

# Caracterización e incidencia de *Ralstonia solanacearum* Smith en plantas de *Musa* AAB en el Sector “El Roble”, Sur del Lago de Maracaibo, Venezuela

Characterization and incidence of *Ralstonia solanacearum* Smith in *Musa* AAB plants at Sector “El Roble” South of Maracaibo Lake, Venezuela

Yarira VIVAS<sup>1</sup>, Isabel URDANETA<sup>1</sup>, Sairo RANGEL<sup>1</sup> y José HERNÁNDEZ<sup>2</sup> ✉

Universidad Nacional Experimental Sur de Lago "Jesús María Semprún", municipio Colón, estado Zulia, Venezuela. <sup>1</sup>Laboratorio de Fisiología Vegetal y <sup>2</sup>Laboratorio de Biotecnología.  
E-mail: hernandezj@unesur.edu.ve ✉ Autor para correspondencia

Recibido: 30/06/2008      Fin de primer arbitraje: 16/03/2009      Primera revisión recibida: 10/06/2009  
Fin de segundo arbitraje: 25/08/2009      Segunda revisión recibida: 08/12/2009      Aceptado: 27/12/2009

## RESUMEN

*Ralstonia solanacearum* es el agente causal del marchitamiento sistémico conocido como “Hereque” (HRQ), enfermedad bacteriana que en Venezuela amenaza la producción de plátano Hartón (*Musa* AAB). La investigación se realizó en una finca de 300 hectáreas de la localidad “El Roble”, límite de los municipios Alberto Adriani y Colón entre los estados Mérida y Zulia, Sur del lago de Maracaibo, ubicada en una zona endémica. El objetivo de caracterizar *R. solanacearum* en plátano Hartón *Musa* AAB se hizo con el fin de asociar la incidencia del HRQ con los valores de precipitación entre diciembre 2007 y marzo 2008; para ello, se estableció en la plantación un diseño experimental en bloques (pobos) al azar. Así, de las plantas afectadas (HRQ) se tomó una porción de tejidos enfermos (hoja, cormo y colino), luego, se sembró en medio selectivo Kelman (TTC) y “repicadas” a los medios con alcoholes hexosa y carbohidratos. Adicionalmente, se realizó tinción de Gram, frotis 40 y 100X, así como infiltraciones inoculantes en plántulas sanas, de bacterias cultivadas *in vitro*  $2,5 \times 10^5$  x ml (BC) y extractos de plantas enfermas sin diluir (EPE). La bacteria aislada es Gram negativa, de colonias rojizas en el medio al tetrazolio, desdobló el manitol, sorbitol, maltosa y lactosa; la evidencia señala a *R. solanacearum*, raza 2, biovar 3. Las inoculaciones con BC exhibieron pérdida en la patogenicidad, en tanto las plántulas inoculadas directamente con EPE ocasionaron síntomas clásicos del marchitamiento entre los 10 y 14 días. La incidencia estuvo vinculada con los índices de precipitación, por lo tanto, el HRQ promedió hasta 4,22% de incidencia durante la máxima de las lluvias. Al mismo tiempo, el análisis estadístico demostró que *R. solanacearum* se mantiene como amenaza latente en plantación de Hartón *Musa* AAB.

**Palabras clave:** *Ralstonia solanacearum*, *Musa* AAB, Hereque, caracterización e incidencia.

## ABSTRACT

*Ralstonia solanacearum* is the causing agent of the systemic wilt known as “Hereque” (HRQ), a bacterial disease that threatens the Harton *Musa* AAB production in Venezuela. This research was developed within a 300 h farm at “El Roble”, the limit zone of Municipios Alberto Adriani and Colón, between Mérida and Zulia States, at the South of Maracaibo Lake, in endemic zone. The purpose of the characterization of *R. solanacearum* in Harton plantain *Musa* AAB was to correlate the incidence of HRQ with the values of precipitation from December 2007 to March 2008. Because of that, a randomized experimental blocks design (*pobos*) was established. A portion of ill tissue (leave, corm, and culms) was taken from the affected plants (HRQ). Then it was planted in a Kelman selective medium and replicated in an alcohols and carbohydrates medium. Additionally, a Gram stain was applied, as well as a 40 and 100x smear, and inoculants infiltrations in healthy crops of bacteria cultivated *in vitro*  $2,5 \times 10^5$  x ml (BC) and extracts of ill plants non dissolved (EPE). The bacterium is negative Gram, of reddish colonies in the middle of the tetrazolio, which split in tow mannitol, sorbitol, maltose and lactose. The evidence indicates that it is *R. solanacearum*, breed 2, biovar 3. The inoculations with BC showed a diminishing in the pathogenicity, and plants inoculated directly with EPC showed classic symptoms of wilt between days 10 and 14. The incidence was related to the precipitation rates, so, the HRQ showed an average of up to 4,22% of incidence during the maximum rains. At the same time, the statistic analysis showed that *R. solanacearum* remains latent in Harton *Musa* AAB plantations.

