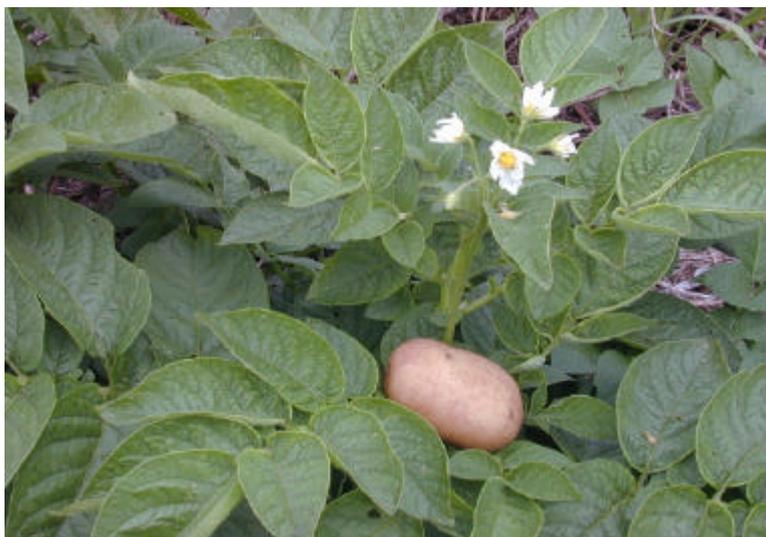




**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PROTECCIÓN AGRICOLA Y
FORESTAL**

TRABAJO DE DIPLOMA

DISTRIBUCCION Y VARIABILIDAD DE *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, AGENTE CAUSAL DE MARCHITEZ BACTERIANA EN EL CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum* L), EN TRES DEPARTAMENTOS DEL NORTE DE NICARAGUA (Estelí, Matagalpa y Jinotega)



AUTOR: Bra. Gabriela Ríos Morales.

ASESORES: Lic. MSc Verónica Guevara T
Ing. MSc Ulises Díaz B

Managua Nicaragua Junio de 2007

DEDICATORIA

A DIOS nuestro señor por darme la gran oportunidad de vivir, estudiar y ver la luz del día hasta hoy.

A mí querida Madre Aura M^a Morales López por su gran apoyo incondicional en el afán de ayudarme a terminar mis estudios.

A mí Padre Antonio Ríos Mayorga por ayudarme siempre que lo he necesitado en mi trayectoria de vida.

A mis queridos hermanos Aleyda Ríos y Julio Ríos por apoyarme en todo momento.

A mí abuelo Manuel Ríos Alvares (q.e.p.d.).

A mis compañeros, Marjorie Padilla, Grethel Olivas, Maria Flores y Luís Enrique Ruiz.

A todas las personas que de una u otra forma me apoyaron en mis años de estudio.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS nuestro señor por darme la oportunidad de llegar a este momento de mi vida.

A la Lic *MSc.* Verónica Guevara T y al Ing. *MSc.* Ulises Díaz Blandón por brindarme su amistad y tiempo de manera incondicional para llevar a cabo con su asesoría mi trabajo de diploma.

A la técnica del laboratorio de Microbiología Candida Espinosa por su gran ayuda y amistad.

A la Universidad Nacional Agraria como *Alma mater* y a los docentes que con sus conocimientos y paciencia contribuyen a formar grandes profesionales.

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron al desarrollo de este trabajo de diploma.

CONTENIDO

	Página.
INDICE GENERAL	<i>i</i>
INDICE DE CUADROS	<i>iii</i>
INDICE DE FIGURAS	<i>iv</i>
INDICE DE ANEXOS	<i>v</i>
RESUMEN	<i>vi</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	4
III. REVISIÓN DE LITERATURA	5
3.1 Origen	5
3.2 Taxonomía y Morfología de la planta de papa	5
3.2.1 Taxonomía	5
3.2.2 Morfología	6
3.2.3 Cultivo de papa en Nicaragua	7
3.3 Principales enfermedades causadas por Oomicetos y Hongos	8
3.4 Enfermedades de origen bacteriano	9
3.4.2 Marchitez Bacteriana	10
3.5 Razas	11
3.5.1 Biovares	11
3.6 Epidemiología de <i>Ralstonia solanaceum</i>	11
3.7 Distribución Mundial de <i>Ralstonia solanaceum</i>	13

IV. MATERIALES Y METODOS	14
4.1 Localización del estudio	14
4.2 Fase de Laboratorio	15
4.2.1 Procesamiento de las muestras	17
4.2.2 Aislamiento del patógeno	17
4.2.3 Identificación de la bacteria <i>Ralstonia solanacerum</i>	17
4.2.4 Caracterización Bioquímica de las cepas de <i>Ralstonia solanacerum</i>	18
4.2.5 Conservación de las cepas	20
4.3 Fase de Invernadero	20
V. RESULTADOS Y DISCUSION	21
5.1 Fase de Laboratorio	21
5.2 Caracterización Bioquímica de Biovares y/o Razas	22
VI. FASE DE INVERNADERO	25
6.1 Prueba de hipersensibilidad	25
VII. DISTRIBUCIÓN, INCIDENCIA Y VARIABILIDAD DE MARCHITEZ BACTERIANA	25
VIII. CONCLUSIONES	26
IX. RECOMENDACIONES	27
X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	28
XI. ANEXOS	31

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Número de cepas y localidades en los tres departamentos de Nicaragua donde se recolectaron muestras de <i>Ralstonia solanacearum</i> .	16
CUADRO 2. Caracterización de biovares de <i>ralstonia solanacearum</i> (French et al., 1995).	19
Cuadro 3. . Resultados de las pruebas para la identificación de los aislamientos de <i>Ralstonia solanacearum</i> provenientes de las zonas de recolección de muestras.	21
CUADRO 4. Clasificación de biovares y razas de <i>Ralstonia solanacearum</i> según su habilidad para utilizar carbohidratos (azúcares y alcoholes) produciendo ácido.	24

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Departamentos de muestreo	15
Figura 2. Colonias bacterianas de <i>Ralstonia solanacerum</i> (E.F. Smith)	22
Figura 3. Reacción positiva de los disacáridos y las hexosas alcohólicas en el proceso de oxidación de carbohidratos en comparación al testigo en el segundo tipo de aislamiento	23

INDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo de figura 1A. Síntomas ocasionados por el biovar I de <i>Ralstonia solanacerum</i> .	31
Anexo de figura 2A. Síntomas ocasionados por el biovar III de <i>Ralstonia solanacerum</i> .	32
Anexo de figura 3A. . Cultivos de papa con sintomatología ocasionada por <i>Ralstonia solanacerum</i> .	33
Anexo de medios 4A. Medios utilizados en la fase de laboratorio.	34

Resumen

La marchitez bacteriana de la papa causada por *Ralstonia solanacearum* (E. F. Smith) es una de las principales limitantes en la producción de este cultivo. *R. solanacearum* es una especie altamente variable, el estudio de su diversidad poblacional es un importante factor a considerar para su control. Con el objetivo de conocer la distribución y la variabilidad, se realizó un estudio durante el período comprendido de Septiembre de 2006 a Enero de 2007, en diferentes localidades distribuidas en tres departamentos de Nicaragua (Estelí, Matagalpa y Jinotega), donde se recolectaron 18 muestras de tejidos vegetales (tubérculos y tallos) de papa (*Solanum tuberosum* L.) y suelo, las que fueron analizadas en laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Agraria (UNA), para el aislamiento, identificación y multiplicación de la bacteria. Se realizaron siembras en plato petri que contenían medio de cultivo medio agar sacarosa-peptona. Posterior a su aislamiento se realizó purificación en un medio específico (tetrazolium). Las cepas bacterianas se identificaron mediante la determinación de características culturales, morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. En el primer caso, se observaron características de borde, elevación, consistencia y color de las cepas individuales cultivadas en el medio agar sacarosa-peptona. Las características morfológicas se comprobaron a través observación en el microscopio óptico. La confirmación de las características fisiológicas y bioquímicas, se realizó a través de pruebas de KOH al 3%, oxidasa, catalasa y revelación de flagelos. Las colonias bacterianas identificadas como *Ralstonia solanacearum*, se les realizó la prueba de carbohidratos para la caracterización de biovars, basada en la utilización de azúcares y oxidación de alcoholes (Hayward, 1991). Las pruebas de hipersensibilidad se realizaron en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Estas fueron inoculadas mediante la infiltración de la suspensión bacteriana de 24 hrs de crecimiento. Como resultado de la prueba, se identificaron dieciséis aislamientos pertenecientes al biovar 3 y dos aislamientos pertenecientes al biovar 1. Siendo el biovar 3 el más prevalente en los sitios de muestro. La raza fue identificada en base a sintomatología presentada, resultando ser la raza 1.

I. INTRODUCCIÓN.

La papa (*Solanum tuberosum L*) es el cuarto cultivo sembrado, en más de cien países siendo el alimento básico de los países desarrollados (Europa y Estados Unidos), quienes consumen 75 kg percapita anuales. En Nicaragua la FAO reporta un consumo percapita de 8 kg anuales, en Nicaragua se cultivan entre 800 - 1200 ha, donde se obtiene una producción de 35 - 40 por ciento de la demanda nacional. La importancia de la papa radica en que sus tubérculos son parte de la dieta de millones de personas a nivel mundial, contiene 80% de agua y la materia seca constituida por carbohidratos, proteínas, celulosa, minerales, vitaminas A y C proporcionan una dieta balanceada, además son utilizadas en la industria para la producción de almidón, comidas rápidas, papas a la francesa, chips, hojuelas y puré (INTA 2004).

Actualmente la papa ha conquistado los lugares más remotos del planeta si bien es cierto que no en todas partes se le somete a intensa explotación y cultivo, por lo menos ya es aceptada en Asia, África, Oceanía y otros lugares (Centro de Estudios Agropecuarios 2002).

Los factores que limitan la producción de papa en Nicaragua son la escasez de semilla, los altos costos pero sobre todo la baja calidad de los tubérculos. La alternativa del uso de semilla sexual de papa en lugar de la propagación convencional por tubérculo-semilla, permite reducir los costos y disminuir los problemas relacionados con las enfermedades transmitidas por propagación (INTA, 2004).

El cultivo de la papa es afectado por diferentes plagas y enfermedades a partir de la siembra hasta la cosecha y posterior a la cosecha, siendo la marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* una de las enfermedades bacterianas más importantes en el cultivo de papa en las zonas cálidas. Su distribución está registrada desde el sur de EEUU hasta Argentina, los síntomas en las plantas afectadas por *Ralstonia solanacearum* (E.F. Smith), son similares a aquellos causados por falta de agua, nutrientes o de algún otro tipo de marchitez. Los síntomas de esta enfermedad comienzan con la caída de las hojas basales seguidos por la marchitez total de la planta. Cuando se hace un corte longitudinal en el tallo de la planta afectada se puede observar un exudado gris gelatinoso, con una decoloración vascular que va desde un color amarillo a café claro que posteriormente se oscurece y se ahueca a medida que aumenta la enfermedad. Esta bacteria se conserva en el suelo, utilizando las heridas naturales de las raíces, bien las producidas en transplante, a los de alimentación de nematodos para invadir a la planta. La propagación de esta bacteria es posible a través de aguas de riego, podas, trasplantes (Programa de Investigación y Proyección Social en papa, 1987).

En el tubérculo, los síntomas se manifiestan por la presencia de un mucílago bacteriano de color grisáceo, que exuda de los ojos o del extremo de inserción del estolón y del anillo vascular de los tubérculos cortados, sin embargo no todos los tubérculos de la planta infectada muestran síntomas, algunas variantes no producen el color marrón en el anillo vascular. La infección más grave proviene de la semilla enferma la cual termina infectando el suelo no infectado además el agua que fluye por los surcos y el contacto entre raíces, también transmite la bacteria (Centro Internacional de la papa, 1985).

El uso de semilla sana, desinfección de herramientas, implementos agrícolas, calzados el empleo de variedades resistentes, la utilización de injertos con resistencia a esta patología, desinfección de suelos y evitando la siembra de papa-semilla en terrenos donde recién se haya sembrado papa, ni en lotes cercanos descartados por la presencia de la enfermedad contribuye a reducir las poblaciones de *Ralstonia solanacearum* (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2004).

