de microorganismos. Por ejemplo, el agar MacConkey contiene lactosa y rojo neutro (como indicador); las bacterias fermentadoras de lactosa (lactosapositivas) aparecen de color rosa intenso, mientras que las no fermentadoras de lactosa son incoloras.

Por lo tanto, el agar MacConkey es un medio selectivo y diferencial a la vez. El formato en el que se presentan los medios de cultivo puede ser:

- Sólido en placas. Son medios con agar envasados en placas de Petri.
- Sólido en tubo. En este caso suele ser agar inclinado (se deja enfriar en esta posición para que la superficie del medio sea mayor).
- Líquido en tubo como, por ejemplo, agua de peptona.
- Semisólido en tubo como, por ejemplo, caldo de tioglicolato.

3.9.6 Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo pueden adquirirse comercialmente listos para su uso o se pueden preparar en el laboratorio a partir de material deshidratado (el cual contiene los componentes necesarios para elaborar cada uno de los tipos de medios existentes).

Para su elaboración hay que seguir las instrucciones dadas por el fabricante, que se especifican en el prospecto del envase. Normalmente consiste en disolver el medio

deshidratado en agua destilada, proceso que se conoce como reconstitución. La cantidad de agua será la que indica el fabricante.

En el caso de medios que contienen agar como agente gelificante, hay que disolver agitando y calentando a la vez, debido a que el agar funde en torno a 100 ºC. Para ello se puede utilizar un termoagitador magnético (que evita una ebullición prolongada).

Una vez reconstituido el medio de cultivo, hay que esterilizarlo para asegurarse de que no crecerá ningún microorganismo contaminante, ya que el objetivo del cultivo es determinar el crecimiento de los microorganismos presentes en muestras clínicas para su posterior identificación.

La esterilización se realiza en un autoclave a 121 ºC durante 15-20 min. Los medios de cultivo en tubo se fraccionan antes de esterilizar y se introducen en el autoclave tapados con algodón graso y papel de aluminio.

Sin embargo, los medios sólidos en placa se suelen esterilizar en recipientes grandes (botellas o matraces) con tapón de plástico o algodón graso. Posteriormente se recomienda esperar a que la temperatura baje a unos 45-50 ºC para fraccionarlo en placas, siempre cerca del mechero para evitar contaminación ambiental. El fraccionamiento consiste en depositar una pequeña cantidad en la placa, hasta que alcance unos 4 mm de altura. Dejar enfriar a temperatura ambiente hasta que solidifique por completo.

Una vez sólido, se invierte (de tal forma que la superficie de apoyo sea la tapa de la placa) y se almacena refrigerado a 4 ºC. Los medios de cultivo que incluyen en su composición sustancias termolábiles, es decir, que se alterarían tras someterse a un tratamiento con calor, necesitan un procedimiento alternativo para su esterilización. Generalmente se

realiza filtración con membranas de un diámetro de poro de cero coma dos a cero coma cuarenta y cinco µm. Los virus no se eliminan, pero sí las bacterias y hongos que pudieran contaminar el medio. Serían ejemplos de sustancias termolábiles el suero y determinados antibióticos.

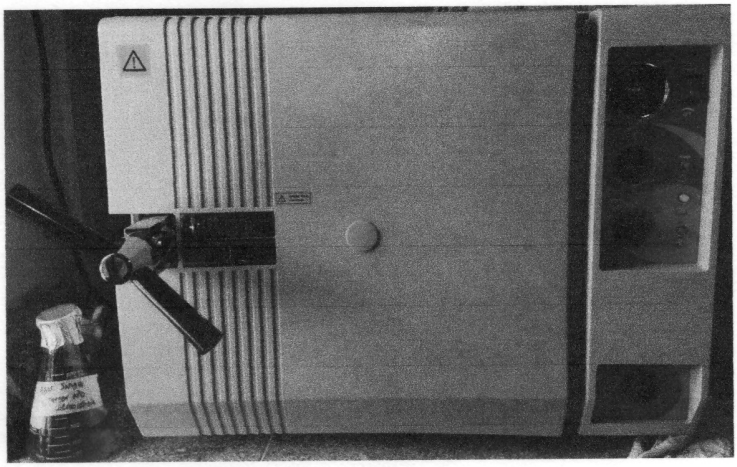


Figura 8. Modelo de autoclave. (Flores, K. 2022).

3.9.7 Cultivo Puro

Los cultivos puros son aquellos que contienen un solo tipo de microorganismo. El modo de obtener estos cultivos consiste en obtener colonias aisladas, que provienen de una sola célula (son clones).

El problema de separar una especie microbiana de las otras, de tal manera que pueda crecer en cultivo puro, fue solucionado en el laboratorio del famoso microbiólogo alemán Roberto Koch (1843-1910). Koch, tal como lo hicieron otros biólogos, descubrió que debería emplearse un medio sólido en lugar del líquido si se deseaban obtener cultivos

microbianos puros. Como ocurre frecuentemente en la ciencia, los descubrimientos de Koch y su grupo estaban basados en las observaciones de algún otro investigador.

En 1872, Johann Samuel Schroeter notó que las bacterias crecían sobre la superficie de materiales diversos, incluyendo la superficie de una papa cortada. Aquí las bacterias daban lugar a la formación de una masa relativamente grande a la que después se le denominó colonia. Cuando estas colonias individuales fueron examinadas al microscopio, se encontró que cada una de ellas estaba formada por cantidades enormes de bacterias; pero el asunto más importante era que todos los organismos de una misma colonia pertenecían a la misma especie.

Aparentemente, las células individuales habían caído del aire, tocando la superficie de la papa en un cierto lugar, multiplicándose ahí hasta producir millones de individuos, con lo que las colonias se hacían visibles a simple vista. Todas las bacterias de una sola colonia habrían derivado de una sola célula, y, por lo tanto, cada colonia constituía un cultivo puro.

3.9.7.1 Características de los cultivos puros

- Las colonias deben ser iguales en forma, tamaño y color.
- Que no existan formas inhibidas.
- Al microscopio deben tener un aspecto común.
- Tiene que tener iguales propiedades tintoriales
- Deben ser bioquímica y fisiológicamente iguales.
- Una regla importante es no agarrar de la primera colonia.

3.9.8 Agar EMB (con Eosina y Azul de Metileno).

El medio de cultivo combina las fórmulas de Holt-Harris y Teague con la de Levine, para obtener un mejor rendimiento en el aislamiento selectivo de *Enterobacterias* y otras especies de bacilos Gram negativos.

Es nutritivo por la presencia de peptona que favorece el desarrollo microbiano. La diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo, está dada por los indicadores eosina y azul de metileno; éstos ejercen un efecto inhibitorio sobre una amplia variedad de bacterias Gram positivas. El agar es el agente solidificante. Muchas cepas de *Escherichia coli* y *Citrobacter spp.* Presentan un característico brillo metálico. Las cepas que utilizan la lactosa poseen centro oscuro con periferia azulada o rosada, mientras que las que no lo hacen son incoloras.

También, pueden crecer especies de *Candida* y se observan como colonias rosadas y puntiformes; la siembra en profundidad permite el desarrollo de clamidosporas en *C. albicans*. *Enterococcus spp.* crece en este medio como colonias puntiformes y transparentes, mientras que *Acinetobacter spp.*, y otras bacterias oxidativas se observan como colonias de color azul lavanda; esto puede ocurrir, aunque las cepas no sean capaces de acidificar a partir de lactosa al 0.5 % y ello se debe a la incorporación de azul de metileno a sus membranas. En este medio se obtiene, además un buen desarrollo de especies de *Salmonella* y *Shigella* (Levine, 1985).

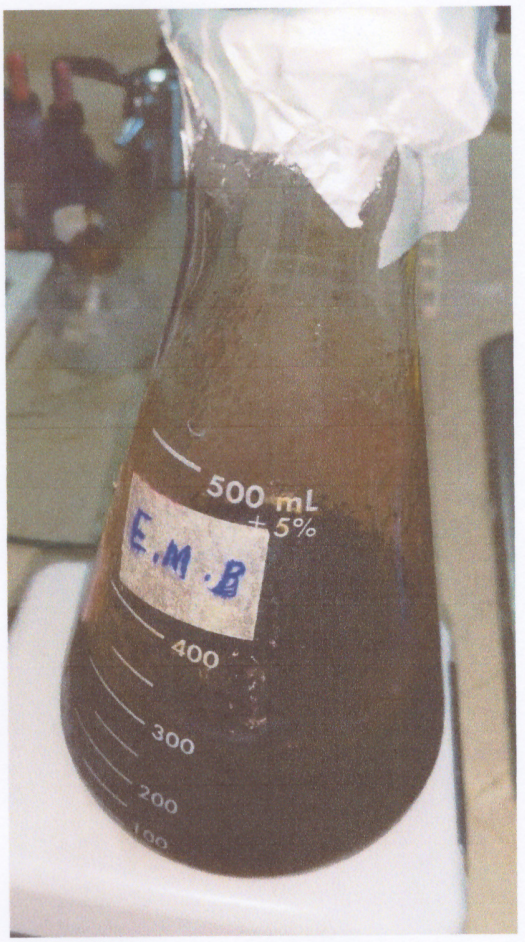


Figura 9. Preparación de Agar EMB. (Flores, K. 2022).

3.9.9 Agar Sangre

El agar sangre es un medio de cultivo sólido enriquecido, diferencial pero no selectivo. Es utilizado para la recuperación y crecimiento de una gran variedad de microorganismos provenientes de muestras clínicas o para subcultivos. Base de Agar Sangre se utiliza para el aislamiento, cultivo y detección de las reacciones hemolíticas de microorganismos fastidiosos. Es adecuado para el aislamiento y cultivo de una amplia variedad de

microorganismos con difíciles características de crecimiento. Al añadir la sangre, se puede emplear para determinar reacciones hemolíticas.

La infusión de corazón y la peptona de carne son fuentes ricas de nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El cloruro de sodio proporciona electrolitos esenciales para el transporte y el balance osmótico. El agar bacteriológico es el agente solidificante. La adición de sangre proporciona factores de crecimiento extra para microorganismo fastidiosos y es la base para determinar las reacciones hemolíticas. Los patrones hemolíticos pueden variar con el tipo de sangre o la base de medio utilizado. Por ejemplo, la sangre desfibrinada de oveja da mejores resultados para estreptococos del grupo A.

Figura 10. Preparación de agar sangre (Flores, K. 2022).

3.9.10 Agar MacConkey

Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos a partir de muestras clínicas, aguas y alimentos. Todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae* desarrollan en el mismo. Su fórmula cumple con los requerimientos de la Armonización de Farmacopeas Europea, Japonesa y de los Estados Unidos de Norteamérica (EP, JP y USP respectivamente).

En el medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva. El agar es el agente solidificante.

Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares. Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras (MacFaddin, 1985).

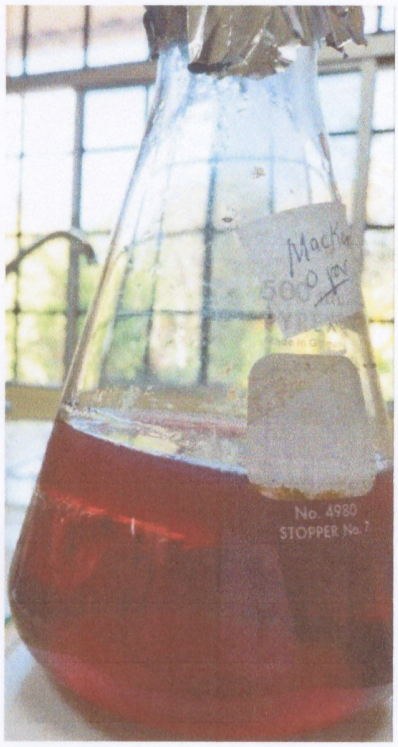


Figura 11. Preparación de agar MacConkey. (Flores, K. 2022).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Colecta de material vegetal con sintomatología de marchitez bacteriana.

Para el presente trabajo se procedió a la colecta de tubérculos, tallos y hojas de la papa con sintomatología de pudrición blanda, posteriormente se almaceno utilizando bolsas ziploc, y se trasladó al laboratorio de Microbiología a una temperatura de 28 °C-30 °C. Luego, se lavó con abundante agua corriente durante unos cinco minutos para eliminar el resto del suelo presente en ellos y se secó con papel absorbente. A los tubérculos se les

elimino la capa más externa de piel y se colocó en hipoclorito de sodio (NaClO) a un porciento por cinco minutos y se lavó con agua destilada estéril.

