

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
ESCUELA DE SANIDAD VEGETAL
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

TRABAJO DE DIPLOMA

Estudio de tres métodos para el diagnóstico de
Pseudomonas solanacearum E. Smith en suelos
cultivados con papa (*Solanum tuberosum* L.) en la I y VI
regiones de Nicaragua.

Autor: Zaida del Carmen Zuniga Moreno
Asesor: Ing. Marlon Dolmuz V.

Managua, Junio de 1990.

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
ESCUELA DE SANIDAD VEGETAL
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

TRABAJO DE DIPLOMA

Estudio de tres métodos para el diagnóstico de *Pseudomonas solanacearum* E. Smith en suelos cultivados con papa (*Solanum tuberosum* L.) en la I y VI regiones de Nicaragua.

Por: Zaida del Carmen Zuniga Moreno

Presentado a la consideración del honorable tribunal examinador
como requisito final para optar el grado profesional de
INGENIERO AGRONOMO.

Dirección de Investigación y Post-grado.

Managua, Junio de 1990.

DEDICATORIA.

A la memoria de los héroes y mártires que ofrendaron sus vidas por la consolidación de la Revolución Popular Sandinista.

A mis padres, Rosa Moreno y Alberto Zuniga que hicieron posible mi formación profesional, con especial cariño a mis hermanos Carlos, Rodolfo y Javier.

A mi esposo Alberto Sediles, por el apoyo y consejos que siempre me ha brindado.

Zaida Zuniga M.

AGRADECIMIENTO.

Deseo expresar mi agradecimiento a mi asesor Ing. Marlon Dolmuz, y agradecer muy especialmente al Dr. Falfuni Guharay por su constante y valiosa ayuda brindada durante la realización de este trabajo.

A la Escuela de Sanidad Vegetal, al Proyecto Holandes ISCA-LUW y al Programa Ciencia de las Plantas ISCA-SLU por su apoyo material en la culminación exitosa de este trabajo y durante mi formación como profesional.

Al colectivo de Microbiología de la Escuela de Sanidad Vegetal especialmente a la Lic. Jazmina Vargas y Doña Candida Rosa Espinoza, por las facilidades y apoyo que posibilitaron el desarrollo de mi trabajo.

Al personal del MIDINRA de las regiones I y VI en especial a los compañeros Angel Lanuza y Carlos Gonzalez, técnicos, y a los productores de papa que nos permitieron desarrollar el trabajo en sus campos.

A todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron conmigo en la realización de este trabajo.

Zeida Zuniga M.

INDICE GENERAL.

Contenido	Página
I INTRODUCCION	1
II OBJETIVOS	5
III MATERIALES Y METODOS	6
Primer método: Historial de campo	6
Segundo método: In Vitro	6
Tercer método: Bioensayo	8
IV RESULTADOS Y DISCUSION	10
Evaluación en base al historial de campo y pruebas In Vitro	10
Evaluación en base al historial de campo y bioensayo	14
V CONCLUSIONES	19
VI RECOMENDACIONES	21
VII BIBLIOGRAFIA	22
VII ANEXOS	24

INDICE DE CUADROS.

Cuadro Nº		Página
1	Descripción del grado de infección por <i>Ps. solanacearum</i> en 10 suelos de la I región y 10 suelos de la VI región colectados en época seca en base al método del historial de campo.....	11
2	Comparación del grado de infestación por <i>Ps. solanacearum</i> de 10 suelos de la I región y 10 suelos de la VI región colectados en <u>época seca</u> en base al método In Vitro y al historial de campo.....	13
3	Comparación del grado de infestación por <i>Ps. solanacearum</i> de 10 suelos de la I región y 10 suelos de la VI región colectados en <u>época lluviosa</u> en base al método In Vitro y al historial de campo.....	14
4	Comparación del grado de infestación por <i>Ps. solanacearum</i> de 10 suelos de la I y 10 suelos de la VI región colectados en <u>época lluviosa</u> en base al método In Vitro y al historial de campo tres meses despues de la recolección.....	15
5	Porcentaje de incidencia y severidad de la enfermedad Marchitez bacteriana en plantas de tomate, tabaco y berengena sembradas en 10 suelos de la I región colectados en época lluviosa (método de bioensayo).....	17
6	Porcentaje de incidencia y severidad de la enfermedad Marchitez bacteriana en plantas de tomate, tabaco y berengena sembradas en 10 suelos de la VI región colectados en época lluviosa (método de bioensayo).....	17

RESUMEN.

Para evaluar la eficiencia del método historial de campo el diagnóstico del grado de infección de suelos por *Pseudomonas solanacearum* se recolectaron 20 muestras de suelo en las regiones I y VI en Nicaragua. De cada región en base al historial de campo se colectaron tres hasta cuatro muestras de suelos con grados alto, medio y cero grado de infección por *Ps. solanacearum* respectivamente. La recolección de las muestras de suelos se realizaron en los meses de Mayo y en Octubre de 1989 efectuándose una recolección en época seca (Mayo) y otra época lluviosa (Octubre) sobre los mismos suelos. A los suelos colectados en época seca se les realizó conteo de colonias de *Ps. solanacearum* por método In Vitro y con los colectados en época lluviosa además del conteo In Vitro se realizaron bioensayos con plantas de tomate, tabaco y berengena.