**Key words:** *Ralstonia solanacearum*, *Musa* AAB, Hereque, characterization and incidence.

## INTRODUCCIÓN

Los cultivos de plátano y banano es la actividad frutícola de mayor relevancia a nivel nacional (Nava, 1989) y la quinta del mundo en lo que a cultivos se refiere (FAO, 2006; Frison y Sharrock, 1988). El Sur del lago de Maracaibo es una fértil llanura aluvial que concentra unas 48.000 hectáreas dedicadas al plátano Hartón (MAT, 1997; Delgado *et al.*, 1998; Sáenz y Rivas, 1992). La producción nacional se ve afectada por varias enfermedades, principalmente Sigatoka Negra de origen fúngico (Delgado y Paiva, 2001), adicionalmente las enfermedades bacterianas representan una seria amenaza para el cultivo (Stover, 1972, Trujillo, 1998). El “Hereque” o “Moko” (HRQ) se caracteriza por una marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (Buddenhagen, 1961; Thwaites, 1999), una bacteria gram negativa que ataca unas 200 especies incluyendo los cultivos de solanáceas y malezas (Belalcázar *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2004).

La enfermedad bacteriana ha sido reportada como una de las más antiguas y estudiada por los fitopatólogos (Rorer, 1911), en la actualidad los avances científicos han permitido la secuenciación completa de su genoma (Salanoubat *et al.*, 2002) permitiendo demostrar una versátil variabilidad genética (Poussier *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2003) que le permite sobrevivir a *R. solanacearum* en diversas condiciones (Caruso *et al.*, 2005). La bacteria puede diseminarse por heridas de la planta, aguas de escorrentía, salpicaduras, semillas infectadas, insectos, herramientas de trabajo (Hayward, 1991; Belalcázar *et al.*, 2004; Nava, 1989, Tackatsu, 1986). En Colombia, de donde se presume pasó a Venezuela, la enfermedad ha causado pérdidas totales de al menos unas 4000 hectáreas (CIAT, 2003), para esta enfermedad no se ha reportado un control eficiente y absoluto, aunque el control biológico y con extracto de lixiviados orgánicos en áreas cultivadas (Arenas *et al.*, 2005) ha brindado resultados interesantes en la disminución de la incidencia de HRQ, por otro lado, el uso de diversos materiales tolerantes a la bacteria en musáceas ha representado una opción en zonas con presencia de la enfermedad (De Oliveira *et al.*, 2000).

Para aislar la bacteria *in vitro* se debe recurrir a medios de tetrazolio (Kelman, 1954). Las técnicas de metabolismo con disacáridos y alcoholes hexosa son una excelente estrategia para caracterizar al patógeno con relación al biovar (Hayward, 1964;

French *et al.*, 1995). Hasta ahora, la bacteria ha sido poco estudiada en las plantaciones de plátano de la región del Sur del lago de Maracaibo, a pesar del impacto económico en la actividad más productiva de la cuenca y por ser el patógeno bacteriano “modelo” para explicar los mecanismos biológicos que gobiernan la patogenicidad en las plantas. El presente reporte científico tuvo como objeto: caracterizar la bacteria *in vitro*, y monitorear la incidencia del patógeno en campo, aunado a su posible relación con las épocas lluviosas en la Finca “El Roble”.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Procedencia del material vegetal y diseño experimental

El estudio se realizó en la finca “El Roble” sector “La Cañabrava” con una superficie aproximada de 300 hectáreas de monocultivo de plátano Hartón (*Musa* AAB), cultivado con tradición de 60 años ubicada entre los municipios Alberto Adriani (Mérida) y Colón (Zulia), con altitud de 60 m.s.n.m., al sur del lago de Maracaibo, Venezuela en suelos francos de la serie “Chamita”, zona que presenta un clima de bosque sub-húmedo tropical con un promedio de precipitaciones de 1344 mm/año durante la última década. Las plantas libres de enfermedad se obtuvieron por micropropagación *in vitro*, con crecimiento de explantes a partir de meristemos en el laboratorio GIBAS de Unesur. El seguimiento del foco infeccioso se hizo mensualmente a intervalos asimétricos de 0, 36, 58 y 90 días desde diciembre del 2007 a marzo del 2008. Se realizó un diseño experimental en tres bloques representativos (pobos) de la finca de unos 3000 m<sup>2</sup> c/u. y se tomó como factor los meses (días) y los órganos de la planta (hoja, seudotallo y cormo de la planta madre adulta y el seudotallo del colino).

### Incidencia de la enfermedad

La incidencia (ICD) fue monitoreada desde Diciembre del 2007- a marzo 2008, las evaluaciones se realizaron mensualmente discriminando las plantas de Hartón sanas y contabilizando las que mostraban síntomas evidentes de marchitamiento HRQ (amarillamiento, flacidez de la hoja bandera, anillo en el cormo, secreción al corte), la ICD fue medida en unidades de porcentaje (%) en función del total de plantas ubicadas por pobo de 3000 m<sup>2</sup> y contabilizando por mes las nuevas plantas afectadas HRQ. La incidencia fue analizada en función del

factor tiempo (días) y los bloques (pobos) con las técnicas del análisis de varianza, prueba de separación de medias Tukey y diagrama de cajas.