Los tallos se cortaron longitudinalmente y se desinfecto superficialmente con alcohol al 70 % por cinco minutos, posteriormente se flameo en un mechero.

Finalmente se tomó una colección de material vegetal con sintomatología de marchitez bacteriana, estás son muestras de hojas de papa con síntomas de pudrición blanda en el distrito de Volcán y Boquete.

4.2 Obtención de aislamiento bacteriano

Se obtuvieron 12 muestras con sintomatología de pudrición blanda, procedentes de Volcán. Estas fueron colocadas en un tubo de ensayo con cultivo puro, a 37 ° C en la incubadora por 24 horas, para esperar el crecimiento de las bacterias.

4.3 Métodos

Para la identificación preliminar de las especies bacterianas causantes de la pudrición en tubérculos de papa, se aplicó un esquema de pruebas bioquímicas y de tinción descrita para bacterias patógenas de plantas, de acuerdo con las recomendaciones de Schaad y colaboradores (2001).

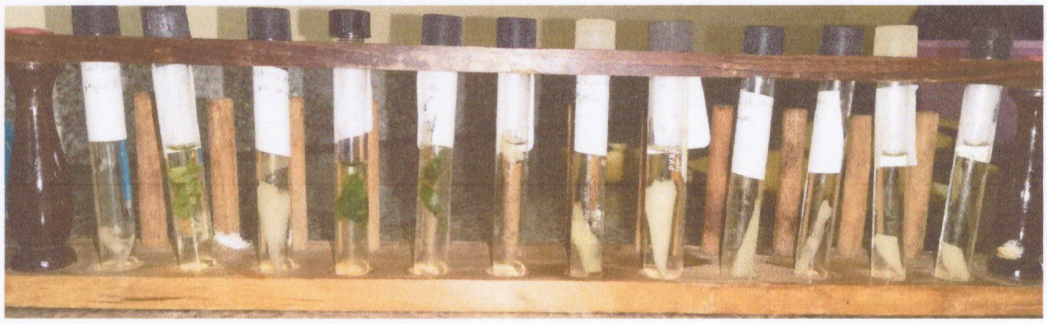


Figura 12. Cultivo puro de las 12 muestras. De derecha a izquierda: 1. Muestra de papa, 2. Muestra de papa, 3. Muestra de papa, 4. Muestra de papa, 5. Muestra de papa, 6. Muestra de papa, 7. Muestra de papa, 8. Muestra de hoja, 9. Muestra de hoja , 10. Muestra de papa, 11. Muestra de hoja, 12. Muestra de raíz. . (Flores, K.2022).

Las colonias se visualizaron bajo el microscopio y se les realizo una tinción de Gram, para observar con más detalle la integridad de las mismas.

4.3.1 Tinción Gram

La tinción Gram consiste en esparcir una muestra de cultivo bacteriano procedente de agar nutritivo LB de 24 a 48 horas de crecimiento, sobre un portaobjetos limpio y estéril, siendo cubierto con una solución de cristal violeta durante un minuto; posteriormente se lavó el portaobjetos con agua destilada, se secó y se cubrió con solución lugol, por un minuto. Una vez transcurrido este tiempo, se lavó con abundante agua y se adicionó solución decolorante alcohol – acetona por un minuto, a continuación, se lavó el decolorante, y se aplicó una solución de safranina y se dejó por un minuto, después de este tiempo se lavó con abundante agua y se observó en un microscopio óptico, donde las células Gram positivas quedaron teñidas de violeta azul oscuro y las Gram negativas de color rojo. El procedimiento para realizar la tinción Gram, se detalla en el anexo uno.

4.3.2 Actividad de la enzima catalasa

En un portaobjetos limpio y estéril se colocó una gota de solución de peróxido de hidrogeno al 5 %, posteriormente con un palillo de madera estéril, previamente impregnado con una muestra de crecimiento bacteriano de resiembra de 24 horas, se mezcló con la solución sobre el portaobjetos. La prueba se consideró positiva, si al cabo de 20 segundos, se forman burbujas de gas.

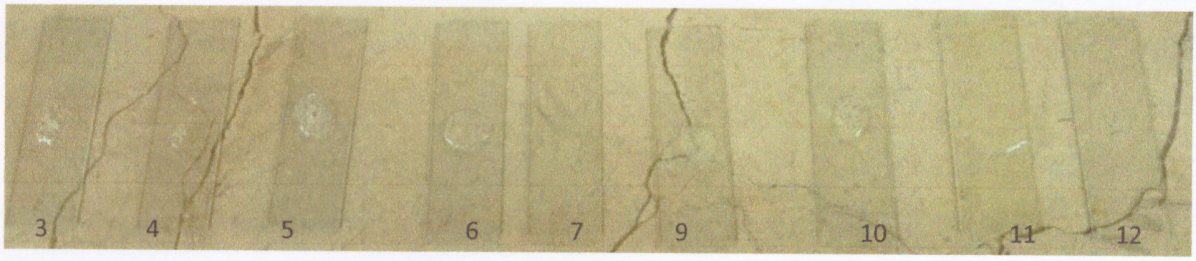


Figura 13. Prueba de Catalasa. En los portaobjetos se observan burbujas en grandes y pequeñas cantidades, esto demuestra que son catalasa positiva. (Flores, K.2022).

4.3.3 Producción de Indol

Se preparó el medio semisólido producción de indol, el cual fue vaciado en tubos de vidrio, estos se esterilizaron a 121 °C por 15 minutos en el autoclave. Posteriormente se inocularon cepas bacterianas provenientes de agar nutritivo LB de 24 horas de crecimiento, por punción en los tubos de ensayo que contienen el medio y los tubos se incubaron a 28 °C durante 48 horas. Después de transcurrido este tiempo se le adicionó 0,3 mL de reactivo de Kovac. La prueba se consideró positiva si se forma un anillo rojo en la superficie del medio líquido.

4.3.4 Prueba de Citrato

Se preparó el medio y se sirvieron tres mL por tubo, los cuales se esterilizaron y se dejaron solidificar en forma de cuña. A partir de un cultivo puro de 24 horas, se sembró en el medio usando un asa bacteriológica. Se incubaron durante 24 – 48 horas. La prueba se considera positiva si se observa crecimiento y color azul en el pico (alcalinidad). El resultado se considera negativo si el medio permanece de color verde debido a que no existe desarrollo bacteriano y no hay cambio de color.

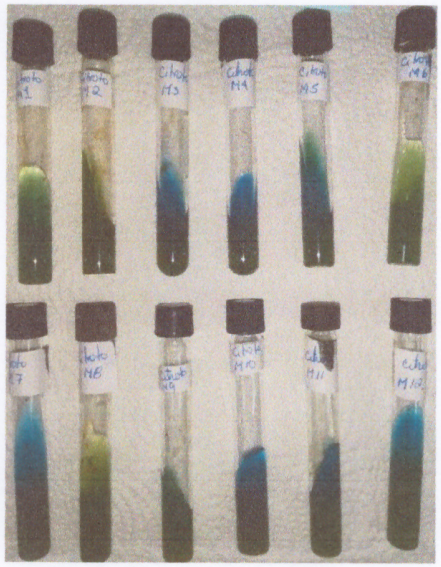


Figura 14. Prueba de citrato. Las bacterias capaces de usar el citrato provocarán el cambio de color del medio de verde a azul intenso, por viraje del indicador de pH, azul de bromotimol, a la vez que se observa crecimiento en la superficie. En la prueba 1, 2 y 8 no se observó crecimiento. En las demás pruebas 3,4,5,6,7,9,10,11 y 12 se obtuvo un resultado positivo (Flores, K.2022).

Esta prueba fue empleada para determinar si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno

en su metabolismo, provocando así una alcalinización del medio. Con esta prueba se prueba se pueden descartar los géneros como: *Escherichia, Shigella, Salmonella typhi y Salmonella paratyphi* son incapaces de crecer con esos nutrientes.

4.3.5 Prueba de Rojo de Metilo (RM).

Se preparó el medio y se sirvieron 3 mL por tubo, a partir de un cultivo puro, se sembró en el medio líquido por siembra, se incubo durante 24 horas. Se agregó unas gotas del reactivo RM. La prueba se considera positiva, si produce un color rojo en la superficie del medio líquido. Y negativo si presenta el color amarillo o naranja.

4.3.6 Prueba de Voges Proskauer (VP)

Se preparó el medio y se sirvieron 3 mL por tubo, a partir de un cultivo puro, se sembró en el medio líquido, se incubo durante 24 horas. Luego, se agregó reactivo UP1 y up2. La prueba se considera positiva, color rojo o rosado en la superficie del medio. Y reacción negativa, color amarillo en la superficie del medio (el mismo color del reactivo) puede formarse un color cobrizo, pero aun así la reacción es negativa.

4.3.7 Prueba de SIM

Se preparó el medio semisólido y se sirvieron 3 mL por tubo. Posteriormente, a partir de un cultivo puro, se inoculo el cultivo puro a una profundidad de ¾ del tubo. Luego, se procedió a incubar a 37 °C durante 18-24 horas para leer los resultados. El oscurecimiento indica la producción de H_2S. La motilidad está indicada por una turbidez difusa lejos de la línea de inoculación. El crecimiento solo a lo largo de la línea de inoculación indica no motilidad. La presencia de indol se prueba mediante la adición de reactivo de Kovac (Cat. 5205) que da una coloración rojo púrpura al reactivo

4.3.8 Prueba de Lisina

A partir de un cultivo puro del microorganismo se inoculo mediante el uso de aguja, se picó en el fondo y se extendió sobre la superficie del mismo. Luego se incubo a 37 °C durante 24 horas.

Interpretación de los resultados:

- Decarboxilación de la lisina: Resultado Positivo: superficie alcalina / profundidad alcalina (pico violeta / fondo violeta). Resultado negativo: superficie alcalina /profundidad ácida (pico violeta / fondo amarillo).
- Desaminación de la lisina: Resultado positivo: superficie rojiza / profundidad ácida. Esto sucede con cepas del género *Proteus*, Providencia y algunas de *Morganella spp.*
- Producción de SH_2: Resultado positivo: ennegrecimiento del medio de cultivo (especialmente en el límite entre la superficie y profundidad). Resultado negativo: el medio de cultivo permanece sin cambio de color.

4.3.9 TSI

A partir de un cultivo puro del microorganismo en estudio, con aguja de inoculación, se inoculo el medio de cultivo, picando el fondo y extendiendo sobre la superficie del mismo. Luego se incubo a 37 °C durante 24 horas.

Interpretación de los resultados:

- Superficie alcalina/profundidad ácida (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa.

- Superficie ácida/Profundidad ácida (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa.
- Superficie alcalina/Profundidad alcalina (pico rojo/fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares.
- La presencia de burbujas o la ruptura del medio de cultivo indican que el microorganismo produce gas.
- El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ
BIBLIOTECA Dr. ROBERTO JAÉN Y JAÉN

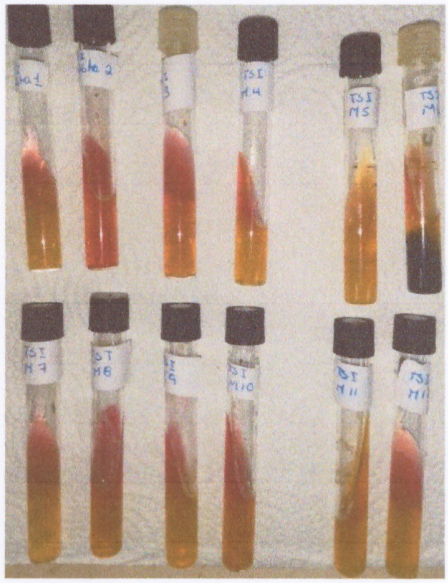


Figura 15. Prueba de TSI. A) Pico alcalino/fondo alcalino (pico rojo/fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares. B) Anaranjado/anaranjado (control, sin inocular). C) Pico alcalino /fondo ácido (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa. D) Pico ácido/fondo ácido (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa. E) El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico (H2S). D) La presencia de burbujas, o ruptura del medio de cultivo, indica que el microorganismo produce gas. Los resultados se muestran en el cuadro 8. (Flores, K.2022).

4.3.10 Prueba de Urea

La urea es hidrolizada por la enzima ureasa, formando dióxido de carbono y amoníaco. Este último proporciona reacción alcalina al medio, que puede comprobarse por el viraje del amarillo al rojo púrpura del indicador de pH rojo fenol contenido en el medio.

4.4 Agar Sangre

Se suspendió 40 g del polvo en un litro de agua purificada. Se dejó reposar cinco minutos, luego procedí a revolver perfectamente hasta obtener una suspensión homogénea. Calenté con agitación frecuente y herví un minuto para disolución total. Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos.