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general.

Conocer la distribución y variabilidad de *Ralstonia solanacearum* (E. F. Smith), agente causal de la marchitez bacteriana en el cultivo de papa en la zona norte de Nicaragua (Estelí, Matagalpa y Jinotega).

2.2 Objetivos específicos.

- 1- Identificar cepas de *Ralstonia solanacearum* (E. F. Smith), en tubérculo y tallos de papa.
- 2- - Caracterizar bioquímicamente las cepas de *Ralstonia solanacearum* (E. F. Smith para determinar biovares
- 3- Identificar razas de *Ralstonia solanacearum* (E. F. Smith), presentes en las zonas de muestreo.
- 4- Determinar variabilidad y distribución de biovares de *Ralstonia solanacearum* (E. F. Smith) presente en las regiones productoras de papa en Nicaragua.

III. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

3.1 Origen

La papa (*Solanum tuberosum*), es una planta originaria de América, por lo que es posible encontrarla a través de gran parte del territorio donde la mayoría de los campesinos han tenido algún contacto con ella. Aunque la historia de la papa puede trazarse en el centro de origen del lago Titicaca (Bolivia – Perú) y en el norte del Perú diez siglos atrás. La adaptabilidad de la papa a diversas condiciones de temperatura fotoperiodismo, suelos entre otros y de producir desde los 80 o 90 días en adelante, han hecho que se haya estudiado, en especial fuera de América y que hoy aparezca junto al trigo y maíz con muchos antecedentes bibliográficos (Montaldo, 1984).

La papa ha conquistado los lugares más remotos del planeta y si bien es cierto que no en todas partes del mundo se le somete a intensa explotación y cultivo, por lo menos ya es aceptada en Asia, África, Oceanía y otros lugares (Centro de Estudios Agropecuarios, 2002).

3.2 La siguiente descripción taxonómica y morfológica de la planta de papa esta basada en Montaldo (1984).

3.2.1 Taxonomía

Familia: Solanácea

Especie: *Solanum tuberosum* L

3.2.2 Morfología

La papa es una planta suculenta, herbácea y anual por su parte aérea y perenne por sus tubérculos (tallos subterráneos) que se desarrollan al final de los estolones que nacen del tallo principal, y a veces de varios tallos, según el número de yemas que hayan brotado del tubérculo.

Los tallos son de sección angular y en las axilas de las hojas con los tallos se forman ramificaciones secundarias.

Las hojas son alternas las primeras hojas tienen aspecto simple vienen después de las hojas compuestas imparipinnadas con tres pares de hojuelas laterales y una hojuela terminal entre las hojuelas laterales hay hojuelas en segundo orden.

Las flores son hermafroditas, tetracíclicas, pentámeras; el cáliz es gemocépalo lobulado; la corola de color blanco a púrpura con cinco estambres anteras de color amarillo más fuerte o anaranjado que por supuesto producen polen.

Las raíces se desarrollan principalmente en el verticilo en los nudos del tallo principal su crecimiento es primero vertical dentro de la capa de suelo arable, luego horizontal de 25 a 50 cm, la planta de papa posee un sistema radicular fibroso y muy ramificado.

El tubérculo es un sistema morfológico ramificado, los ojos de los tubérculos tienen una disposición rotada alterna desde el extremo proximal del tubérculo donde va inserto el estolón hasta el extremo distal, donde los ojos son más abundantes.

3.2.3 Cultivo de papa en Nicaragua

En los años ochenta hubo un crecimiento y expansión del área cultivada de papa en la región I, en la zona de Mira flor Estelí, y el valle de Jalapa que permitió la creación del programa nacional de papa en 1986. El área cultivada 1986 paso de 35 a 750 hectáreas y la producción de 341 a 11,300 toneladas métricas solo en la región 1, según datos del programa nacional de papa.

Para el año 1990 el cultivo se extendió a casi todas las zonas de la región 1 y sexta región del país y se iniciaba en algunas zonas de carazo. En el periodo del 90 al 96 se cultivaron 1,000 hectáreas según los indicadores del instituto nacional de tecnología agropecuaria, cuya producción fue de 13,286 toneladas métricas de papa, de las cuales se comercializaron el 70% aproximadamente, pero en 1998 el área de producción se redujo a un poco más de 450 hectáreas para una producción estimada de 5,100 toneladas. En 1999 las zonas productoras de papa que registra el INTA se localizan en la parte norte y noroeste del país; el 60% se encuentra en Jinotega; el 25% Matagalpa y el 15% en Estelí. Sin embargo el sistema de información geográfico del MAGFOR indica que las mejores zonas para el cultivo son Jinotega 51,102 hectáreas, el Jicaro y Jalapa con 13,278 hectáreas y Estelí con 4,355 hectáreas (MAGFOR, 1999).

3.3 Principales enfermedades causadas por Oomicetos y hongos

Una de las enfermedades mas graves que afectan al cultivo de papa es el tizón tardío (*Phytophthora infestans*). Inicia con la aparición de manchas acuosas circulares e irregulares en el follaje que en pocos días se vuelven necróticas de color castaño cuando están secas o negras cuando están húmedas, bajo condiciones de mucha humedad, las manchas se extienden rápidamente y forman zonas pardas con bordes irregulares en el borde de la lesión y en el envés de la hoja se forma una zona blanquecina constituida por hifas. La temperatura entre 10 y 25 grados acompañada de lluvia favorecen el desarrollo de la enfermedad. Las esporas que la lluvia lava de las hojas y de los tallos infectados penetran el suelo infectan los tubérculos causándoles una decoloración pardusca superficial (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria, 2004).

Otra de las enfermedades importantes es el tizón temprano (*Alternaria solani*), la cual esta ampliamente difundida y es una de las enfermedades foliares mas importante en el cultivo de papa en zonas con condiciones climáticas favorables tales como la alta humedad relativa y temperaturas entre 18 y 25°C. Por lo general la enfermedad aparece en forma de manchas foliares irregulares constituidas por anillos concéntricos, las manchas tienen un color que varia de marrón a negro y pueden ser pequeñas profundas y con bordes bien definidos (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria, 2004).