Los resultados del análisis In Vitro sobre las muestras de suelos en platos Petri indicaron que todas las muestras de suelos colectados presentaron algún número de colonias de *Ps. solanacearum* por lo cual no existió ningún suelo libre de infestación según el historial de campo, 19 de los 20 suelos colectados en época lluviosa posibilitaron el desarrollo de síntomas de la enfermedad, resultando las plantas de berengena las mas susceptibles en menor tiempo por el método del bioensayo. En suelos colectados en época seca el número de colonias fue mayor en relación al número de colonias encontradas en época lluviosa en los mismos suelos.

Aunque no fue posible encontrar una correlación efectiva entre el diagnóstico del grado de infestación del suelo por el método del historial de campo y los otros dos métodos de estudio, se observó algún grado de asociación entre el diagnóstico por el historial y conteo In Vitro para el caso de los suelos de la primera región cuando se trató de suelos catalogados como alto y medio grados de infestación, según el método historial de campo unicamente.

I. INTRODUCCION.

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los alimentos más importantes de Europa y de América, siendo cultivada extensamente en los últimos 100 años; el objetivo principal de cultivar la papa radica en su gran valor alimenticio, también sirve para la preparación de productos industriales, tales como harina, almidón y bebidas alcohólicas (Parson, 1983).

El área de cultivo de papa en el mundo es de alrededor de 22 millones de hectáreas con una producción promedio de 13.3 toneladas por hectárea (MIDINRA, 1985). La papa es un cultivo de ciclo corto y muy tecnificado que requiere medidas agrotécnicas y fitosanitarias muy estrictas para que alcance buenos rendimientos (Caceres, 1984)

La papa pertenece a la familia Solanaceae, se cultivo puede ser posible bajo diversas condiciones pero dentro de un clima predominante fresco o frío, con adecuada disponibilidad de agua en el suelo y sin exceso de humedad ambiental (Messiaen, 1979). En Centro America se realizan dos siembra al año la 1ª y la mayor producción de papa corresponde a la época lluviosa. En Nicaragua existen cuatro época de siembra (MIDINRA, 1985): Mayo-Junio ó siembra en primera, Septiembre-Octubre ó siembra de postrera, Noviembre-Diciembre ó siembra de apante y Enero-Febrero ó siembra de riego.

La marchitez bacteriana inducida por *Pseudomonas solanacearum* E. Smith, es una enfermedad que afecta a gran número de plantas cultivadas y silvestres en las que incluyen la papa y otras solanaceas de importancia económica (Buddenhagen y Kelman, 1964), por la amplitud de la

gama de hospedantes de esta bacteria fitopatógena y por su distribución cada vez mayor en diferentes regiones de la mayoría de países Latinoamericanos, la marchitez bacteriana es considerada como la enfermedad más importante y más difícil de combatir en el cultivo de papa y es también la más seria limitación para la expansión del cultivo a nuevas zonas de producción tales como las clima húmedos y cálidos de las zonas tórridas (Hidalgo y Rincón, 1984). Buddenhagen, et.al. (1962), basándose en el rango de hospedantes y en la morfología de las colonias en el medio Kelman (TTZC) dividen los aislamientos de *Pseudomonas solanacearum* E. Smith de plantas de América Central y América del sur en tres razas.

Raza I : ataca tabaco, tomate y otras plantas de la familia *Solanaceae*.

Raza II: causa marchitamiento en el plátano y algunas otras especies del género *Musa* y *Heliconia* sp.

Raza III: ataca la papa y tomate, pero es limitadamente patógeno al tabaco.

Buddenhagen (1960) y Sequeira y Averre (1961), diferenciaron las razas I, II y III por la producción del pigmento de melanina en medio de cultivo que contenía tiroxina.

Debido a la importancia y a la agresividad de este patógeno bacteriano y al difícil control de la enfermedad que produce, se hace necesario conocer bien la sintomatología que la caracteriza y dominar los métodos del aislamiento e identificación como premisa importante para luchar contra la misma.

Los síntomas que pueden orientar el muestreo en el campo y que caracterizan la mayoría de las plantas afectadas son la epinastia y el marchitamiento, el atraso en el desarrollo de las plantas y el amarillamiento del follaje, estos síntomas se pueden presentar en cualquier

estadio del crecimiento de las plantas pero el mayor grado de marchitez y colapso ocurre cuando son infestadas las plantas jóvenes de tejidos suculentos.

Los diferentes hospedantes (tomate, tabaco, berengena y papa) presentan además algunos detalles en la sintomatología específica (Stefanova, 1981).

La transmisión de *Ps. solanacearum* ocurre principalmente por el uso de semillas (tubérculos) portadora de la bacteria, lo cual da lugar a una diseminación rápida y a través de distancias considerables, en forma local la bacteria es transportada por el agua y en el suelo, se adhiere a los implementos y a los pies del hombre (French, et.al, 1972).

Se considera que *Ps. solanacearum* sobrevive muchos años en el suelo (Kelman, 1953; Nielson y Haynes, 1960). Otros consideran que suelos libres de papa y malezas durante seis meses es suficiente para hacer desaparecer los síntomas de la enfermedad (Navarro y Zapata, 1984). Actualmente está bastante documentado el hecho de que la sobrevivencia de *Ps. solanacearum* está muy relacionado con la especialización fisiológica y que en ausencia de plantas hospederas la raza I sobrevive más tiempo que la raza II y III y la raza II más tiempo que la III (Granada, 1984).