Posteriormente se agregó sangre estéril 5-10 % al medio esterilizado, fundido y enfriado a 45-50 °C. Se Homogenizo y distribuyo en placas de Petri estériles.

Figura 16. Vertido del agar sangre. (Flores, K.2022)

4.5 Agar Eosina y Azul de Metileno (EMB).

Para este medio de cultivo, se rehidrato 36 g del medio en un litro de agua destilada. Luego, después de 10 -15 minutos. Se calentó agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Se esterilizo en autoclave a 121

°C durante 15 minutos. Posteriormente se enfrió aproximadamente a 45 °C. Por último, se distribuyó en cajas de Petri estériles y se conservó a temperatura ambiente.

Figura 17. Preparación de agar EMB. El agar se vierte en los platos Petric, se deja reposar por 15 minutos, y se cultivan las muestras. (Flores, K.2022).

4.6 Agar MacConkey

Se disolvió 50 g de medio en un litro de agua destilada, se dejó reposar de 10 a 15 minutos. Luego, se procedió a calentar lentamente hasta ebullición, agitando para su completa disolución. Posteriormente se llevó al autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Se Vierten en cajas de Petri estériles. Por último, se conservaron en refrigeración.

Figura 18. Vertido del agar MacConkey. (Flores, K.2022).

4.7 MicroScan

Es un sistema total para el laboratorio de Microbiología el cual permite realizar las pruebas para identificación y susceptibilidad de microorganismos de interés clínico de una manera rápida, sencilla, confiable y estandarizada para integrarla a su rutina diaria de trabajo.

Se realizaron pruebas de MicroScan para la identificación de bacterias. Utilizaron cuatro pruebas de MicroScan para la identificación de cuatro bacterias. En el dilutor inocule la bacteria, agite y posteriormente, suspendí la bacteria

Preparación del inoculo: se toma una colonia aislada, se destapa el dilutor del inoculo, y se introduce el inoculador dentro del dilutor. Posteriormente, se mezcla suavemente por inversión cinco veces y deje reposar por un minuto. Luego se sirve en el panel. Se agrega dos gotas de aceite mineral estéril a la prueba de Urea, Glucosa, Lisina y Arginina.

Luego, se incuba a 37 °C por 24 horas. Se agrega los reactivos de Kovacs VP, Nit y TDA. Por último, se leen los resultados.

Figura 19. Prueba de MicroScan para la identificación bioquímica de las bacterias. (Flores, K.2022).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cuanto a los resultados obtenidos se puede mencionar que del total de las muestras revisadas de *Solanum tuberosum* (Ocho tubérculos de papa, tres hojas y una raíz), se aislaron 12 muestras, pero solo se logró identificar nueve muestras, entre los cuales destacaron bacterias del género *Klebsiella* y *Enterobacter*. Siendo representadas por la especie *Klebsiella pneumoniae* , *Enterobacter aerogenes y Enterobacter cloacoe.*

En este estudio, la utilización de medios de cultivos como Agar sangre, agar MacConkey y agar EMB, así como las pruebas morfológicas y bioquímicas permitieron diferenciar aquellos géneros bacterianos que están asociados a esta enfermedad en la papa. Las

bacterias patógenas que se identificaron en los tubérculos de papa *(Solanum tuberosum L.)* colectadas en tierras altas, son del género *Klebsiella* y *Enterobacter.* Las pudriciones blandas y la pierna negra son ocasionadas por bacterias que pertenecen a la familia de *Enterobacteriaceae*. Estas se clasifican entre los diez patógenos de mayor importancia en la agricultura, limitan el rendimiento y la calidad de los tubérculos.

Danyluk et al. (2013), señalaron que la microbiota dominante sobre hortalizas recién cosechadas está constituida por bacterias *Enterobacter, Bacillus spp., Pantoea spp., Cyanobacterium, Erwinia spp., Pectobacterium y Pseudomonas*, provenientes del contacto con el suelo, agua y aire. En las áreas dañadas por necrosis o pudrición en algunos de los tubérculos colectados en este trabajo, se identificaron bacterias, se observó una delimitación marcada que detuvo el avance de la pudrición, lo que puede sugerir que las bacterias antagonistas identificadas *Enterobacter aerogenes y Enterobacter cloacae* impidieron el crecimiento necrotrófico de algún agente patogénico que estuviera colonizando el tubérculo. El-Ghaouth et al. (1998) mencionaron que estos organismos no causan algún daño al estar en contacto con el tejido vegetal. Cabe señalar que se han reportado a distintas especies de *Enterobacter spp*., como agentes de biocontrol debido a que pueden suprimir enfermedades como la pudrición seca en tubérculos de papa, ocasionada por *Fusarium spp*., al producir diferentes metabolitos antifúngicos (Schisler, 1994); además, puede reducir la severidad de la enfermedad hasta un 25% (Chelkowski, 1989; Schisler et al., 1995; Schisler et al., 2000).

Se puede aislar con frecuencia de la superficie de las raíces de varias plantas. *K. pneumoniae, K. oxytoca, K. planticolason* capaces de fijar N_2 y se clasifican como fijadores de N_2. Se informaron aislamientos de *Klebsiella* fijadora de N_2 en hojas de

arroz, rizosfera, suelo de pastizales, camote. *Klebsiella pneumoniae*, es un sistema modelo en N_2 fijación, pero otras cepas de esta misma especie son patógenos temidos. Las cepas de *K. pneumoniae* que promueven el crecimiento de las plantas son capaces de colonizar la rizosfera y el interior de plántulas de leguminosas como la alfalfa (*Medicago sativa*) y *Medicago truncatula* , pero colonizan *Arabidopsis thaliana* , trigo (*Triticum aestivum*) y arroz (*Oryza sativa*) en gran números más altos. (SH Gillespie, 1994).

Un factor importante para la movilidad de las bacterias es la presencia o ausencia de flagelos. En ese sentido, las bacterias de los géneros *Klebsiella pneumoniae* no motil, está rodeada de fimbrias (Korhonen et al., 1986).

La capacidad de las bacterias para afectar el crecimiento de las plantas no sólo depende de su abundancia, sino de su capacidad para proliferar a través de la raíz (Loper et al., 1985). En general, las bacterias inoculadas en la semilla colonizan sólo el primer tercio del sistema radical (Hatzinger y Alexander, 1994).

En la muestra seis, se identificó la bacteria *Enterobacter cloacae,* Es una bacteria Gram negativa con forma de bastón, anaeróbica facultativa y porta flagelos peritricos . Es oxidasa negativa y catalasa positiva. Se les puede encontrar en el suelo, agua y como parte de la microbiota de animales, insectos y tracto gastrointestinal humano. Sin embargo, juegan un papel importante como patógenos en plantas e insectos.

En cuanto a *Enterobacter aerogenes* son bacilos gramnegativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, ampliamente distribuidos en la naturaleza. Al igual que la *E. cloacae* se les puede encontrar en el suelo, agua y como parte de la microbiota de animales, insectos y tracto gastrointestinal humano (Sanders, C.).

En Panamá y países vecinos (Trujillo, 1996) este género ha venido adquiriendo importancia en los últimos años, sobre todo el grupo causante de pudriciones blandas. Integrantes del género *Enterobacter* han sido señalados en cultivos y plantas ornamentales, entre ellos, la papa (*Solanum tuberosum L.*; Faría y col., 1993).

Según el tipo de suelo, la enfermedad se ve favorecida por una amplia variedad, desde arenosos a arcillosos pesados, en un amplio rango de pH. En el campo, la enfermedad se localiza por focos, asociados a menudo con mal drenaje (Madigan, M, 2003). A su vez, el monocultivo y los restos de plantas de papa y tubérculos infectados que no son cosechados, junto a malas prácticas culturales y sanitarias, traen como consecuencia un aumento del inóculo en el suelo y un incremento en la incidencia de la enfermedad.

Klebsiella pneumoniae es un patógeno del suelo que infecta las raíces de papas a través de heridas y puntos de emergencia de raíces laterales. La propagación entre las plantas se produce por contacto entre raíces infectadas y raíces sanas cercanas. La infección también puede partir desde tubérculos infectados usados como semilla.

Aunque según investigaciones se encontró que *K. pneumoniae* residía en las capas intercorticales del tallo y en la raíz del maíz, la nitrogenasa reductasa solo se encontró en las raíces cuando las bacterias recibieron una fuente de C exógena, como lo demuestra la inmunolocalización con un anticuerpo contra nitrogenasa reductasa purificada, pero no se han encontrado en la papa (*Solanum tuberosum L.*). Teniendo en cuenta la diversidad de géneros que pueden estar relacionados con la expresión de esta sintomatología (Toth, I. 2003).

Se destacan las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* dentro de las principales causantes de la pudrición blanda en tubérculos de papa, así como en la pudrición o marchitez de los tallos en plantas de papa en crecimiento, enfermedad conocida como pierna negra y la marchitez bacteriana en hojas (García, 2000). Estas bacterias causan problemas en la producción de papa en todo el mundo.

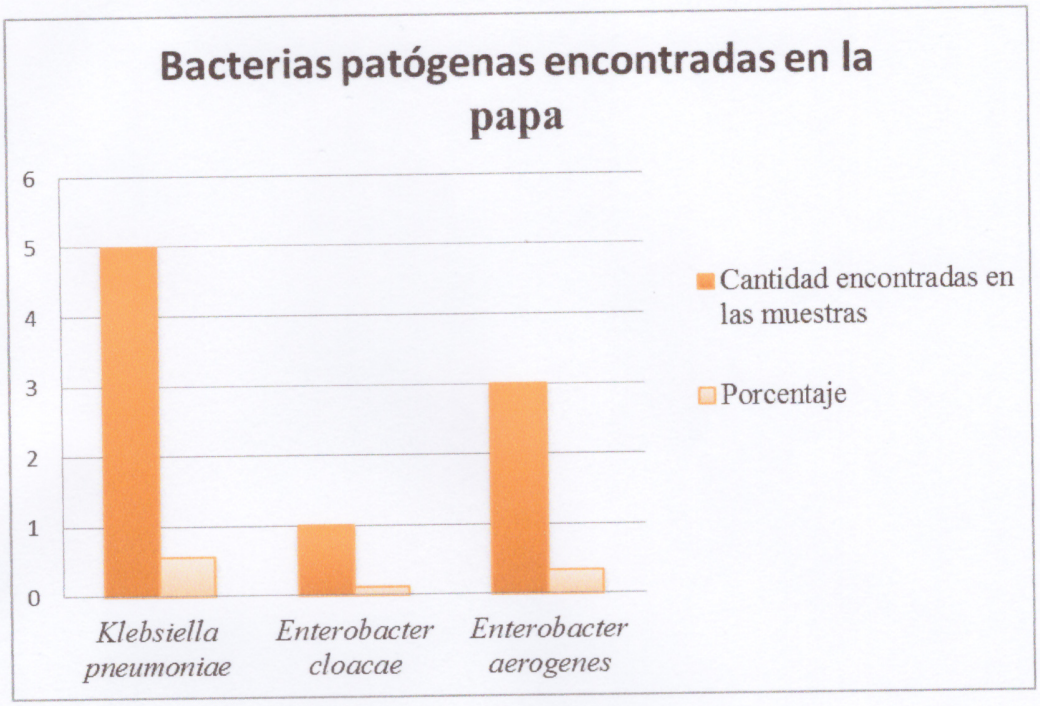
Cuadro 6. Resultado de las pruebas bioquímicas realizadas a las muestras de papa (*Solanum tuberosum).*

Muestra	TSI	MOT	IND	H_2S	CIT	VP	RM	UREA	LYS	OXI	CAT	SIM
3,5,7,9, 11.	A/A H_2S- CO_2+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	H_2S - M- I-
4,10,12.	A/A H_2S- CO_2+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	H_2S- M+ I-
6	A/A H_2S- CO_2+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	H_2S- M+ I-

En la muestra tres, cinco, siete, nueve y once, se identificó la bacteria *Klebsiella pneumoniae.* En la muestra cuatro, diez y doce, se identificó la bacteria *Enterobacter aerogenes* y en la muestra seis se identificó la bacteria *Enterobacter cloacae*

Las muestras uno, dos y ocho, en los medios de cultivos no se obtuvo crecimiento Estas muestras fueron cultivadas nuevamente en otros agares y no obtuvo crecimiento.

Figura 20. Bacterias patógenas encontradas en la papa *(Solanum tuberosum).* (Flores, K.2022).



