

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Ralstonia solanacearum* RAZA 2, AGENTE CAUSANTE DEL MOKO DE PLÁTANO EN COLOMBIA

Eduardo A. Gómez C.¹, Elizabeth Alvarez² y Germán Llano²

¹Pontificia Universidad Javeriana. eduardo.gomez@javeriana.edu.co, eduardogomez4@gmail.com

²Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. e.alvarez@cgiar.org, gllano@cgiar.org

RESUMEN

La Marchitez bacteriana o Moko del plátano causado por *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith raza 2 es la enfermedad bacteriana más importante de este cultivo en Colombia. La técnica de BIO-RCP, se utilizó para detectar la bacteria. Inicialmente se colectaron un total de 337 muestras (193 de suelo y 144 de tejido vegetal), provenientes de cultivos afectados en seis regiones productoras de plátano en Colombia. Se extrajo ADN mediante lisis por calor a 189 cepas seleccionadas por su crecimiento en SMSA, 29 de las cuales se aislaron de suelo y 160 de tejido. Mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), usando los cebadores OLI 1 y Y2, se amplificó un fragmento de 288 pb del gen 16S del ADN ribosomal de *R. solanacearum* en 98 cepas de tejido y 8 de suelo. 64 cepas de tejido y las 8 de suelo, se seleccionaron de acuerdo a su procedencia y se identificaron como biovar 1 con base en la producción de ácidos a partir de los disacáridos celobiosa, lactosa y maltosa y la oxidación de los alcoholes dulcitol, sorbitol y manitol. La prueba de patogenicidad en plántulas de plátano 'África' (*Musa* cv. AAB) bajo condiciones de invernadero, mostró que 35 cepas fueron altamente patogénicas, 28 moderadamente patogénicas, 8 tuvieron patogenicidad baja y 1 no fue patogénica. Mediante infiltración en hojas de tabaco, 63 cepas indujeron reacción de hipersensibilidad correspondiente a la raza 2, y 9 cepas indujeron amarillamiento, reacción atípica para esta raza. La técnica de BIO-RCP facilitó la detección del patógeno en suelo y plantas.

Palabras clave: frutas, enfermedades del banano

SUMMARY

Bacterial wilt or Moko of plantain, caused by *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, race 2, is the most important bacterial disease of this crop in Colombia. The BIO-PCR technique was used for detecting the bacterium. A total of 337 samples were initially collected (193 from soil and 144 from plant tissue) from affected crops in six of Colombia's plantain-growing regions. DNA was extracted by thermolysis from 189 strains selected for their growth in SMSA medium; of these, 29 were isolated from soil and 160 from tissue. With primers OLI 1 and Y2, a 288-bp fragment could be amplified by PCR, from the 16S gene of ribosomal DNA in 98 tissue strains and 8 from soil. 64 of the tissue strains and the 8 from soil were selected according to origin and identified as biovar 1 by their production of acids from disaccharides cellobiose, lactose, and maltose, and oxidation of alcohols dulcitol, sorbitol, and manitol. Pathogenicity tests on seedlings of the plantain 'Africa' (*Musa* cv. AAB) under greenhouse conditions showed that 35 strains were highly pathogenic, 28 moderately pathogenic, 8 had low pathogenicity, and 1 was nonpathogenic. For infiltration in tobacco leaves, 63 strains, induced hypersensitivity, and 9 induced yellowing, an atypical reaction for this race. BIO-PCR technique facilitated the detection of the pathogen in soil and plants.

Keywords: fruits, banana diseases

INTRODUCCIÓN

El Moko del plátano, Maduraviche o Ereke causado por *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith raza 2 (Yabucchi *et al*, 1995 citado por Ito *et al*, 1998) es la enfermedad bacteriana más importante de este cultivo en Colombia, afectando posiblemente 125.000 familias que dependen directamente del cultivo de plátano y banano. Actualmente a pesar de la divulgación de las medidas preventivas y manejo de la enfermedad continua en aumento, hasta el punto que el 95 % de los predios plataneros tiene como mínimo una planta con Moko (Comunicación personal, Galindo, ICA Bogotá 2004).