La literatura recomienda diferentes medidas para el control de la enfermedad como: tratamiento del suelo (pero esto es costoso y fitotóxico), selección de plantas sanas, rotación de cultivos y uso de variedades resistentes (Pazos y Hevesi, 1974).

Torres (1984) considera que la acción con más perspectiva para contrarrestar el ataque de la enfermedad es el uso de variedades resistentes, Schmiediche (1984) menciona que no existe ningún control químico de la enfermedad y las únicas medidas físicas que se pueden tomar

para controlar el patógeno son medidas de rotación de cultivos y almacenamiento de semillas. A nivel natural los llamados suelos supresivos para este patógeno facilitan la producción de papa y limitan el desarrollo de enfermedad aún cuando el inóculo este presente (Robbs, 1984).

En Nicaragua la producción de papa tanto para semilla como para consumo se concentra en las regiones I y VI, siendo la marchitez bacteriana un problema de importancia económica, dado el uso de variedades de papa susceptible a la enfermedad.

Actualmente en Nicaragua la principal forma de lucha contra esta enfermedad, es el uso de rotación de cultivo con cultivos no susceptibles al ataque de *Fs. solanacearum* o bien dejar reposar los suelos antes cultivados con papa por periodo no menores de un año dado que es conocido que la bacteria puede sobrevivir largo tiempo en el suelo. Así que basado en lo que se conoce como el historial de campo se decide la utilización de áreas determinadas para el cultivo de la papa en cada ciclo agrícola.

Dado que este método de decisión no ha sido correlacionado con exigentes métodos de laboratorio respecto a su exactitud para diagnosticar si un suelo está o no libre de inóculo se hace necesario evaluar su real utilidad, así como también evaluar otras alternativas que podrían darnos mejores pautas para la cuantificación del inóculo presente en el suelo.

II. OBJETIVOS.

- a) Relacionar el método de diagnóstico por historial de campo con los métodos In Vitro y bioensayos.
- b) Determinar la validez del método del historial de campo en el diagnóstico de suelos con variados grados de infestación por *Pseudomonas solanacearum*.
- c) Determinar otras alternativas que ayuden a la oportuna detección de *Pseudomonas solanacearum*.

III. MATERIALES Y METODOS.

El estudio fué realizado durante el período de Mayo 89-Febrero 90 para lo cual fueron seleccionadas las regiones I y VI por considerarse las principales productoras de papa. En la región I se seleccionó la localidad de Mirafior y en la región VI las localidades de Yasika sur, Cipre, Parcila, Los Robles y Jinotega. La prueba In Vitro se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Escuela de Sanidad Vegetal de la U.N.A., la prueba de bioensayo se realizó en el invernadero de la Escuela de Sanidad Vegetal que se encuentra ubicado en el km. 12 1/2 Carretera Norte.

Primer método : Historial de campo.

De cada región se seleccionaron 10 lotes en base a su historial de campo como sigue:

- Tres muestras de suelos libres de infestación .
- Tres muestras de suelo con un grado medio de infestación .
- Cuatro muestras de suelos con un grado alto de infestación .

Para la recolección de cada una de las muestras, se extrajeron 10 submuestras de tierra al azar en cada lote seleccionado, tomándose además información agronómica complementaria (anexo 1).

El suelo fué recolectado en dos período en la primera semana del mes de Mayo (época seca) y el otro período fué en Octubre cuando existía una saturación de agua en el suelo (época lluviosa) en los mismos lotes muestreados inicialmente.

Segundo Método: In Vitro.

Posteriormente en el laboratorio de Microbiología de la Escuela de Sanidad Vegetal, se realizó el análisis In Vitro del número de colonias por cada 10 gramos de suelo procediéndose a pesar 10 gr. de suelos de cada una de las muestras, un día antes de realizar el análisis se determinó el porcentaje de humedad sometiendo 10 gr. de suelo a 80 °C. por 8 horas y luego se volvió a pesar este para poder determinar su porcentaje de humedad por diferencia de pesos.

Se tomaron 10 gr. de suelo fresco por muestra, luego este se mezcló con 90 ml. de agua destilada estéril y después de mezclarlo se dejó en reposo durante 15 min., posteriormente se realizó una dilución en serie hasta obtener dilución de 10^{-8} para todas las muestras, el medio de cultivo empleado para el aislamiento fue TTZC (Tripheniltetrazoliumchloride) que es un medio específico para esta bacteria y el medio SPA que es un medio general que hace que la bacteria tenga un crecimiento rápido y fue utilizado para la conservación de las cepas para su posterior identificación.

Ya vertidas las placas con el medio TTZC se procedió a la siembra y con uso de micropipeta se depositó 0.1 ml de las suspensiones en cada placa, con tres repeticiones, después con una espátula de Drisgalski se procedió al estriado.

Dos días después se realizó el conteo de colonias que presentaban forma irregular y bordes enteros, blancos lechosos y con un centro rosado, se procedió a aislar a estas bacterias procediéndose a identificar cada una de ellas, para esto se utilizó cultivo joven de 48 hr. y se realizó la prueba de inmunodifusión con antisuero específico de *Pseudomonas solanacearum* (Lelliott y Stead, 1987) en placa petri con agar el cual se le hicieron cuatro

orificios, uno en el centro en el cual iba una gota de antisuero y otros tres orificios alrededor, en dos de ellos se colocó una dilución del cultivo a identificar y en el otro una gota de agua destilada esteril como testigo, a los tres días se observaron los resultados.