En las hojas y en menor grado en los tallos, se forman manchas necróticas, marcadas internamente por serie de anillos concéntricos, apareciendo cerca de la floración y aumentando a medida que madura la planta, las lesiones se forman primero en las hojas

inferiores y causan un amarillamiento generalizado caída de hojas o muerte precoz (Agrios, 1999).

En los tubérculos, las lesiones son oscuras hundidas, de forma circular e irregular rodeadas a menudo por brotes levantados de color púrpura, el tejido en estado avanzado de deterioro es usualmente blanco, húmedo y de color castaño, los tubérculos con lesiones por tizón temprano están propensos a ser invadidos por organismos secundarios como sucede con otras pudriciones (Agrios, 1999)

3.4 Enfermedades de origen bacteriano

La Pierna negra causada por *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* y *Erwinia carotovora* var. *carotovora*, aunque recientemente *E chrysathemi* ha sido aislada de plantas de papa con síntomas de pierna negra. En Nicaragua no se han reportado trabajos sobre las pérdidas ocasionadas por estas bacterias en los cultivos de papa. La pierna negra puede aparecer en cualquier estado de desarrollo de la planta durante la cosecha y el almacenamiento, la bacteria puede penetrar al interior del tubérculo a través de las lenticelas, la punta del estolón de la planta madre infectada, las heridas producidas al momento de la cosecha, constituyendo un problema durante el almacenamiento (pudrición blanda). La bacteria sobrevive en los tallos, tubérculos infectado y en el suelo por poco tiempo, los tallos de las plantas infectadas presentan una pudrición negra alquitranosa la cual inicia desde tubérculo-semilla infectada extendiéndose hacia el tallo, el tejido vascular se ennegrece y presenta un olor fétido y de consistencia viscosa, comúnmente las plantas infectadas presentan enanismo, hábito de crecimiento erecto, follaje clorótico y posteriormente las hojas se marchitan y eventualmente la planta muere (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria, 2004).

3.4.2 Marchitez bacteriana

Esta enfermedad es causada por *Ralstonia solanacearum*, que es un bacilo Gram negativo, cuyo tamaño aproximado es de 0,5 X 1,5 μm por lo que no se puede observar a simple vista, presenta un único flagelo polar que le da movilidad, aerobica estricta, la temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 28 y 30°C, es una bacteria de crecimiento rápido (Agrios, 1997).

Las colonias presentan una gran variabilidad morfológica. Kelman (1954) menciona que en cuanto a morfología pueden ser observadas dos tipos de colonias: un tipo en donde la colonia es fluida (mucoide) debido a su abundante producción de polisacárido extracelular, lisa, irregular y redonda; mientras que el otro tipo de colonia es una mutante de apariencia seca, redonda, translúcida, rugosa y no fluida; en un medio que contenga tetrazolium, las colonias normales virulentas son lisas, fluidas, irregulares, blancas o levemente rosadas en el centro de la colonia, las colonias avirulentas se diferencian por que no son fluidas y presentan el centro blanco y el borde rosado.

3.5 RAZAS

Ralstonia solanacearum se ha dividido en cinco razas basándose en el rango de hospederos del patógeno. La raza 1 afecta una gran variedad de plantas incluyendo la papa, tomate, tabaco, banano, maní, particularmente solanáceas, los síntomas ocasionados por la raza 1 son clorosis marchitamiento típico es común en climas calidos y en regiones bajas. La raza 2 esta limitada a musáceas causando marchitez bacteriana a banano triploide (enfermedad del moko) y heliconias y el síntoma es una reacción hipersensitiva. La raza 3 afecta papa y tomate particularmente en ambientes fríos, pero no es altamente virulenta en

otros cultivos de solanáceas el síntoma ocasionado por esta raza es solamente clorosis a diferencia de la raza 1 es mas común en altitudes o en latitudes mayores (Goszczyńska *et al.*, 2000).

Quinon *et al.* (1964), posteriormente Yu *et al.*, (2003) fueron los primeros en mostrar especificidad de hospedero para ciertos aislamientos pudiendo justificar la separación de las cepas y clasificaron la raza 4 que afecta jengibre y la raza 5 que afecta mora.

3.5.1 BIOVARES

Basándose en pruebas bioquímicas y fisiológicas (utilización de ciertos alcoholes y disacáridos), Hayward (1991) ha dividido la especie en cinco biovares: Biovar I (razas I y II), Biovar 2 (raza III), Biovar 3 (raza I), Biovar 4 (raza I) y Biovar 5 (raza I).

3.6 Epidemiología

Ralstonia solanacearum es la bacteria fitopatógena, después de *Agrobacterium tumefaciens*, que puede afectar a un mayor número de especies vegetales. Se ha citado sobre más de 200 especies distintas, de alrededor de 50 familias Castaño *et al.*, (1994).

La familia más susceptible, referida a número de especies afectadas es la *Solanaceae* entre los huéspedes de mayor importancia económica podemos destacar la papa, tomate, pimiento, berenjena, algodón, tabaco, banano, cacahuate etc. La raza III (biovar 2), que afecta a las solanáceas, es la que provoca mayor preocupación en Europa. Muchas malas hierbas son también hospederas de la bacteria, e influyen de forma importante en el mantenimiento del inoculo en zonas infectadas. Entre ellas cabe destacar la *Solanum dulcamara*, especie muy común en los márgenes fluviales. Otras malas hierbas muy

comunes como *Solanum nigrum*, *Urtica dioica*, *Brassica spp*, *Portulaca oleracea* también han sido citadas como hospederas eventuales, la bacteria puede sobrevivir en el suelo durante varios años y puede servir de inóculo para infectar plantas sensibles (Hayward *et al.*, 1964)

La principal forma de supervivencia de la bacteria es a través de tubérculos y residuos de cultivos contaminados, que actúan como fuente de inóculo de la enfermedad. Las malezas también actúan de igual manera al ser hospederas de la bacteria *Ralstonia solanacearum*, un ejemplo de esta interacción enfermedad - maleza es *S. dulcamara* que facilita la supervivencia de la bacteria en épocas frías (Surrey. U.K. *et al.*, 1994).