La técnica de BIO-PCR desarrollada por Schaad *et al* (1995) mejora la eficiencia de la detección de células viables de este patógeno especialmente suelo. Esta técnica consistió en el aislamiento de colonias en medio selectivo Sur África (SMSA) (Englebrecht, 1994; Martins, 2000; Denny y Hayward, 2001) el cual ha demostrado alta sensibilidad y especificidad comparado con TTC (Kelman, 1954) y posterior amplificación median-

te Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP)

R. solanacearum difiere en el rango de hospederos que ataca, distribución geográfica, patogenicidad, relaciones epidemiológicas y propiedades fisiológicas.

Por esta razón, durante las últimas tres décadas han sido utilizadas las razas y los biovares como una clasificación informal a nivel infrasub-específico el cual no se rige por el Código de Nomenclatura de Bacterias. La raza 1 (biovares 1, 3 ó 4) ataca un gran número de plantas, incluyendo batata, tomate y solanáceas en general. La raza 2 (biovares 1 ó 3) afecta plátano, banano y heliconias; la raza 3 (biovar 2) es considerada específica de batata y está asociada a algunas solanáceas; la raza 4 (biovar 4) ataca jengibre y la raza 5, mora (Hayward, 1991).

Este trabajo tuvo como objetivo aislar *Ralstonia solanacearum* a partir de suelo y de tejido afectado de plátano, mediante BIO-PCR utilizando el medio de cultivo SMSA y el cebador específico OLI 1 junto con el cebador no específico Y2. Mediante inoculación en plantas de plátano y reacción de hi-

persensibilidad en tabaco se identificaron las cepas pertenecientes a raza 2, además se evaluó su patogenicidad. Mediante caracterización bioquímica se determinaron los biovares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedencia de las muestras

Se procesaron 134 muestras de tejido vegetal afectado (seudotallos, raquis, frutos, rizomas) de plantas de plátano, banano y heliconias seleccionadas de plantas que presentaban los síntomas típicos de la enfermedad y muestras de suelo procedentes de fincas afectadas por Moko ubicadas en áreas productoras de los departamentos de Valle del Cauca, Quindío, Antioquia, Caquetá, Meta y Magdalena en Colombia (Tabla 1).

Procesamiento de muestras de tejido vegetal

Con el fin de extraer la bacteria presente en el tejido, se seleccionaron fragmentos de tejido

Tabla 1. Muestras de tejido vegetal utilizadas para aislar *Ralstonia solanacearum* raza 2 según su procedencia por departamento, cultivo y fuente del aislamiento

Muestra No	Procedencia			Muestra No	Procedencia		
	Departamento/ Localidad	Cultivo	Fuente		Departamento/ Localidad	Cultivo	Fuente
1	Quindío	Plátano	Raquis	79	Montenegro (Quindío)	Plátano	Rizoma
2	Quindío	Plátano	Pecíolo	80	Montenegro (Quindío)	Plátano	Seudotallo
3	Quindío	Plátano	Pecíolo	81	Montenegro (Quindío)	Plátano	Fruto
4	Urabá (Antioquia)	Banano	Seudotallo	83	Quindío	Plátano	Fruto
5	Urabá (Antioquia)	Banano	Rizoma	84	Quindío	Plátano	Seudotallo
6	Urabá (Antioquia)	Banano	Fruto	85	Quindío	Plátano	Colino
7	Urabá (Antioquia)	Banano	Fruto	86	Calarcá (Quindío)	Plátano	Raquis
15	Quindío	Plátano	Suelo	88	La Tebaida (Quindío)	Plátano	Rizoma
17	Jamundí (Valle)	Plátano	Suelo	89	La Tebaida (Quindío)	Plátano	Seudotallo
18	Jamundí (Valle)	Plátano	Colino	90	Montenegro (Quindío)	Plátano	Pecíolo
32	Caquetá	Plátano	Seudotallo	91	Montenegro (Quindío)	Plátano	Raquis
33	Caquetá	Plátano	Seudotallo	92	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Pecíolo
34	Caquetá	Plátano	Raquis	94	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Raquis
38	Quindío	Plátano	Suelo	95	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Rizoma
39	Quindío	Plátano	Suelo	96	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Seudotallo
40	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Suelo	97	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Rizoma
41	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Suelo	98	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Raquis
42	Fuente de Oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	99	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Seudotallo
43	Fuente de Oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	100	Armenia (Quindío)	Plátano	Colino
48	Armenia (Quindío)	Plátano	Fruto	101	Armenia (Quindío)	Plátano	Seudotallo
54	Fuente de Oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	102	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Pecíolo
55	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	104	Armenia (Quindío)	Plátano	Fruto
57	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	106	Armenia (Quindío)	Plátano	Seudotallo
58	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	107	Armenia (Quindío)	Plátano	Fruto
59	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	109	Armenia (Quindío)	Plátano	Pecíolo
60	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	110	Magdalena	Banano	Seudotallo
63	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo	111	Magdalena	Banano	Rizoma
64	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo	112	Magdalena	Banano	Colino
65	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo	113	Palmira (Valle)	Heliconia	Seudotallo
66	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo	114	Palmira (Valle)	Heliconia	Rizoma
67	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	115	Palmira (Valle)	Heliconia	Rizoma
69	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo	160	Quindío	Plátano	Suelo
70	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo	161	Quindío	Plátano	Suelo
71	Urabá (Antioquia)	Plátano	Rizoma	588	Fuente de Oro (Meta)	Plátano	Pecíolo
72	Urabá (Antioquia)	Plátano	Seudotallo	CIAT 1008 ⁴	Ibagué (Tolima)	Plátano	Sin Inf.
73	Urabá (Antioquia)	Plátano	Seudotallo				
76	Montenegro (Quindío)	Plátano	Seudotallo				
78	Montenegro (Quindío)	Plátano	Raquis				

