

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE  
CAUSAL DEL MOKO DEL PLÁTANO, *Ralstonia solanacearum* RAZA 2,  
PROVENIENTE DE PLANTACIONES AFECTADAS EN COLOMBIA.**

**EDUARDO AUGUSTO GÓMEZ CALVO**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA Y VETERINARIA  
BOGOTÁ D.C.  
5 Diciembre 2005**

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE  
CAUSAL DEL MOKO DEL PLÁTANO, *Ralstonia solanacearum* RAZA 2,  
PROVENIENTE DE PLANTACIONES AFECTADAS EN COLOMBIA.**

**EDUARDO AUGUSTO GÓMEZ CALVO**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial  
Para optar al título de**

**Microbiólogo Agrícola y Veterinario**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA Y VETERINARIO  
Bogotá D.C.  
5 Diciembre 2005**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

### **Artículo 23 de la resolución No 13 de Junio de 1946.**

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL  
AGENTE CAUSAL DEL MOKO DEL PLÁTANO, *Ralstonia solanacearum*  
RAZA 2, PROVENIENTE DE PLANTACIONES AFECTADAS EN  
COLOMBIA.**

**EDUARDO AUGUSTO GÓMEZ CALVO**

**APROBADO**

---

**Elizabeth Álvarez Ph.D.**  
**Directora**

---

**Clemencia Forero de la Rotta M.Sc.**  
**Asesora**

---

**María Ximena Rodríguez**  
**Jurado**

---

**José Salvador Montaña**  
**Jurado**

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL  
 AGENTE CAUSAL DEL MOKO DEL PLÁTANO, *Ralstonia solanacearum*  
 RAZA 2, PROVENIENTE DE PLANTACIONES AFECTADAS EN  
 COLOMBIA.**

**EDUARDO AUGUSTO GÓMEZ CALVO**

**APROBADO**

---

**Angela Umaña Muñoz M.Phil**  
**Decana Académica**

---

**David Gómez M.Sc.**  
**Director de Carrera**

## **DEDICATORIA**

**Dedico este trabajo y mi grado a :**

**Mi Abuelo José de Jesús Gómez Trimiño que contribuyó a mi formación personal y lo tengo muy presente.**

**También lo dedico a mis hijos ;**

**A Andrea Carolina Contreras Proaño el amor de mi vida, por todo lo felices que somos y seremos.**

**Y a mí Eduardo Augusto Gómez Calvo.**

## AGRADECIMIENTOS

A mi Mamá Inirida Calvo Rincón, Hermano William Felipe Gómez Calvo y Tía Ana Rita Gómez Benavides por el apoyo recibido.

A Elizabeth Álvarez Jefe de Patología de Yuca del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), por la oportunidad de trabajar y aprender de ella.

A Germán Alberto Llano el otro duro de este trabajo.

A Andrea Carolina Contreras Proaño y familia, Maria Helena Proaño y Alvaro Contreras

A Clemencia Forero de la Rotta y la Pontificia Universidad Javeriana

Al equipo del laboratorio de patología de Yuca:

Jhon Loke (o)  
Juan Fernando Mejía  
Herney Renguifo  
José Luis Claros  
Zulma Zamora

A mi Papá Luis Augusto Gómez Benavides y al esposo de mi Tía Alberto Vásquez

A todas las personas del CIAT que facilitaron mi vida y ayudaron de alguna forma a que todo fuera más fácil;

María Antonia Henríquez  
Juan Bosco Cuasquer  
Lina María Rodríguez  
Lorena Cortes  
Personal de Biblioteca Olga L. González, Mariano Mejía, y Rommel Durán  
De Cafetería como María, Wilson y Fernando  
De transporte como Felipe  
De Aseo como Onofre Leal  
De Patología de arroz Girlena Aricapa

Además a todo el personal de CIAT que me brindó su desinteresada amabilidad y que lastimosamente no conozco sus nombres

Y a mis amigos casi hermanos de Bogotá con quienes siempre me he divertido.

Lastimosamente, si olvido a alguien no es porque no sea importante solamente se me escapó....

## TABLA DE CONTENIDOS

1.	Introducción.	3
2.	Marco Teórico.	6
2.1.	El Plátano.	6
2.2.	Cultivo de Plátano en el Mundo.	8
3.3.	Cultivo de Plátano en Colombia.	8
2.4	Plagas y Enfermedades más Importantes en el Cultivo de Plátano.	10
2.4.1.	Enfermedades Fungosas	10
2.4.1.1.	Mal de Panamá ó Veta Amarilla.	10
2.4.1.2.	Sigatoka amarilla	11
2.4.1.3.	Sigatoka negra.	11
2.4.2.	Enfermedades Virales.	12
2.4.2.1.	Virus del Rayado del Banano.	12
2.4.2.2.	Virus del Cogollo Racemoso del Banano.	12
2.4.3.	Enfermedades Bacterianas.	13
2.4.3.1.	Enfermedad de Bugtok.	13
2.4.3.2.	Enfermedad de la Mancha Rojiza del Seudotallo del banano enfermedad de sanguínea “Blood Disease”	ó 13
2.4.3.3.	Enfermedad del Moko.	15
2.4.3.4.	Enfermedad del Moko en Colombia.	17
2.5.	<i>Ralstonia solanacearum</i> .	18
2.5.1.	Género <i>Ralstonia</i> .	19
2.5.2.	Caracterización Fenotípica de <i>Ralstonia solanacearum</i> .	19
2.5.3.	Características Fisiológicas.	20
2.5.4.	Características Morfológicas.	21
2.5.5.	Clasificación.	22
2.6.	Razas y Biovares.	23

2.6.1.	Razas.	23
2.6.2.	Biovares.	24
2.7.	Patogenicidad.	25
2.8.	Reacción en Cadena de la Polimerasa.	26
2.9.	BIO-PCR	28
2.10.	Métodos de Aislamiento, Detección e Identificación de <i>Ralstonia solanacearum</i> .	28
2.11.	Medio Semiselectivo Sur África (SMSA).	29
2.12.	Reacción de Hipersensibilidad en Tábaco.	30
2.13.	Modos de Dispersión y Fuentes de Inóculo.	30
2.14.	Manejo de la Enfermedad.	31
3.	Formulación del Problema y Justificación.	32
3.1.	Formulación del Problema.	32
3.2.	Justificación	32
4.	Objetivos.	34
4.1.	Objetivo General.	34
4.2.	Objetivos Específicos.	34
5.	Materiales y Métodos.	35
5.1.	Aislamiento de las cepas de <i>Ralstonia solanacearum</i> .	35
5.1.1.	Obtención de Muestras.	35
5.1.2.	Procesamiento de Muestras de Tejido Vegetal.	39
5.1.3.	Procesamiento de Muestras de Suelo.	42
5.2.	Identificación de la Bacteria.	42
5.2.1.	Prueba de KOH y Oxidasa.	43
5.2.2.	Extracción y Amplificación del ADN mediante PCR.	43
5.3.	Conservación de las Cepas.	44
5.4.	Caracterización Bioquímica de las Cepas de <i>R. solanacearum</i> para	45

	determinar biovares.	
5.5.	Prueba de Hipersensibilidad	47
5.6.	Evaluación de Patogenicidad	49
5.7.	Análisis Estadístico.	51
5.7.1	Análisis de correlación	51
5.7.2	Análisis de Correspondencia Múltiple	51
6.	Resultados.	53
6.1.	Aislamiento e Identificación de las Bacterias.	53
6.2.	Identificación Molecular de <i>Ralstonia solanaceum</i>	56
6.3.	Conservación de las Cepas.	59
6.4.	Determinación de Biovares.	60
6.5.	Reacción de Hipersensibilidad.	62
6.6.	Evaluación de Patogenicidad.	64
6.7.	Análisis Estadístico.	66
6.7.1.	Análisis de correlación	66
6.7.2.	Análisis de correspondencia múltiple	67
7.	Discusión.	71
8.	Conclusiones.	75
9.	Recomendaciones.	77
10.	Referencias.	78
11.	Anexos	85

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Características fisiológicas más importantes.	25
Tabla 2	Cebadores para PCR útiles para <i>R. solanacearum</i> y bacterias cercanamente relacionadas.	30
Tabla 3	Muestras de tejido vegetal y suelo tomadas de cultivos afectados con Moko; según su procedencia por departamento, cultivo y fuente del aislamiento	36
Tabla 4	Caracterización de biovares de <i>Ralstonia solanacearum</i> (Hayward 1964)	46
Tabla 5	Procedencia, origen, cultivo, fuente y reacción de hipersensibilidad (RH) con su respectiva variable numérica.	52
Tabla 6	Cepas de <i>R. solanacearum</i> seleccionadas por su crecimiento en medio SMSA, y reacción de KOH y oxidasa positiva.	54
Tabla 7	Cepas identificadas como <i>R. solanacearum</i> mediante PCR con los cebadores OLI 1 y Y2.	58
Tabla 8	Clasificación de <i>R. solanacearum</i> en biovares, según su habilidad para utilizar disacáridos y oxidar alcoholes hexosa, produciendo ácido para reacción positiva +.	60
Tabla 9	Patogenicidad de 72 cepas de <i>Ralstonia solanacearum</i> raza 2, aisladas de cultivos de plátano, banano y heliconia inoculadas en plantas de plátano variedad 'África' ( <i>Musa</i> cv. AAB).	61
Tabla 10	Grupos obtenidos mediante prueba de separación de medias. DMS ( $\alpha=5\%$ ) para los valores ABCPE.	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Enfermedad del Moko en Colombia.	22
Figura 2	Departamentos de muestreo.	36
Figura 3	Síntomas de la enfermedad.	39
Figura 4	Desinfección de Tejido Vegetal.	40
Figura 5	Procesamiento y siembra de la muestra en medio SMSA.	41
Figura 6	Plantas de tabaco utilizadas en la inoculación.	47
Figura 7	Infiltración de la suspensión bacteriana en el parénquima de empalizada.	48
Figura 8	Plantas de plátano utilizadas en pruebas de patogenicidad.	49
Figura 9	Método de Inoculación en pruebas de patogenicidad.	50
Figura 10	Aislamiento de bacterias en medio SMSA.	53
Figura 11	Producto amplificado mediante PCR, utilizando los cebadores OLI 1 y Y2 en la región 16S ARNr de <i>Ralstonia solanacearum</i> .	57
Figura 12	Producto amplificado mediante PCR, utilizando los cebadores OLI 1 y Y2 en la región 16S ARNr de <i>Ralstonia solanacearum</i> .	57
Figura 13	Colonias características de <i>R. solanacearum</i> identificadas mediante PCR en medio semiselectivo SMSA.	58
Figura 14	Conservación de las cepas - 80 °C.	59
Figura 15	Caracterización bioquímica.	62
Figura 16	Reacción positiva de hipersensibilidad en hoja de tabaco.	63
Figura 17	Reacción negativa de hipersensibilidad en hoja de tabaco.	63
Figura 18	Escala de síntomas.	64
Figura 19	Síntomas de marchitamiento y amarillamiento de las hojas causado <i>R. solanacearum</i> raza 2.	65
Figura 20	Fenograma del Análisis de Correspondencia Múltiple de 73 cepas de <i>R. solanacearum</i>	69
Figura 21	Representación espacial del Análisis de Correspondencia Múltiple de 73 cepas de <i>R. solanacearum</i> .	70

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	. Análisis de varianza para la agresividad de las 72 cepas de <i>R. solanaceum</i> aislados de cultivos de plátano, banano y heliconia en Colombia	85
Anexo 2	Correlación de las variables origen, cultivo, tipo de tejido (fuente), ABCPE y RH, mediante el coeficiente de Spearman.	87
Anexo 3	Resultados del Análisis de Correspondencia Multiple para las variables origen, cultivo, tipo de tejido (fuente), ABCPE y RH.	88

## 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. En la detección de la bacteria se utilizó la técnica de BIO-PCR, la cual consistió en selección de aislamientos en medio semi-selectivo SMSA y posterior amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En el presente trabajo se llevó a cabo el aislamiento e identificación molecular, además de la caracterización bioquímica y patogénica de cepas de *R. solanacearum* y su posible relación con la procedencia. Se dio inicio al aislamiento de las cepas procesando 22 muestras de suelo y 140 de tejido vegetal, provenientes de cultivos afectados en diversas regiones colombianas en los departamentos de Magdalena, Valle del Cauca, Quindío, Antioquia, Caquetá y Meta en Colombia.