Esto dificulta los trabajos de erradicación, ya que constituyen una fuente continua de inóculo que puede infectar cultivos sensibles. En los focos europeos en los que se ha detectado la bacteria en aguas superficiales, siempre se ha asociado a la presencia de *Solanum dulcamara*. Por último cabe destacar la adaptación de *Ralstonia solanacearum* al agua, ya que es capaz de sobrevivir en el agua durante largos periodos de tiempo, lo que constituye un riesgo de diseminación a larga distancia. En el almacenamiento previo a la siembra puede existir un contagio de la bacteria por contacto, sobre todo si se producen exudados exteriores que contienen millones de bacterias (Hayward *et al.*, 1994)

La utilización de tubérculos infectados para la siembra es también una de las principales formas de transmisión de la enfermedad. Una vez sembrada la semilla de papa la enfermedad puede ser transmitida por insectos y nemátodos, las prácticas culturales y

cualquier otra actividad como un traspase de tierra contaminada supone un riesgo de introducción de la enfermedad en otras zonas, la facilidad de supervivencia de la bacteria en el agua, y su conservación en plantas como *Solanum dulcamara*, que crece en cauces fluviales y canales, hace que el riego sea una de las principales vías de transmisión. Una vez que la bacteria coloniza un cauce fluvial, puede utilizar éste como vehículo de transporte a largas distancias. En Inglaterra se ha detectado la bacteria hasta 100 km aguas abajo de un foco de infección (Hooker, 1980)

3.7 Distribución mundial de *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum, causante de la enfermedad conocida como marchitez bacteriana se encuentra afectando, a la mayoría de países productores de papa, incluyendo el centro y sur de África, siendo una gran limitante para la producción en Uganda, Etiopía, Kenia, Madagascar, Ruanda, Burundi, Nigeria y Camerún.

Aunque no es una enfermedad tan grave en Egipto, la infección latente de los tubérculos ha provocado la disminución de las exportaciones de papa hacia Europa. En el sur de Asia, la marchitez afecta a los cultivos ubicados a altitudes moderadas los Himalayas, Pakistán, Nepal y Bután; también a altitudes moderadas y planicies de la India, donde está siendo eficazmente controlada.

En Indonesia, Filipinas, Vietnam del Sur, Laos, Japón y sur de China, ubicados en el oriente y sudeste de Asia, la marchitez constituye una enfermedad severa.

A comienzos de los años noventa, la marchitez se convirtió en una grave amenaza para la producción de papa en los países europeos, incluyendo a Bélgica, Inglaterra, Francia, Países Bajos, España, Italia y Portugal se ha encontrado también en Rusia, en América

Latina, se ha reportado la existencia de esta enfermedad en todos los países productores de papa con excepción de Ecuador. Su presencia en Australia y en el sudeste de los Estados Unidos ha estimulado las investigaciones, sobre la enfermedad en estos países.

Se reporta presencia de *Ralstonia solanaceum* en Suecia y a grandes altitudes en Costa Rica, Colombia, Perú de tal manera que existen posibilidades potencialmente para la supervivencia de la bacteria e infección de cultivos de papa a temperaturas relativamente bajas (Centro de Estudios Agropecuarios, 1999).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 LOCALIZACION DEL ESTUDIO

El presente estudio fue realizado en dos fases de laboratorio e invernadero localizados en la Universidad Nacional Agraria (UNA), Km12 ½ Carretera Norte, geográficamente a 12° 08' latitud Norte y 86°10' longitud oeste con una altitud de 56 msnm en el departamento de Managua, durante el período comprendido de Septiembre 2006 a Enero de 2007.

4.2 FASE DE LABORATORIO

Se realizó en los laboratorios de Microbiología la que consistió en, realizar aislamientos de la bacteria en estudio, la que se obtuvo a partir de tubérculos y tallos de papa con síntomas de marchitamiento bacteriano. Las muestras fueron colectadas en 18 sitios de fincas de productores de papa, ubicadas en ocho localidades pertenecientes a los Departamentos de Estelí, Jinotega y Matagalpa (Figura 1) (Cuadro1).



Figura 1. Departamentos de muestreo

Cuadro 1. Número de cepas y localidades en los tres departamentos de Nicaragua donde se recolectaron muestras de *Ralstonia solanacearum*.

Cepas		Hospedante	Localidades	Departamento
No	Muestras			
1	T1	Papa	El Sesteo	Estelí
2	T2	Papa	El Sesteo	Estelí
3	T3	Papa	La Tejera	Estelí
4	T4	Papa	La Tejera	Estelí
5	T5	Papa	La laguna	Estelí
6	T6	Papa	La laguna	Estelí
7	T7	Papa	La laguna	Estelí
8	T8	Papa	La laguna	Estelí
9	T9	tomate	La joya	Estelí
10	P1	Papa	Palcila	Matagalpa
11	P2	Papa	Palcila	Matagalpa
12	P3	papa	Palcila	Matagalpa
13	A1	Papa	Aranjuez	Matagalpa
14	A2	Papa	Aranjuez	Matagalpa
15	S c	papa	Aranjuez	Matagalpa
16	M1	papa	Mojón	Jinotega
17	M2	Papa	Mojón	Jinotega
18	L1	papa	Cerro de Agua	Jinotega

*T=Tisey P=Palcila A=Aranjuez M= Mojón Sc= Sta Cecilia L= Las Lomas

4.2.1 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Las muestras de plantas, provenientes de fincas de productores, que presentaron los síntomas típicos de marchitamiento, se cortaron en fragmentos pequeños de 1cm aproximadamente, teniendo la precaución de tomar fragmentos con síntomas iniciales, y sanos.

Para luego ser lavados con agua del grifo y posteriormente, desinfectados con hipoclorito de sodio al 5 %, por tres minutos, y lavados nuevamente con agua destilada estéril, secados con papel toalla, trasladándose a plato petri con medio agar nutriente (AN), dejándose incubar por 24 horas.