con presencia de síntomas, los cuales una vez lavados y desinfectados se maceraron en un mortero, acompañados de una solución buffer que contenía Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, con pH 7.6. Esta suspensión se sembró con un asa estéril en cajas Petri con el medio de cultivo semi-selectivo Sur África (SMSA) el cual es una modificación del medio Cloro Trifenil Tetrazolio (TTC). EL medio SMSA contiene peptona 10 g/L, glicerol 5 ml/L, casaminoácidos 1 g/L, agar 18 g/L y los antibióticos polimixin β sulfato 100 mg/L (600.000 U), Bacitracin 25 mg/L; penicilina 0.5 mg/L (82,5 U), junto con cloranfenicol 5 mg/L, 2,3,5 cloro trifenil tetrazolio 50

mg/L y cristal violeta 5 mg/L (Englebrecht 1994; Denny y Hayward, 2001). Las cajas sembradas con la suspensión, se incubaron por un periodo de tres a cinco días dependiendo del momento de aparición de las colonias, a una temperatura de 28° C.

Procesamiento de muestras de suelo

A partir del suelo tomado alrededor de plantas de plátano afectadas por la bacteria, se prepararon suspensiones adicionando 3,3 g de suelo en 30 ml de buffer TE pH 7,6. Se realizaron diluciones seriadas en buffer TE, luego se tomaron 100 µL de las diluciones 10⁻¹, 10⁻²

y 10⁻³ y se sembraron en cajas de Petri con el medio semiselectivo SMSA. Las cajas se incubaron a una temperatura de 28° C por un periodo de tres a cinco días dependiendo del momento de aparición de las primeras colonias.

Aislamiento de bacterias

A partir de las muestras se seleccionaran colonias de bacterias con crecimiento similar a la cepa control CIAT 1008 de *R. solanacearum*, proveniente de Ibagué (Tolima), perteneciente al banco de cepas del laboratorio de Patología de Yuca.

Prueba de KOH y oxidasa. Se seleccionaron colonias de bacterias purificadas pertenecientes al grupo de bacterias Gram-negativas, mediante la prueba de KOH (3 %) colocando una gota de este reactivo en una lámina de vidrio y posteriormente disolviendo en ella una colonia del cultivo puro y metabólicamente activo, de 24 horas de crecimiento, considerando positiva la reacción que origina un hilo mucoso al levantar el asa desde la suspensión bacteriana.

La prueba de la oxidasa se hizo colocando dos gotas de solución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetra metil-p-fenilendiamina, en una tira de papel filtro y posteriormente se frotó una colonia, observando una reacción positiva determinada por el viraje de color en el papel de incoloro a púrpura oscuro entre los siguientes 30 a 60 segundos (Goszczyńska *et al*, 2000). Para las dos pruebas se incluyó como testigo la cepa CIAT 1008.

Extracción de ADN y RCP

Se extrajo ADN genómico a partir de colonias puras con 36 horas de crecimiento en agar nutritivo de las cepas seleccionadas (Seal *et al*, 1999). Se suspendió la colonia en viales con 100 µL de agua destilada estéril, calentándolos en baño María a 96° C por 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 2 min. y se tomaron 2,5 µL del sobrenadante como ADN molde en la reacción en cadena de la polimerasa.