### **Aislamiento bacteriano de plantas de Hartón *Musa* AAB y caracterización de *R. solanacearum***

En la plantación, por cada bloque (pobo) fueron muestreadas de manera aleatoria 3 plantas con síntomas del HRQ y se tomaron muestras por triplicado de diferentes órganos (hoja, seudotallo, cormo e hijo). Posteriormente a las 6 horas, las muestras se llevaron al laboratorio y almacenadas por separado en la nevera a -20 °C, luego se pesó 1 g de tejido semiafectado, el cual fue esterilizado con alcohol isopropílico 70% por 2 minutos y macerado en agua destilada + Buffer TRIS HCL pH 7,6. Luego, en la campana de flujo laminar con mechero se realizó el sembrado en medio semi-selectivo que contenía 1g cloruro de tetrazolio (TTC) + 18 g. Agar-Agar + 10 g. dextrosa +10 g. peptona + 1 g. Casaminoácidos (1g), cristal violeta diluidos en 1000ml de agua destilada. (French *et al.*, 1995; Kelman, 1954; Denny y Hayward, 2001; Gómez *et al.*, 2006;) con tres repeticiones + el control (planta sana *in vitro*), incubando por 72 horas a  $\pm$  27°C. De manera alternativa, a las colonias positivas para *R. solanacearum* se le realizó la tinción *Gram* siendo posteriormente observada en el microscopio óptico a 40 y 100X.

### **Metabolismo con alcoholes y disácaridos**

Las colonias rojizas con borde crema resultantes en el medio con TTC fueron traspasadas a diferentes medios basales con azul de bromotimol AZB con adición de: maltosa y lactosa (disacáridos); manitol y sorbitol (alcoholes hexosa) por 96 horas a  $\pm$  27 °C (French *et al.*, 1995); con el fin de determinar el biovar se empleó la metodología de Buddenhagen *et al.*, 1962 en relación al viraje de color indicativo del metabolismo ácido de los alcoholes y carbohidratos. Como control negativo de las placas se empleó una cepa activa de *Pseudomonas fluorescens*.

Para disertación de la significación estadística ( $p \leq 0,05$ ) en los diferentes órganos de la planta (hoja, seudotallo, cormo e hijo) se empleó en matriz no paramétrica binaria, por positivo (+ amarillo) o negativo (- turquesa) sustituyendo con 0 y 1 en el programa estadístico SPSS v.15

### **Prueba de patogenicidad**

Una vez realizada la fase de caracterización de las bacterias, se procedió a infiltrar a las plántulas de plátano “Hartón” sanas con concentración del aislado de *R. solanacearum*  $2,5 \times 10^5$  x UFC ml (BC), enriquecidas en medio King por unas 72 horas procedentes de las colonias medio Kelman, al mismo tiempo se inoculó con “extracto reciente” de plantas enfermas (EPE) dilución  $10^{-1}$ , la inyección con aguja hipodérmica se realizó a razón de 0,5 ml. en el pecíolo de la hoja anterior a la “bandera”, e incubando por 5 días para reproducir los síntomas clásicos del marchitamiento en plantas mantenidas en un umbráculo.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Dinámica en el porcentaje de plantas afectadas por “Hereque” bajo las condiciones de cultivo en la finca “El Roble” (diciembre 2007-marzo 2008).**

En los 3 pobos durante las evaluaciones realizadas en campo se observó que la incidencia de plantas afectadas por “Hereque” osciló entre 0 y 7,63% (Cuadro 1), esta proporción de la enfermedad varió poco durante el tiempo en que se tomaron los registros. En promedio, el pobo 1 mostró una mayor cantidad de plantas afectadas, seguido del pobo 2 y el 3. La tendencia fluctuante en el tiempo fue similar en cada pobo si es comparado con los 3 valores promedio. A partir de las mediciones en día 0 (mediados diciembre 2007), momento en que se detectó la mayor cantidad de plantas con síntomas de la enfermedad, el valor descendió progresivamente hasta el día 58 en 1,69% y repuntó nuevamente el día 90 en 3,21% (Figura 1).

Estos resultados indican que el brote del HRQ se mantuvo constante cerca del 4% de incidencia sin sobrepasar el umbral económico, pero sin desaparecer, varios reportes hasta ahora publicados indican que en la rizósfera de las plantas la comunidad biológica influye sobre las interacciones ecológicas que pueden favorecer o en su defecto limitar el desarrollo de bacterias patógenas, este mecanismo ampliamente estudiado (PGPR) promueve en las plantas mecanismos de resistencia sistémica inducida (Kloepper *et al.*, 1993) o provocando antibiosis con otros microorganismos (Parck *et al.*, 2007). Por su parte, los reportes en Colombia (Gómez *et al.*, 2006), indican una gran severidad en los brotes de *R. solanacearum* en las

diferentes zonas productoras, destacan que la diseminación del patógeno dentro del cultivo, es favorecida por el manejo agronómico (Hayward, 2006), la dinámica de los hospederos (malezas) y los vectores (Belalcázar *et al.*, 2004), además de las condiciones ecológicas aditivas que inciden en la agresividad del patógeno (Islam y Toyota, 2004).

**Relación de la incidencia de *R. solanacearum* con los valores mensuales de precipitación**

Los datos de precipitación registrados por la estación meteorológica digital del INIA-Chama arrojan los siguientes valores de mm. por cada mes: diciembre 458 mm; enero 121 mm; febrero, 37 mm y marzo 169 mm. Esta fluctuación en la precipitación se

corresponde con el incremento y la disminución del brote de la enfermedad en las plantas cultivadas de plátano Hartón. Este contraste expresado en la Figura 2, sugiere que la incidencia del HRQ oscila de manera similar a los valores de precipitación. Este comportamiento ratifica que *R. solanacearum* es un patógeno que puede sobrevivir por tiempo prolongado en condiciones adversas en la rizósfera del suelo y de planta, incluso en malezas hospederas (Carusso *et al.*, 2005; Belalcázar, 2004; Grey y Steck, 2001), este mecanismo favorece el incremento de su población y virulencia en épocas húmedas, así en la morfología de la bacteria su sistema de movilidad piloso con flagelos polares la ayudan a moverse fácilmente en medios acuosos y a una velocidad rápida pero a distancias muy cortas (Liu *et al.*, 2001).