El número de colonias de *Pseudomonas solanacearum* evaluados por placa se sumo a las otras dos repeticiones y se sacó un promedio para luego esta cantidad se multiplica por la dilución correspondiente (cuadro 2). Este método In Vitro se realizó con dos repeticiones en cada época de recolección del suelo (época seca y época lluviosa).

También se realizó sin repetición, cuando se estableció el bioensayo con suelo recolectado en época lluviosa.

Tercer método: Bioensayo.

Finalmente se realizaron varios bioensayos usando como plantas indicadoras tomate, variedad U.C - 82, tabaco, variedad Samsun y berengena.

Para efecto de realizar los bioensayos, los suelos colectados en el campo en época lluviosa fueron colocados en bandejas y fueron humedecidos por 8 días, después se les trasplantaron 20 plantitas de tomate de cuatro semana de edad que habían estado creciendo sobre suelo esteril, a las plantas al momento del trasplante se les hirieron las raíces secundarias para facilitar el ingreso del patógeno, procediéndose de igual forma con el tabaco, el tomate y la berengena.

Para efecto de determinar el grado de incidencia de la enfermedad sobre las plantas utilizadas se preparo la siguiente escala:

- 0 - sana
- 1 - Decoloración y flacidez leve de las hojas.
- 2 - Hojas con flacidez intermedia.
- 3 - Plantas flácidas.
- 4 - Plantas totalmente flácidas.
- 5 - Plantas muertas.

Para cuantificar la severidad se utilizó la siguiente fórmula:

$$S = \frac{\sum (\text{Nº de plantas en cada escala} \times \text{Valor de la escala})}{(\text{Nº total de plantas} \times \text{Valor máximo de la escala})} \times 100$$

Las plantas de tomate, tabaco y berengena fueron dejadas crecer durante los mismos períodos en suelos esteril esto para estar seguro de la ausencia del inóculo en la semilla de estas plantas lo cual fué comprobado.

El banco utilizado para el experimento fué acondicionado para crear un ambiente adecuado para el desarrollo de la bacteria, para esto se cubrió con un plástico transparente y se tomaron datos de temperatura (en grados centígrados) y porcentaje de humedad relativa cada hora resultando un promedio diario de 30 °C y 80 % de humedad.

Con la información obtenida según el historial de campo y con los resultados de las pruebas In Vitro y los bioensayos se hizo un análisis descriptivo para obtener toda la información resultante del estudio.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

Evaluación en base a historial de campo y pruebas In Vitro.

En el cuadro 1 se observa la descripción de los 20 lotes seleccionados en base al historial de campo. En ambas regiones podemos observar la existencia de suelos con alto y medio grado de infección por *Pseudomonas solanacearum* así como libres de la misma. El criterio fundamental que determinó el nivel de infestación en este caso fué el tiempo entre el momento que se hizo la encuesta y la última siembra de papa en el mismo; en la práctica según criterio de los técnicos, para tener un suelo libre de infestación que ha sido cultivado con papa en ciclos anteriores este debe dejarse reposar de papa por lo menos un año y hacer rotación con cultivos no susceptibles, mientras más tiempo repose el suelo y rote con cultivos no susceptibles a *Ps. solanacearum* el grado de infestación será menor. Es conocido que la bacteria puede sobrevivir largos períodos en el suelo (Kelman, 1953; Nielson y Haynes, 1960) lo cual justifica el mayor tiempo de reposo posible como una buena medida de prevenir la enfermedad dado lo difícil de su control en el campo (Schmiediche, 1984).

Aunque en base al historial de campo fué posible evaluar el nivel de infestación del suelo por *Ps. solanacearum* en ambas regiones en estudio, se pudo conocer que para el caso de la VI región no existe información escrita sobre los antecedentes del suelo, basandonos para realizar la evaluación en la experiencia de los productores y técnicos encargados de la atención de dicho cultivo en la zona, no así en la I región donde según criterios aportados por los técnicos existe en el MIDINRA una base de datos

sobre los antecedentes de los suelos generalmente cultivados con papa (Carlos Gonzales (Técnico Región VI) y Angel Lanuza (Técnico Región I), Comunicación personal).

Cuadro 1. Descripción del grado de infección por *Ps. solanacearum* en 10 suelos de la I región y 10 suelos de la VI región colectados en época seca en base al método del historial de campo.

Nº de muestra	Región	Lote	Grado de infestación por <i>Ps. solanacearum</i> .
1	I	Mirafior-Esteli	Alta
2	I	Mirafior-Esteli	Alta
3	I	Mirafior-Esteli	Alta
4	I	Mirafior-Esteli	Medio
5	I	Mirafior-Esteli	Medio
6	I	Mirafior-Esteli	Medio
7	I	Mirafior-Esteli	Libre
8	I	Mirafior-Esteli	Libre
9	I	Mirafior-Esteli	Libre
10	I	Mirafior-Esteli	Libre
1	VI	Yasica Sur- Matagalpa	Alta
2	VI	Parcila-Matagalpa	Alta
3	VI	Cipre-Jinotega	Alta
4	VI	Parcila-Matagalpa	Media
5	VI	Parcila-Matagalpa	Media
6	VI	Los Robles-Jinotega	Media
7	VI	Los Robles-Jinotega	Media
8	VI	Los Robles-Jinotega	Libre
9	VI	Cipre-Jinotega	Libre
10	VI	Jinotega-Jinotega	Libre

En el cuadro 2 puede observarse el número de colonias de *Ps. solanacearum* en 10 gramos de suelos en cada uno de los veinte suelos estudiados en la época seca. Como pudo constatarse no existió ningún suelo realmente libre de infestación por *Ps. solanacearum* según el análisis In Vitro, pudiéndose determinar que en el caso de la región I los mayores números de colonias en 10 gramos de suelo correspondieron a los suelos con

alto grado de infección (según el historial de campo) y los menores valores en número de colonias para los suelos catalogados medio y libre de infección, no observándose para estos ningún tipo de relación.