El volumen del cóctel de amplificación fue de 9.98 µL el cual contenía 1,25X de buffer para Taq polimerasa; 0,012 mM de cada dNTP; 1,87 mM de MgCl₂; 0,25 U de Taq polimerasa; 0,16 µM de los cebadores OLI1: 5'GGGGTAGCTTGCTACTGCC3' y Y2: 5'CCACTGCTGCCCGTAGGAGT3' (Seal *et al*, 1999; Martins, 2000).

La amplificación del ADN se realizó en un termociclador MSJ-Research PTC-100 con el siguiente programa: Denaturación inicial durante 2 min. a 96° C; 50 ciclos de desnaturalización por 20 seg. a 94° C, apareamiento por 20 seg. a 62° C, y extensión por 30 seg. a 72° C; junto con una extensión final de 5 min. a 72° C (Seal *et al*, 1999; CIAT 2004). Los productos del PCR fueron separados en geles de agarosa al 1,5 %, teñidos con bromuro de etidio 0,001 % y visualizados bajo luz ultravioleta, evaluando presencia de una banda de 287-288 pares bases del fragmento 16S rRNA generada por amplificación con el cebador específico OLI 1 y el cebador no específico Y2 (Woese *et al*, 1983; Young *et al*, 1991 citados por Seal *et al*, 1999).

Determinación de biovars

Las cepas pertenecientes a *Ralstonia solanacearum* se pueden clasificar en diferentes

biovars por su producción de ácido a partir de los disacáridos (celobiosa, lactosa y maltosa) y la oxidación de los alcoholes hexosa (sorbitol, dulcitol y manitol) en medio base, para determinar biovars según Hayward (1964) (Denny y Hayward, 2001).

El medio base tiene la siguiente composición por litro: 1 g NH₄H₂PO₄, 0,2 g KCl, 0,2 g MgSO₄·7H₂O, 1,0 g Bacto peptona, 3,0 g agar y 80,0 mg azul de bromotol con pH entre 7,0-7,1 tornándose de color verde oliva. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 121° C - 20 lb de presión de 20 a 30 minutos (Denny y Hayward, 2001). También se prepararon soluciones acuosas al 10% con cada uno de los carbohidratos de prueba y se esterilizaron mediante filtración con filtros Millipore® cuyo tamaño del poro fue de 0,22 µm. Esta solución de carbohidratos se agregó al medio base estéril cuando la temperatura estuvo entre 55 y 60° C, obteniendo una concentración final del 1%. Después de mezclar el medio base con cada uno de los azúcares, cerca de 5 ml del medio líquido se agregaron dentro de tubos de cultivo estériles (Denny y Hayward, 2001).

La inoculación de la bacteria se realizó mediante punción hasta ¾ partes del medio utilizando colonias con 24 horas de crecimiento en agar nutritivo, se observaron las reacciones después de 1, 3, 7, 14 y 28 días de incubación a 28° C; con el cambio de color de verde oliva a amarillo se evidencia la producción de ácidos a partir de los disacáridos y oxidación de los alcoholes hexosa (Denny y Hayward, 2001).

Prueba de patogenicidad en plátano

Las cepas identificadas por PCR como *R. solanacearum* se inocularon en plantas de plátano 'África' (*Musa* cv. AAB), provenientes de cultivo de meristemos *in vitro*, las cuales fueron transplantadas a los 15 días de edad en bolsas plásticas de 1 Kg. de capacidad con mezcla de arena - tierra estéril en una proporción 3:2 y con humidificación permanente durante los siguientes 15 días, garantizando el óptimo desarrollo de la planta.

Las plantas no fueron regadas 24 horas antes de la inoculación. Por cada cepa de *R. solanacearum* se inocularon cuatro plantas de plátano de aproximadamente 6 semanas de edad mediante inyección al seudotallo con jeringas de 1 ml estériles, cuyo tamaño de la aguja es 27G x 1/2", hasta el centro del seudotallo a una altura de 2 cm. desde la superficie del suelo y se inyectaron 0,5 mL de suspensión bacteriana con cultivos de bacterias puros con crecimiento previo de 24 horas en agar nutritivo, a partir de los cuales se preparó la suspensión en agua deionizada estéril.