Cuadro 1. Porcentaje plantas afectadas con “Hereque” causado por *Ralstonia solanacearum* en 3 pobos de plátano Hartón (*Musa* AAB), de la finca “El Roble”, Municipio Alberto Adriani y Colón Sur del lago de Maracaibo durante los meses de diciembre 2007 a marzo 2008.

Días de observación	Porcentaje de plantas afectadas				Desv
	** Pobo 1	Pobo 2	Pobo 3	Promedio (días)	
* 0	7,63	5,45	1,09	4,72	3,33
36	3,63	4,72	1,36	3,24	1,71
58	2,9	2,18	0	1,69	1,51
90	5,45	2,54	1,63	3,21	1,99
Promedio	4,90	3,72	1,02	3,22	1,98
Desv.	2,11	1,61	0,71	1,48	0,70

\* 1<sup>ra</sup> observación en campo.

\*\*Área de la plantación seleccionada al azar, aproximada a 3000 m<sup>2</sup>. Densidad de siembra 1200 plantas/ha.

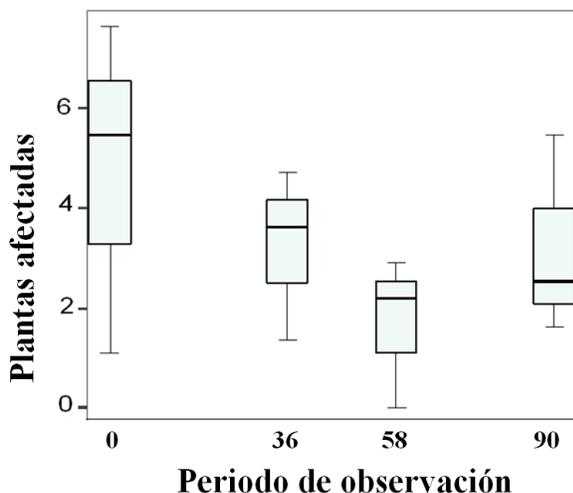


Figura 1. Diagrama de cajas sobre el porcentaje de plantas infectadas con *Ralstonia solanacearum* en los pobos por tiempo (0, 36, 58 y 90 días) de observación.

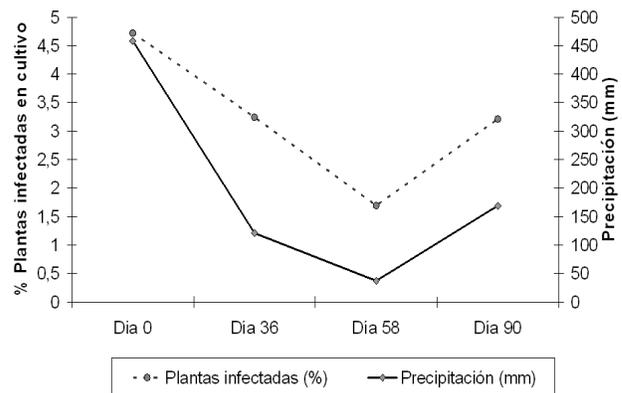


Figura 2. Gráfico de doble eje, relación entre la dinámica en el porcentaje de plantas con síntomas de “hereque” causado por *Ralstonia solanacearum* dentro del cultivo y los valores promedios mensuales de la precipitación de diciembre 2007- marzo 2008 en la finca “El Roble”.

La incidencia del HRQ fluctuó de manera significativa en los bloques o “pobos” según el Anava (Cuadros 2 y 3), detalla además que, en definitiva durante las mediciones a los días 0, 36, 58 y 90 en todos los bloques varió (en promedio) pero no marcó una tendencia significativa (p-valor 0,48), estos resultados sugieren que los nuevos brotes, o cantidad de plantas con síntomas de la enfermedad se mantuvieron sin un alza importante pero con cierta expectativa de incremento a las variables eco fisiológicas principalmente la precipitación.

**Caracterización de *Ralstonia solanacearum* en plantas con síntomas de “Hereque” en la finca “El Roble”**

En el Cuadro 4, se puede detallar un total de 144 placas sembradas con *R. solanacearum*: 136 Gram positivas y 8 Gram negativas en los diferentes órganos del plátano Hartón. En plantas con síntomas de la enfermedad, la bacteria actúa de forma sistémica en los tejidos, encontrándose tanto en hoja, seudotallo, cormo, colino e incluso en plantas asintomáticas dentro de los pobos infectados con HRQ. Las pruebas en medios con disacáridos y alcoholes hexosa proporcionaron indicio del biovar caracterizado al que corresponde la cepa aislada de las plantas de la finca “El Roble”, el cual, se relaciona al biovar 3 de la raza 2 que afecta al genero *Musa*.

Las pruebas en maltosa, sorbitol, lactosa y manitol dieron positivas en la mayoría de las muestras tornándose las colonias rojas a amarillas (Figura 3b y

3c). Por otro lado el control del medio con tetrazolio en siembra con *Pseudomonas fluorescens* un organismo cercano, resultó negativo (Figura 3a), lo que demuestra la selectividad del medio. Resultados similares reportan investigadores (Gómez *et al.*, 2006; Denny y Haywart, 2001; García *et al.*, 1999; French *et al.*, 1995; Kelman, 1954) que trabajaron con una similar metodología para aislar e identificar los biovares de la bacteria, en papa y musáceas respectivamente.