Para los suelos correspondientes a la VI región no se pudo establecer ninguna asociación entre el número de colonias y el grado de infección del suelo según el historial de campo, observándose que suelos que se determinaron como alto, medio y libre infección presentaron variados números de colonias en 10 gramos de suelo. El hecho que existiera algún grado de asociación entre el número de colonias (método *In vitro*) y el diagnóstico en base al historial de campo solo en la I región parece indicar que esto corresponde a los registros del historial de campo que sobre estos suelos existe en la I región, los cuales no existen para los suelos de la VI región.

En el cuadro 3 puede observarse el número de colonias de *Ps. solanacearum* en 10 gramos de suelo en los veinte lotes en estudio colectados en época lluviosa (Octubre, 1989).

Puede observarse que para los suelos de la I región existió siempre algún grado de asociación entre el número de colonias obtenido por el método *In Vitro* y la severidad de *Pseudomonas solanacearum* determinada en base al historial de campo, solamente para suelos catalogados con alta incidencia. Para el caso de la VI región esta asociación continuó sin ser evidente.

Para determinar el número de colonias en 10 gramos de suelo, en todos los suelos colectados en la época lluviosa fué necesario realizar diluciones en el orden de 10^3 , 10^4 y 10^5 en contraste con las diluciones realizadas en los suelos colectados en los mismos lotes de estudios en época seca,

Cuadro 2. Comparación del grado de infestación por *Ps. solanacearum* de 10 suelos de la I región y 10 suelos de la VI región colectados en época seca en base al método In Vitro y al historial de campo.

Nº de muestra	Región	Nº de colonias de <i>Ps. solanacearum</i> /10 gr. de suelo.	% de humedad de la muestra	Infección por Historial de campo
1	I	16×10^7	20	Alta
2	I	17×10^7	25	Alta
3	I	15×10^7	20	Alta
4	I	5×10^6	15	Media
5	I	7×10^6	10	Media
6	I	10×10^7	14	Media
7	I	8×10^7	20	Libre
8	I	8×10^7	18	Libre
9	I	6×10^7	20	Libre
10	I	4×10^7	10	Libre
1	VI	10×10^7	14	Alta
2	VI	7×10^7	10	Alta
3	VI	15×10^7	15	Alta
4	VI	15×10^7	20	Media
5	VI	12×10^7	25	Media
6	VI	8×10^7	5	Media
7	VI	14×10^7	12	Media
8	VI	5×10^7	14	Libre
9	VI	14×10^7	9	Libre
10	VI	17×10^7	10	Libre

dilución que fué del orden de 10^6 y 10^7 , lo cual nos indica que en suelo con alto grado de humedad disminuye el número de colonias, no pudiéndose precisar que tipo de relación existe en el tiempo.

Cuadro 3. Comparación del grado de infestación por *Ps. solanacearum* de 10 suelos de la I región y 10 suelos de la VI región colectados en época lluviosa en base al método In Vitro y al historial de campo.

Nº de muestra	Región	Nº de colonias de <i>Ps. solanacearum</i> /10 gr. de suelo.	% de humedad de la muestra	Infección por Historial de campo
1	I	15x10 ⁴	35	Alta
2	I	16x10 ⁵	30	Alta
3	I	17x10 ⁴	30	Alta
4	I	8x10 ⁶	25	Media
5	I	8x10 ³	25	Media
6	I	9x10 ⁴	30	Media
7	I	5x10 ³	35	Libre
8	I	10x10 ⁴	30	Libre
9	I	8x10 ⁵	28	Libre
10	I	5x10 ⁴	25	Libre
1	VI	7x10 ³	30	Alta
2	VI	12x10 ⁴	28	Alta
3	VI	10x10 ⁴	30	Alta
4	VI	10x10 ⁴	25	Media
5	VI	13x10 ³	30	Media
6	VI	7x10 ⁵	24	Media
7	VI	9x10 ⁴	35	Media
8	VI	10x10 ⁴	25	Libre
9	VI	12x10 ⁴	35	Libre
10	VI	15x10 ⁵	25	Libre

Evaluación en base al historial de campo y bioensayo.

Para efecto de realizar los bioensayos, se utilizaron los 20 suelos colectados en época lluviosa; se realizó de nuevo un conteo de colonias en 10 gramos de suelo para cada caso debido a que entre la fecha de colección de dichos suelos y la fecha de establecimiento del bioensayo medió un tiempo de tres meses, tiempo durante el cual los suelos estuvieron en reposo en el

invernadero.

Cuadro 4. Comparación del grado de infestación por *Ps. solanacearum* de 10 suelos de la I y 10 suelos de la VI región colectados en época lluviosa en base al método In Vitro y al historial de campo tres meses después de la recolección.