La concentración de la suspensión se determinó a través de lecturas de absorbancia en espectrofotómetro y se ajustó a 0,1 con una longitud de onda de 600 nm, correspondiente aproximadamente a 1 x 10⁸ ufc.ml⁻¹ (He *et al*, 1983). Como testigo positivo se inoculó la

cepa patogénica de *R. solanacearum* CIAT 1008 y como testigo negativo se inoculó agua estéril. Las plantas inoculadas permanecieron bajo condiciones controladas de temperatura entre 24° C y 29° C, luminosidad con 13 horas de luz aproximadamente y humedad relativa de 80 a 91% los primeros cuatro días; posteriormente se redujo la humidificación a una hora diaria.

Las evaluaciones de severidad se realizaron teniendo en cuenta el desarrollo de los síntomas de marchitamiento, con los cuales se definió una escala visual de 1 a 5, siendo 1 planta con una hoja marchita y 5 plantas con cinco hojas marchitas. Para esto se realizaron evaluaciones diarias durante 18 días, a partir del cuarto día, observando la aparición de síntomas como flacidez en las hojas, marchitamiento y estancamiento del crecimiento. Con esta información se calculó el Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE). En trabajos preliminares realizados por CIAT (sin reportar) se encontró que a partir del quinto día es posible evidenciar síntomas de la enfermedad como flacidez y/o marchitamiento de las hojas.

Prueba de hipersensibilidad

Se probó la capacidad de las cepas para inducir reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). A partir de cultivos puros se preparó una suspensión en agua deionizada estéril, utilizando colonias con un tiempo de 24 horas de incubación en agar nutritivo, cuya absorbancia fue de 0,1 con una longitud de onda de 600 nm, correspondiente a una concentración de aproximadamente 1 x 10⁸ ufc.ml⁻¹ (He *et al*, 1983). En esta prueba se usaron plantas de tabaco de ocho semanas de edad, las cuales se inocularon mediante infiltración de la suspensión bacteriana, inyectando con jeringa de 1 ml en las nervaduras localizadas en el envés de las hojas, permitiendo la distribución de la suspensión en el parénquima de empalizada.

Se inocularon dos hojas por cada planta y dos plantas por cada cepa. La reacción fue evaluada a las 16 horas después de la inoculación, observando clorosis en las células afectadas del parénquima y humedad en el tejido limitado por un borde definido del tejido no inoculado. Entre las siguientes 36 y 60 horas se evidenció que el área de la hoja infiltrada se vuelve necrótica y seca, debido a la pérdida de agua. Finalmente el área afectada se tornó delgada, blanca y translúcida. Síntomas de hipersensibilidad correspondientes a la raza 2 de *R. Solanacearum*. (Lozano y Sequeira, 1970).

Análisis de datos

Se hizo análisis de varianza a la variable ABCPE y prueba de separación de medias por Diferencia Mínima Significativa (DMS, $\alpha = 5\%$), para separar las cepas en grupos de acuerdo a su patogenicidad (Tabla 1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de *R. solanacearum*

A partir de muestras procedentes de seis regiones de Colombia de suelo de cultivos de plátano con Moko y de tejido de plantas de plátano, banano y heliconias afectadas, se seleccionaron 189 cepas de bacterias consideradas inicialmente como *R. solanacearum* por su crecimiento en medio semi-selectivo SMSA, similar al crecimiento del control CIAT 1008, observadas 48 horas después de incubación a 28° C; en este medio se redujo el crecimiento de bacterias saprófitas.

Análisis mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP)

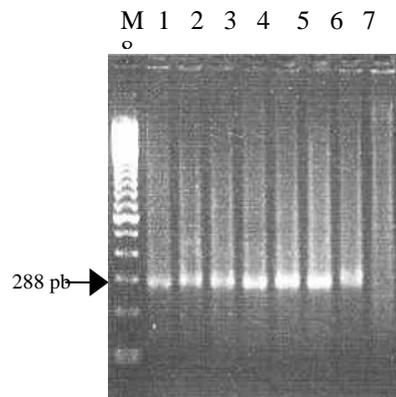


Figura 1. Producto de 288 pb amplificado con los cebadores OLI 1 y Y2 en la región 16S rRNA de *Ralstonia solanacearum*, de 288 pb. M= marcador 100 pb, carril 1 a 3= cepas de Quindío; carril 4 a 6= cepas de Urabá; carril 7= CIAT 1008; carril 8= control negativo. En la figura se indica la banda, característica de la bacteria.