**Pruebas de patogenicidad de la bacteria en plátano hartón**

El color de las colonias en medio basal con tetrazolio después de las 72 horas postsiembra de la bacteria tiende a presentar una coloración rojiza (Kelman, 1954) (Figura 3a, Figura 4a y 4b) la tinción de Gram clasifica a la colonia como Gram negativa, propio de muchas bacterias fitopatógenas. *R. solanacearum* en su mayoría una vez que invade el tejido reside en los espacios intercelulares con otros microorganismos (Hickichi *et al.*, 2007; Sinohara *et al.*, 2005) y proliferan de manera rápida invadiendo el citosol de la célula e interactuando con su hospedante (French, 2006; Brencic y Winams, 2005; Stackawicz, 2001) por sistemas de secreción tipo III y IV a través de la membrana y los flagelos (González y Dreyfus, 2003; Valls *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2001; Alfano y Collier, 1997) este mecanismo biológico evidencia que *Ralstonia* secreta proteínas que alteran la fisiología de la célula de una gran gama de hospedantes incluyendo a *Musa* AAB (Bundenhagen, 1964).

Cuadro 2 Análisis de varianza para el porcentaje de plantas afectadas por *Ralstonia solanacearum* en función de los periodos (días) de evaluación en campo.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	Grados de Libertad	Media cuadrática	F	Significación
Modelo correg.	169,501(a)	6	28,250	19,077	0,001
Pobo	31,693	2	15,846	10,701	0,001
Días	13,773	3	4,591	,905	0,111
Error	8,885	6	1,481		
Total	178,386	12			

A R<sup>2</sup> = 0,950 (R<sup>2</sup> corregida = - 0,90) (p ≤ 0,05).

Cuadro 3. Prueba de homogeneidad de varianzas para Días y Pobos.

	Estadístico de Levene	Grados de Libertad 1	Grados de Libertad 2	Significación
Días	1,062	3	8	0,418
Pobos	3,589	2	9	0,071

**Inoculación de la bacteria en plántulas de plátano Hartón**

Las colonias de *R. solanacearum* aisladas de plantas enfermas en medio selectivo con tetrazolio y sometidas a crecimiento en medio King (activación) fueron infiltradas en plántulas sanas con poco éxito, trabajos realizados por Gómez *et al.*, (2006) reporta una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC para reproducir la enfermedad en condiciones de invernadero, sin embargo, cuando se transfirió el extracto fresco de plantas enfermas (EPE) Dilución  $10^{-1}$  a plántulas sanas se observó la presencia de los síntomas de marchitamiento a los 10 días acentuándose progresivamente hasta el día 12 (Figura 5c), el marchitamiento gradual se percibió por primera vez en la hoja infiltrada. Estos resultados indican que la patogenicidad de la bacteria es inhibida por el ambiente *in vitro* y la variabilidad genética tornándolas “avirulentas” (Castillo y Greenberg, 2007; Robertson *et al.*, 2004) por otro lado French *et al.*, (2006) alerta sobre esta propiedad de las colonias

cultivadas y repicadas en medios kelman, sugiriendo que la bacteria ocasiona daño a la planta solo si interactúan los factores que la incitan a ser patogénica a su hospedante.

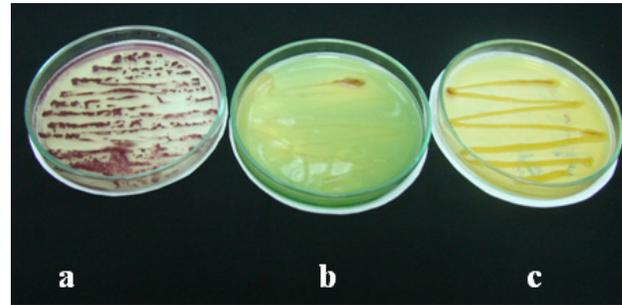


Figura 3. Colonias de *Ralstonia solanacearum* en: a) medio kelman a las 72 horas. b) Medios para metabolismo: el color verde de la placa se debe al azul de bromotimol. c) Placa + en medio con hidrato de carbono (maltosa) correspondiente a una muestra extraída del cormo.

Cuadro 4. Identificación del Biovar de *Ralstonia solanacearum* con empleo de disacáridos y alcoholes hexosa, en los órganos de la planta de plátano hartón, *Musa* AAB en la finca “El Roble”, límite del Municipio Alberto Adriani (Mérida) y Municipio Colón (Zulia), Sur del lago de Maracaibo.

Órgano	Presencia de colonias rojizas: <i>Ralstonia</i> sp.		Metabolismo: medios con hidratos de carbono y alcoholes hexosa						BIOVAR	
	Medio basal tetrazolio		Maltosa	Sorbitol	Lactosa	Manitol				
	+	-	+	-	+	-	+	-		
<b>Pobo 1</b>										
Hoja**	9	0	3		3		3		3	
Seudotallo*	9	0	3		2	1	3		3	
Cormo*	9	0	3		2	1	3		3	
Colino*	9	0	3		2	1	3		3	
Control †	11	1								
<b>Pobo 2</b>										
Hoja**	9	0	3		3		3	2	1	
Seudotallo*	8	1	3		2	1	3	3		
Cormo*	9	0	2	1	3		3	2	1	
Colino*	8	1	3		3		3	2	1	
Control †	10	2								
<b>Pobo 3</b>										
Hoja**	8	1	3		3		3		3	
Seudotallo*	9	0	3		2	1	3	2	1	
Cormo**	9	0	3		3		3	3		
Colino*	9	0	3		2	1	3	3		
Control †	10	2								
<b>Total</b>	<b>136</b>	<b>8</b>	<b>35</b>	<b>1</b>	<b>30</b>	<b>6</b>	<b>36</b>	<b>0</b>	<b>32</b>	<b>4</b>

† Planta asintomática dentro de la plantación con reporte de brotes de “Hereque”.