Las áreas de los campos de papa que reciben exceso de agua; por ejemplo, las zonas bajas, las áreas en hondonadas centrales, o incluso las áreas que están expuestas a exceso de lluvia, pueden crear condiciones anaeróbicas en el suelo. De hecho, con toda probabilidad la causa más frecuente de la Pudrición blanda de las semillas y de la Pierna negra son los suelos que se anegan en el momento incorrecto.

El control de estos patógenos por lo general se ha realizado utilizando plaguicidas y otros químicos, los cuales han tenido efectos negativos sobre el ambiente y la calidad de vida de las poblaciones humanas (Serrano y Galindo, 2007). La aplicación sistemática de productos químicos en la agricultura implica actualmente dificultades como el

resurgimiento de plagas, el desarrollo de resistencia genética de microorganismos, la contaminación del ambiente y daños a la salud humana

El manejo cuidadoso de la ventilación y la temperatura son los únicos métodos efectivos de control de la Pudrición blanda bajo condiciones de almacenamiento. Los altos volúmenes de aire secarán los tubérculos infectados y las temperaturas inferiores a 10 °C son desfavorables para el desarrollo de la Pudrición blanda. En el campo, las únicas técnicas de manejo efectivas incluyen el control adecuado de otros patógenos, evitar el exceso de riego y tomar las medidas necesarias para reducir el daño mecánico al mínimo

Otro factor importante es el exceso de agua ya que permite que las bacterias se muevan fácilmente a través de los tejidos de la planta, además de llevar a una disminución en la disponibilidad de oxígeno, lo que crea un ambiente anaeróbico dentro de la planta, limitando sus defensas dependientes de oxígeno (Toth y col., 2003), esto se consigue con las cámaras húmedas, que resultan idóneas para reproducir los síntomas causados por los aislados.

Los autores también indican que los síntomas son destructivos a temperaturas iguales o por encima de 28 ºC y que las plantas pueden permanecer asintomáticas o con síntomas leves a temperaturas inferiores a 20 ºC.

Las bacterias patógenas en el momento de contacto con la planta ponen en marcha un abanico de propiedades que contribuyen al éxito de la invasión final. Estos factores influyen en la virulencia (capacidad de incrementar la severidad de la enfermedad de la planta), que no se debe confundir con la patogenicidad (capacidad de producir la enfermedad). Así, los factores de virulencia son importantes para que las bacterias

invadan y colonicen rápidamente el tejido, alcanzando unos altos niveles de población antes de que la respuesta de la planta limite el crecimiento bacteriano.

En la literatura especializada, las temperaturas optimas reportadas para *Enterobacterias* su desarrollo es de 28 a 35 ºC y tanto la temperatura como la humedad son dos factores críticos para el inicio y el desarrollo de la pudrición blanda (Pérombelon, 2002). Dada la importancia de la temperatura demostrada también en ambos experimentos, podría esperarse que, cuando está por debajo de la temperatura ambiente (26ºC), no predominará la infección del patógeno en el cultivo, que es lo observado en campo por los agricultores, teniendo en cuenta que Tierras Altas, es uno de los distritos de Panamá que registra temperaturas más bajas.

VI. CONCLUSIONES

Se logró aislar cepas bacterianas, obteniéndose 12 muestras de aislados bacterianos de papa con sintomatología de pudrición blanda colectadas en Tierras Altas, provincia de Chiriquí. Las pruebas bioquímicas en tubérculos de papa permitieron identificar 2 bacterias patógenas.

La identificación de la bacteria *Klebsiella pneumoniae* en los cultivos de papa, nos pone en alerta ya que es una bacteria patógena frecuente del tracto urinario, lo que conlleva a alertar a los trabajadores para un mejor manejo de las tierras utilizadas para el cultivo, y así tener una mejor cosecha.

Se ha comprobado que los sistemas de identificación para *Enterobacterias* por MicroScan, son útiles para la identificación, ya que varias cepas no pudieron ser identificadas por pruebas manuales.

El manejo cuidadoso de la ventilación, manipulación y la temperatura son los únicos métodos efectivos de control de la Pudrición blanda bajo condiciones de almacenamiento.

El estudio confirmo que existen diferentes géneros bacterianos asociados a los síntomas de pudrición blanda en el área de Tierras Altas.

VII. RECOMENDACIONES

Eliminar la mayor parte de rastrojos del cultivo anterior y malezas, rotar los cultivos, utilizar semillas sanas, evitar riegos pesados y anegamiento del campo, desinfectar las herramientas con lejía al 3%, seleccionar tubérculos y un almacenamiento adecuado.

Llevar a cabo inspecciones periódicas a los cultivos y evitar el manejo de productos húmedos con tierra pegada para la revisión de los mismos.

Aplicar fuentes de calcio que trasloquen eficientemente en los tejidos de la papa, para que lleguen a los frutos y presenten una mayor resistencia a las bacterias patógenas que provocan la Pudrición blanda.

Ampliar el estudio, colectar un mayor número de muestras en estas localidades y hacer uso de herramientas moleculares que permitan la identificación específica de las especies bacterianas que producen la enfermedad en estas áreas.

Hacer un llamado de atención a productores y técnicos vinculados al cultivo en la región, para extremar las medidas de manejo que permitan disminuir la incidencia de estas bacterias en un producto alimenticio de amplia demanda en el país.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A, Dommelen, J, Vanderleyden , (2007). Biología del ciclo del nitrógeno.

Agrios, G. (1999). Fitopatología. Editorial Limusa. México.

Álvarez, M. (2002). El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum L.)* en México y el estudio de la costra negra (*Rhizoctonia solani*). Buenavista, México.

Analisis de función de mercadeo en la producción y comercialización de la papa y su efecto socioeconómico en la provincia de chiriqui. (1997). Tesis.

Assefa J. (2013). Postharvest Biological control of Fusarium dry-rot diseases in potato tubers using Clonostachys rosea strain IK726. Disponible en línea: https://stud.epsilon.slu.se/5248/12/assefa-jima_t_130130.pdf (consulta, octubre 2017).

Barnett, H., Hunter, B. (2006). Illustrated Genera of Imperfect Fungi, 4th. (Ed.), APS Press. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 218p.

Bayona, R. (2013). Manejo integrado de plagas y enfermedades en el cultivo de papa. Paucartambo, Cusco, Perú. 28 pp.

Bell, S., Roberts, J., Verrall, S., Cullen, W., Williams, W., Harrison, G., & Claxton, R. (1999). Detection and quantification of Spongospora subterranea f. sp. subterranea in soils and on tubers using specific PCR primers. European Journal of Plant Pathology 105:905-915. https://doi.org/10.1023/A:1008782309333

Bopp, C.A., Brenner, F.W., Fields, P.I., Wells, J.G., and N.A. Strockbine. (2003). Escherichia, Shigella, and Salmonella. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen,

M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Borba, N. (2008). La papa un alimento básico. RAP-AL Uruguay. 11pp.

Boyd, A. (1972). Potato storage diseases. Review of Plant Pathology 51:297-321. Disponible en línea: https://www.cabi.org/isc/FullTextPDF/2006/20063049509.pdf

Brown E. (1988). Efficacy of guazatine and iminoctadine for control of postharvest decays of oranges. Plant Disease 72:906-908. Disponible en línea: https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1988Articles/PlantDisease72n10_906.PDF

Buckenhüskes H. (2005). Nutritionally relevant aspects of potatoes and potato constituents. pp. 17-26. In: Haverkort A. J., Struik P.C. (Eds.) Potato in progress. Science meets practice. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Burkholder, WH. (1950). Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. Phytopathology. 40: 115–117.

Cambra, M., Palacio-Bielsa, A. (2005). Enfermedades bacterianas de la patata: Situación en Aragón. Surcos Aragón. 91: 26-31.

Carrasco, D. (2007). Aislamiento e identificación de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos, comprobando su actividad enzimática. Trabajo Especial de Grado. Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador. 39 pp.

Castillero, E. (1994). SH Gillespie MB, BCh, BAO, MRCP (Reino Unido), MRCPath, en Microbiología médica ilustrada. Biblioteca Nacional Ernesto, J. Bicentenario independencia de Panamá de España. https://binal.ac.pa/binal/component/content/article/.../94-panama-y-sus-contrastes#:~:text=En%20las%20tierras%20altas%20la,coincide%20con%20el%20invierno%20astron%C3%B3mico.

CEA. (2002). (Centro de estudios agropecuarios) Cultivo de la papa serie Agronegocios ed Iberoamérica S.A de C.V

Clesceri, L., Greenberg A., Eaton A.D. (1998). Part 9000, MicrobiologicalExamination., Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th Edition, APHA.

Coenye, T., Vandamme, P. (2003). Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches. Environmental Microbiology. 5: 719–729.

Compant, S., Nowak J., Coenye T., Clément C. y Barka E. (2008). Diversity and occurrence of Burkholderia spp. in the natural environment. Federation of European Microbiological Societies. 32: 607–626.

Contreras, A. (2008). Historia y origen de la papa cultivada: Influencia de la papa americana en el mejoramiento de la especie a nivel mundial. Universidad Austral de Chile, Chile. Revista ALAP´08 (Asociación Latinoamericana de Perfusión). 516pp.

Cronin, D., Moënne, Y., Fenton, A., Dunne, C., & O'gara, F. (1997). Ecological interaction of a biocontrol Pseudomonas fluorescens strain producing 2, 4-

diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. FEMS Microbiology Ecology 23:95-106. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00394.x

Czajkowski, R., Pérombelon, M., Jafra S., Lojkowska, E., Potrykus M., van der Wolf J. y Sledz W. (2015). Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. Annals of Applied Biology. 166: 18-38.

Czajkowski, R., Perombelon, M., Van Veen, A., & Van der Wolf, J. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. Plant pathology 60:999-1013. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02470.x

Chavarro, M., Angel D. y Martinez H. (2004). Utilización de iniciadores específicos para el diagnóstico molecular de *Ralstonia solanacearum* a partir de aislamientos provenientes del departamento de Antioquia. Revista de La División de Ciencias de La Salud. 18: 67–68.

Chelkowski J. (1989). Toxinogenic of Fusarium species causing dry rot of potato tubers. Pp 435-440. In: Chelkowski J. (ed.). *Fusarium: Mycotoxins*, Taxonomy and Pathogenicity. Elsevier Publishing Company, New York, USA. 492 p. https://doi.org/10.1002/food.19900340624

Daily G.C., Alexander S., Ehrlich P.R., Goulder L., Lubchenco J., Matson P.A., Mooney H.A., Postel S., Schneider S.H., Tilman D.and Woodwell G.M., (1997).

Ecosystems Services: Benefits Supplied to Human Societies by Natural Ecosystems. Issues Ecol., 2, pp. 1-18

Danyluk MD, Fatica MK, Brar PK, McEgan R, Valadez AM, Schneider KR and Trinetta V. (2013). Fruits and Vegetables. Chapter 50. In: Salfinger Y and Tortorello ML. (Eds.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 5th edition. American Public Health Association (APHA Press). Washington, D.C. USA. 515,533,561pp. https://doi.org/10.2105/MBEF.0222.055

El-Ghaouth, A., Wilson, C., Wisniewski, M. (1998). Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of Botrytis cinerea by Candida saitoana in apple fruit. Phytopathology 88:282-291. https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.4.282

Elphistone, G. (1987). La pudrición blanda y pierna negra de la papa. Boletín de información. Técnica N.º 21. Colegio internacional de la papa. Lima, Perú

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2014). FAOSTAT. Food and agriculture data. Disponible en línea: http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC (consulta, octubre 2017).

Farmacopea Nacional Argentina, Codex Medicamentarius Argentino, Séptima Edición, volumen 1. (2003). Control Microbiológico de Productos no Obligatoriamente Estériles.

Farmer III, J.J. (2003). *Enterobacteriaceae:* introduction and identification. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ
BIBLIOTECA Dr. ROBERTO JAÉN Y JAÉN

Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Fiers M, Chatot C, Edel-Hermann V, Le Hingrat Y, Konate AY, Gautheron N and Steinberg C. (2010). Diversity of microorganisms associated with atypical superficial blemishes of potato tubers and pathogenicity assessment. European Journal of Plant Pathology 128:353-371. https://doi.org/10.1007/s10658-010-9657-2

Fiers M, Edel-Hermann V, Chatot C, Le Hingrat Y, Alabouvette C and Steinberg C. (2012). Potato soil-borne diseases. A review. Agronomy for Sustainable Development 32:93-132. https://doi.org/10.1007/s13593-011-0035-z

Fiers M. (2010). Origins of the blemishes of potato tubers: from the soil microbiology to the pedoclimatic environment. Food and Nutrition. Université de Bourgogne, France. 261p. Disponible en línea: https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00572491/document

Fonseca, I. (2014). Identificación bioquímica y molecular de *Burkholderia gladioli* y análisis de su interacción con plantas de *Solanum tuberosum*. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. 305 pp.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT) [Internet]. (2016). Disponible en: http://www.fao.org/

Forbes, Sahm and Weissfeld (ed.). (1998). Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 10th ed. Mosby, Inc., St. Louis, Mo.