En un gel de agarosa al 1,5%, se detectó una banda de peso molecular de 288 pb, fragmento ubicado en el gen 16S rRNA, en 106 de los 189 cepas obtenidas, lo que permitió identificarlos como *R. solanacearum*. (Figura 1).

Determinación de biovars

De acuerdo a su procedencia se seleccionaron 72 cepas (8 de suelo y 64 de tejido). La reacción de cada una de las cepas a los azúcares y alcoholes evaluados, indicó que todos las cepas caracterizadas pertenecen al biovar 1, porque no utilizan ninguno de los tres azúcares, ni oxidan los tres alcoholes hexosa de las pruebas bioquímicas realizadas.

Prueba de patogenicidad y confirmación de Raza 2

La reacción de hipersensibilidad obtenida en hojas de tabaco indicó que 63 de las 72 cepas causaron una reacción típica de hipersensibi-

lidad en hojas de tabaco, 48 horas después de la inoculación, mientras que las 9 cepas restantes indujeron amarillamiento, reacción de hipersensibilidad atípica para esta raza (Figura 2). Ocho cepas que mostraron reacción atípica de hipersensibilidad, se obtuvieron de la costa atlántica.

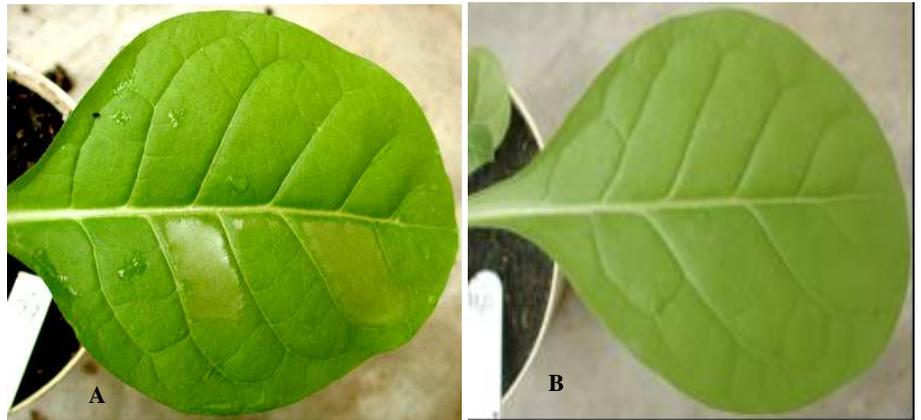


Figura 2. A. Reacción típica de hipersensibilidad en hoja de tabaco, 48 horas después de inoculado con la cepa 79 de *R. solanacearum* Raza 2. B. Control inoculado con agua destilada estéril.



Figura 3. Plantas de plátano inoculadas en elseudotallo, bajo condiciones de invernadero:

A. Control inoculado con agua.

B. Marchitamiento y amarillamiento de las hojas causado por la cepa 85 de *R. solanacearum* raza 2.

Setenta y un cepas fueron patogénicas al inocularlas en plantas de plátano, confirmando que pertenecen a la raza 2. Sólo una cepa de Urabá no fue patogénica (Figura 3). La prueba de separación de medias, estimada mediante DMS ($\alpha = 5\%$), permitió agrupar las cepas en tres categorías de acuerdo a su patogenicidad (ABCPE). Las cepas de patogenicidad alta indujeron en la planta valores de ABCPE entre 45,13 y 73,38; las cepas de patogenicidad media mostraron valores entre 18,00 y 43,13; mientras que las cepas de patogenicidad baja indujeron valores entre 0 y 15,75 (Tabla 2). Cinco cepas obtenidas de banano fueron moderadamente patogénicas, mientras que las otras dos mostraron patogenicidad alta. Las tres cepas aisladas de heliconia mostraron patogenicidad media. Por su parte, las cepas aisladas de suelo mostraron diferentes grados de patogenicidad. De rizo-

ma y raquis se obtuvieron cepas de mayor patogenicidad que de los otros tejidos. Las cepas no mostraron relación entre patogenicidad y origen geográfico (Tabla2).

CONCLUSIONES

- La técnica de BIO-RCP facilitó la detección del patógeno en suelo y plantas.
- Todas las cepas de *R. Solanacearum* aisladas, corresponden al Biovar 1.
- La patogenicidad de las cepas mostró variación de acuerdo al cultivo y tejido de donde se aisló.