La identificación molecular se realizó mediante extracción de ADN mediante lisis por calor a 189 cepas seleccionadas por su crecimiento en SMSA, 29 aisladas de suelo y 160 de tejido, positivas a pruebas de KOH y oxidasa. Mediante la técnica de PCR, usando los cebadores OLI1 y Y2, se amplificó un fragmento de 288 pb del gen 16S ARN ribosomal de *R. solanacearum* en 96 cepas de tejido y 8 de suelo.

Se evaluaron 72 cepas, seleccionadas de acuerdo a su procedencia ocho de suelo, 54 cepas de tejido de plátano, siete de tejido banano y tres de tejido de heliconias, para determinar la reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco, patogenicidad en plántulas de plátano 'África' (*Musa* cv. AAB) y determinación de biovares. La prueba de patogenicidad, mostró que 35 cepas fueron altamente patogénicas, 28 moderadamente patogénicas, 8 tuvieron patogenicidad baja y 1 la cepa 59 aislada de seudotallo de plátano y proveniente del municipio de Fuente de Oro en el Meta 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, 24 horas después de la inoculación. La técnica de BIO-PCR facilitó la detección de células viables del patógeno en suelo y tejido vegetal; las cepas evaluadas 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.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Ralstonia solanacearum* E.F. Smith (Yabucchi *et al.*, 1995 citado por Ito *et al.*, 1998) es el agente causal de una de las principales enfermedades de origen bacterial reportada en el mundo; en numerosos estudios se menciona que es una de las más importante y devastadora para varios cultivos en regiones templadas y tropicales alrededor del mundo (Hayward 1991). Dentro de las especies de importancia económica atacadas por la enfermedad, están algunas pertenecientes a la familia de las musáceas como banano y plátano causando la enfermedad conocida como Moko, Madura Viche o Ereke.

Colombia es un país que ha adquirido un gran desarrollo en el cultivo de plátano, especialmente como resultado de la crisis cafetera y el desarrollo tecnológico a raíz de las investigaciones del ICA (Instituto Colombiano Agropecuario) y CORPOICA (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria). El Moko del plátano reportado desde 1971 en Colombia, 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, en la actualidad continua siendo una seria amenaza en la región, a pesar de que el ICA implementó una campaña de control casi desde el momento de su aparición (Vargas *et al.*, 2002). La enfermedad actualmente continua en aumento a pesar de la divulgación de las medidas preventivas para el manejo de la enfermedad, hasta el punto que el 95 % de los predios plataneros tiene como mínimo una planta con Moko (Galindo, información personal 2004).

Los avances obtenidos con las técnicas de identificación y caracterización de *R. solanacearum* en los últimos años, especialmente a través de métodos moleculares, han contribuido a aumentar los conocimientos sobre los aspectos evolutivos de este patógeno (Seal y Elphinstone, 1994; Cook y Sequeira, 1994; Martins 2000). Aunque *R. solanacearum* es una bacteria que ataca un amplio rango de especies, la dificultad para desarrollar estrategias de control de la enfermedad ha sido atribuida en gran parte a la falta de conocimientos básicos sobre la ecología y evolución de este patógeno (Cook y Sequeira, 1994).

Las cepas de *R. solanacearum* difieren en el rango de hospedantes que ataca, su distribución geográfica, patogenicidad, relaciones epidemiológicas y propiedades fisiológicas (Hayward 1991). Durante las últimas tres décadas han sido utilizadas las razas y los biovares como una clasificación informal a nivel subespecífico la cual no se rige por el Código de Nomenclatura de Bacterias (Hayward 1991).

La raza 1 (biovares 1, 3 o 4) afecta a una amplia gama de solanáceas que incluyen a la papa y varias malezas, aunque algunas cepas pueden afectar tabaco, maní, el jengibre y al plátano diploide; es común en las regiones bajas así como en los trópicos y subtrópicos. La raza 2 (biovares 1 y 3) está limitada a musáceas como plátano, banano y heliconias. La raza 3 (biovar 2) es considerada específica de batata y está asociada con algunas solanáceas, entre estas papa. La raza 4 (biovar 4) ataca jengibre y la raza 5 mora (Hayward 1991).

Para el aislamiento de células viables de *R. solanacearum* se utiliza el medio semiselectivo Sur África (SMSA, por sus siglas en inglés) (Englebrecht 1994, Elphinstone *et al.*, 1996 citados por Martins 2000; Denny y Hayward, 2001) el cual ha demostrado alta sensibilidad y especificidad comparado con el medio cloro trifetil tetrazolio (TTC, por sus siglas en inglés) (Kelman 1954).

Las colonias de *R. solanacearum* en el medio SMSA son fluidas, con bordes irregulares y mucoides formando un remolino rojo en el centro, clasificadas como un tipo virulento y de apariencia similar en el medio TTC (Kelman 1954). Por otro lado, el tipo de colonias avirulentas son secas, más pequeñas y de forma redonda. Es fácil distinguir las colonias fluidas de las secas en SMSA.

La técnica BIO-PCR desarrollada por Schaad *et al.* (1995) parece resolver los problemas para detectar células viables de *R. solanacearum* en suelo; en esta técnica, el cultivo de bacterias en agar previo a la PCR, provee beneficios de amplificación biológica para el ADN, por lo que la combinación de un medio selectivo para la propagación de células viables de *R. solanacearum* y PCR para amplificar fragmentos específicos de su ADN puede mejorar la eficiencia de la detección de células viables de este patógeno (Opina *et al.*, 1997 citado por Ito *et al.*, 1998).

En este trabajo se adoptó la técnica de BIO-PCR utilizando el medio semiselectivo SMSA en la detección de células viables de *R. solanacearum*. Mediante inoculación en plantas de plátano y reacción de hipersensibilidad en tabaco se identificaron las cepas pertenecientes a raza 2, además se evaluó su agresividad y además se determinó mediante pruebas bioquímicas el biovar correspondiente.

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1. EL PLÁTANO

El plátano es una fruta tropical originada en el suroeste asiático, perteneciente a la familia de las musáceas. Las dos especies más conocidas en nuestro medio son: *Musa paradisiaca* que corresponde al plátano para cocción, y la *Musa sapientum* o banano. (Roldán *et al.*, 2002).

### MORFOLOGÍA Y TAXONOMÍA

**Familia:** Musáceas (Infoagro 2005).

**Especie:** *Musa cavendishii* (plátanos comestibles cuando están crudos) y *M. paradisiaca* (plátanos machos o para cocción) (Infoagro 2005).

**Origen:** Tiene su origen en Asia meridional, siendo conocida en el Mediterráneo desde el año 650, llegó a Canarias en el siglo XV y desde allí fue llevada a América en el año 1.516. El cultivo comercial se inició en Canarias a finales del siglo XIX y principios del siglo XX (Infoagro 2005).

**Planta:** Herbácea perenne gigante, con rizoma corto y tallo aparente, que resulta de la unión de las vainas foliares, cónico y de 3.5-7.5 m de altura, terminado en una corona de hojas (Infoagro 2005).

**Hojas:** Muy grandes y dispuestas en forma de espiral, de 2-4 m. de largo y hasta de medio metro de ancho, con un pecíolo de 1 m o más de longitud y limbo elíptico alargado, ligeramente decurrente hacia el pecíolo, un poco ondulado y glabro. De la corona de hojas sale durante la floración, un escapo pubescente de 5-6 cm. de diámetro, terminado por un racimo colgante de 1-2 m de largo. Éste lleva brácteas ovales alargadas, agudas, de color rojo púrpura, cubiertas de un polvillo blanco harinoso; de las axilas de estas brácteas nacen a su vez las flores (Infoagro 2005).

**Tallo:** El verdadero tallo es un rizoma grande, almidonoso, subterráneo, que está coronado con yemas; éstas se desarrollan una vez que la planta ha florecido y fructificado. A medida que cada chupón del rizoma alcanza la madurez, su yema terminal se convierte en una inflorescencia al ser empujada hacia arriba desde el interior del suelo por el alargamiento del tallo, hasta que emerge arriba del seudotallo (Infoagro 2005).

**Flores:** Flores amarillentas, irregulares y con seis estambres, de los cuales uno es estéril, reducido a estaminodio petaloideo. El gineceo tiene tres pistilos, con ovario ínfero. El conjunto de la inflorescencia constituye el “régimen” de la platanera. Cada grupo de flores reunidas en cada bráctea forma una reunión de frutos llamada “mano”, que contiene de 3 a 20 frutos. Un régimen no puede llevar más de 4 manos, excepto en las variedades muy fructíferas, que pueden contar con 12-14 (Infoagro 2005).

**Fruto:** Oblongo; durante el desarrollo del fruto éstos se inclina geotrópicamente, según el peso de este, el cual hace doblar el pedúnculo se doble. Esta reacción determina la forma del racimo. Los plátanos son polimórficos, pudiendo contener de 5-20 manos, cada una con 2-20 frutos; siendo de color amarillo verdoso, amarillo, amarillo-rojizo o rojo (Infoagro 2005).

La mayoría de los frutos de la familia de las Musáceas comestibles son estériles, debido a un complejo de causas, entre otras, a genes específicos de esterilidad femenina, triploidía y cambios estructurales cromosómicos, en distintos grados (Infoagro 2005).

## **2.2. CULTIVO DE PLÁTANO EN EL MUNDO**

En el año de 1999 el área mundial de plátano alcanzó 4.8 millones de hectáreas sembradas, con 30.6 millones de toneladas. Las regiones más productoras en el mundo por razones agro-climáticas son África y América Latina, participando con el 74.2% y 22.5% de la producción mundial respectivamente y por último está el continente Asiático con 3.3% (Rodríguez y Rodríguez, 2001).

Los cuatro países de mayor producción en el continente Africano en su orden son Uganda, Ruanda, Ghana y Nigeria; por América Latina y el Caribe están Colombia y Perú; por

último, en el continente Asiático está Sri Lanka. Colombia aporta el 39.1% de la producción de América Latina y el Caribe y en el ámbito mundial participa con el 8.8%, con un comportamiento relativamente estable en los últimos ocho años, (Rodríguez y Rodríguez, 2001).

Entre 1992 y 1998 el rendimiento promedio pasó de 7.2 a 6.8 ton/ha, que representa una reducción promedio anual de 0.8%, debido a enfermedades como la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y Amarilla (*Mycosphaerella musicola* Leach), que constituyen una amenaza importante para los cultivos de plátano y banano en el mundo (Herrera y Aristizábal, 2003).

### **2.3. CULTIVO DE PLÁTANO EN COLOMBIA**

El cultivo del plátano (*Musa* AAB) en Colombia se ha constituido en un renglón de gran importancia socioeconómica, desde el punto de vista de generación de empleo y seguridad alimentaria, donde según la Corporación Colombia Internacional el consumo en fresco, para el año 1999 se estimó en 62 Kg/persona/año, uno de los más altos del mundo. Dentro del sector agropecuario, el plátano se cultiva en 400.000 ha, con una producción de 2.970.000 toneladas/año, de las cuales el país consume el 96% y exporta el 4%, ocupando el quinto lugar en exportaciones después del café, caña de azúcar y flores. El plátano participa con el 6.8% del total de la producción agrícola del país; además pertenece al sector tradicional de la economía campesina, donde el 87% del área cultivada pertenece a pequeños productores, para quienes es uno de los componentes principales de la dieta alimenticia. El plátano se encuentra como cultivo tradicional asociado con cacao, yuca, frutales y es utilizado fundamentalmente como sombrío del café, mientras que 13% se encuentra como monocultivo tecnificado (Rodríguez y Rodríguez, 2001).

En Colombia se cultivan variedades adaptadas a un rango de temperatura entre 17 y 35° C y a varios pisos térmicos, entre las que se destacan Hartón (*Musa* CV. AAB), la más adaptada y productiva, cultivada entre 0 y 1000 m.s.n.m., encontrándose en regiones naturales de importancia en el Caribe, Orinoquía, litoral Pacífico y Amazonía; la Dominico Hartón (*Musa* CV. AAB), cultivada entre 1000 y 1400 m.s.n.m. es la más común en la zona cafetera central de la Región Andina donde se encuentran los principales

centros productores con 231.000 ha (64% del área cultivada) que aportan 67% de la producción nacional y Dominico (Musa CV. AAB) cultivada entre 0 y 2000 m.s.n.m.. (Rodríguez y Rodríguez, 2001; Herrera y Aristizábal, 2003).