Fraire, M., Yáñez, M., Nieto, D., y Vázquez, G. (2003). Hongos patógenos en fruto de fresa (Fragaria x ananassa Duch.) en postcosecha. Revista Mexicana de Fitopatología 21:285-291. Disponible en línea: http://www.redalyc.org/html/612/61221307

French, E. (1984). Marchitez bacteriana de la papa (*Pseudomonas solanacearum*) en América Latina. Centro Internacional de la papa (CIP). Seminario de Investigaci6n y de Trabajo: "Avances en el control de la marchitez bacteriana *(P. Solanacearum*) de la papa en América Latina: Reunión de planeamiento", realizado en Brasilia Agosto 31 Sept. 3, 1982. 121 pp.

Friedmans, B. (1960). Market diseases of fresh fruits and vegetables. Economic Botany 14:145-156. https://doi.org/10.1007/BF02860016

Gan, Z., Yang, J., Tao, N., Liang, L., M, Q., Li, J., Zhang ,K. (2007). Cloning of the gene *Lecanicillium psalliotae* chitinase Lpchi1 and identification of its potential role in the biocontrol of root-knot nematode Meloidogyne incognita. Applied Microbiology and Biotechnology 76:1309-1317. https://doi.org/10.1007/s00253-007-1111-9

Gandarillas, A. y Ortuño N. (2009).Compendio de enfermedades, insectos, nemátodos y factores abióticos que afectan el cultivo de papa en Bolivia. Fundación PROINPA. Cochamba-Bolivia. 182pp.

Gashgari, M., Gherbawy, A. (2013). Pathogenicity of some *Fusarium* species associated with superficial blemishes of potato tubers. Polish Journal of Microbiology 62:59-66.

Gherbawy, A., Gashgari, M. (2013). Mycobiota associated with superficial blemishes of potato tubers. Food Biotechnology 27:137-151. https://doi.org/10.1080/08905436.2013.781947

González, I., Arias Y. y Peteira B. (2009). Interacción planta-bacterias fitopatógenas: caso de estudio Ralstonia Solanacearum-plantas hospedantes. Protección Vegetal. 24: 69-80.

Goszczynska T, Serfontein, J., Serfontein, S. (2000). Introduction to practical phytobacteriology; a manual for phytobacteriology by SAFRINET, SDC Switzerland. 83p. Disponible en línea: https://www.researchgate.net/publication/237021880_Introduction_to_Practical_Phytobacteriology_A_manual_for_phytobacteriologyde

Haan EG, Dekker-Nooren TC, van den Bovenkamp GW, Speksnijder AG, van der Zouwen PS and van der Wolf JM. (2008). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* can cause potato blackleg in temperate climates. European Journal of Plant Pathology 122:561. https://doi.org/10.1007/s10658-008-9325-y

Hatzinger, B., Alexander, M. (1994). Relationships between the number of bacteria added to soil or seeds and their abundance and distribution in the rhizosphere of alfalfa. Plant Soil 158: 211-222.

Henry, D., Mahenthiralingam, E., Vandamme, P., Coenye, T., Speert, D. (2001). Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex. J Clin. Microbiol. 39: 1073–1078.

Herrera JE and Scott GJ. (1993). Factores limitantes a la producción y usos de la papa: resultados de la encuesta a los programas nacionales de América Latina. Revista Latinoamericana de la papa 5:122-134. Disponible en línea: http://www.papaslatinas.org/ojs/index.php/rev-alap/article/viewFile/63/65

Holt-Harris, J.E., and O. Teague. (1916). A new culture medium for the isolation of *Bacillus typhosus* from stools. J. Infect. Dis. 18:596-600.

Inostroza J. (2009). Manual de papa para La Araucanía: Manejo y plantación. INIA Carillanca. Temuco, Chile. Boletín Nº 193.114 pp.

INSTITUTO DE INVESTIGACION AGROPECUARIA DE PANAMÁ (IDIAP). (1983). Investigaciones en Papa; Panamá.

INSTITUTO DE INVESTIGACION AGROPECUARIA DE PANAMÁ (IDIAP). (1986). Caracterización Ambiental y Principales Sistemas de Cultivo en Fincas Pequeñas. Panamá.

INSTITUTO DE RECURSOS DEL MINISTERIO DE DESARROLLO AGROPECUARIO (MIDA). (1982). Producción de Papa en Panamá. Panamá.

Isenberg H. (2004). Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology; p. 3.17.13.

Jemison, J., Sexton, P., Camire, M. (2008). Factors influencing consumer preference of fresh potato varieties in Maine. American Journal of Potato Research 85:140-149. https://doi.org/10.1007/s12230-008-9017-3

Koneman, F. (2008). Diagnóstico Microbiológico texto y atlas en color. 6ª Edición. Editorial Panamericana.

Korhonen, T., Lassila, T., Laakso , K. Haahtela. (1986). Adhesion of fimbriated nitrogen-fifing enteric bacteria to roots of grasses and cereals. Plant Soil 90: 59-69

Lally R, Woolfrey B. (1984)Clumping factor defective methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 3:151-152.

Lavelle P, and Spain A.(2001). Soil Ecology. Kluwer Academic Publishers.

Lavelle P., Decaens T., Aubert M., Barot S., Blouin M., Bureau F., Margerie P., Mora P., and Rossi J.P., (2006). Soil invertebrates and ecosystem services. European Journal of Biology. 42.S3-S15 .

Lelliott & Stead (1987). Métodos para el Diagnóstico de Enfermedades Bacterianas en plantas. Vol. 2

Leslie, J., Summerell, A. (2006). The Fusarium laboratory manual. Blackwell Publishing Professional, Iowa, USA. 388p. Disponible en línea: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470278376.fmatter/pdf (consulta, octubre 2017).

Levine, M. (1918). Differentiation of *B. coli and B. aerogenes* on a simplified eosin-methylene blue agar. J. Infect. Dis. 23:43-47.

Lodewyckk, C., Megeay M., Vangronsveld J., Clijsters J. y van der Lelie D. (2002). Isolation, characterization and identification of bacteria associated to the zinc

hyperaccumulator Thlaspi caerulescens subsp. calaminaria. International Journal of Phytoremediation. 4: 101-115.

Loper, J.E., C. Haack y M.N. Schoth. (1985). Population dynamics of soil pseudomonads in the rhizosphere of potato. Appl. Environ. Microbiol. 49: 416-422.

López-García B, Veyrat A, Pérez-Payá E, González-Candelas L and Marcos JF. (2003). Comparison of the activity of antifungal hexapeptides and the fungicides thiabendazole and imazalil against postharvest fungal pathogens. International Journal of Food Microbiology 89:163-170. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00118-1

MacFaddin, J.F. (1985). Media for the isolation – cultivation – maintenance of medical bacteria. Volume 1. Williams and Wilkins, Baltimore, London.

Madigan M, Martinko J, Parker J. Brock, (2003). Biología de los microorganismos. 10ª edición. 10 España: Prentice Hall Iberia. p.1089.

Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (2009). Biología de los Microorganismos (12 Ed.). Ed. Pearson.

Manici, M., Cerato, C. (1994). Pathogenecity of *Fusarium oxysporum* f. sp. tuberosi isolates from tubers and potato plants. Potato Research 37:129-134. https://doi.org/10.1007/BF02358713

Méndez, P. & Inostroza J. (2009). Manual de papa para La Araucanía: Manejo de cultivo, enfermedades y almacenaje. INIA Carillanca. Temuco, Chile. Boletín N.° 194. 116 pp.

Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. (2012). *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. Future Microbiol; 7: 887-902.

Migula, N. (1894). Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe.1: 235–238

Mikitzel L. (2014). Tuber physiological disorders. Chapter 14. Pp: 237. In: Navarre R, Pavek MJ. (eds.). The Potato: Botany, Production and uses. CABI, USA. 382p. http://doi.org/10.1079/9781780642802.0000

Ministerio De Desarrollo Agropecuario (MIDA). (2017). Disponible en https://www.mida.gob.pa/noticias_id_4523.html

Mora-Aguilar R. (2014). Consumo y mercado de la papa en México. XXVI Congreso bienal de la Asociación Latinoamericana de la Papa (ALAP). Disponible en línea: https://consumoymercadodepapa.wordpress.com/2014/11/28/consumo-y-mercadeo-de-la-papa-en-mxico/ (consulta, abril 2018).

Murray P., Baron, Pfaller, Tenover and Yolken. (1999). Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M. (2009). Microbiología Médica. (6ªEd.).

Naerstad, R, Dees, M., Le, H., Holgado, R., & Hermansen, A. (2012). Occurrence of skin blemish diseases (scab and scurf) in Norwegian potato production. Potato Research 55:225-239. http://doi.org/10.1007/s11540-012-9221-x

Olivieri, P., Maldonado, S., Tonon, V., and Casalongue, A. (2004). Hydrolytic activities of Fusarium solani and Fusarium solani f. sp eumartii Associated with the

Infection Process of Potato Tubers. Journal of Phytopathology 152:337-344. http://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00851.x

P, Vanhooren., E, Vandamme. (1999). Encyclopedia of Food Microbiology.

Peix, A., Ramírez M. y Velázquez E. (2009). Historical evolution and status of the taxonomy of genus Pseudomonas. Elsevier. 9: 1132-1147.

Pérez F., León J. & Galindo N. (2015). Actinomicetos aislados del compost y su actividad antagonista a fitopatógenos de la papa (*Solanum tuberosum spp. andigena* Hawkes).

Pérombelon , M., 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. Scottish Crop Research Institute Annual Report 10.

Pérombelon, M. (2002). Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: an overview of pathogenesis. Plant Pathology. 51: 1–12

Políticas Públicas para el desarrollo Integral, Desarrollo Social con Eficiencia Económica. (1994).

Ponce R. (2013). Caracterización molecular de las variedades de papas cultivadas (*Solanum spp.)* más importantes del Perú mediante el uso de microsatélites. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Potrykus, M., Golanowska M., Sledz W., Zoledowska S. y Motyka A. (2016). Biodiversity of *Dickeya* spp. isolated from potato plants and water sources in temperate climate. Plant Disease. 100: 408-417

Prescott, L., Harley, J., Klein, D. (2004). Microbiology (5ª Ed.) Ed. Interamericana.

Rubio, A. y Kirk W. (2008).Efecto de la temperatura y fotoperiodo sobre la fisiología de la planta y susceptibilidad al tizón tardío de la papa. Revista ALAP´08 (Asociación Latinoamericana de Perfusión), 516 pp.

Schaad, N., Jones J. y Chun W. (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS PRESS. Third Edition. Minnesota, USA. 350 pp.

Schaad, N., Sowell G. Jr., Goth R., Colwell R. y Webb R. (1978). *Pseudomonas pseudoalcaligenes subsp. Citrulli subsp. nov*. International journal of systematic bacteriology. 28: 117–125.

Schaad, W., Jones, J., Chum, W. (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd Ed. APS Press, St. Paul, MN, USA 398p.

Schisler DA, Kurtzman CP, Bothast RJ and Slininger PJ. (1995). Evaluation of yeasts for biological control of Fusarium dry rot of potatoes. American Journal of Potato Research, 72:339-353. https://doi.org/10.1007/BF02849331

Schisler DA, Slininger PJ, Kleinkopf G, Bothast RJ and Ostrowski RC. (2000). Biological control of *Fusarium* dry rot of potato tubers under commercial storage conditions. American Journal of Potato Research 77:29-40. https://doi.org/10.1007/BF02853659

Schisler, D. (1994). Selection and performance of bacterial strains for biologically controlling Fusarium dry rot of potatoes incited by Gibberella pulicaris. Plant Disease 78:251-255. https://doi.org/10.1094/PD-78-0251

Schubert, E., Ramsey J. Bact. (1959). APHA Diagnostic Procedures and Reagents 3.a edition, 1951. 77:648, Tharshis and Frish AM. J. Clin. Path. 21:101. 1951.

Seifert, K., Gams, W. (2011). The genera of Hyphomycetes-2011 update. Persoonia 27:119-129. http://dx.doi.org/10.3767/003158511X617435

Sherris, J. (2004). Microbiología Médica. Ed. McGraw-Hill.