AGRADECIMIENTOS

A los Dres: Ever Vargas, Huber Ancízar S. (ICA, Armenia); Aníbal Tapiero (CORPOICA, Villavicencio) y Luis Carlos Jiménez (SUNISA, Medellín), por el suministro de muestras de suelo y tejido. Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) por la financiación de este proyecto.

Tabla 2. Procedencia y patogenicidad de 72 cepas de *Ralstonia solanacearum* raza 2, aisladas de cultivos de plátano., banano y heliconia

Cepa No	Procedencia			Patogenicidad			Cepa No	Procedencia			Patogenicidad		
	Departamento o Localidad	Cultivo	Fuente	ABCPE ¹	Grupo ²	Hipersen ³		Departamento o Localidad	Cultivo	Fuente	ABCPE ¹	Grupo ²	Hipersen ³
1	Quindío	Pl.	Ra.	18,00	2	+	79	Montenegro (Quindío)	Pl.	Riz	66,88	1	+
2	Quindío	Pl.	Pe.	69,38	1	+	80	Montenegro (Quindío)	Pl.	Seu.	67,88	1	+
3	Quindío	Pl.	Pe.	49,00	1	+	81	Montenegro (Quindío)	Pl.	Fr.	10,88	3	+
4	Urabá (Antioquia)	Ban.	Seu.	43,13	2	-	83	Quindío	Pl.	Fr.	55,00	1	+
5	Urabá (Antioquia)	Ban.	Riz	38,75	2	-	84	Quindío	Pl.	Seu.	61,00	1	+
6	Urabá (Antioquia)	Ban.	Fr.	31,83	2	-	85	Quindío	Pl.	Col.	68,38	1	+
7	Urabá (Antioquia)	Ban.	Fr.	62,17	1	-	86	Calarcá (Quindío)	Pl.	Ra.	59,75	1	+
15	Quindío	Pl.	Sue.	37,63	2	+	88	La Tebaida (Quindío)	Pl.	Riz	61,75	1	+
17	Jamundí (Valle)	Pl.	Sue.	69,50	1	+	89	La Tebaida (Quindío)	Pl.	Seu.	60,38	1	+
18	Jamundí (Valle)	Pl.	Col.	42,50	2	+	90	Montenegro (Quindío)	Pl.	Pe.	19,25	2	-
32	Caquetá	Pl.	Seu.	33,88	2	+	91	Montenegro (Quindío)	Pl.	Ra.	19,38	2	+
33	Caquetá	Pl.	Seu.	40,38	2	+	92	Quimbaya (Quindío)	Pl.	Pe.	63,13	1	+
34	Caquetá	Pl.	Ra.	27,63	2	+	94	Quimbaya (Quindío)	Pl.	Ra.	47,25	1	+
38	Quindío	Pl.	Sue.	59,50	1	+	95	Quimbaya (Quindío)	Pl.	Riz	65,63	1	+
39	Quindío	Pl.	Sue	62,00	1	+	96	Quimbaya (Quindío)	Pl.	Seu.	33,00	2	+
40	Quimbaya (Quindío)	Pl.	Sue.	15,75	3	+	97	Quimbaya (Quindío)	Pl.	Riz	28,63	2	+
41	Quimbaya (Quindío)	Pl.	Sue.	56,25	1	+	98	Quimbaya (Quindío)	Pl.	Ra.	59,50	1	+
42	Fuente de Oro (Meta)	Pl.	Seu.	28,00	2	+	99	Quimbaya (Quindío)	Pl.	Seu.	40,25	2	+
43	Fuente de Oro (Meta)	Pl.	Seu.	20,75	2	+	100	Armenia (Quindío)	Pl.	Col.	71,88	1	+
48	Armenia (Quindío)	Pl.	Fr.	37,13	2	+	101	Armenia (Quindío)	Pl.	Seu.	58,50	1	+
54	Fuente de Oro (Meta)	Pl.	Seu.	36,25	2	+	102	Quimbaya (Quindío)	Pl.	Pe.	1,38	3	+
55	Fuente de oro (Meta)	Pl.	Seu.	55,25	1	+	104	Armenia (Quindío)	Pl.	Fr.	41,25	2	+
57	Fuente de oro (Meta)	Pl.	Seu.	45,63	1	+	106	Armenia (Quindío)	Pl.	Seu.	24,75	2	+
58	Fuente de oro (Meta)	Pl.	Seu.	56,63	1	+	107	Armenia (Quindío)	Pl.	Fr.	68,25	1	+
59	Fuente de oro (Meta)	Pl.	Seu.	0,00	3	+	109	Armenia (Quindío)	Pl.	Pe.	45,13	1	+
60	Fuente de oro (Meta)	Pl.	Seu.	47,25	1	+	110	Magdalena	Ban	Seu.	63,25	1	+
63	Granada (Meta)	Pl.	Seu.	50,69	1	+	111	Magdalena	Ban	Riz	34,38	2	+
64	Granada (Meta)	Pl.	Seu.	46,13	1	+	112	Magdalena	Ban	Col.	29,50	2	-
65	Granada (Meta)	Pl.	Seu.	47,63	1	+	113	Palmira (Valle)	Hel.	Seu.	40,50	2	+
66	Granada (Meta)	Pl.	Seu.	69,75	1	+	114	Palmira (Valle)	Hel.	Riz	40,38	2	+
67	Fuente de oro (Meta)	Pl.	Seu.	41,63	2	+	115	Palmira (Valle)	Hel.	Riz	33,63	2	+
69	Granada (Meta)	Pl.	Seu.	27,00	2	+	160	Quindío	Pl.	Sue.	12,38	3	+
70	Granada (Meta)	Pl.	Seu.	5,75	3	+	161	Quindío	Pl.	Sue.	1,75	3	+
71	Urabá (Antioquia)	Pl.	Riz	21,25	2	-	588	Fuente de Oro (Meta)	Pl.	Pe.	71,25	1	+
72	Urabá (Antioquia)	Pl.	Seu.	10,75	3	-	CIAT 1008 ⁴	Ibagué (Tolima)	Pl.	Sin inf.	65,13	1	+
73	Urabá (Antioquia)	Pl.	Seu.	10,75	3	-							
76	Montenegro (Quindío)	Pl.	Seu.	61,88	1	+	DMS $\alpha=5\%$				28,33		
78	Montenegro (Quindío)	Pl.	Ra.	73,38	1	+							