Los departamentos con mayor área cosechada y producción en el ámbito nacional son: Antioquia, Quindío y Tolima que participan con 14%, 10% y 9% del área en producción respectivamente (Rodríguez y Rodríguez, 2001; Herrera y Aristizábal, 2003).

## **2.4. PLAGAS Y ENFERMEDADES MÁS IMPORTANTES EN EL CULTIVO DE PLÁTANO**

Se han reportado varias plagas y enfermedades como principales limitantes para la producción de plátano. Las plagas de mayor importancia son:

- † THRIPS (*Hercinothrips femoralis*)
- † COCHINILLA ALGODONOSA (*Dysmicoccus alazon*)
- † ÁCAROS (*Tetranychus telarius*, *Tetranychus urticae*)
- † TALADRO O TRAZA (*Hieroxestis subcervinella*)
- † BARRENADOR DE LA RAÍZ DEL PLÁTANO (*Cosmopolitas sordidus*)
- † NEMATODOS (*Pratylenchus*, *Helicotylenchus*, *Meloidogyne*)  
(Infoagro 2005).

### **2.4.1. ENFERMEDADES FUNGOSAS**

#### **2.4.1.1. MAL DE PANAMÁ O “VETA AMARILLA”**

Es considerada la enfermedad más grave que afecta a la platanera y es causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Las principales variedades comerciales, especialmente la “Gross Michel”, son atacadas por *Fusarium*. La variedad cultivada en Canarias, la “Pequeña Enana” se considera como altamente resistente al hongo, aunque esa resistencia interna es sólo relativa, viéndose disminuida por factores adversos del

medio, tales como frío, suelos de textura arcillosa, mal drenaje y empleo de aguas salinas en el riego (Infoagro 2005).

La infección se produce cuando el patógeno penetra las raíces de la planta y los síntomas se inician con el amarillamiento en los bordes de las hojas viejas, extendiéndose la invasión por los vasos del xilema a las más jóvenes, las cuales colapsan gradualmente en el pecíolo y cuelgan muertas alrededor delseudotallo (Moore *et al.*, 1995; Kangire y Rutherford, 2001)

#### **2.4.1.2. SIGATOKA AMARILLA**

El agente causal es el hongo *Mycosphaerella musicola*, cuya forma imperfecta es *Cercospora musae*, es una enfermedad menos severa que el Mal de Panamá, ya que solo ataca los limbos de las hojas. Las esporas (ascosporas, conidias) germinan en la superficie de la hoja y el micelio penetra por una abertura estomática. El primer síntoma aparece en el limbo como una franjita decolorada, paralela a la venación secundaria, seguido por una mancha ovalada de color gris en el centro y amarillo oscuro hacia el exterior, por último la abundancia de manchas origina la desecación de la lamina foliar (OIRSA 2001).

#### **2.4.1.3. SIGATOKA NEGRA**

Causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* fue descubierta en Honduras en 1972 y se piensa que es la más agresiva y destructiva de las sigatokas. El primer síntoma de la enfermedad aparece como manchitas de amarillentas a parduscas, del tamaño de la cabeza de un alfiler, en la superficie baja de la hoja. Luego se vuelven rayas parduscas que cuando se expanden y se unen se forma un tejido necrótico de color café, desarrollándose lesiones necróticas oscuras; los tejidos infectados producen esporas (conidias y ascosporas) que son liberadas con la lluvia, y el viento se encarga de llevarlas a infectar nuevas hojas. Una infección severa da como resultado una reducción significativa en la producción y calidad del fruto. La mayor parte de los plátanos cultivados no reciben atención alguna, por lo que su rendimiento se ve reducido significativamente (OIRSA 2001).

## **2.4.2. ENFERMEDADES VIRALES**

### **2.4.2.1. VIRUS DEL RAYADO DEL BANANO**

Esta enfermedad es causada por el virus del rayado del banano (BSV), perteneciente al grupo de los “badnavirus”; los síntomas foliares son similares a los ocasionados por el virus del mosaico del pepino (CMV), sin embargo, posteriormente se desarrollan manchas necróticas en las hojas de las plantas afectadas, aunque algunas veces no hay expresión de síntomas (Jones *et al.*, 1993).

Los bananos son las únicas plantas conocidas en las cuales un virus (el Virus del Rayado del Banano) se introduce en el propio ADN del banano, para revelarse en los períodos de estrés, reconstruyéndose y causando la enfermedad. La secuencia del genoma del banano revelaría cómo este virus es capaz de manifestarse cuando la planta está más vulnerable (Jones *et al.*, 1993).

### **2.4.2.2. VIRUS DEL COGOLLO RACEMOSO DEL BANANO**

El cogollo racemoso del banano (BBTD) es la enfermedad viral más importante que ataca plátano y banano en todo el mundo sin ser reportada en América, aunque el áfido vector se encuentra presente en los cultivos. Algunos de los síntomas son hojas angostas, verticales y progresivamente más cortas; el borde de las hojas generalmente se enrolla hacia arriba y muestran un amarillamiento marginal junto con rayas de color verde oscuro en la nervadura central y el pecíolo (Thomas *et al.*, 1994).

## **2.4.3. ENFERMEDADES BACTERIANAS**

### **2.4.3.1. ENFERMEDAD DE BUGTOK**

Causa daños considerables al plátano Pisang Kepok en Filipinas (Eden y Green<sup>b</sup>, 1994; Molina 1999), los síntomas de esta enfermedad son similares a los producidos por la enfermedad del Moko en América Latina, variando de acuerdo a la etapa de crecimiento de la planta y la ruta de infección. Las hojas totalmente extendidas de las plantas, de

cualquier edad muestran un conspicuo amarillamiento transitorio, seguido por pérdida de turgencia, desecación y necrosis total. En las plantas maduras la base del pecíolo se colapsa y las hojas marchitas prenden alrededor del seudotallo; esta infección no siempre es sistémica y algunas veces se producen hijuelos saludables (Eden y Green<sup>b</sup>, 1994).

El análisis reciente del ADN realizado mediante las técnicas RFLP y PCR, ha confirmado que la misma cepa de la bacteria causa ambas enfermedades, el Moko y el Bugtok (Eden y Green<sup>b</sup>, 1994). Las diferencias en la sintomatología se deben a las diferencias en los sistemas de manejo bajo los cuales se producen diferentes variedades. En el caso de la producción de plátano por pequeños agricultores, raramente se practica el deshije, el embolsado de la fruta y la remoción del brote masculino. Además, los brotes masculinos de las variedades de plátano son más dulces y parecen ser más atractivos para los insectos que los brotes masculinos del banano Cavendish, que son más amargos y no son consumidos (Molina 1999).

#### **2.4.3.2. ENFERMEDAD DE LA MANCHA ROJIZA DEL SEUDOTALLO DEL BANANO O ENFERMEDAD SANGUÍNEA “BLOOD DISEASE”**

Es una enfermedad devastadora en los cultivos de banano en Indonesia. Se reportó por primera vez en la región sur de Sulawesi, en Indonesia y luego se propagó a Java Occidental en los años 80. En un primer aislamiento a la bacteria Gram-negativa agente causal de esta enfermedad se le dio el nombre de *Pseudomonas celebensis*. Una de las características observadas de la bacteria fue la producción de colonias no fluidas, más pequeñas y con un desarrollo más lento que las de *R. solanacearum* (Eden y Green<sup>b</sup>, 1994).

Los análisis genéticos realizados mediante los agrupamientos RFLP de todo el genoma, la comparación de secuencias parciales del ADN ribosomal 16s y el análisis de los productos amplificados del “consensus primer” del tRNA, indican que la bacteria que ocasiona esta enfermedad está estrechamente relacionada con *R. solanacearum* pero son diferentes. Razón por la cual se recomienda utilizar como nombre común el de la bacteria de la enfermedad de la mancha rojiza de seudotallo del banano “Blood Disease bacterium”, con

el propósito de distinguir a este patógeno de *R. solanacearum* raza 2, (enfermedad del Moko) las cuales también se presentan en el sureste de Asia (Eden y Green<sup>b</sup>, 1994).

Debido a la similitud con *R. solanacearum* en áreas afectadas por Blood Disease bacterium, las medidas fitosanitarias empleadas para el manejo de la enfermedad del Moko son también efectivas contra este patógeno, particularmente la desinfección de las herramientas de trabajo, el saneamiento de las plantaciones y la selección de material de siembra. Otro medio de transmisión es mediante el material de siembra infectado y por insectos vectores, siendo la causa principal de la rápida diseminación de este patógeno (Eden y Green<sup>a</sup>, 1994).

Tanto la enfermedad sanguínea como la del Moko puede propagarse por las herramientas de trabajo contaminadas, así como en el suelo. Sin embargo las observaciones en el campo indican que los síntomas de la podredumbre de la fruta son más comunes en el Pisang Kepok, demostrando que como en el Bugtok, la inoculación de la enfermedad se produce a través de las flores. Estas conclusiones que son apoyadas por observaciones realizadas en Indonesia, consisten en que un cultivar de tipo Pisang Kepok, no produce brote masculino desarrollado y por consiguiente significativamente es menos afectado por la enfermedad sanguínea. *R. solanacearum* es más sistémica en la infección con Moko, moviéndose en dirección ascendente, en contraste con el movimiento lento hacia abajo de la bacteria en la infección con Bugtok. La infección avanzada en las plantas con frutas también puede causar su pudrición, sin embargo esto raramente ocurre en las plantaciones comerciales, ya que la detección temprana lleva a la eliminación rápida de las plantas infectadas. Sin embargo, si esto ocurre la descomposición de la fruta en la infección con Moko es similar a los síntomas de Bugtok (Molina 1999).

#### **2.4.3.3. ENFERMEDAD DEL MOKO**

Marchitez Bacteriana o Moko es el nombre de la enfermedad que se da para Musáceas, causada por *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* E. F. (Smith) raza 2, la cual induce un marchitamiento que se inicia con el amarillamiento y el colapso de las hojas más jóvenes, así como la necrosis de la hoja candela, estos síntomas progresan hacia las hojas más viejas e internamente los tejidos vasculares se tornan necróticos, especialmente los

localizados cerca de la zona de la zona central del pseudotallo. Las frutas inmaduras de las plantas infectadas muestran color amarillo y pudrición seca de la pulpa formando una cavidad; cuando se presentan infecciones tempranas, o antes de la floración, se produce un desarrollo anormal del racimo y algunas plantas pueden no llegar a producirlos (De Oliveira e Silva 2000).

La enfermedad del Moko puede ser propagada a través del suelo infestado, por contacto de las raíces o transmitida por insectos vectores, siendo el racimo floral el sitio de la infección primaria; subsecuentemente la enfermedad puede incluir síntomas de marchitez y como en el caso de Bugtok para plátano en Filipinas puede ser limitante para el fruto y presentar decoloración vascular localizada (Denny y Hayward, 2001). Estas características asociadas con la falta de cultivares resistentes y tecnología de baja producción convierten la enfermedad del Moko en un problema muy serio para el cultivo de plátano y banano (Molina 1999; De Oliveira e Silva 2000).

La propagación del Moko en una plantación comercial ocurre principalmente por el uso de herramientas de trabajo contaminadas, que comúnmente son utilizadas para el deshoje regular y otras actividades de poda, de aquí que la infección comienza desde las partes basales de la planta. La infección de la fruta es casi inexistente en las plantaciones comerciales, ya que las frutas se embolsan lo que las protege de los insectos. Además, también se remueven los brotes masculinos reduciendo la posibilidad de inoculación por insectos a través de flores masculinas (Molina 1999).