Slininger PJ, Kleinkopf G, Bothast RJ and Ostrowski RC. (2000). Biological control of *Fusarium* dry rot of potato tubers under commercial storage conditions. American Journal of Potato Research 77:29-40. https://doi.org/10.1007/BF02853659

Snavely and Brahier A. J. Clin. Path. (1953). Hosty, Freeman and Irwin, Public, Health. Lab. 33:511.

Sneh, B., Burpee, L., Ogoshi, A. (1991). Identification of Rhizoctonia species. 3rd print. APS press. St Paul, Minnesota, USA. 133p.

Stevenson, R., Loria, R., Franc, D., Weingartner, P. (2001). Compendium of potato diseases. Second Edition. The American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN, USA. 144p. http://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.06934.x

T.L. Roberts y J.L Henry. (2003). El muestreo de suelos: Los beneficios de un buen trabajo.

Talibi I, Askarne L, Boubaker H, Boudyac, EH, Msanda F, Saadi B, Ait Ben and Aoumar A. (2012). Antifungal activity of Moroccan medicinal plants against citrus sour rot agent Geotrichum candidum. Letters in Applied Microbiology 55:155-161. http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03273.x

Theron, D. (1991). Dry rot of potatoes caused by Gliocladium roseum. Plant Pathology 40:302-305. http://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1991.tb02380.x

Tortora, J. (2007). Introducción a la Microbiología. (9ª Ed.) Ed. Panamericana.

Toth I., van der Wolf J., Saddler G., Lojkowska E., Hélias V., Pirhonen M., Tsror L. y Elphinstone J. (2011). *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. Plant Pathology. 60: 385–399

United States Pharmacopeia (USP 27). (2004). (61) Microbial Limit Test

United States Pharmacopeia (USP 31), (2008). (61) Microbiological Examination of Nonsterile products: Microbial Enumeration Tests. Harmonized Method.

Vázquez, G., Rubio, A., Salinas, M., Santiago, D. (2013). Usos alternativos de la papa en el Estado de México Disponible en línea: https://www.researchgate.net/profile/David_Santiago-Ramos/publication/260437185_Usos_alternativos_de_la_papa_en_el_Estado_de_Mexico/links/004635315013a361e4000000/Usos-alternativos-de-la-papa-en-el-Estado-de-Mexico.pdf (consulta, octubre 2017).

Vidaver, A., Lambrecht, P. (2004). Bacteria as plant pathogens. The American Phytopathological Society. University of Nebraska, Lincoln, NE, EEUU.

YABUUCHI E., Kosako Y., Yano I., Hotta H. y Nishiuchi Y. 1995. Transfer of two Burkholderia and an Alcaligenes species to Ralstonia gen nov. proposal of Ralstonia pickettii (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. Microbiology and Immunology. 39: 897–904.

Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y. y col. (1992). Proposal of Burkholderia gen nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia*. Microbiology and Immunology. 36: 1251–1275.

Zimudzi J, Coutinho TA and Van der Waals JE. (2017). Pathogenicity of Fungi Isolated from Atypical Skin Blemishes on Potatoes in South Africa and Zimbabwe. Potato Research 60:119-144. https://doi.org/10.1007/s11540-017-9345-0

Zotarelli L, Reyes-Cabrera JE, Worthington CM, Hutchinson C, Byrd S, Gergela D y Rowland DL. (2013). Trastornos fisiológicos de la papa-Necrosis por calor interno. Departamento del Ciencias para la Horticultura, Servicio de Extensión Cooperativa de la Florida, Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas, Universidad de la Florida. (UF/IFAS). 4p. Disponible en línea: https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/HS/HS122100.pdf.

Zuno, F., Estrada, P., Gallegos, J., Rocha, N., Aldana, M., Virgen, G., Miller, M. y Muñoz, C. (2009). Producción in vitro de plántula de papa inoculada con *Pseudomonas* sp. Terra Latinoamericana. 27: 207-217

IX. ANEXOS

Anexo 1.

Figura 21. Tubérculos de papa con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 %. (Flores, K.2022).

Anexo 2.

Cuadro 11. Soluciones para realizar la tinción de gram.

Compuesto	Porcentaje	Solución
Cristal violeta	1%	A
Lugol (yodo)	1% y 2%	B
Safranina	2%	C
Alcohol	70%	Decolorante

acetona	30%	Decolorante

Se preparan frotis bacterianos colocando sobre un portaobjetos una muestra de bacterias bien extendidas.

Procedimientos para realizar la Tinción de Gram:

Teñir con la solución A durante 1 minuto, después lavar con abundante agua destilada el exceso de colorante.

Cubrir con la solución B durante 1 minuto, después lavar el exceso con abundante agua destilada.

Decolorar con la solución decolorante (se puede emplear etanol 95%), hasta que la preparación deje de perder color.

Lavar con abundante agua para eliminar el resto del disolvente.

Teñir con la solución C durante 1 minuto, después lavar con agua destilada para eliminar el resto de colorante.

Secar la preparación

Agregar aceite de inmersión para visualizar al microscopio óptico con el objetivo de 100X

Recomendación: Hacer paralelamente a la muestra problema, muestras patrón con una bacteria Gram + y una Gram -, para hacer las comparaciones y el control del procedimiento.

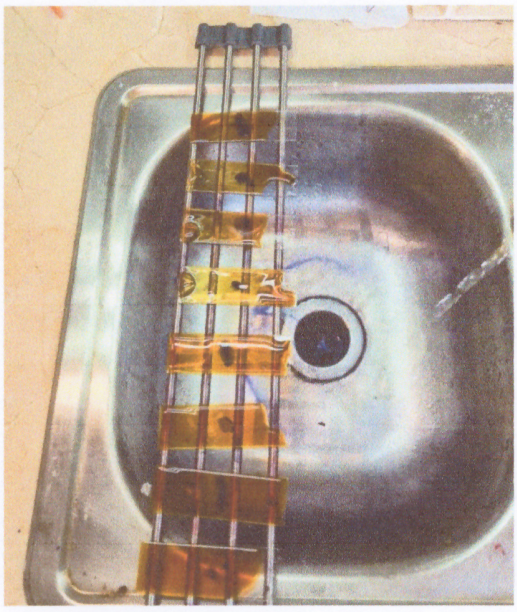


Figura 22. Tinción de Gram (Flores, K.2022).

Anexo 3.

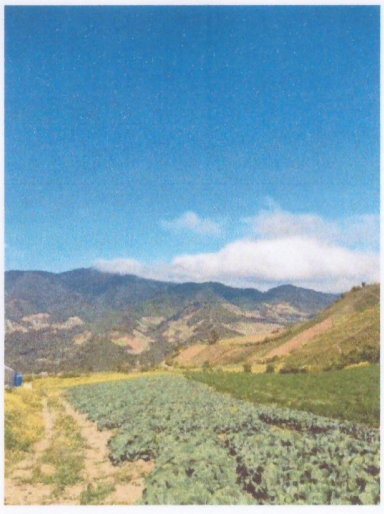


Figura 23. Finca donde se tomaron las muestras en Tierras Altas (Flores, K.2022).

El productor del cultivo reitero en varias oportunidades que los síntomas de marchitez solo se observan en las partes más bajas de la parcela.

Figura 24. Colecta de papas (*Solanum tuberosum),* en Tierras Altas (Flores, K.2022).

Anexo 4.

Pruebas bioquímicas

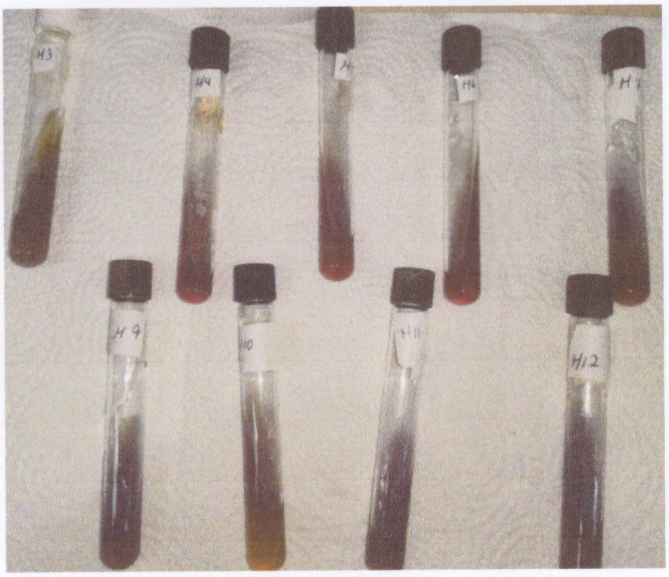


Figura 25. Prueba de Lisina. Las muestras dieron un resultado positivo para la lisina, excepto la 6, la cual dio un resultado negativo. (Flores, K.2022)

Figura 26. Prueba de SIM. Los resultados se muestran en el cuadro 9 (Flores, K.2022).

Figura 27. Prueba de Urea. En las muestras se obtuvo un resultado positivo (Flores, K.2022).

Anexo 5.

Preparación de los medios empleados para la identificación de los aislados

Cuadro 12. Componentes para la preparación del Agar MacConkey.

Componente	Cantidad (gramos/ litros)
Digerido pancreático de gelatina	17.0 gr
Sales biliares	1.5gr
Digerido péptico de tejido animal	1.5 gr
Cloruro de sodio	5.0 gr
Digerido pancreático de caseína	1.5 gr
Cristal violeta	0.001 gr
Lactosa	10.0 gr
Agar bacteriológico	13.5 gr
Rojo neutro	0.03 gr
pH	7.1+/- 0.2
H_2O estéril	1L

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión y 120°C. El caldo nutritivo LB se prepara de la misma manera, pero sin añadirle los 6 gr de Agar.

Anexo 6.

Cuadro 13. Componentes para la preparación del Agar sangre.

Componentes	Cantidad (Gramos/litros)
Peptona	5 g/L
Tripteína	12 g/L
Extracto de levadura	3 g/L
Extracto de sangre	3 g/L
Almidón soluble	1 g/L
Cloruro sódico	5 g/L
Agar	15g/L

Una vez preparado el medio de cultivo, se enfría y se le añade la sangre, se deja reposar y se vierte en los platos Petric.

Figura 28. Extracción de sangre para la preparación del agar sangre (Flores, K.2022).

Anexo 7.

Tinción de Gram

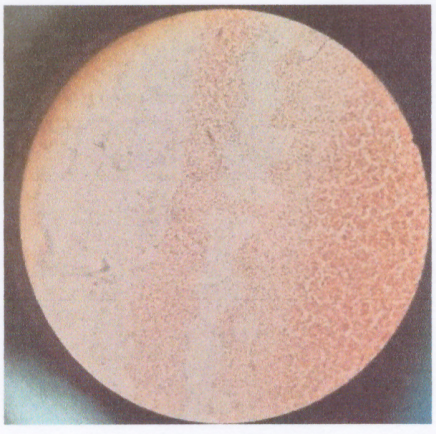


Figura 29. Resultados de la tinción de gram, muestra 3 gram negativa (Flores, K.2022).

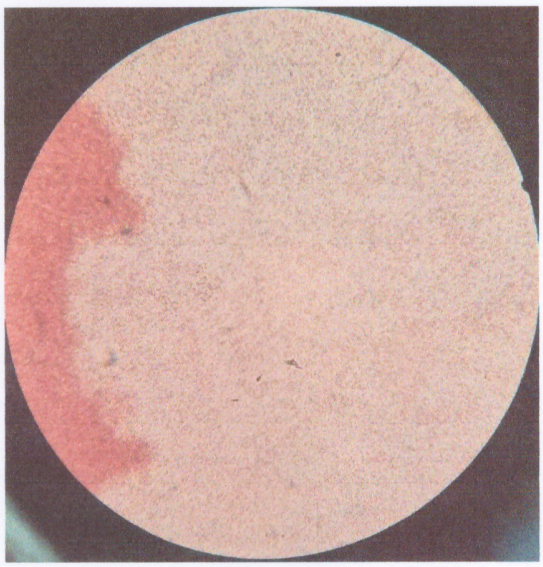


Figura 30. Resultados de la tinción de gram, muestra 4 gram negativa (Flores, K.2022).