Nº de muestra	Región	Nº de colonias de <i>Ps. solanacearum</i> /10 gr. de suelo.	% de humedad de la muestra	Infección por Historial de campo
1	I	14x10 ⁷ *	20	Alta
2	I	16x10 ⁷	20	Alta
3	I	17x10 ⁷	18	Alta
4	I	6x10 ⁶	13	Media
5	I	6x10 ⁶	20	Media
6	I	11x10 ⁶	17	Media
7	I	3x10 ⁴	18	Libre
8	I	6x10 ⁷	20	Libre
9	I	7x10 ⁶	20	Libre
10	I	5x10 ⁷	17	Libre
1	VI	8x10 ⁶	20	Alta
2	VI	6x10 ⁷	20	Alta
3	VI	11x10 ⁷	20	Alta
4	VI	12x10 ⁶	18	Media
5	VI	9x10 ⁶	23	Media
6	VI	8x10 ⁶	20	Media
7	VI	12x10 ⁶	20	Media
8	VI	5x10 ⁷	18	Libre
9	VI	9x10 ⁷	27	Libre
10	VI	10x10 ⁷	20	Libre

* Resultados obtenidos de suelos almacenados durante tres meses en invernadero.

En el cuadro 4 se observa el número de colonias /10 gramos de suelo, así como los porcentajes de humedad de los suelos que fueron menores en relación al que tenían estos cuando fueron colectados (cuadro 3), fue necesario realizar el conteo en diluciones de 10⁶ y 10⁷ en la mayoría de

los casos para poder determinar el número de colonias por gramo de suelo no pudiendo ser determinada la causa de este resultado con exactitud, pero podría suponerse efecto de la humedad o bien efecto de la ausencia de suficiente hospedero en el campo al momento de la recolección.

En los cuadros 5 y 6 pueden observarse los resultados de los grados de incidencia y severidad presentados por plantas de tomate, tabaco y berengena que fueron cultivados sobre los mismos suelos colectados en ambas regiones en época lluviosa. Para el caso de la región I, el tomate, el tabaco y la berengena presentaron fuerte incidencia y severidad de la enfermedad a los 14, 14 y 7 días después del trasplante respectivamente (en nueve de las diez muestras de suelo evaluadas), resultando completamente sanas las plantas de la muestra número 7 de la I región.

No se puede precisar con este estudio el por que la muestra en el suelo número 7 de la región I no desarrolló síntomas de la enfermedad en la prueba del bioensayo, pero según el historial de campo este suelo fué considerado libre de inóculo y había sido rotado con pasto en ciclos anteriores pudiéndose suponer que se trata de un suelo con un muy bajo número de colonias por gramo de suelo por no haberse cultivado papa o estamos en presencia de un suelo supresivo al patógeno (Robbs, 1984).

Se observa que la berengena en el más corto tiempo presentó los mayores grados de incidencia y severidad de la enfermedad.

Para los suelos de la VI región, las plantas de tomate, tabaco y berengena presentaron altos valores de incidencia de la enfermedad a los 16, 7 y 7 días después del trasplante en los diez suelos estudiados; nuevamente se observa

que la berengena presentó los mayores grados de incidencia de la enfermedad en el más corto tiempo.

Cuadro 5. Porcentaje de incidencia y severidad de la enfermedad Marchitez bacteriana en plantas de tomate, tabaco y berengena sembradas en 10 suelos de la I región colectados en época lluviosa (método de bioensayo).

Nº de muestra	Tomate (14 DDT)*		Tabaco (14 DDT)		Berengena (7DDT)		Grado de infección historial de campo
	Incidencia	Severidad	Incidencia	Severidad	Incidencia	Severidad	
1	100	82	100	74	100	68.8	Alta
2	100	73	100	76	100	68.8	Alta
3	100	78	100	77	100	71.1	Alta
4	77.7	28.8	100	40	100	44.4	Media
5	77.7	31.1	100	42.2	100	46.6	Media
6	100	68.8	100	60	100	55.5	Media
7	0	0	0	0	0	0	Libre
8	100	48.8	100	48	100	51.1	Libre
9	100	42	100	48	100	40	Libre
10	100	37	90	36	100	35.5	Libre

*DDT= Días despues del trasplante.

Cuadro 6. Porcentaje de incidencia y severidad de la enfermedad Marchitez bacteriana en plantas de tomate, tabaco y berengena sembradas en 10 suelos de la VI región colectados en época lluviosa (método de bioensayo).

Nº de muestra	Tomate (14 DDT)*		Tabaco (14 DDT)		Berengena (7DDT)		Grado de infección historial de campo
	Incidencia	Severidad	Incidencia	Severidad	Incidencia	Severidad	
1	82.3	61.1	100	30	100	37.7	Alta
2	88.2	65.8	70	36	100	64	Alta
3	100	80	100	46	100	77.7	Alta
4	100	74.4	100	42.2	100	78	Media
5	84.2	68.4	100	35.5	100	62.2	Media
6	100	64.4	70	40	100	66	Media
7	100	80	100	44	100	80	Media
8	100	38.8	70	28	100	48	Libre
9	100	81.1	100	28	100	70	Libre
10	100	74.4	100	44	100	80	Libre

*DDT= Días despues del trasplante.