\*\* Significativo ( $p \leq 0,01$ ) \* Significativo ( $p \leq 0,05$ ) con datos transformados

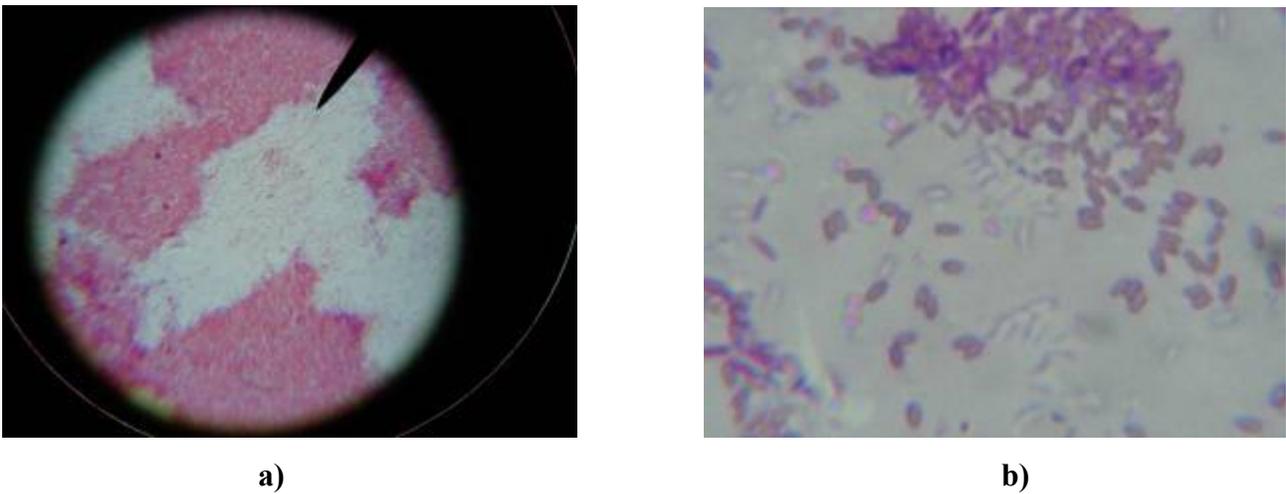


Figura 4. Muestras de la colonia de *Ralstonia solanacearum* correspondiente al aislamiento de los cultivos de con tetrazolio, coloreadas con tinción de Gram. a) 40X y b) 100X.

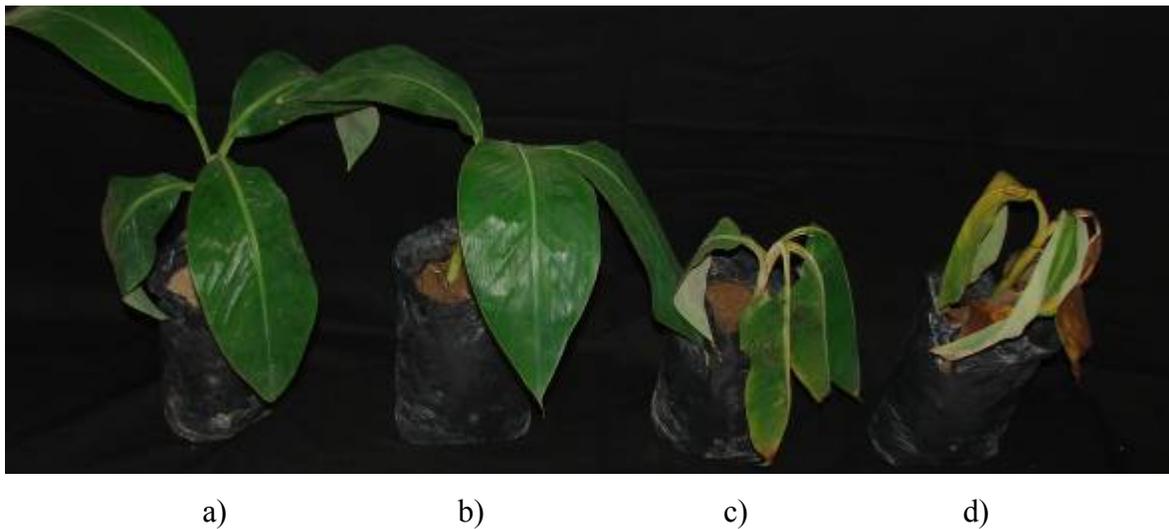


Figura 5. Inoculación con extracto de plantas infectadas de *Ralstonia solanacearum*: Infiltración bacteriana (0,5 ml) en hojas de plántulas de plátano Hartón. a: planta control negativo b: Planta inoculada, expresión de síntomas 5 días; c: 10 días y d: 12 días después de la infiltración

### CONCLUSIONES

Los síntomas en las plantas enfermas de plátano Hartón (*Musa* AAB) de la finca “El Roble” son ocasionados por una cepa patogénica de *R. solanacearum*, raza 2, biovar 3.