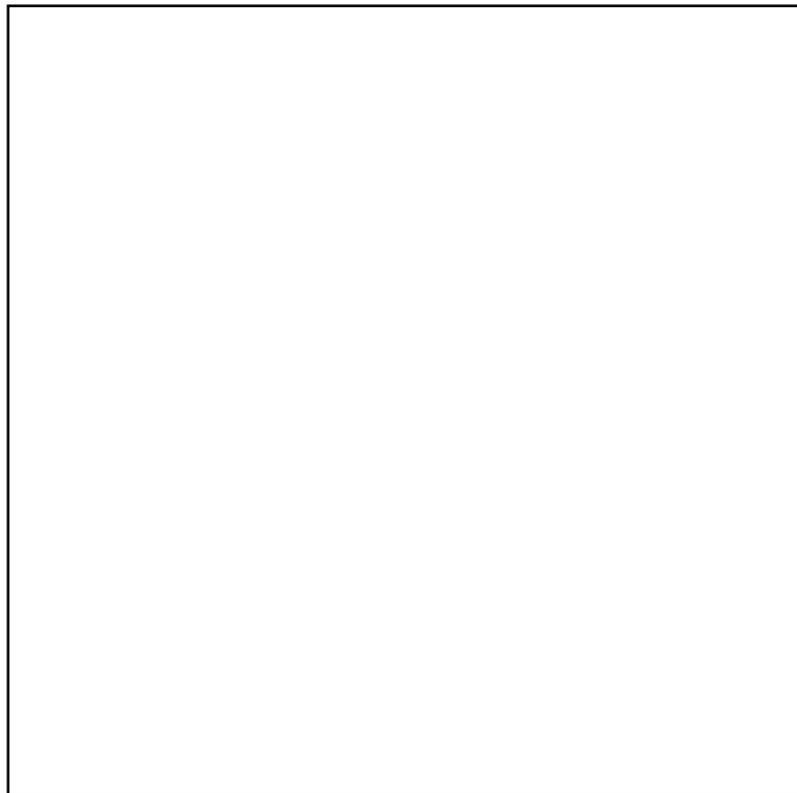
Algunos aspectos de la epidemiología de la marchitez bacteriana como la transmisión de raíz a raíz, movimiento del suelo y diseminación por herramientas de trabajo, y la transmisión por insectos de la enfermedad del Moko en plátano y banano son bien conocidos; otros requieren reinvestigación usando los métodos más sensibles que actualmente están disponibles en la detección del patógeno (Hayward 1991).

En relación con la resistencia del banano al Moko y de acuerdo a los resultados registrados, se conoce que varios genes recesivos deben estar involucrados en su comportamiento, ya que algunos de los cultivares de banano han mostrado diferentes niveles de susceptibilidad (De Oliveira e Silva 2000). Se conoce que el Pelipita (ABB) es

altamente resistente al patógeno, indicando de este modo la resistencia genética como una medida de control viable para la enfermedad, en las regiones donde el cultivo se realiza con tecnología de baja producción (De Oliveira e Silva 2000).

#### **2.4.3.4. ENFERMEDAD DEL MOKO EN COLOMBIA**

Colombia, especialmente el departamento del Quindío, ha adquirido un gran desarrollo en el cultivo de plátano, como resultado de la crisis cafetera y el desarrollo tecnológico a raíz de las investigaciones del ICA (Instituto Colombiano Agropecuario) y CORPOICA (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria); el Moko del plátano se reporta desde 1971 pero actualmente continúa siendo una seria amenaza en la región; a pesar de que el ICA implementó desde el momento de su aparición, una campaña de control, actualmente el problema continúa en aumento (Vargas *et al.*, 2002) (Figura 1).



**Figura 1.** Enfermedad del Moko en Colombia

## 2.5. *Ralstonia solanacearum*

*Ralstonia solanacearum* E.F. Smith (Yabucchi *et al.*, 1995 citado por Ito *et al.*, 1998) es el agente causal de la marchitez bacteriana que afecta varias especies de plantas, alrededor de 50 familias (Ito *et al.*, 1998), entre los hospedantes se incluyen maní, papa, tomate, plátano, tabaco, banano, jengibre, algunas especies de árboles y arbustos de importancia económica, siendo responsable de sustanciales pérdidas económicas en estos cultivos por todo el mundo. Normalmente este patógeno infecta a través de las raíces, se mueve sistémicamente a través del xilema y causa síntomas de marchitez que usualmente son letales (Denny y Hayward, 2001).

*R. solanacearum* es un organismo de tipo cuarentenario; para plantas sospechosas o con síntomas de enfermedad el diagnóstico y certificación de material vegetal libre de este patógeno requiere las pruebas de inmunofluorescencia y patogenicidad. Si la prueba de inmunofluorescencia es positiva, la de patogenicidad debería ser utilizada para confirmar (EPPO 1990).

Varios genes bacterianos de *R. solanacearum* están involucrados en la interacción entre bacterias y plantas hospederas. Dentro de estos pueden ser citados: *hrp* (hypersensitive reaction and pathogenicity), responsable del inicio de síntomas en plantas hospederas y/o desenvolvimiento de la reacción de hipersensibilidad en plantas no hospederas; *dsp* (disease specific) comprende los genes implicados en el desarrollo de la enfermedad en plantas hospederas, y que no están involucrados en la inducción de reacción de hipersensibilidad (HR) en especies no hospederas; *avr* (avirulence reaction) corresponden a genes implicados en el control de la interacción específica entre cultivar y raza, limitando un rango de hospederos (Feng *et al.*, 1992).

Se han identificado varios genes, cuyos productos o acción son requeridos para el desarrollo normal de la enfermedad, siendo el polisacárido extracelular (EPS) el principal factor de virulencia. Enzimas como la endoglucanasa extracelular (Egase), la endopoligaracturonasa (Pgase) y la pectina metil esterasa (PMEase) son consideradas factores de virulencia secundarios, pues actúan en las paredes celulares de las células de la planta, contribuyendo a la expresión mas rápida de los síntomas de la marchitez

bacteriana en plantas hospederas, en su ausencia las plantas infectadas tardarían mas tiempo en morir (Feng *et al.*, 1992).

### **2.5.1. GENERO *Ralstonia***

Las especies del este género son bacilos rectos o levemente curvos de 0.5 - 1.0 x 1.5 - 3.0 µm, no esporulados, móviles por medio de uno o varios flagelos polares, raramente inmóviles, aerobios estrictos, catalasa positiva y quimiorganotrofas. El género posee un gran número de especies, tanto saprófitas como patógenas de humanos, animales y plantas (Agrios 1997).

Las especies fitopatógenas exhiben una enorme diversidad bioquímica y fisiológica, otras producen pigmentos fluorescentes, visibles solo bajo luz ultravioleta (Hayward 1991).

### **2.5.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE *Ralstonia solanacearum***

Estudios que incluyen rango de hospederos del patógeno, morfología de la colonia, análisis bioquímico, fisiología y su caracterización molecular sugieren que esta bacteria es una especie compleja, heterogénea y comprende diversas poblaciones (Hayward 1991, Martins 2000). Otros estudios demuestran la heterogeneidad de este organismo a nivel subespecífico, como la diferencia en la versatilidad nutricional entre los biovares 1, 2, 3 y 4, formando grupos distintos a través de taxonomía numérica (Engelbrecht 1989), además producción de diferentes patrones electroforéticos en proteínas de la membrana (Dristig *et al.*, 1990).

### **2.5.3. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS**

En bacterias, las características morfológicas son de poco valor taxonómico, porque no proporcionan suficiente información, razón por la cual las bacterias son distinguibles por sus características fisiológicas y bioquímicas (Tabla 1).

*R. solanacearum* no crece a más de 40° C, reduce nitrato y dependiendo del biovar, puede producir ácido a partir de disacáridos y oxida alcoholes hexosa (Goszczyńska *et al.*, 2000).

Las colonias no son fluorescentes pero se puede presentar un pigmento café difusible en medios complejos (Denny y Hayward, 2001).

**Tabla 1.** Características fisiológicas más importantes de *R. solanacearum* Goszczyńska et al., 2000).

PRUEBA	REACCIÓN
Coloración de Gram	-
Gránulos de Poly-B-hydroxybutirato	+
Prueba de KOH 3%	+
Prueba de oxidación de la glucosa	+
Prueba de oxidasa	+
Tolerancia a soluciones de NaCl al 0.5%	-
Tolerancia a soluciones de NaCl al 2%	-
Tolerancia a soluciones de NaCl al 4%	-
Prueba de Catalasa	+
Prueba hidrólisis o licuefacción de gelatina	-
Prueba Simmons citrato	+
Prueba hidrólisis de almidón	-
Prueba reducción de nitratos	+
Arginina dihidrolasa	+

#### 2.5.4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

*R. solanacearum* es un bacilo móvil de 0.5 – 0.7  $\mu\text{m}$  x 1.5 – 2.5  $\mu\text{m}$  con uno o cuatro flagelos polares cuando se presentan, pero la motilidad (y posible flagelación) de las cepas varía con el tipo de colonia y edad del cultivo (Agrios 1997).

Kelman (1954), menciona que en cuanto a morfología pueden ser observadas dos clases de colonias: una es fluida (mucoide) debido a su abundante producción de polisacárido extracelular (EPS), lisa, irregular y redonda; mientras que la otra es una colonia mutante de apariencia seca, redonda, translúcida, rugosa y no fluida. En un medio que contenga tetrazolio, las colonias normales virulentas son lisas, fluidas, irregulares, blancas o levemente rojas en el centro de la colonia y las mutantes avirulentas son completamente

opuestas. Las diferencias entre los tipos de colonias y niveles de virulencia están relacionados con la presencia y cantidad del mucopolisacárido extracelular que produce la bacteria (Kelman 1965). Este patógeno presenta gran variación en la mayoría de las cepas y pierde fácilmente patogenicidad si se almacena en un medio de cultivo; su tasa de mutación a un tipo avirulento puede ser muy rápido, fenómeno que está relacionado con la variación de la colonia (French *et al.*, 1995).

En medio líquido complejo, las cepas mucoides tienen los mayores porcentajes de células móviles cuando los cultivos han crecido a una concentración de  $1 \times 10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup>; sin embargo los cultivos en fase estacionaria tienen muy pocas células móviles. Las células son inicialmente inmóviles, pero comúnmente adquieren motilidad después de estar en medio de cultivo fresco por un espacio de tiempo entre 4 y 6 horas (Denny y Hayward, 2001).

### **2.5.5. CLASIFICACIÓN**

Desde el principio *R. solanacearum* fue categorizada como una *Pseudomonas* no fluorescente pero luego fue asignada al género *Burkholderia* (He *et al.*, 1983) al evidenciar completamente que no está relacionada con *Pseudomonas* fluorescentes. En 1992, Yabuuchi *et al.* (1995) transfirieron siete especies de bacterias al grupo II de homología del ARNr, incluyendo a *P. solanacearum*, mientras que las *Pseudomonas* fluorescentes están en el grupo I de homología del ARNr.

Luego en menos de tres años el mismo grupo de trabajo la reclasificó con base en los datos de análisis filogenético de la secuencia de nucleótidos del gen 16S ARNr, hibridización del ARNr -ADN, análisis de lípidos celulares o de ácidos grasos y las características fenotípicas dentro del mismo grupo, pero en un nuevo género, *Ralstonia* donde reubicaron las especies *R. solanacearum*, *Ralstonia pickettii* y *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*); en este nuevo contexto, el género *Pseudomonas* pasó a ser exclusivamente de las especies fluorescentes (grupo I) y las fitopatógenas no fluorescentes *Acidovorax* al grupo III y *Burkholderia* al grupo II. (Yabuuchi *et al.*, 1992; Yabuuchi *et al.*, 1995 citado por Denny y Hayward, 2001).

A diferencia de la especies de *Burkholderia*, los ácidos grasos de *Ralstonia* carecen de lípidos de ornitina OL-1 y OL-2, y menos del 1% del total de los ácidos grasos es ácido ciclopropanoico (Denny y Hayward, 2001). También de acuerdo con el análisis de secuencia del fragmento 16S del ARN ribosomal, se ha determinado que *R. solanacearum* es miembro de la beta-subdivisión de la clase proteobacteria (Hayward 1991).

Aunque filogenéticamente y en propiedades quimiotaxonómicas las especies de *Ralstonia* son similares, difieren marcadamente en patogenicidad, rango de hospederos y otras propiedades fenotípicas. *R. pickettii* ha sido aislada de fuentes de clínica humana y medioambientales, entre estas están: soluciones de terapia respiratoria, agua deionizada y desinfectantes acuosos; también es capaz de crecer intracelularmente en la ameba de vida libre *Acanthamoeba* spp. *R. pickettii* tiene importancia debido a que ha sido aislada de plantas y material del suelo y fenotípicamente es similar a *R. solanacearum* biovar 3 (Denny y Hayward, 2001).