A nivel de observación se constató que existió mayor grado de dificultad

en la expresión de la enfermedad en las plantas de tabaco evaluada en los suelos de la VI región con respecto a los de la I región, lo cual podría deberse a la presencia de diferentes razas de *Ps. solanacearum* en los suelos de las diferentes regiones. Esto se supone porque los síntomas del tabaco en los suelos de la VI región presento diferentes síntomas tales como marchitez de las hojas tomando aspecto de sombrilla teniendo las plantas un menor desarrollo respecto a las plantas de tabaco sembradas en suelos de la I región; la raza III podría encontrarse en la VI región y la raza I en la I región según Buddenhagen (1962) y los datos en el cuadro 5.

Actualmente el método de predicción de la enfermedad por medio del historial de campo no parece ser lo suficientemente efectivo acerca del diagnóstico de si un suelo está libre o no de inóculo, parece que la implementación del método requiere más rigurosidad en el manejo de la información de los antecedentes del suelo, así como también requiere de la inclusión de información relativa al uso de maquinaria, pendiente del suelo, maleza presente en cada ciclo agrícola, entre otros. Un manejo de información rigurosa (registro del historial de campo) combinada con otros métodos de diagnóstico (como los bioensayos) podría brindarnos un diagnóstico más seguro; algo muy importante es que con un poco de capacitación los productores mismos podrían ejecutar ambos métodos de diagnóstico por lo sencillo de los mismos y su poca inversión material.

V. CONCLUSIONES.

En todos los lotes de suelos estudiados se encontró la existencia de determinados número de colonias de bacterias *Ps. solanacearum* cuando se realizó el conteo In Vitro en cada uno de los suelos, por lo cual ningún lote fue considerado libre de bacteria.

En los 19 de los 20 lotes de suelos estudiados se desarrollaron los síntomas de la enfermedad *Pseudomonas solanacearum* cuando sobre estos fueron cultivados plantas de tomate, tabaco y berengena utilizando el método de bioensayo.

La muestra de suelo número 7 correspondientes a I región no permitió el desarrollo de síntomas de la enfermedad causada por *Pseudomonas solanacearum* cuando sobre este fueron sembradas plantas de tomate, tabaco y berengena; esto nos hace suponer que esta bacteria detectada por el método In Vitro pertenece a la raza II según Buddenhagen, et al (1962).

Las plantas de berengena, en todos los suelos que permitieron el desarrollo de la enfermedad causada por *Pseudomonas solanacearum*, desarrollaron síntomas más temprano que las plantas de tomate y tabaco.

Las plantas de tabaco, cuando fueron usadas como plantas indicadoras, fueron las que mostraron mayor dificultad para la expresión de los síntomas de la enfermedad cuando se sembraron sobre suelos de la I región con

respecto a los suelos de la VI región, lo que hace suponer que *Pseudomonas solanacearum* raza I y II están en la I región y la raza III está presente en la VI región.

En los mismos lotes de estudios, se observó un mayor número de colonias de *Pseudomonas solanacearum* cuando los suelos fueron colectados en época seca que cuando fueron colectados en época lluviosa.

Actualmente el método del historial de campo no es lo suficientemente efectivo para diagnosticar si un suelo está completamente libre del inóculo de *Pseudomonas solanacearum*, aunque sí se observó que para el caso de los suelos de la I región existió algún grado de asociación entre los resultados obtenidos en base al historial de campo y los obtenidos por el método In Vitro en el laboratorio lo cual no se observó para los suelos de la VI región, esto es debido a la existencias de registro de datos del historial de campo de la I región.

VI. RECOMENDACIONES.

- a) Establecer un sistema que permita fortalecer la metodología del diagnóstico en base al historial de campo y que considere la información más exacta posible de los antecedentes del suelo y que incluya no solo información de los cultivos y sus relaciones sino también sobre las especies de malezas debido a que estas son hospedantes de la bacteria *Pseudomonas solanacearum*.
- b) Repetir y aplicar los tres métodos de diagnóstico del presente experimento en suelos colectados en época seca y lluviosa y no solo en época lluviosa como en este estudio.
- c) Realizar estudios para determinar cual es el efecto del grado de humedad del suelo sobre la sobrevivencia de *Pseudomonas solanacearum* en época de mayor y menor precipitación (época lluviosa) y al inicio, intermedio y fin de la época seca, así como el efecto de la rotación de cultivos no susceptibles, el efecto del suelo desnudo, y el tiempo.
- d) Utilizar plantas de berengena como plantas indicadoras cuando sea necesario diagnosticar la presencia de *Pseudomonas solanacearum* por el método de bioensayo.