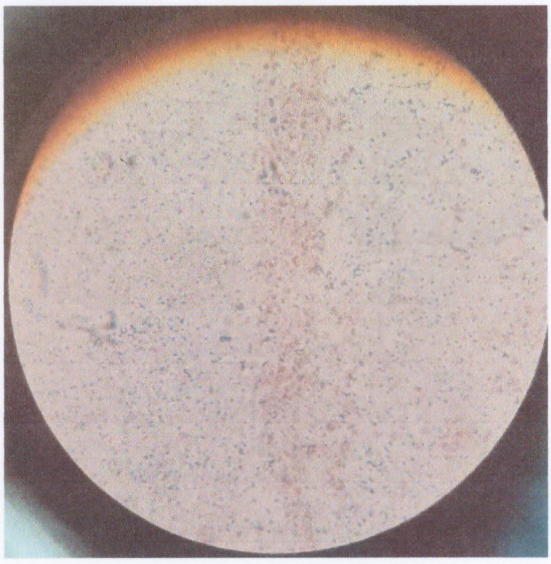


Figura 31. Resultados de la tinción de gram, muestra 5 gram negativa (Flores, K.2022).

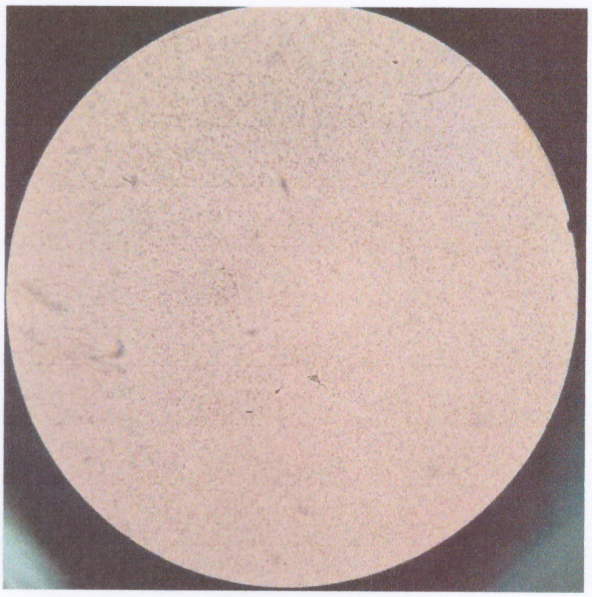


Figura 32. Resultado de la tinción de gram, muestra 6 gram negativa (Flores, K.2022).

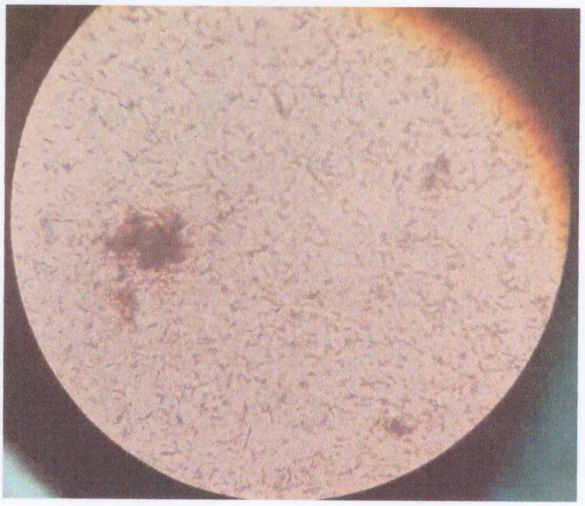


Figura 33. Resultados de la tinción de gram, muestra 7 gram positiva (Flores, K.2022).

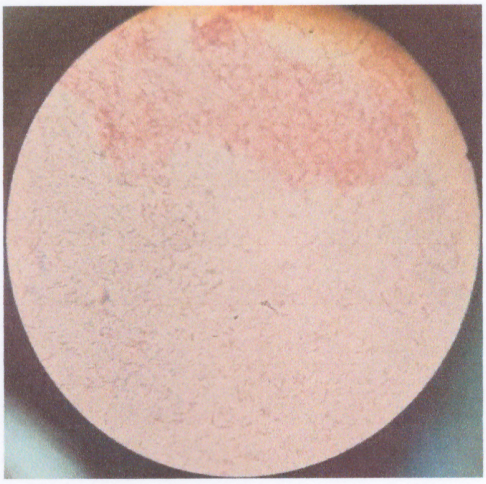


Figura 34. Resultados de la tinción de gram, muestra 9 gram negativa (Flores, K.2022).

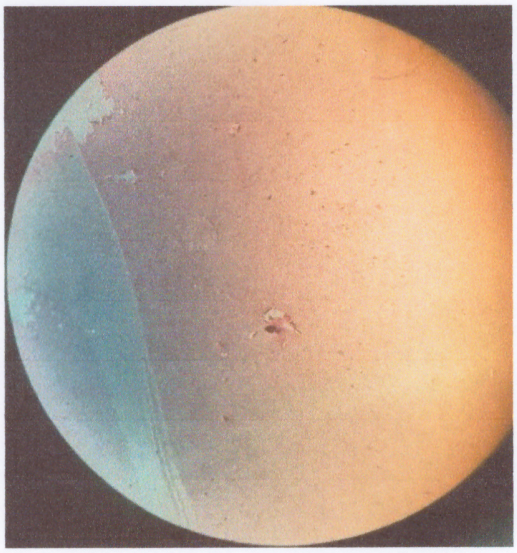


Figura 35. Resultados de la tinción de gram. Muestra 10, gram negativa (Flores, K.2022).

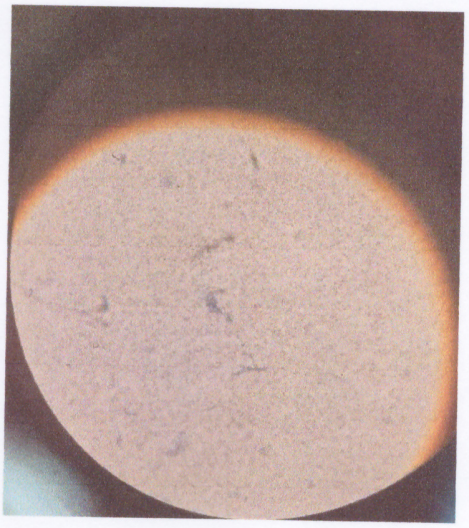


Figura 36. Resultados de la tinción de gram. Muestra 11, gram negativa (Flores, K.2022).

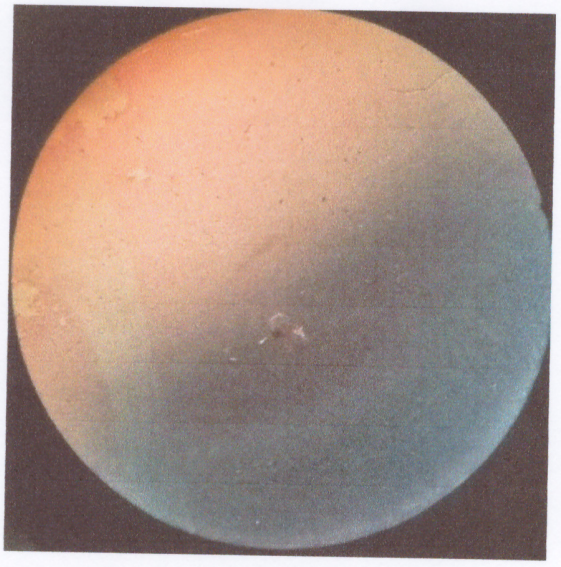


Figura 37. Resultados de la tinción de gram. Muestra 12, gram negativa (Flores, K.2022).

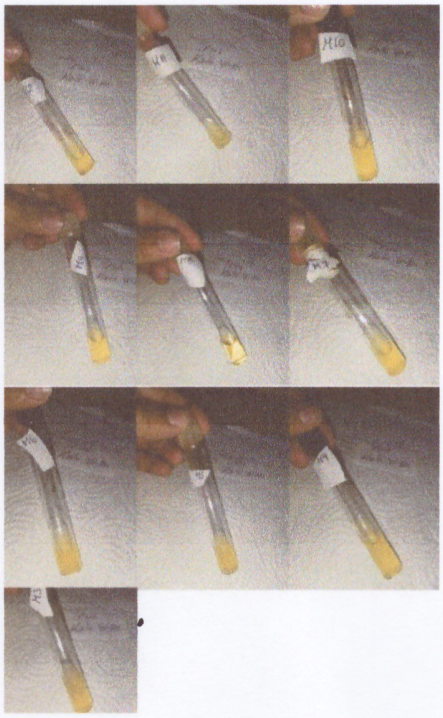


Figura 38. Resultados de la prueba bioquímica RM-VP. Todas las pruebas dieron positivo a VP, negativo a RM (Flores, K.2022).

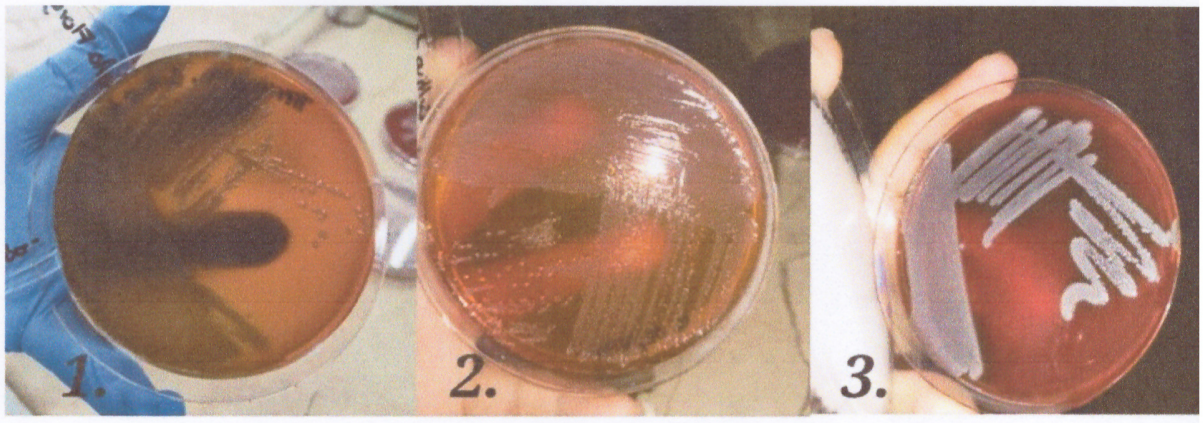


Figura 39. Medio de cultivo Agar sangre, muestra 1: *Klebsiella pneumoniae*, muestra 2: *Enterobacter aerogenes* y la muestra 3: *Enterobacter cloacae (*Flores, K.2022).

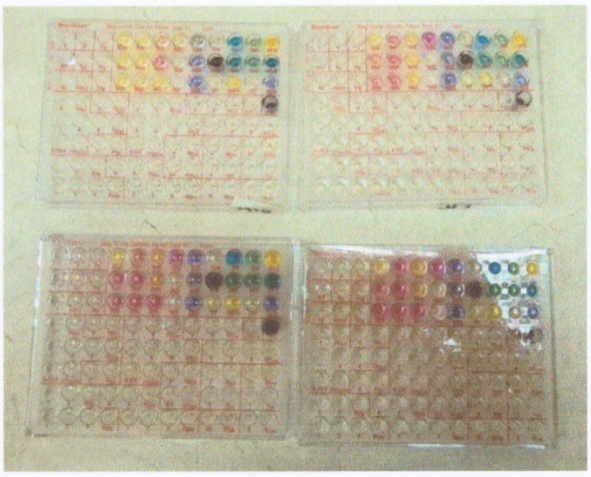


Figura 40. Resultados de las pruebas de MicroScan (Flores, K.2022).

Figura 41. Resultados de la muestra 5. La bacteria que se identifico es *Klebsiella pneumoniae (*Flores, K.2022).

Figura 42. Resultados de la muestra 7. La bacteria que se identifico es *Klebsiella pneumoniae (*Flores, K.2022).

Figura 43. Resultados de la muestra 10, la bacteria que se identifico es *Enterobacter aerogenes* (Flores, K.2022).

Figura 44. Resultados de la muestra 11. La bacteria que se identifico es Klebsiella pneumoniae (Flores, K.2022).

Anexo 8.

Cuadro 14. Componentes para la preparación de Agar EMB.

Componentes	**Cantidad (gramos/litros)**
Digerido pancreático de gelatina	10.0 g
Lactosa	5.0 g/L
Sacarosa	5.0 g/L
Fosfato dipotasico	2.0 g/L
Agar	13.5 g/L
Eosina Y	0.4 g/L
Azul de metileno	0.065 g/L

Formula por litro de agua destilada.

Anexo 9.