Se pudo demostrar que el porcentaje en la incidencia de la enfermedad está correlacionado con los valores de precipitación reportados para el periodo en que se realizaron las observaciones, la dinámica entre el aumento de plantas con “Hereque” y los

promedios de precipitación mensual fue coincidente; en épocas lluviosas se encuentra mayor cantidad de plantas afectadas.

Durante las observaciones en los 3 pobos, la incidencia de la enfermedad se promedió baja, en el total de la plantación, entre diciembre (2007) y marzo (2008), el brote de “Hereque” no sobrepasó el umbral económico, no obstante, se manifestó como un riesgo latente, constante y progresivo en el tiempo. La evidencia estadística propone que *R. solanacearum* es perseverante en cada sector o “pobo” de la finca.

En plantas con síntomas de la enfermedad la presencia de la bacteria es sistémica, se puede encontrar en hojas, pseudotallo, cormo e hijos de manera simultánea, inclusive en plantas aparentemente sanas, demostrando una gran dinámica en los mecanismos biológicos de *R. solanacearum*.

*R. solanacearum* cuando crece y es mantenida o replicada varias veces en medios de cultivo con tetrazolio atenúa su grado de patogenicidad y, de esta forma al ingresar en plantas sanas se comporta de manera “avirulenta”.

#### LITERATURA CITADA

- Alfano, J. and A. Collmer. 1997. The Type III (Hrp) Secretion Pathway of Plant Pathogenic Bacteria *in*: Trafficking Harpins, Avr Proteins, and Death. *Journal of Bacteriology* 179 (18): 5655-5662.
- Allen, C.; P. Prior and A. Hayward. 2004. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia Solanacearum*. Species complex. St. Paul (Minnesota): APS Press.
- Arenas, A.; D. López; D. Álvarez; G. Llano y J. Loke. 2005. Efecto de prácticas ecológicas sobre la población de *Ralstonia solanacearum* Smith, causante del Moko del plátano. *Fitopatología Colombiana* 28 (2): 76-80.
- Belalcazar, S.; F. Rosales y L. Pocasangre. 2004. El “Moko” en el plátano y banano y el rol de las plantas hospederas en su epidemiología. *Memorias de la XVI reunion de Acorbat.* p. 16-36.
- Brencic, A. and S. Winnams. 2005. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69 (1): 155-194.
- Buddenhagen, I. W. 1961. Bacterial kilt of bananas: History and known distribution. *Tropical Agriculture* 38: 107-121.
- Buddenhagen, I. W.; L. Sequeira and A. Kelman. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52: 726. (Abstract).
- Buddenhagen, I. W. and A. Kelman. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2: 203-230.
- Caruso, P.; J. Palomo, E. Bertolini, B. Álvarez, M. López and E. Bioscan. 2005. Seasonal variation of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2 populations in a Spanish river: Recovery of stressed cells at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (1): 140-148.
- Castillo, J. and J. Grennberg. 2007. Evolutionary dynamics of *Ralstonia solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (4): 1225-1238.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 2003. *Memorias del Curso Manejo integrado de la enfermedad del Moko del plátano.* CIAT, Cali, Junio 9 a 13 de 2003. 52 p.
- Delgado, E. y R. Paiva. 2001. Estudio del efecto de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet) sobre la sostenibilidad de la producción de musáceas en Barinas, Venezuela. *Rev. Fac. Agr. (LUZ)* 15:1-10.
- Delgado, M.; A. García, J. Nava, G. Carroz y F. Barboza. 1998. Diagnóstico técnico-socioeconómico de la zona platanera subregión Sur del Lago de Maracaibo. *Informe Técnico CORPOZULIA-FUSAGRI.*
- Denny, T. and A. Hayward. 2001. Gram – negative bacteria. *In*: N. W. Schaad, J. B. Jones and W. Chum (eds). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.* American Phytopathological Society (APS) St Paul, MN, USA. p. 151-173.
- De Oliveira, E.; S. Silva, V. De Mello, S. Gasparotto and L. Rires de Boher. 2000. Evaluación de *Musa* spp. para la resistencia a la enfermedad de Moko (*Ralstonia solanacearum*, raza 2). *Infomusa* 9 (1): 19-20.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2006. *Datos agrícolas faostat.* Disponible en línea en: <http://faostat.fao.org/faostat/colletions?subset=agricultura&lenguaje>. Última visita 18/09/2008.
- French, E. 2006. Interaction between strains of *Ralstonia solanacearum*, its host and the environment. *CIP sección 10.* 11 p.