A pesar de que las cepas de *R. solanacearum* difieren en el rango de hospederos, distribución geográfica, patogenicidad, relaciones epidemiológicas y propiedades fisiológicas (Hayward 1991), 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 (Hayward 1991).

## **2.6. RAZAS Y BIOVARES**

*R. solanacearum* es muy heterogénea y teniendo en cuenta su patogenicidad ha sido clasificada en razas, basados en el rango de hospederos y los diferentes biovares que se han identificado con base en las características fisiológicas; la raza 1 corresponde a los biovares 1, 3 o 4, la raza 2 a los biovares 1 o 3, la raza 3 al biovar 2 y la raza 4 al biovar 4. Entre cada una de estas razas y biovares hay numerosos subtipos que pueden ser asociados con una localización geográfica en particular (He *et al.*, 1983).

### 2.6.1. RAZAS

*R. solanacearum* ha sido dividida en cinco razas basándose en el rango de hospederos del patógeno. La raza 1 afecta un amplio rango de hospederos que incluye papa, tomate, tabaco, bananos diploides, maní, jengibre, olivo y muchas semillas particularmente de solanáceas. La raza 2 está limitada a musáceas causando marchitez bacteriana de bananos triploides (enfermedad del Moko) y heliconias. La raza 3 afecta papa y tomate particularmente en ambientes fríos, pero no es altamente virulenta en otros cultivos de solanáceas (Goszczyńska *et al.*, 2000). Los primeros en mostrar especificidad de hospedero para ciertos aislamientos pudiendo justificar la separación de las cepas fueron Quinon *et al.* (1964), posteriormente Yu *et al.* (2003) clasificaron las de jengibre en la raza 4 y las cepas de mora como raza 5.

### 2.6.2. BIOVARES

Existen medios especializados para clasificar *R. solanacearum* dentro de biovares junto con un amplio rango de hospederos, para establecer la clasificación de esta bacteria (French *et al.*, 1995). Cada uno de los seis biovares de *R. solanacearum* pueden ser diferenciados basándose en su habilidad y en diferencias para producir ácido a partir de tres disacáridos (maltosa, lactosa y celobiosa) y la oxidación de tres alcoholes hexosa (manitol, dulcitol y sorbitol) (Denny y Hayward, 2001) Tabla 2.

Recientemente se identificó una variación del biovar 2 (N2 o 2T), denominado ahora como el biovar 6 (Denny y Hayward, 2001), esta nueva subdivisión del biovar 2 se realiza con pruebas adicionales usando los azúcares D-ribosa, trehalosa, y *meso*-inositol como fuentes de carbono. La marchitez bacteriana de papa en regiones tropicales y subtropicales es causada por cepas biovar 2 (raza 3) con un fenotipo D-ribosa negativo, trehalosa negativo, y *meso*-inositol positivo. Este fenotipo es RFLP grupo 26 en la clasificación de Cook *et al.* (1994), sin embargo un fenotipo distinto de biovar 2: D-ribosa negativo, trehalosa positivo y *meso*-inositol negativo, aparece en partes de Chile y Colombia y corresponde al RFLP grupo 27; muchos de estos aislamientos no producen nitritos a partir de nitratos, que es una propiedad universal entre otras cepas de biovar 2. Un tercer fenotipo de biovar 2, que aparece principalmente en Perú y Brasil es D-ribosa positivo,

trehalosa positivo y meso-inositol positivo. Este fenotipo fue nombrado como biovar N2 o biovar 2T (Denny y Hayward, 2001).

Se conoce que en Australia los biovars 3 y 4 de *R. solanacearum* pueden atacar jengibre, pero sólo las cepas pertenecientes al biovar 4 son altamente virulentas y destructivas; sin embargo, cepas del biovar 3 provenientes de Kerala en India son altamente agresivas y marchitan plantas de jengibre en un periodo de 4 a 6 días, mientras que las cepas menos agresivas tardaban 10 días en expresar síntomas (Yu *et al.*, 2003).

## **2.7. PATOGENICIDAD**

La realización y determinación de la patogenicidad es un paso muy importante en la identificación de bacterias fitopatógenas. Las pruebas de patogenicidad no están estandarizadas y dependen de la relación entre el hospedero y el patógeno (Goszczyńska *et al.*, 2000).

Debido a que existen dificultades para verificar todas las características de una bacteria y diferenciar entre especies, algunos grupos de bacterias fitopatógenas sólo pueden ser diferenciadas por su patogenicidad en plantas, ya que sólo atacan determinadas especies de plantas como ejemplo *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, patógena únicamente de tomate. Esto se debe a que algunas como *R. solanacearum* son muy restringidas en cuanto a su rango de hospederos, mientras que en otras es más amplio (Goszczyńska *et al.*, 2000).

**En este trabajo se tuvo en cuenta la terminología propuesta por Vanderplank (1984) que define virulencia, avirulencia, agresividad y patogenicidad:**

**Virulencia:** Se refiere a la aptitud de la cepa para interactuar con una línea de hospederos compatibles, culminando en la expresión de síntomas típicos de la enfermedad (independientemente de la severidad de esos síntomas).

**Avirulencia:** Hace referencia a la inhabilidad para causar enfermedad en una planta resistente.

Agresividad: Se refiere a la intensidad de los síntomas inducidos por una cepa en particular en un hospedero compatible, puede por consiguiente ser estimada por medir la cinética de desarrollo de enfermedad, por la clasificación de los diferentes tipos de síntomas o por otro rasgo cuantitativo.

Patogenicidad: Se refiere a la potencialidad de una cepa para inducir enfermedad o respuesta de hipersensibilidad (RH), que son dos típicos tipos de interacciones específicas para patógenos de plantas.

De acuerdo con estas definiciones virulencia y agresividad son componentes de la patogenicidad.

## **2.8. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica con innumerables aplicaciones en ciencias biológicas, entre estas se ha aplicado para identificar cepas de *R. solanacearum* (Seal *et al.*, 1999). Una ventaja significativa de la técnica de PCR es el potencial para detectar cantidades muy pequeñas de bacteria en el ambiente. Sin embargo no hay muchos reportes de estudios para la detección de *R. solanacearum* a partir de muestras de suelo con PCR. Una razón de esto es que la técnica de PCR requiere DNA libre de materiales del suelo, particularmente materiales húmicos que inhiben la Taq polimerasa en PCR. Otro problema general con la técnica de PCR es la inhabilidad para diferenciar entre células muertas y células viables, que reviste gran importancia en el diagnóstico de los microorganismos que habitan en el suelo (Ito *et al.*, 1998).

Excepto por la temperatura de apareamiento utilizada, las reacciones de amplificación son similares a la de la mayoría de los protocolos de PCR y varios pares de cebadores han sido reportados para permitir la amplificación de un fragmento específico de *R. solanacearum* y de bacterias muy cercanamente relacionadas, tal como se presenta en la Tabla 2. Aunque muchos cebadores no han sido exhaustivamente estudiados por sensibilidad y especificidad, deben ser utilizados con debida precaución. (Denny y Hayward, 2001).

**Tabla 2.** Cebadores para PCR útiles para identificar *R. solanacearum* y bacterias cercanamente relacionadas.

Primer	Secuencia del Primer (5' a 3')	Temperatura de apareamiento	No de bases amplificadas	Especificidad
Y2	CCCACTGCTGCCTCC CGTAGGAGT	68°C	287-288	<i>R. solanacearum</i> y relacionadas
OLI1	GGGGGTAGCTTGCTA CCTGCC	68°C	287-288	<i>R. solanacearum</i> y relacionadas
759	GTCGCCGTCAACTCA CTTTCC	53°C	281	<i>R. solanacearum</i> y relacionadas
760	GTCGCCGTCAACTCA GCGGAATCG	53°C	281	<i>R. solanacearum</i> y relacionadas
PS96-H	TCACCGAAGCCGAAT CCGCGTCCATCAC	64°C	148	<i>R. solanacearum</i>
PS96-I	AAGGTGTCGTCCAGC TCGAACCCGCC	64°C	148	<i>R. solanacearum</i>
PehA#3	CAGCAGAACCCGCG CCTGATCCAG	70°C	504	<i>R. solanacearum</i>
PehA#6	ATCGGACTTGATGCG CAGGCCGTT	70°C	504	<i>R. solanacearum</i>

(Denny y Hayward, 2001).

## 2.9. BIO-PCR

La combinación de un medio selectivo para la propagación de células viables de *R. solanacearum* y PCR para amplificar fragmentos específicos de su ADN puede mejorar la eficiencia en la detección de células viables de este patógeno en suelo. (Ito *et al.*, 1998; Gómez *et al.* 2005).

Se pueden utilizar medios de cultivo selectivos para aumentar la detección de bajas poblaciones de *R. solanacearum* a partir de muestras de suelo o en material vegetal mediante PCR, con el objetivo de diluir los inhibidores de la PCR y a la vez aumentar la población de la bacteria. Esta técnica se denomina “BIO-PCR” se utiliza para detección de

células viables de *R. solanacearum*, utilizando un medio de cultivo selectivo y cebadores específicos usados para la PCR; la técnica desarrollada por Schaad *et al.* (1995) detecta células viables de *R. solanacearum*; de esta manera el cultivo de bacterias en agar previo a la PCR provee beneficios de amplificación biológica para el ADN blanco (Ito *et al.*, 1998).

## **2.10. MÉTODOS DE AISLAMIENTO, DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *Ralstonia solanacearum***

A pesar de que la bacteria *R. solanacearum* se multiplica fácilmente en su hospedero, bajo condiciones *in vitro* se multiplica más lentamente que otras bacterias patógenas y microorganismos saprófitos de plantas y suelo.

El aislamiento de *R. solanacearum* a partir de muestras de plantas sintomáticas y frescas es usualmente fácil, debido a la alta densidad del patógeno en los tejidos. El aislamiento del patógeno a partir de plantas asintomáticas es más difícil debido al bajo número de células viables presentes en los tejidos, al igual que a partir de muestras de suelo, por la presencia de otros microorganismos, muchos de los cuales pueden multiplicarse más rápidamente que *R. solanacearum* (Denny y Hayward, 2001).

Para identificar la bacteria, ésta debe ser primero aislada a partir del tejido vegetal enfermo; el método será determinante junto con el medio de cultivo seleccionado, el cual debe ser de diagnóstico o semiselectivo. Estos medios varían en su complejidad y usualmente contienen antibióticos para la supresión de otros organismos; la preparación algunas veces es complicada y no son usados rutinariamente, como en el caso de patógenos como *Erwinia* spp. y *R. solanacearum* que se recomiendan medios semiselectivos, otro pequeño grupo de microorganismos utilizan fuentes de carbono complejas que usadas adecuadamente por estos exhiben características de diagnóstico (Goszczyńska *et al.*, 2000). En el caso de *R. solanacearum* existen medios especializados para la clasificación dentro de biovars, además del amplio rango de hospederos para establecer la clasificación de la bacteria.

### **2.11. MEDIO SEMISELECTIVO SUR ÁFRICA (SMSA)**

Varios medios semiselectivos han sido descritos para el aislamiento de *R. solanacearum*, aunque no permiten el crecimiento de todas las cepas de la bacteria y no inhiben la presencia de algunas bacterias Gram-negativas. Los medios más conocidos y más utilizados son SM-1, SMSA y una modificación del SMSA. Los medios SMSA y su modificación tienen glicerol. Sin embargo es más favorable el uso de glucosa en lugar de glicerol ya que permite un crecimiento más rápido de *R. solanacearum*, evitando algunos problemas con las bacterias competidoras y antagonistas. En el medio SMSA el tiempo y la temperatura de incubación óptimos son de 48-72 horas a 28° C, en estas condiciones el crecimiento y el tamaño de las colonias es equivalente al de las colonias en medio TTC; en el medio SM-1 las colonias son pequeñas y tardan más tiempo en aparecer (Denny y Hayward, 2001).

### **2.12. REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD EN TABACO**

Cuando una especie vegetal específica es inoculada con bacterias patógenas que afectan especies de plantas diferentes, se activan en forma rápida los mecanismos de defensa de la planta. Algunas de las células en el área invadida mueren, restringiendo la invasión del patógeno para prevenir que se difundan en toda la planta. Esta reacción de hipersensibilidad en plantas ocasionada por algunas bacterias fitopatógenas, es usada como una herramienta de diagnóstico (Goszczyńska *et al.*, 2000).