Obtención de cultivos puros por el método de rayado: uso de agares enriquecidos, selectivos y diferenciales

Los microorganismos son observados con el microscopio, pero sus actividades solamente se pueden estudiar a través de un cultivo puro. Un cultivo puro es un cultivo de un solo tipo de microorganismos. Cuando se cultiva un microorganismo, se multiplica y aumenta el número de células. Este proceso se llama crecimiento. Para obtener un cultivo puro, se debe obtener el crecimiento de la bacteria en el laboratorio. El estudio en el laboratorio requiere que proporcionemos al microorganismo los nutrientes apropiados y las condiciones ambientales adecuadas para que se pueda desarrollar. También es indispensable que se evite la entrada de otros microorganismos en el cultivo puro. Esos microorganismos no deseados, llamados contaminantes, son ubicuos y las técnicas microbiológicas se orientan a evitar los contaminantes. Una vez que se ha aislado un cultivo puro, se puede proceder a estudiar las características culturales de las bacterias y determinar sus capacidades.

Cuando hay que estudiar microorganismos que causan enfermedades (patógenos) se deben tomar precauciones especiales para evitar la infección de las personas cercanas al área de trabajo. El término técnica aséptica se refiere a la manipulación de cualquier cultivo microbiano de tal forma que no haya contaminación.

Los microorganismos se cultivan en agua, a la que se han añadido los nutrientes apropiados. La solución acuosa que contiene los nutrientes necesarios se denomina medio de cultivo líquido o caldo. Los medios de cultivo contienen fuentes de energía para los

microorganismos como glucosa, lactosa, xilosa, etc.; fuentes de carbono como el extracto de carne, y de nitrógeno como la peptona y el extracto de levadura. Además, debe contener vitaminas, aminoácidos, ácidos grasos, etc. Al medio de cultivo se le puede añadir agar, que es un agente solidificante compuesto de carbohidratos complejos obtenidos de ciertas algas marinas. De esta forma se obtienen medios de cultivo sólidos o agares. Para obtener cultivos puros se utilizan la técnica de siembra por estrías o rayado y la técnica de vaciado; ambas técnicas involucran la disminución de la concentración de los microorganismos, para seleccionar la especie de interés.

Tipos de medios de cultivo

Aunque la mayoría de las bacterias se desarrollan bien en caldo nutritivo o agar nutritivo, otros no crecen bien, y otros más, simplemente, no crecen. Además, se necesitan muchos medios de cultivo elaborados para propósitos especiales que facilitan la identificación, aislamiento y cuantificación de ciertos tipos de bacterias. Actualmente se cuenta con numerosos medios de cultivo a los cuales, de acuerdo con su función o aplicación, se les puede clasificar de la manera siguiente:

Medios Enriquecidos:

La adición de componentes como sangre, suero o extractos de tejidos de animales y plantas al caldo nutritivo o agar, les proporciona sustancias nutritivas complementarias para que el medio pueda soportar el crecimiento de bacterias exigentes. Ejemplos de medios enriquecidos: Agar Sangre de Carnero y Agar Chocolate.

Medios Selectivos:

La adición al agar nutritivo de ciertas sustancias químicas específicas no permitirá el desarrollo de ciertos grupos de bacterias, sin inhibir al mismo tiempo el crecimiento de otros grupos. Por ejemplo, el cristal violeta en concentraciones específicas no permite el crecimiento de bacterias Gram positivo sin afectar el crecimiento de bacterias Gram negativo. Ejemplo de medios selectivos: Agar MacConkey, Agar Shigella-Salmonella.

Medios diferenciales:

La adición de ciertos reactivos o sustancias químicas, conlleva como resultado determinado tipo de crecimiento bacteriano o de cambios, lo cual permite diferenciar distintos tipos de bacterias. Por ejemplo, si se siembra una mezcla de bacterias en un agar sangre de carnero, algunas bacterias pueden hemolizar (destruir) los glóbulos rojos, mientras que otras no lo hacen. Cuando aparece una zona clara alrededor de la colonia de la bacteria es indicativo que ocurre la hemólisis. Así es posible distinguir entre bacterias hemolíticas y no hemolíticas. El medio agar sangre de carnero sirve simultáneamente como medio de enriquecimiento y diferencial.

Procedimiento para la técnica de siembra por estrías o rayado:

Preparar la mesa de trabajo, desinfectando la superficie con alcohol.

Etiquetar o rotular el fondo de la caja de Petri de los diferentes agares con: nombre, fecha y bacteria sembrada.

Rayar o estriar la caja, cerca del mechero, tomando una asada del cultivo mixto y siguiendo cualquiera de los esquemas que se proporcionan en el diagrama adjunto.

Incubar las cajas en posición invertida a 37°C por 24-48 horas. En esta posición la humedad de la tapadera de la caja no cae en el medio de cultivo.

Siguiendo los pasos anteriores, cada estudiante debe sembrar o rayar los siguientes agares: nutritivo, sangre de carnero, XLD y MacConkey.

X. GLOSARIO

1. Agalla: Hinchamiento o crecimiento excesivo que aparece en la planta por acción de la infección de un patógeno.
2. Agente causal: Todo aquel organismo capaz de causar daño a las plantas y productos vegetales.
3. Aislar: Separar un elemento o un cuerpo de una combinación o del medio en que se halla, generalmente para identificarlo o analizarlo.
4. Amarillamiento: Pérdida del color verde normal de las plantas.
5. Anaerobio: Dicho de un ser vivo: Que puede vivir sin oxígeno.
6. Anegamiento: Acción de regar en exceso.
7. Bacteria: Microorganismo unicelular sin núcleo diferenciado, algunas de cuyas especies descomponen la materia orgánica, mientras que otras producen enfermedades.
8. Báculovirus: Tipo de virus que atacan a los insectos.
9. Biomasa microbial: masa de origen vegetal.
10. Calidad del suelo: se entiende como la capacidad del suelo para funcionar, dentro de un uso de la tierra y ecosistemas delimitados, para mantener una productividad biológica, calidad ambiental y promover la salud de plantas, animales y seres humanos. Esta comprende componentes físicos, químicos y biológicos del suelo y sus interacciones (Doran & Parkin, 1994). En general, un suelo de buena calidad provee bienes y beneficios a través de los servicios que proporcionan los ecosistemas los ecosistemas y que el hombre puede recibir por su bienestar (Daily et al., 1997). Estos servicios son muy dependientes de la presencia de fauna y de los procesos biológicos (Lavelle et al., 2006). Un suelo saludable, es aquel que

suple satisfactoriamente los requerimientos de nutrimentos y condiciones físico-ambientales para que las plantas produzcan sanamente sin mucha ayuda de agroquímicos. Mientras que un suelo enfermo o degradado es aquel cuya capacidad de producir fue reducida drásticamente por malas prácticas y requiere de muchos insumos externos para producir lo esperado.

11. Cancro: Lesión necrótica y profunda que se produce en el tallo o ramas de la planta.
12. Clima: es un factor externo relacionado a la contribución de energía radiante (temperatura) y a la energía en movimiento (agua, viento etc.). El clima es considerado un promedio de los eventos del tiempo.
13. Clorosis: Amarillamiento de los tejidos normalmente verdes, debido a la destrucción de la clorofila o a la dificultad para sintetizarla.
14. Contacto: Fungicida que protege solo la parte en la que es aplicada. No se distribuye en la planta.
15. Costras: Pequeñas superficies endurecidas que se forman sobre los tubérculos por acción de algunos hongos.
16. Cultivo: Método de obtención de microorganismos, células o tejidos mediante siembras controladas en medios adecuados.
17. Estolón: Tallo lateral que crece horizontalmente por debajo del suelo y forma los tubérculos.
18. Extracción: Procedimiento para el que se usa una aguja para extraer sangre de una vena; habitualmente, para hacer pruebas de laboratorio.

19. Feromonas: Sustancias químicas producidas por un insecto con el fin de provocar un comportamiento determinado en otro individuo de la misma especie que generalmente es la atracción sexual.
20. Fungicida: Compuesto químico destinado a eliminar hongos.
21. Herbicida: Compuesto químico destinado a eliminar malezas.
22. Hidrolisis: Desdoblamiento de una molécula por la acción del agua.
23. Hospedante alterno: Es una planta que puede ser infectada por un patógeno para sobrevivir pero que no es necesariamente vital para completar su ciclo de vida.
24. Infección: Establecimiento de un patógeno dentro de una planta hospedante.
25. Infestación: Contaminación de una planta, suelo, herramientas, etc. Con bacterias, hongos, insectos, etc.
26. Inocular: Introducir en un organismo una sustancia que contiene los gérmenes de una enfermedad.
27. Insecticida: Compuesto químico destinado a eliminar insectos.
28. Lactosa: Azúcar que contiene la leche, formado por glucosa y galactosa.
29. Mancha foliar: Lesión limitada a las hojas.
30. Manejo de la plaga: Conjunto de actividades destinadas a disminuir o erradicar una plaga.
31. Monocultivo: Sistema de cultivo en el que la tierra es usada para sembrar una sola especie vegetal.
32. Mosaico: Síntoma que se caracteriza por zonas entremezcladas de coloración verde normal de las hojas con color amarillo o verde claro.
33. Moteado: Áreas irregulares de color verde claro y oscuro.

34. Necrosis: Es la muerte de tejido corporal. Ocurre cuando muy poca sangre fluye al tejido. Esto puede suceder por lesión, radiación o sustancias químicas. La necrosis no se puede revertir.

35. Necrosis: Muerte de células o tejidos vegetales causados por un patógeno.

36. Nematicida: Compuesto químico destinado a eliminar nematodos.

37. Organismos: el factor biótico externo lo constituyen la flora, la fauna y la especie humana, los que constituyen una biofunción en el suelo.

38. Patógeno: Organismo capaz de causar enfermedad en las plantas.

39. Plaga: Toda especie, raza o biotipo vegetal o animal o agente patógeno dañino para las plantas o productos vegetales.

40. Plaguicida: Compuesto químico destinado a eliminar o reducir una plaga.

41. Plantas repelentes: Plantas que producen sustancias químicas que ahuyentan a otros organismos.

42. Plantas: Ser vivo autótrofo y fotosintético, cuyas células poseen pared compuesta principalmente de celulosa y carecen de capacidad locomotora.

43. Procedimiento: Método de ejecutar algunas cosas.

44. Pudrición: Reblandecimiento, decoloración y con frecuencia desintegración de los tejidos de una planta como resultado de una infección producida por bacterias u hongos.

45. Pústulas: Lesión a manera de vesículas.

46. Raíz: Órgano de las plantas que crece en dirección inversa a la del tallo, carece de hojas e, introducido en tierra o en otros cuerpos, absorbe de estos o de aquella las materias necesarias para el crecimiento y desarrollo del vegetal y le sirve de sostén.

47. Resistencia: Capacidad de un organismo para superar, totalmente o hasta cierto grado, el efecto de un patógeno u otro factor perjudicial.

48. Sacarosa: azúcar.

49. Selección negativa: Eliminación de plantas enfermas.

50. Selección positiva: Selección de las mejores plantas.

51. Signo: Patógeno o sus partes o productos que se observan sobre una planta hospedante.

52. Síntoma: Reacciones o alteraciones internas y externas que sufre una planta como resultado de su enfermedad.

53. Sintomatología: Conjunto de los síntomas de una enfermedad.

54. Sistémico: Que se difunde internamente por toda la planta.

55. Suelo: es un cuerpo tetradimencional que almacena energía (espacio, profundidad, ancho y tiempo); tiene un límite superior (atmosfera), lateral con otros cuerpos, inferior con la roca, el cual es desarrollado en el tiempo. Según Lal et al., (1997), el suelo se localiza entre las interfaces atmosfera, hidrosfera, y biosfera. Se basa en tres formas de energía: gravitacional, interna en la roca y la energía solar.

56. Superficie: Límite o término de un cuerpo, que lo separa y distingue de lo que no es él.

57. Susceptibilidad: Incapacidad de una planta para resistir el efecto de un patógeno o factor prejudicial.

58. Tejido: Cada uno de los diversos agregados de células de la misma naturaleza, diferenciadas de un modo determinado, ordenadas regularmente y que desempeñan en conjunto una determinada función.

59. Textura de suelo: es la propiedad física del suelo derivada de la composición granulométrica, constituida por arena, limo y arcilla, cuyos diámetros están contempladas en la escala de la Sociedad Internacional de Ciencias de Suelo.

60. Tierra: es una porción de la corteza terrestre que involucra el suelo, el subsuelo, los organismos y la atmosfera cercana, así como los procesos naturales e inducidos y los resultados de las actividades humanas pasadas y presentes que tienen un efecto en el comportamiento de la misma (FAO, 1985).

61. Tubérculo: Parte de un tallo subterráneo, o de una raíz, que engruesa considerablemente, en cuyas células se acumula una gran cantidad de sustancias de reserva, como en la patata y el boniato.