- French, E.; L. Gutarra, P. Alley and J. Elphinstone. 1995. Culture media for *Ralstonia solanacearum* isolation, identification and maintenance. *Fitopatología Peruana* 30 (3): 126-130.
- Frison, E. and S. Sharrock. 1988. The economic, social and nutritional importance of banana in the World. Bananas and food security/Les productions bananieres: UN enjeu économique majeur pour la sécurité alimentaire. International symposium, Douala, Cameroon, 10-14 November 1988. INIBAP, Montpellier, France. p. 21-35.
- García, R.; A. García y L. Delgado. 1999. Marchitez bacteriana del tomate causada por el biovar 2-a, de *Ralstonia solanacearum*, en algunas localidades del estado Mérida-Venezuela. *Revista Forestal Venezolana* 43 (2): 183-189.
- Gómez, E.; E. Álvarez y G. Llano. 2006. Identificación y caracterización de cepas de *Ralstonia solanacearum*, raza 2, agente causal del moko de plátano en Colombia. *Fitopatología Colombiana* 28 (2): 71-75.
- González, B. y G. Dreyfus. 2003. Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. Reporte técnico. UNAM, Facultad de Medicina.
- Grey, B. and T. Steck. 2001. The viably but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (9): 3866-3872.
- Kloepper, J. W.; S. Tuzun, L. Liu and G. Wei. 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as inducers of systemic disease resistance. In "Pest Management: Biologically based technologies". R. D. Lumsden and J. L. Waughn, Eds. p. 156-165. American Chem. Soc. Books, Washington, DC. USA.
- Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Appl. Bacteriol.* 27: 265-277.
- Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 29: 64-87.
- Hayward, A. C. 2006. Pudrición de las frutas de banano causada por *Ralstonia solanacearum*, raza 2. *Materias de nomenclatura, transmisión y control.* *Infomusa* 15 (1): 7- 11.
- Hikichi, Y.; T. Yoshimochi, S. Tsujimoto, R. Shinohara, K. Nakaho, A. Kanda, A. Kiba and K. Ohnishi. 2007. Global regulation of pathogenicity mechanism of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Biotechnology* 24: 149- 154.
- Islam, T. and K. Toyota. 2004. Effect of moisture conditions and pré-incubation at low temperature on bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes of Environments* 19 (3): 244-247.
- Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Ralstonia solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* (44): 693.
- Liu, H.; Y. Kang, S. Genin, M. Schell and T. Denny. 2001. Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. *Microbiology* 147: 3215-3229.
- Ministerio de Agricultura y Tierras (MAT). 1997. Censo Agrícola. Dependencia Santa Bárbara del Zulia.
- Nava, C. 1989. Problemática del cultivo de plátano en Venezuela: Memorias IX Reunión ACORBAT. Mérida. Venezuela. p. 643-653.
- Park, K.; D. Paul, Y. K. Kim, K. W. Nam, Y. Lee, H. Choi and S. Lee. (2007). Induced Systemic Resistance by *Bacillus vallismortis* EXTN-1 Suppressed Bacterial Wilt in Tomato Caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Pathol. J.* 23 (1): 22-25.
- Poussier, S.; P. Thoquet, M. Trigalet, S. Barthelet, D. Meyer, M. Arlat and A. Trigalet. 2003. Host plant-dependent phenotypic reversion of *Ralstonia solanacearum* from non-pathogenic to pathogenic forms via alterations in the *phcA* gene. *Molecular Microbiology* 49 (4): 991-1000.
- Robertson, A.; W. Wetchter, T. Denny, B. Forthum and D. Kluepfel. 2004. Relationship between avirulence gene (*avrA*) Diversity in *Ralstonia solanacearum* and bacterial wilt incidence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17 (12): 1376-1384.

- Rorer, J. B. 1911. A bacterial disease of banana and plantains. *Phytopathology* 1 (2): 45-49.
- Salanoubat, M.; S. Genin, F. Artiguenave, J. Gouzy, S. Mangenot, M. Arlat, A. Billault, P. Brottier, J. C. Camus, L. Cattolico, M. Chandler, N. Choisine, C. Claudel Renard, S. Cunnac, N. Demange, C. Gaspin, M. Lavie, A. Moisan, C. Robert, W. Saurin, T. Schiex, P. Siguier, P. Thébault, M. Whalen, P. Wincker, M. Levy, J. Weissenbach and C. A. Boucher. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 415: 497-502.
- Sáez, V. y C. Rivas. 1992. Zonificación agroclimática de cultivos en la región Sur del Lago de Maracaibo (Estado Zulia). *MARNR*. 108 p.
- Sinohara, R.; A. Kanda, K. Ohnishi, A. Kiba and Y. Hickichi. 2005. Contribution of folate biosynthesis to *Ralstonia solanacearum* proliferation in intercellular spaces. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (1): 417-422.
- Staskawicz, B. 2001. Genetics of plant-pathogen interaction specifying plant disease resistance. *Plant Physiology* 125: 73-76.
- Stover, R. H. 1972. Banana, Plantain and Abaca Disease. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England. 316 p.
- Takatsu, A. 1986. Ricos e consecuencias da disseminacao do moko para outras regioes do Brasil. p. 54-59 *In: Simposio sobre Moko da Bananeira, Manaus, AM (1984)*. Anais. Embrapa-CNPMPF, documento 19. Embrapa- CNPMPF, Cruz das almas, BA.
- Thwaites, R.; S. Eden Green and R. Black. 1999. Diseases caused by bacteria. *In: Diseases of Banana, Abacá and Enset*. Editor David R. Jones. p. 213-238.
- Trujillo, G. 1998. Fundamentos de bacterias fitopatogénas. *Revista Alcance de la Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela* 56: 211.
- Valls, M.; S. P. Genin and C. Boucher. 2006. Integrated regulation of the type iii secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *Plos Pathogens* 2 (8): 798-807.
- Yu, Q.; M. Alvarez, P. Moore, F. Zee, M. Kim, A. Silva, P. Hepperly and R. Ming. 2003. Molecular diversity of *Ralstonia solanacearum* isolated from ginger in Hawaii. *Bacteriology* 93 (9): 1124- 1130.