Las razas de *R. solanacearum* se distinguen por el tipo de reacción de hipersensibilidad obtenida en hojas de tabaco, durante las siguientes 36 - 48 horas de la infiltración con una suspensión bacteriana en hojas de tabaco.

### **2.13. MODOS DE DISPERSIÓN Y FUENTES DE INÓCULO**

Las células bacterianas son capaces de sobrevivir por largos periodos de tiempo en algunos tipos de suelo y bajo ciertas condiciones del clima; aunque las células viables

desaparecen rápidamente en algunos ambientes, las estrategias de manejo integrado para marchitez bacteriana son dependientes de nuestro entendimiento de como el patógeno sobrevive en el suelo (ito *et al.*, 1998).

Algunas evidencias sugieren que la fase epifítica de la bacteria durante su ciclo de vida, puede contribuir a la supervivencia y proveer una fuente de inóculo para renovar las poblaciones del suelo. La persistencia de *r. Solanacearum* en suelo puede ocurrir cuando la bacteria sobrevive en las plantaciones o permanece latente en los residuos de cosecha infectados y/o en la rizosfera de malezas hospederas, además este patógeno puede ser transportado en un amplio rango de material vegetativo de propagación (hayward 1991).

#### **2.14. MANEJO DE LA ENFERMEDAD**

En ausencia de cultivos resistentes, el control de la enfermedad depende de la oportuna detección del patógeno en el suelo y en los materiales de propagación; además de sembrar material de propagación libre de *r. Solanacearum*. La detección es difícil debido a que este patógeno forma parte de un amplio y complejo grupo de cepas que no han sido universalmente detectadas mediante una sola prueba. Sin embargo hoy en día se encuentran disponibles pruebas específicas para la detección e identificación de diferentes poblaciones de *r. Solanacearum*. Un entendimiento de la diversidad del patógeno en fincas a nivel local es esencial para el futuro desarrollo y utilización de métodos de detección apropiados (yu *et al.*, 2003).

### **3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

#### **3.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

En la actualidad Colombia es uno de los mayores países productores de plátano afectado por la enfermedad del moko; debido a esta situación se hace necesario desarrollar e implementar un método eficiente de detección del patógeno. También es indispensable identificar la variabilidad del patógeno en diferentes regiones productoras en cuanto a patogenicidad para implementar estrategias de manejo de la enfermedad.

#### **3.2. JUSTIFICACIÓN**

En Colombia el plátano es un alimento básico de la canasta familiar y su exportación constituye un factor importante en la generación de divisas para la economía nacional. Según reporte de FAO, Colombia figura como el segundo productor mundial de plátano, después de Uganda, alcanzando en el 2003 una producción de 2.925.000 toneladas con una participación de 9,2%, y un rendimiento de 7.7 Tm/Ha. El 86% de la producción es destinada al mercado interno y el 24% a la exportación, siendo el primer exportador mundial de plátano, con un acumulado total de 789,995 toneladas entre 1997 y el 2002 (Roldán *et al.*, 2002). El cultivo de plátano está amenazado por una enfermedad bacteriana vascular que ha devastado zonas productoras de plátano en los Llanos Orientales y Tolima, afectando actualmente importantes áreas productoras del país, generando grandes pérdidas. Esta enfermedad llamada Moko o Marchitez Bacteriana, cuyo agente causal es la bacteria *Ralstonia solanacearum*, es transmitida por insectos y diseminada a través de herramientas de trabajo, agua de riego, residuos de plantas, contacto de las raíces de plantas sanas con las raíces de plantas enfermas y/o suelos contaminados.

En la actualidad la enfermedad se ha venido controlando con poco éxito, debido a la carencia de tecnologías efectivas de manejo y a que no existen variedades de plátano resistentes, además de la falta de entendimiento de este patógeno. Las únicas herramientas de control a disposición de los agricultores son el uso de semilla limpia y algunas otras prácticas de control cultural, por lo que se hace necesario buscar fuentes de resistencia para utilizar en programas de fitomejoramiento.

En Colombia la problemática va más allá de contar con la presencia de la enfermedad, la falta de un método de diagnóstico en campo y el manejo de ésta. Hay que tener en cuenta la variabilidad del patógeno, es una importante razón por la cual el control de la enfermedad no ha tenido el éxito esperado; la diversidad de hospederos en una misma raza o su comportamiento entre diferentes especies dentro de la familia de las musáceas, pueden ser algunos de los factores que influyen, sin tener en cuenta las posibles diferencias genéticas; razón por la que es importante el desarrollo de una investigación que permita determinar la variabilidad del patógeno en las diferentes regiones productoras de Colombia contemplar un análisis de agresividad y patogenicidad de las cepas y seleccionar aquellas con las que en el futuro se evaluará resistencia genética u otros métodos para el manejo de la enfermedad.

Este estudio será base para generar e implementar nuevas estrategias y alternativas efectivas de manejo de la enfermedad, sostenibles y de bajo costo dentro de un programa de manejo integrado de plagas y enfermedades que tengan un impacto favorable al medio ambiente; además será el inicio para futuros proyectos con los que se podría beneficiar una población de aproximadamente 125.000 familias que dependen directamente del cultivo de plátano y banano, junto a agremiaciones o entidades productoras en Colombia, adquiriendo gran importancia, debido a que en la actualidad la enfermedad continúa en aumento a pesar de la divulgación de las actuales medidas preventivas y manejo de la enfermedad.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Mediante la técnica de BIO-PCR identificar cepas de *Ralstonia solanacearum* obtenidas en cultivos de plátano en diferentes regiones de Colombia, y determinar su patogenicidad.

### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar cepas de *R. solanacearum* de suelo y de tejido de plantas enfermas de plátano, mediante la técnica de BIO-PCR.
- Caracterizar bioquímicamente las cepas de *R. solanacearum* para determinar biovares.
- Determinar agresividad y patogenicidad de las cepas de *R. solanacearum* mediante inoculación en plantas de plátano; además se determinarán las pertenecientes a raza 2 junto con la reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco.
- Relacionar patogenicidad, reacción de hipersensibilidad en tabaco y biovares, con el tipo de tejido y origen geográfico de la muestra.
- Conformar una colección con las cepas caracterizadas.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

Los ensayos fueron llevados a cabo en los laboratorios e invernaderos del Programa Patología de Yuca del CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) en Palmira, donde se tuvieron condiciones controladas de temperatura, luminosidad y humedad relativa.

### **5.1. AISLAMIENTO DE LAS CEPAS de *Ralstonia solanacearum***

#### **5.1.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

Se procesaron muestras de diferente tipo de tejido vegetal afectado (seudotallo, raquis, fruto, rizoma y colino), 116 muestras provenientes de plantas de plátano, 18 de banano y 4 de heliconias seleccionadas de plantas con síntomas similares a los de Moko. Las muestras fueron colectadas en algunas fincas productoras afectadas de cuatro regiones naturales, ubicadas en municipios de los departamentos de Valle del Cauca, Cundinamarca, Quindío, Caquetá, Antioquia, Magdalena y Meta en Colombia, regiones en donde la enfermedad se presenta con gran frecuencia no solo en plátano y banano sino también en heliconias, especie también perteneciente a la familia de las musáceas. También se procesaron 22 muestras de suelo, 2 de malezas *Talinum paniculatum* conocida como “lechugilla” y 1 de agua tomadas de sitios cercanos a plantas de plátano afectadas con la enfermedad. (Tabla 3) (Figura 2).



**Figura 2.** Regiones y Departamentos de muestreo. A = Antioquia. C = Casanare. Cu = Cundinamarca. Mg = Magdalena. Mt = Meta. Q = Quindío. V = Valle del Cauca

**Tabla 3.** Muestras de tejido vegetal y suelo tomadas de cultivos afectados con Moko; según su procedencia por departamento , cultivo y fuente del aislamiento

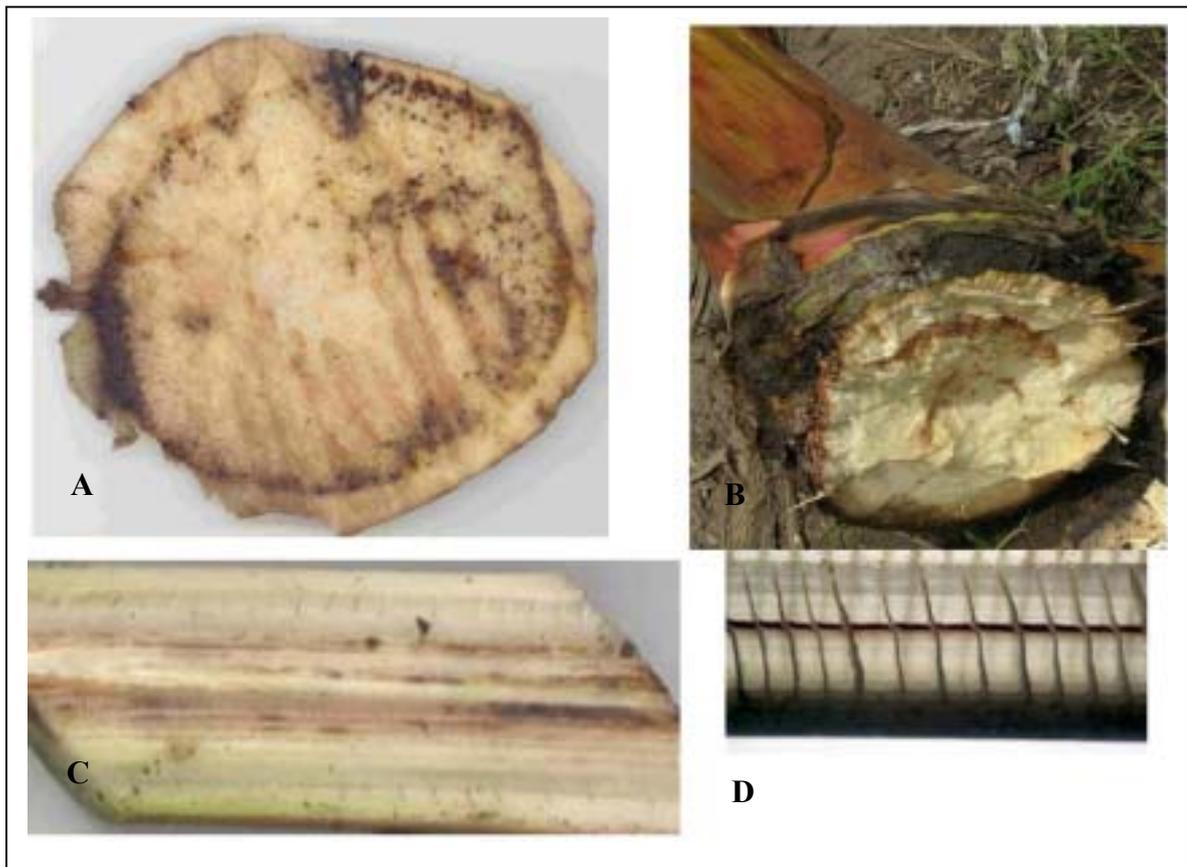
Muestra No.	PROCEDENCIA			Muestra No.	PROCEDENCIA		
	Departamento o Localidad	Cultivo	Fuente		Departamento o Localidad	Cultivo	Fuente
1	Quindío	Banano	Colino	82	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo
2	Quindío	Banano	Seudotallo	83	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo
3	Quindío	Banano	Seudotallo	84	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Rizoma
4	Quindío	Banano	Colino	85	Granada (Meta)	Plátano	Raquis
5	Quindío	Banano	Seudotallo	86	Granada (Meta)	Plátano	Raquis
6	Quindío	Plátano	Colino	87	Granada (Meta)	Plátano	Rizoma
7	Quindío	Plátano	Raquis	88	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
8	Quindío	Plátano	Peciolo	89	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
9	Quindío	Plátano	Seudotallo	90	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
10	Quindío	Plátano	Peciolo	91	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
11	Urabá (Antioquia)	Banano	Seudotallo	92	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo

Muestra No.	PROCEDENCIA			Muestra No.	PROCEDENCIA		
	Departamento o Localidad	Cultivo	Fuente		Departamento o Localidad	Cultivo	Fuente
12	Urabá (Antioquia)	Banano	Rizoma	93	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
13	Urabá (Antioquia)	Banano	Fruto	94	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
14	Urabá (Antioquia)	Banano	Fruto	95	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
15	Urabá (Antioquia)	Banano	Raquis	96	Granada (Meta)	Plátano	Hojas
16	Quindío	Plátano	Suelo	97	Granada (Meta)	Plátano	Peciolo
17	Quindío	Plátano	Suelo	98	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Raquis
18	Quindío	Plátano	Suelo	99	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Rizoma
19	Quindío	Plátano	Suelo	100	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo
20	Quindío	Plátano	Suelo	101	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo
21	Quindío	Plátano	Suelo	102	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
22	Quindío	Plátano	Suelo	103	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
23	Quindío	Plátano	Suelo	104	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
24	Quindío	Plátano	Suelo	105	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
25	Quindío	Plátano	Suelo	106	Urabá (Antioquia)	Plátano	Rizoma
26	Cundinamarca	Plátano	Fruto	107	Urabá (Antioquia)	Plátano	Rizoma
27	Cundinamarca	Plátano	Seudotallo	108	Urabá (Antioquia)	Plátano	Seudotallo
28	Cundinamarca	Plátano	Fruto	109	Urabá (Antioquia)	Plátano	Seudotallo
29	Cundinamarca	Plátano	Seudotallo	110	Urabá (Antioquia)	Plátano	Seudotallo
30	Jamundí (Valle)	Plátano	Suelo	111	Urabá (Antioquia)	Plátano	Seudotallo
31	Jamundí (Valle)	Plátano	Colino	112	Montenegro (Quindío)	Plátano	Seudotallo
32	Quindío	Plátano	Suelo	113	Montenegro (Quindío)	Plátano	Peciolo
33	Quindío	Plátano	Suelo	114	Montenegro (Quindío)	Plátano	Raquis
34	Quindío	Plátano	Suelo	115	Montenegro (Quindío)	Plátano	Rizoma
35	Quindío	Plátano	Suelo	116	Montenegro (Quindío)	Plátano	Seudotallo
36	Quindío	Plátano	Suelo	117	Montenegro (Quindío)	Plátano	Fruto
37	Quindío	Plátano	Suelo	118	Montenegro (Quindío)	Plátano	Fruto
38	Quindío	Plátano	Suelo	119	Montenegro (Quindío)	Plátano	Raquis
39	Quindío	Plátano	Suelo	120	Calarcá (Quindío)	Plátano	Fruto
40	Quindío	Plátano	Suelo	121	Calarcá (Quindío)	Plátano	Seudotallo
41	Quindío	Plátano	Suelo	122	Calarcá (Quindío)	Plátano	Colino
42	Quindío	Banano	Colino	123	Calarcá (Quindío)	Plátano	Raquis
43	Quindío	Plátano	Peciolo	124	La Tebaida (Quindío)	Plátano	Fruto
44	Urabá (Antioquia)	Banano	Raquis	125	La Tebaida (Quindío)	Plátano	Fruto
45	Urabá (Antioquia)	Banano	Raquis	126	La Tebaida (Quindío)	Plátano	Rizoma
46	Urabá (Antioquia)	Banano	Fruto	127	La Tebaida (Quindío)	Plátano	Seudotallo
47	Caquetá	Plátano	Seudotallo	128	Montenegro (Quindío)	Plátano	Seudotallo
48	Caquetá	Plátano	Seudotallo	129	Montenegro (Quindío)	Plátano	Rizoma
49	Caquetá	Plátano	Seudotallo	130	Montenegro (Quindío)	Plátano	Hojas
50	Caquetá	Plátano	Raquis	131	Montenegro (Quindío)	Plátano	Peciolo
51	Granada-Meta	Plátano	Seudotallo	132	Montenegro (Quindío)	Plátano	Colino
52	Granada-Meta	Plátano	Seudotallo	133	Montenegro (Quindío)	Plátano	Seudotallo
53	Granada-Meta	Plátano	Suelo	134	Montenegro (Quindío)	Plátano	Peciolo
54	Granada-Meta	Plátano	Agua	135	Montenegro (Quindío)	Plátano	Raquis
55	Granada-Meta	lechugilla	Tallo	136	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Peciolo
56	Granada-Meta	lechugilla	Tallo	137	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Rizoma
57	Armenia (Quindío)	Plátano	Fruto	138	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Raquis
58	Armenia (Quindío)	Plátano	Seudotallo	139	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Rizoma

Muestra No.	PROCEDENCIA			Muestra No.	PROCEDENCIA		
	Departamento o Localidad	Cultivo	Fuente		Departamento o Localidad	Cultivo	Fuente
59	Armenia (Quindío)	Plátano	Colino	140	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Seudotallo
60	Armenia (Quindío)	Plátano	Fruto	141	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Rizoma
61	Orito-Putumayo	Plátano	Seudotallo	142	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Raquis
62	Orito-Putumayo	Plátano	Seudotallo	143	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Seudotallo
63	Orito-Putumayo	Plátano	Seudotallo	144	Armenia (Quindío)	Plátano	Raquis
64	Orito-Putumayo	Plátano	Fruto	145	Armenia (Quindío)	Plátano	Seudotallo
65	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	146	Armenia (Quindío)	Plátano	Colino
66	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	147	Armenia (Quindío)	Plátano	Seudotallo
67	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	148	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Pecíolo
68	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	149	Armenia (Quindío)	Plátano	Fruto
69	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	150	Armenia (Quindío)	Plátano	Fruto
70	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	151	Armenia (Quindío)	Plátano	Seudotallo
71	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	152	Armenia (Quindío)	Plátano	Seudotallo
72	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	153	Armenia (Quindío)	Plátano	Fruto
73	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Colino	154	Armenia (Quindío)	Plátano	Fruto
74	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Fruto	155	Armenia (Quindío)	Plátano	Pecíolo
75	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	156	Magdalena	Banano	Seudotallo
76	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Pecíolo	157	Magdalena	Banano	Seudotallo
77	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	158	Magdalena	Banano	Rizoma
78	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Raquis	159	Magdalena	Banano	Colino
79	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	160	Palmira (Valle)	Heliconia	Seudotallo
80	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	161	Palmira (Valle)	Heliconia	Seudotallo
81	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	162	Palmira (Valle)	Heliconia	Rizoma
				163	Palmira (Valle)	Heliconia	Rizoma

### 5.1.2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE TEJIDO VEGETAL

Las muestras de diferentes tipos de tejido vegetal afectado fueron seleccionadas de plantas que presentaban los síntomas típicos de la enfermedad (Figura 3), teniendo la precaución de tomar fragmentos que presentaban síntomas iniciales de la enfermedad acompañados de tejido sano, con el fin de disminuir la presencia de microorganismos saprófitos presentes con frecuencia cuando los tejidos se encuentran en un estado avanzados de colonización por la bacteria causante de la enfermedad y que crecen normalmente más rápido que las bacterias patógenas de plantas (Goszczyńska *et al.*,2000).



**Figura 3.** Síntomas de la enfermedad. **A., B.** Corte transversal de Rizoma. **C., D.** Corte de pseudotallo, necrosis en los haces vasculares.

Los fragmentos de tejido afectado fueron lavados con agua deionizada durante 30 minutos, y luego se desinfectaron en hipoclorito de sodio a una concentración del 1 % durante un minuto, posteriormente se enjuagaron con agua deionizada estéril y después fueron sumergidos en etanol al 70% durante un minuto y finalmente fueron enjuagados con agua deionizada estéril para remover residuos de los desinfectantes. Este procedimiento se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar, bajo condiciones asépticas y utilizando material esterilizado a 121° C, 20 lb de presión por 20 a 30 minutos (Figura 4).



**Figura 4.** Desinfección de Tejido Vegetal.

Con el fin de extraer la bacteria presente en el tejido, los fragmentos de tejido desinfectados se maceraron en un mortero, con una solución buffer Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, con pH 7.6 (TE). Esta suspensión se sembró con un asa estéril en cajas Petri en el Medio Semiselectivo SMSA, peptona 10 g/L, glicerol 5 ml/L, casaminoácidos 1 g/L, agar 18 g /L, adicioonando los antibióticos polimixin  $\beta$  sulfato 100 mg/L (600.000U), Bacitracin 25 mg/L (fuente Baneocin®, 36mg/L); penicilina 0.5 mg/L (82,5U), cloranfenicol 5 mg/L, 2,3,5 cloro trifenil tetrazolio 50 mg/L y cristal violeta 5 mg/L (Englebrecht 1994; Elphinstone *et al.*, 1996 citado por Martins 2000 y Denny & Hayward 2001) modificación del medio TTC (Kelman 1954 citado por Denny y Hayward, 2001) (Figura 5)



**Figura 5.** Procesamiento y siembra de la muestra en medio SMSA.

La solución de antibióticos, el cloranfenicol, 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride y el cristal violeta se esterilizaron mediante filtración utilizando filtros Millipore® con tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  acondicionados para su uso en jeringas. Este stock se adicionó bajo condiciones asépticas, cuando la temperatura del medio SMSA fue de 50 °C.

Las cajas sembradas con la suspensión, se incubaron por un periodo de tres a cinco días a una temperatura de 28° C. Se comparó el crecimiento de las colonias con la cepa CIAT 1008 de *R. solanacearum* raza 2, aislada de muestras de plátano provenientes de Ibagué - Tolima y perteneciente al banco de cepas del laboratorio de Patología de Yuca en el CIAT.

### **5.1.3. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE SUELO**

Con el fin de obtener las cepas de *R. solanacearum* a partir del suelo tomado alrededor de plantas de plátano afectadas por esta bacteria, se prepararon suspensiones adicionando 3.3 g de suelo en 30 ml de buffer TE pH 7.6 estéril las cuales fueron mezcladas en vortex. Se realizaron diluciones seriadas en buffer TE, luego se tomaron 100  $\mu\text{l}$  de las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  y se sembraron en cajas de petri con el medio semiselectivo SMSA. Las cajas

petri con el medio SMSA, se incubaron a una temperatura de 28° C por un periodo de tres a cinco días dependiendo de la aparición de las primeras colonias. Como referencia para comparar el crecimiento de las colonias típicas se utilizó la cepa CIAT 1008 de *R. solanacearum* raza 2.

## **5.2. IDENTIFICACIÓN DE LA BACTERIA**

Posterior al periodo de incubación se seleccionaron las colonias cuyo crecimiento en el medio SMSA presentaron características morfológicas similares a las de la cepa de referencia CIAT 1008 de *R. solanacearum* raza 2. Las colonias seleccionadas fueron repicadas y sembradas por agotamiento en agar nutritivo (AN) con el fin de obtener colonias individuales. Se tuvo la precaución de no hacer repiques constantes de la colonia, ya que de esta manera las cepas pueden perder su patogenicidad (Goszczyńska *et al.*, 2000).

### **5.2.1. PRUEBA DE KOH Y OXIDASA**

Una vez aisladas y purificadas las colonias se inició la identificación de éstas, seleccionando las pertenecientes al grupo de bacterias Gram-negativas mediante prueba de KOH al 3%, siendo positivas las que al reaccionar con este reactivo se tornaron extremadamente mucoides y al levantar el asa desde la colonia fueron capaces de formar un hilo. Como prueba adicional se realizó la prueba de oxidasa, cuyo objetivo fue seleccionar bacterias del género *Ralstonia* y *Pseudomonas* sp., las colonias se esparcieron individualmente sobre papel filtro humedecido con una solución del reactivo dicloro de tetra metil para fenilendiamina al 1%. Considerándose positivas a la prueba de oxidasa aquellas colonias que entre los siguientes 30 a 60 segundos se tornaron de color púrpura oscuro (Goszczyńska *et al.*, 2000). Para estas pruebas se utilizaron cultivos puros con un periodo de incubación de 24 a 36 horas en (AN) y se incluyó como testigo la cepa CIAT 1008.

## 5.2.2. EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL ADN MEDIANTE PCR

Para identificar las cepas pertenecientes a *R. solanacearum*, se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Seal *et al.*, 1992; Opina *et al.*, 1997 citado por Ito *et al.*, 1998) utilizando el cebador específico OLI 1 (5'GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC3') y el cebador no específico Y2 (5'CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT3') (Martins 2000).