VII. BIBLIOGRAFIA.

- BUDDENHAGEN, I. W. 1960. Strains of *Pseudomonas solanacearum* indigenous hosts in banana plantations of Costa Rica and their relationships to bacterial wilt of bananas *Phytopathology*. 50: 660-661.
- BUDDENHAGEN, I.W, L: SEQUEIRA and A. KELMAN, 1962. Designation of races of *Pseudomonas solanacearum* *phytopatology* 52(8):726.
- BUDDENHAGEN, I and KELMAN, N. A. 1964. Biological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Ann. Rev. Phytopatology* 2:203-230.
- CASERES, E. 1984. Producción de hortalizas. Instituto Interamericano para la agricultura. San José, Costa Rica. 337 p.
- FRENCH, E. R.; H. TORREZ. T.; AMES DE ICDCHEA; L. SALAZAR; C. FRIBOURG; E. N. FERNANDEZ; A. MARTIN; J. FRANCO; M.M. DE SCURRAH; I. A. HERRERA; C. VISE; L. LAZO Y O.A. HIDALGO. 1972. Enfermedades de la papa en Perú. Ministerio de Agricultura Bol. Tech 77. Est. Exp. Agric. La Molina. Lima, Perú. 36 p.
- GRANADA, A. G. 1984. *Pseudomonas solanacearum*: Potencial de inóculo y su determinación. En HIDALGO, D. y RINCON, H. (Eds.). Marchitez bacteriana de la papa (*Ps. solanacearum*) en America Latina. Centro Internacional de la papa. Lima Perú. pp 55-72.
- HIDALGO, A. y H. RINCON (Eds.). 1984. Marchitez bacteriana de la papa (*Ps. solanacearum*) en América Latina. Centro Internacional de la papa. Lima Perú. 120 p.
- KELMAN, A. 1953 The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. N. Carolina Agr. Exp. Sta. tech. Bull. 99. 194 p.
- LELLIOTT, R. A. and D. E. STEAD. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Published on behalf of the British Society for Plant Pathology by Blackwell Scientific publications. 216 pp
- MESSIAEN, C. M. 1979, Las hortalizas. Trad. del Frances por J. E. y M. D. FARRENY. Mexico. 455 p.

- MIDINRA. 1985. Folleto sobre el cultivo de papa Esteli Nicaragua.
- NAVARRO, R. y J. L. ZAPATA. 1984. Algunos trabajos con Ps. solanacearum realizados en Colombia. En HIDALGO, D. y RINCON, H. (Eds.). Marchitez bacteriana de la papa (Ps. solanacearum) en America Latina. Centro Internacional de la papa. Lima Perú. pp 17-20.
- NIELSEN, L.W. and F. S. HAYNES. 1960, Resistance in *Solanum tuberosum* to *Pseudomonas solanacearum*. Am potato J. 37:260-267.
- PARSON, 1983. Papa. Ed. Trillas, Mexico. 54 pp.
- PAZOS, V. y M. HAVESI. 1974. Marchitamiento bacteriano de la papa. Revista C. NIC.5(2):131-142.
- ROBBS, C. 1984. Control integrado de la marchitez bacteriana de la papa. (Trad. del Portugues). En HIDALGO, D. y RINCON, H. (Eds.). Marchitez bacteriana de la papa (Ps. solanacearum) en America Latina. Centro Internacional de la papa. Lima Perú. pp 73-82.
- SEQUEIRA, L. and C.W. AVERRE. 1961 Distribution and pathogenicity of strains of *Pseudomonas solanacearum* from virgin soils in Costa Rica. Plant. Dis. Reprtr. 45:435.
- SCHMIEDICHE, P. 1984. Resistencia genética: Fuente y mejoramiento genético. En HIDALGO, D. y RINCON, H. (Eds.). Marchitez bacteriana de la papa (Ps. solanacearum) en America Latina. Centro Internacional de la papa. Lima Perú. pp. 91-96.
- STEFANOVA, M. 1981. Metodología para la detección, el aislamiento y la identificación de *Pseudomonas solanacearum* SMITH. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. La Habana, Cuba, 18 pp.
- TORRES, E. 1984. Situación actual de las investigaciones sobre la marchitez bacteriana de la papa en Perú. En HIDALGO, D. y RINCON, H. (Eds.). Marchitez bacteriana de la papa (Ps. solanacearum) en America Latina. Centro Internacional de la papa. Lima Perú. pp 21-26.

ANEXO 1.

Resultados en base al historial de campo de 10 lotes de la I Región y 10 lotes de la VI región.

Nº muestra	Región	Localidad	Identificación	Grado de infestación	Variedad de papa	Rotación	
1	I	Miraflores	Felipe López	Alta	Condor	Maiz	
2	I	Miraflores	Eugenio González	Alta	Desireé	Maiz	
3	I	Miraflores	-	Alta	7 var.	Repollo - maiz	
4	I	Miraflores	Eugenio González	Medio	Desireé	Maiz	
5	I	Miraflores	Juan Ubeda	Medio	Desireé	-	
6	I	Miraflores	Tayacan	Medio	Ponder, Condor	Repollo	
7	I	Miraflores	C.M.R.	Libre	-	Pasto	
8	I	Miraflores	Tayacan	Libre	Condor	Maiz	
9	I	Miraflores	El Cebollal	Libre	Desireé	-	
10	I	Miraflores	C.A.S.	Libre	Baraca	Maiz	
1	VI	Yasica Sur	-	Alta	Kennebeck	Pasto	
2	VI	Parcila	-	Alta	Kennebeck	-	
3	VI	Cipre	-	Alta	Kennebeck	Lechuga, frijol	
4	VI	Parcila	-	Media	Kennebeck	Maiz	
5	VI	Parcila	-	Media	Kennebeck	Maiz	
6	VI	Los robles	Finca San Martin	Media	Kennebeck	-	
7	VI	Los robles	-	Media	Kennebeck	-	
8	VI	Los robles	Finca San Martin	Libre	Kennebeck	-	
9	VI	Cipres	-	Libre	Kennebeck	Maiz	
10	VI	Jinotega	-	Libre	Kennebeck	Frijol, maiz	