4.2.2 Aislamiento del patógeno

La bacteria fue inicialmente aislada en el medio agar sacarosa-peptona (ASP), la identidad de los aislamientos fue comprobada en el medio cloruro de tetrazolium (TZC) de Kelman (1954). Se aislaron y purificaron 18 cepas de las 8 localidades en los 3 departamentos.

4.2.3 Identificación de la bacteria

A las colonias típicas de *Ralstonia solanacearum* crecidas en el medio tetrazolium, para su posterior identificación se les realizaron pruebas, basadas en características culturales, morfológicas y fisiológicas; utilizando la metodología de Klement (1990).

Prueba de KOH

La prueba consistió en colocar tres gotas de KOH al 3% sobre un porta objeto limpio y con un asa de platino debidamente flameada se tomó una colonia de la bacteria, la cual se

mezcló debidamente con el reactivo, para obtener resultado positivo (si forma un hilo mucoso) o negativo (no forma el hilo).

Prueba oxidasa

La prueba consistió en colocar sobre un porta objeto un trozo de papel filtro humedecido con una solución del reactivo (Tetramethyl p-phenylene diamine dihydrochloride), considerándose positiva la prueba si las cobnias toman el color del reactivo en 10 segundos.

Prueba de catalasa

Sobre un porta objeto se colocó con ayuda del asa, parte del cultivo bacteriano agregándose una gota de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada), la efervescencia causada por la liberación del oxígeno libre en forma de gas, indicará la presencia de catalasa del cultivo en estudio.

Tinción de flagelos

Sobre un porta objeto fue colocada la suspensión bacteriana, la que se fijó químicamente con formol, se dejó secar y se agregó ácido tánico (mordiente engruesa los flagelos) y del colorante rosa anilina (tiñe), hasta cubrir la suspensión.

4.2.4 Caracterización bioquímica de las cepas de *R. solanacearum* (E.F. Smith)

A las colonias bacterianas identificadas como *Ralstonia solanacearun*, se les realizó la prueba de carbohidratos para la caracterización de los biovares, basada en la utilización de tres disacáridos (lactosa, maltosa y celobiosa) y la oxidación de tres hexosas alcohólicas

(dulcitol, manitol y sorbitol) (French et al., 1995. Cuadro 2). Utilizando un medio base 1g $\text{NH}_4 \text{H}_2 \text{PO}_4$ (fosfato mono ácido de amonio), 0.2g kcl (cloruro de potasio), 0.2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de magnesio) 1g peptona, 0.03g azul de bromotimol, 3g de agar ,1000 ml agua destilada y se ajusta el pH a 7.1, en cada tubo de ensayo se colocó 4.5ml del medio base y se esterilizó en auto clave a 121 °C por 15 minutos la solución acuosa al 10% de carbohidratos (maltosa, lactosa, celobiosa, manitol, dulcitol y sorbitol).

A cada tubo con medio base se le agregó 0.5 ml de la solución de carbohidratos siguiendo los procedimientos de Lelliott y Stead (1987). Se procedió a inocular seis tubos con la cepa de *R solanacerum*, se inocularon tubos que contenían solamente el medio base, para ser utilizado como testigo, realizándose las observaciones 1, 3, 7, 12, 18, días después de la inoculación.

Cuadro 2 - Caracterización de biovares de *Ralstonia solanacearum* (French et al., 1995).

Fuentes de carbono	Biovares				
Oxidación de los alcoholes	1	2	3	4	5
Manitol	-	+	+	+	+
Sorbitol	-	+	+	+	-
Dulcitol	-	+	+	+	-
Oxidación de los azucares					
Lactosa	-	-	+	+	+
Maltosa	-	-	+	+	+
Celobiosa	-	-	+	+	+

4.2.5 Conservación de las cepas

Las diferentes cepas fueron conservadas en tubos de ensayo con agua destilada estéril, para evitar que mutaran a formas avirulentas (French *et al.*, 1995) para luego realizar pruebas posteriores en la fase de invernadero.

4.3 Fase de invernadero

El experimento se estableció en el invernadero de la Universidad Nacional Agraria (UNA), ubicada en el Km. 12 ½ carretera norte Managua, Nicaragua, con el objetivo de probar la capacidad de las cepas para inducir reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) variedad Habano Sol 7-5-1. A partir de cultivos puros se preparó una suspensión en agua destilada estéril, utilizando colonias con un tiempo de 24 horas de incubación en agar nutritivo.

Se utilizaron plantas de tabaco de seis semanas de germinadas las cuales se trasplantaron a macetas con capacidad de 2 kg las maceteras fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al cinco por ciento y enjuagadas con agua, agregándoseles suelo estéril. Una semana después de transplantadas se inocularon mediante la infiltración de la suspensión bacteriana, inyectando con jeringas hipodérmicas de 1ml en las nervaduras localizadas en el envés de la hoja, permitiendo la infiltración y distribución de la suspensión bacteriana en el parénquima. Se inocularon dos hojas por planta y dos plantas por cada cepa, la reacción fue evaluada a las 12 horas después de la inoculación.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 FASE DE LABORATORIO

De las muestras recolectadas, se obtuvieron cultivos bacterianos los que fueron purificados en un medio específico (tetrazolium) y después fueron identificadas a través de características culturales, morfológicas y pruebas fisiológicas, resultando como la bacteria identificada *Ralstonia solanacearum* (Cuadro 3).

Cuadro 3 -Resultados de las pruebas para la identificación de los aislamientos de *Ralstonia solanacearum* provenientes de las zonas de recolección de muestras.

Pruebas características de identificación		
Características culturales	Superficie	Lisa
	Elevación	Convexa
	Color	Blanco cremosa
	Borde	Irregular
Características morfológicas	Forma	Bacilar
	Presencia del hilo KOH 3 %	+
	Presencia de flagelo	polar
Características fisiológicas	Desarrollo de colonias en TZC (Kelman)	+
	Color de las colonias	Crema centro rosado
	Oxidasa	+
	Catalasa	+

Las colonias de *Ralstonia solanacearum*, crecidas en el medio tetrazolium, se caracterizaron por presentar coloración blanco-cremosa con el centro rosado (Figura 2), bordes irregulares, haciéndose visibles a partir de las 48 horas, de incubación completándose su desarrollo máximo a las 72 horas.