¹ ABCPE: Área bajo la curva de progreso de la enfermedad, ² Grupo de patogenicidad 1: patogenicidad alta; 2: patogenicidad media; 3: patogenicidad baja ³ +: Reacción de hipersensibilidad típica; -: Reacción atípica de amarillamiento ⁴ Cepa testigo de la colección de CIAT; Pl. = Plátano; Banano = Ban.; Heliconia = Hel. Raquis = Ra.; Pecíolo = Pe.; Seudotallo = Seu. Rizoma = Riz.; Colino = Col.; Fruto = Fr.; Suelo = Sue

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Denny, T. P. Hayward, A. C. 2001. Gram-negative bacteria. en: Schaad, N.W.; Jones, J.B.; Chun, W.(eds.). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathological Society (APS). St Paul, MN, USA. pp 151-173.

Goszczyńska, T. Serfontein, J. J. y Serfontein, S. 2000. Introduction to Practical Phytobacteriology. First edition. Safrinet. Pretoria – South Africa. 83p.

Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseu-*

domonas solanacearum. Annual review of phytopathology. 29: 64-87.

He, L.Y. Sequeira, L. y Kelman, A. 1983. Characteristics of Strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. Plant Disease. 67 (12): 1357-1361.

Ito, S. Ushijima, Y. Fujii, T. Tanaka, S. Kameya-iwaki, M. Yoshiwara, S. y Kishi, F. 1998. Detection of Viable Cells of *Ralstonia solanacearum* in Soil Using a semiselective Medium and PCR technique. Journal of Phytopathology. 146: 379 – 384.

Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium me-

dium. Phytopathology. 44: 693-695.

Lozano, J.C.; Sequeira, L. 1970. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infiltration technique. Phytopathology 60: 833-838

Martins, O. 2000. Polymerase Chain Reaction in the diagnosis of Bacterial Wilt, caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* Georg-August University, Göttingen, Germany. 127 pp.

Seal, S. E. Taghavi, M. Fegan, N. Hayward, A. C. y Fegan, M. 1999. Determination of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* rDNA subgroups by PCR test. Plant Pathology 48: 115 – 120.