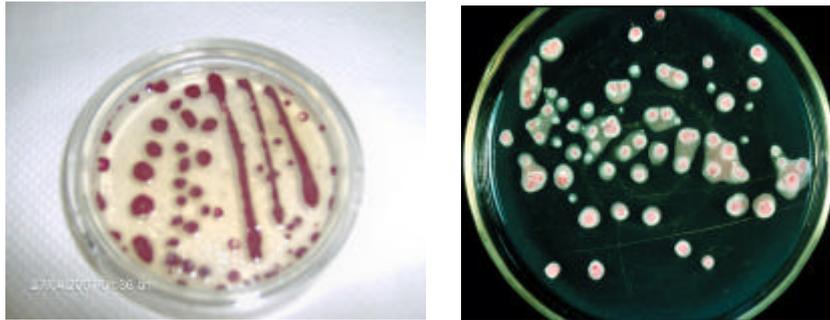


Figura 2. Colonias características de *Ralstonia solanacearum* (E.F. Smith) en medio tetrazolium.

Las células de *R. solanacearum* observadas a través del microscopio presentaron forma bastonada, con un penacho de flagelos en sus extremos, no forma esporas, ni cápsulas. En la tinción de Gram resultó ser Gram-negativa, las observaciones de estas características morfológicas de colonias y de células permitió identificar a la bacteria *Ralstonia solanacearum* E.F Smith, Hayward (1964), Kelman (1953,1954).

5.2 Caracterización de biovares y razas

En el Cuadro 4 se presenta la clasificación de las colonias aisladas, la que estuvo basada en la capacidad para oxidar tres disacáridos (lactosa, maltosa y celobiosa) y la oxidación de tres hexosas alcohólicas (dulcitol, manitol y sorbitol). Se observó diferencia en cuanto a la utilización de los mismos. Un primer tipo de aislamiento (muestras 1y 2), se caracterizó por no utilizar como fuentes de carbono los azúcares lactosa, maltosa y celobiosa y no oxidar los alcoholes sorbitol, manitol y dulcitol; al no reaccionar con los alcoholes y los azúcares la

prueba de dicho aislamiento resulta ser negativa quedando demostrado así que el aislamiento pertenece al biovar I de la Raza I.

El segundo tipo de aislamiento bacteriano, (muestras 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18) se caracterizó por utilizar, como fuente de carbono los azúcares lactosa, maltosa, celobiosa y también oxidó los alcoholes sorbitol, manitol y dulcitol, al reaccionar con los alcoholes y los azúcares, la prueba de dicho aislamiento es positiva quedando demostrado que este segundo grupo de aislamientos pertenece al biovar III de la Raza I

(Figura 3) (Cuadro 4). Coincidiendo los resultados obtenidos en la caracterización de biovars con presentados por los autores Buddenhagen y Kelman (1964).



Figura 3. Reacción positiva de los disacáridos y las hexosas alcohólicas en el proceso de oxidación de carbohidratos en comparación al testigo en el segundo tipo de aislamiento.

Cuadro 4 -Clasificación de biovares y razas de *Ralstonia solanacearum* según su habilidad para utilizar carbohidratos (azúcares y alcoholes) produciendo ácido.

Nº de cepas*	Cultivo	M	C	L	MN	S	D	Biovar	Raza
1	papa	-	-	-	-	-	-	I	I
2	papa	-	-	-	-	-	-	I	I
3	papa	+	+	+	+	+	+	III	I
4	papa	+	+	+	+	+	+	III	I
5	Papa	+	+	+	+	+	+	III	I
6	Papa	+	+	+	+	+	+	III	I
7	papa	+	+	+	+	+	+	III	I
8	papa	+	+	+	+	+	+	III	I
9	tomate	+	+	+	+	+	+	III	I
10	papa	+	+	+	+	+	+	III	I
11	papa	+	+	+	+	+	+	III	I
12	papa	+	+	+	+	+	+	III	I
13	papa	+	+	+	+	+	+	III	I
14	papa	+	+	+	+	+	+	III	I
15	papa	+	+	+	+	+	+	III	I
16	papa	+	+	+	+	+	+	III	I
17	papa	+	+	+	+	+	+	III	I
18	papa	+	+	+	+	+	+	III	I

* Los números de Cepas corresponden a los sitios de muestreo.
M-Maltosa. C-celobiosa. L-Lactosa. MN-Manitol. S-Sorbitol. D-Dulcitol
- : Reacción negativa +: Reacción positiva

VI FASE DE INVERNADERO

6.1 Prueba de hipersensibilidad

Las plantas de tabaco inoculadas con el biovar I presentaron una reacción de hipersensibilidad (RH), mostrando clorosis seguida de marchitamiento después de las 24 horas de la inoculación (Anexo 1A). Las plantas de tabaco inoculadas con el biovar III, se caracterizaron por presentar clorosis a los dos días después de la inoculación y marchitamiento después de 7 días (Anexo 2A). Para confirmar si el marchitamiento fue causado por *Ralstonia solanacearum*, se realizaron aislamientos de las plantas de tabaco inoculadas. Resultando positivo el crecimiento de colonias de *Ralstonia solanacearum* en el medio TZC (Kelman) que es un medio específico para dicho patógeno.

VII-Distribución y variabilidad de marchitez bacteriana

Los resultados obtenidos en la recolección de muestras en los dieciocho (18) sitios de muestreo distribuidos en ocho localidades en tres departamentos (Estelí, Matagalpa y Jinotega) productores de papa, se encontró presencia de la enfermedad en las ocho localidades. En los sitios de muestreo en el departamento de Estelí, se comprobó la presencia de dos biovares de la Raza I el biovar I y biovar III, no encontrándose esta variación en las otras localidades de muestreo de los departamentos de Matagalpa y Jinotega respectivamente. Resultando solamente el biovar III. Los altos niveles de incidencia basados en el criterio de observación de plantas infectadas en las localidades mencionadas, coinciden con las lluvias las que sirven en la diseminación y principalmente por el uso de semillas con baja calidad provenientes de campos infestados, esto provoca que la enfermedad no se desarrolle en focos o en forma sectorizada (Hooker, 1980), sino que se presente generalizada en los campos.

VIII CONCLUSIONES

- Se encontró presente *Ralstonia solanacearum* (E.F. Smith), en tubérculo y tallos de papa.
- Bioquímicamente se caracterizaron las cepas identificadas como *Ralstonia solanacerum* a través de la prueba de oxidación de carbohidratos, la que determinó que los biovars presentes en las zonas de Estelí, son el biovar I y el biovar III.
- En los departamentos de Matagalpa y Jinotega el biovar identificado fue el biovar III.
- En los sitios de estudio las cepas de *Ralstonia solanacerum* pertenecen a la raza I identificada a través de los síntomas presentados en plantas hospederas.
- El biovar III de *ralstonia solanacerum* raza I se encuentra distribuido en los tres departamentos (Estelí, Matagalpa y Jinotega) de muestreo.

IX RECOMENDACIONES

- Se deben realizar estudios sobre el manejo de esta enfermedad (marchitez bacteriana) puesto que causa pérdidas que aun no han sido calculadas en los cultivos papa y tomate.
- Utilizar técnicas serológicas y moleculares para una identificación mas precisa y rápida de las diferentes variantes de *Ralstonia solanacerum*.
- En futuras investigaciones, incluir un mayor número de localidades y sitios de muestreo.
- Realizar estudios de variabilidad comparativa incluyendo un mayor número de hospedantes (cultivos y malezas) y de referencia internacional.

XX BIBLIOGRAFÍA

- **AGRIOS, G. 1999.** Fitopatología. Editorial Limusa. México.

- AGRIOS, G. N. 1997** Plant pathology 4. ed. Academic press, San Diego, CA, USA
635P.

- BUDDENHAGEN, I. W Y A. KELMAN. 1964.** Biological and physiological aspect of
bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* Annual review of phytopathology 2:
203-230

- CASTAÑO, Z. J. L. DEL RÍO 1994** Guía para el diagnostico de enfermedades en los
cultivos de importancia económica. 3 ed Zamorano Honduras C.A.

- . CIP; 1999** (Centro Internacional de la papa) Compendio de Enfermedades

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

- CIP; 1985** (Centro Internacional de la papa) Principales Enfermedades nematodos
insectos y ácaros de la papa.

- FRENCH, E. R 1994.** Control integrado de marchites bacteriana dela papa. Circular del Centro Internacional de la papa (CIP).

- FRENCH, E.B., GUTARRA, L, ALEY, P., AND ELPHINSTONE, J. 1995.** Culture media for *Ralstonia solanacearum* isolation, identification and maintenance. Fitopatologia 30: 126-130.

- GOSZCZYNSKA, T. SEFRONTEIN, J. J. SEFRONTEIN 2000** Introduction to practical phytobacteriology.

- **HAYWARD, 1991** Tropical variant of Biovar 2 of *Ralstonia solanacerum* phytopathology.

- HAYWARD, A. C. 1964** Characteristic of *Ralstonia solanacearum* journal of Appliedbactrerriologic 27:265-277.

- HOOKER, W.J. 1980** Compendio de enfermedades de la papa. Centro Internacional de la papa (CIP). Lima, Peru.

- INTA; 2004** (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria.) Manejo Integrado de Plagas del Cultivo dela papa.

- **KELMAN, A. 1953.** The bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith North Carolina Agricultural Experiment Station Technical bulletin 99.194p.

- **KELMAN, A. 1954.** The relationship of pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium.
- **Z. KLEMENT 1990.** Methods in Phytobacteriology Akadémiai Kiado, Budapest.
- **LELLIOTT Y STEAD 1987.** Métodos para el Diagnostico de Enfermedades Bacterianas en plantas. Vol. 2
- **MONTALDO. A. 1984.** Cultivo y Mejoramiento de la papa.
- **MINISTERIO AGROPECUARIO FORESTAL (MAGFOR), 1999** Agricultura y desarrollo
- **PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN Y PROYECCIÓN SOCIAL EN PAPA 1987.**
El cultivo de papa con énfasis en producción de semilla. 962p
- **QUINON, V. L. ARAGAKI, M, ISNII M. 1964** Patogenicity and serological relations of tree strains of *Ralstonia solanacearum* in Hawaii
- **SURREY. U.K. HAYWARD AC. HARTMAN GL (1994)** Bacterial Wilt. The disease and it's causative agent. *Pseudomonas solanacearum*. Ed CAB international Guilford
- **YU, Q. ALVARES .2003** molecular diversity of *Ralstonia solanacearum* phytopathology .isolated from ginger in Hawaii phytopathology.

XI. ANEXOS

Figura 1A. Síntomas ocasionados por el biovar I de *Ralstonia solanaceum*.



Figura 2A. Síntomas ocasionados por el biovar III de *Ralstonia solanaceum*.



Figura 3A. Cultivos de papa con sintomatología ocasionada por *Ralstonia Solanacerum*.



4a. MEDIOS UTILIZADOS EN LA FASE DE LABORATORIO

❖ **AGAR NUTRITIVO** este medio esta constituido típicamente por:

Peptona

Extracto de carne

Agar agar

Este medio viene preparado y solo se agregan 20gr a 1000ml de agua destilada, se ajusta el ph 7.5 y luego se autoclava a 121?c

❖ **MEDIO TETRAZOLIUM** (clorotrimetilo tetrazolium ps) consta de tres partes:

Parte I

Bactopectona, 10gr

Hidrolizado de caseína 1gr

Agar 17gr

Água destilada 700 ml

Parte II

Glucosa 6gr

Água destilada 200 ml

Parte III

TZC 1gr

Água destilada 100 ml

NOTA: se esterilizan las tres partes por separado una vez esterilizado se mezclan cuando el médio tiene aproximadamente una temperatura de 60 ?C

MÉDIO DE SPA para *Pseudomona solanacearum*.

Sacarosa	20.0 g
Peptona	5.0 g
K ₂ H PO ₄	0.5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.25 g
Oxido de Agar N° 3	12.0 g
Água destilada	1 litro