La extracción del ADN genómico de las células bacterianas se realizó utilizando colonias puras de las cepas seleccionadas con 24 a 36 horas de crecimiento en agar nutritivo. La colonia se suspendió en 100 µl de agua estéril, grado cromatografía líquida de alta resolución y se homogenizó mediante un vórtex, posteriormente la suspensión se colocó en baño maría a 96° C por 5 minutos, fragmentando mediante lisis la pared y las membranas celulares para exponer el ADN. Finalmente la suspensión se centrifugó a 12000 rpm durante dos minutos y se tomaron 2.5 µl del sobrenadante como ADN molde para la PCR.

El volumen del cóctel de amplificación fue de 9.98 µl y contenía 1.25X de buffer para Taq polimerasa; 0.012 mM de cada dNTP; 1.87 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0.25 U de Taq polimerasa y 0.16 µM de los cebadores OLI 1 y Y2 (Seal *et al.*, 1999).

La amplificación del ADN se realizó en un termociclador (MSJ-Research PTC-100) con el siguiente programa: 2 min. a 96° C; 50 ciclos de denaturación por 20 seg. a 94° C, apareamiento por 20 seg. a 62° C, y extensión por 30 seg. a 72° C; y una extensión final por 5 min. a 72° C (Seal *et al.*, 1999).

Los productos de la PCR fueron separados en geles de agarosa al 1.5% en buffer TBE 0.5X, teñidos con bromuro de etidio al 0.001% y visualizados bajo luz ultravioleta en un Eagle Eye II de STRATAGENE; se evaluó la presencia de la banda de 287-288 pares de bases (pb) fragmento del gen 16S ARNr generado por la amplificación con los cebadores OLI 1 y Y2. El marcador utilizado fue de 100 pb. Se incluyeron como testigos tres cepas de *R. solanacearum* biovar 3, G 175 de berenjena proveniente de Kenia, G 216 de Tabaco

proveniente de Japón y CIAT 1004 de papa proveniente de Nambour (Australia), pertenecientes al banco de cepas del laboratorio de Patología de Yuca en el CIAT.

### **5.3. CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS**

Se seleccionaron cepas identificadas como *R. solanacearum* mediante PCR de acuerdo a su procedencia para ser criopreservadas, método de almacenamiento a largo plazo con mínimo de cambio fenotípico (Denny y Hayward, 2001).

Los tubos de criopreservación se llenaron con una solución de glicerol al 60% y luego se esterilizaron. Cada una de las cepas seleccionadas fue sembrada en cajas petri con agar nutritivo y se incubaron por un periodo de 24 a 36 horas con el fin de obtener mayor cantidad de células viables. Una vez se cumplió el tiempo de incubación se tomaron cuatro asadas de biomasa bacteriana de cada uno de los cultivos puros que fueron mezclados con la solución de glicerol; los tubos de criopreservación se sellaron y luego se almacenaron (por duplicado) a una temperatura de  $-80^{\circ}$  C. Para asegurar la patogenicidad de las cepas uno de los tubos será utilizado como stock en pruebas posteriores.

### **5.4. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS CEPAS DE *R. solanacearum* PARA DETERMINAR BIOVARES.**

Las cepas seleccionadas previamente e identificadas como *R. solanacearum* mediante la técnica de PCR con los cebadores específicos, se clasificaron en diferentes biovares por su producción de ácido a partir de tres disacáridos (celobiosa, lactosa y maltosa) y la oxidación de tres alcoholes hexosa (sorbitol, dulcitol y manitol) en medio base (Tabla 4) (Hayward 1964 citado por Denny y Hayward, 2001 y He *et al.*, 1983).

El medio base tenía la siguiente composición por litro: 1 g  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0.2 g KCl, 0.2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.0 g Bacto peptona, 3.0 g agar y 80.0 mg azul de bromotimol. El medio se calentó hasta disolver el agar y el pH se ajustó a 7.2 tornándose de color verde oliva. Posteriormente se esterilizó en autoclave a  $121^{\circ}$  C 20 lb de presión por 20 a 30 minutos (Denny y Hayward, 2001).

Se prepararon soluciones acuosas al 10% con cada uno de los carbohidratos de prueba los cuales fueron esterilizados previamente mediante filtración con filtros Millipore® con poro 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 agregó dentro de tubos de cultivo estériles bajo condiciones asépticas (Denny y Hayward, 2001).

Debido a que la consistencia del medio era semisólida; los tubos se sembraron mediante punción en 3/4 partes del medio con un asa recta estéril utilizando una colonia proveniente de un cultivo puro de *R. solanacearum* con crecimiento previo de 24 horas en agar nutritivo.

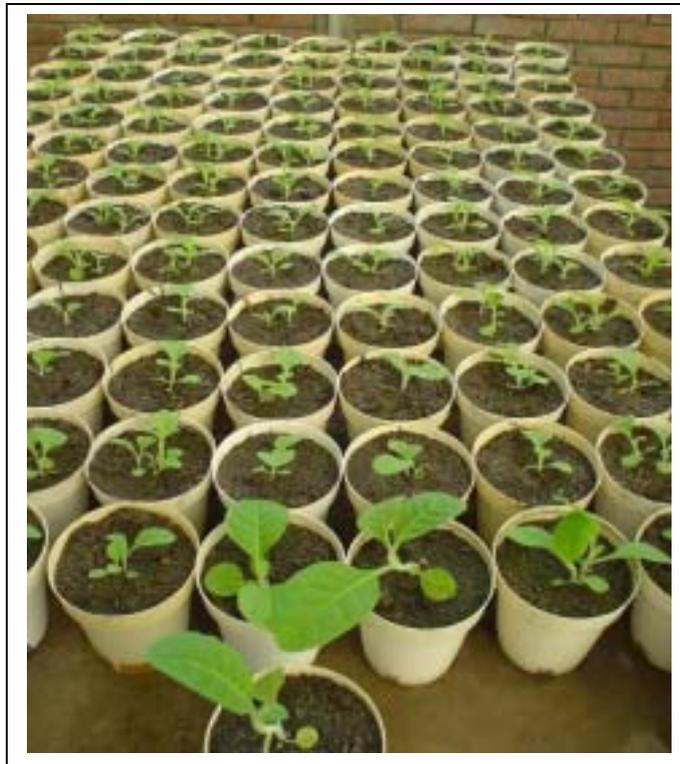
Los tubos inoculados fueron incubados a una temperatura de 28° C y las lecturas se realizaron 1, 3, 7, 14 y 28 días después de la inoculación. Se evaluó el cambio de color en el medio inoculado: medio verde oliva, reacción negativa; cambio de color a amarillo de arriba hacia abajo, reacción positiva, con producción de ácidos a partir de los disacáridos u oxidación de los alcoholes hexosa. Se incluyeron en la prueba como testigos las cepas de *R. solanacearum* G 216 de tabaco y CIAT 1004 de papa pertenecientes al Biovar 3, capaces de producir ácido a partir de los tres disacáridos y alcoholes hexosa.

**Tabla 4.** Caracterización de biovares de *Ralstonia solanacearum* (Hayward 1964)

Fuente de Carbono	Biovares				
	1	2	3	4	5
Utilización de:					
Manitol	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	-
Dulcitol	-	-	+	+	-
Oxidación de:					
Lactosa	-	+	+	-	+
Maltosa	-	+	+	-	+
Celobiosa	-	+	+	-	+

## 5.5. PRUEBA DE HIPERSENSIBILIDAD

Se probó la capacidad de las cepas para inducir reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco, (*Nicotiana tabacum*). Se estableció un semillero de tabaco sembrando las semillas en una mezcla de arena - suelo 3:2 la cual fue esterilizada por vapor durante 90 minutos a temperatura ente 70 y 80° C. A las 4 semanas de edad las plántulas se transplantaron a materas de 300 ml con la misma mezcla de arena - suelo. Las plantas permanecieron en un invernadero de vidrio bajo condiciones controladas de temperatura, luminosidad y humedad relativa (Figura 6).



**Figura 6.** Plantas de tabaco utilizadas en la inoculación.

A partir de cultivos puros de las cepas de *R. solanacearum* se preparó una suspensión bacteriana en agua deionizada estéril, utilizando colonias con 24 horas de crecimiento en AN, cuya absorbancia fue de 0.1 con una longitud de onda de 600 nm, correspondiente a una concentración de aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup> (He *et al.*, 1983). Se utilizaron plantas de tabaco de ocho semanas de edad, las cuales se inocularon por infiltración con una jeringa en las nervaduras por el envés de las hojas, permitiendo localizar la suspensión en parénquima de empalizada (Figura 7).

Se inocularon dos hojas por cada planta, utilizando dos plantas por cada cepa, para evaluar la reacción en un total de cuatro hojas por cepa, utilizando el signo (+) para reacción de hipersensibilidad positiva característica de la raza 2 y (-) para reacción atípica.



**Figura 7.** Infiltración de la suspensión bacteriana en el parénquima de empalizada.

La reacción positiva fue evaluada a las 24 horas después de la inoculación, observando clorosis en las células afectadas del parénquima y humedad en el tejido. El área afectada fue delimitada por un borde definido del tejido no inoculado, evidenciando que el área de la hoja infiltrada se vuelve necrótica y seca, posteriormente debido a la rápida pérdida de agua en las siguientes 36 horas a 48 horas después de la infiltración el área afectada se torna blanca, translúcida y seca. Síntomas de hipersensibilidad correspondiente a la raza 2 de *R. Solanacearum*. (Lozano y Sequeira, 1970).

## **5.6. EVALUACIÓN DE PATOGENICIDAD**

Las cepas se inocularon en plantas de plátano de la variedad susceptible 'África' (*Musa* cv. AAB), provenientes de cultivo de meristemos *in vitro*, y transplantadas a los 30 días de edad en bolsas plásticas de 1 Kg. de capacidad con una mezcla de arena - suelo estéril en una proporción 3:2. Estas plantas se incubaron durante 15 días en cámara húmeda, para garantizar su óptimo desarrollo (Figura 8).



**Figura 8.** Plantas de plátano utilizadas en pruebas de patogenicidad.

Plantas de 6 semanas de edad se inocularon en invernadero con condiciones controladas de temperatura entre 24 y 29° C (mínima nocturna y máxima diurna, respectivamente), humedad relativa entre 91 y 80 % (máxima nocturna y mínima diurna, respectivamente) y luminosidad con 13 horas de luz aproximadamente. Las plantas no fueron regadas 24 horas antes de la inoculación (EPPO 1990). Para la inoculación se utilizaron cultivos puros de cada una de las bacterias con crecimiento previo de 24 horas en agar nutritivo, a partir de las cuales se preparó una suspensión en agua deionizada estéril.

En condiciones de asepsia, la concentración de cada una de las suspensiones fue determinada a través de lecturas de la absorbancia en un espectrofotómetro TURNER® modelo 390 con una longitud de onda de 600 nm, utilizando celdas fisher® (ref. spectronic\*20). La concentración se ajustó mediante diluciones con agua deionizada estéril hasta obtener una absorbancia de 0.1, correspondiente aproximadamente a  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por mililitro (He *et al.*, 1983) expresando el resultado como  $\text{ufc.ml}^{-1}$ .

El método de inoculación utilizado fue el de inyección, con jeringas estériles de 1 ml y atóxicas y tamaño de la aguja de 27G x 1/2". Se inoculó el seudotallo a una altura de 2 cm. de la superficie del suelo 0.5 ml de la suspensión bacteriana (Figura 9). Se inocularon plantas de plátano, utilizando cuatro repeticiones por unidad experimental, en un diseño de bloques al azar. Como testigo positivo se inoculó la cepa de *R. solanacearum* (CIAT 1008) y como testigo negativo se utilizó agua deionizada estéril. Las plantas inoculadas se

incubaron durante cuatro días bajo humidificación constante, posteriormente se redujo la humidificación a una hora diaria.



**Figura 9.** Método de Inoculación en pruebas de patogenicidad.

Las evaluaciones hicieron teniendo en cuenta el desarrollo de los síntomas de marchitamiento, se realizaron evaluaciones diarias a partir del cuarto hasta el día 21, observando la aparición de síntomas como flacidez en las hojas y marchitamiento, con los cuales se definió una escala visual de 1 a 5, según la cual; 1 = planta con una hoja marchita; 2 = planta con dos hojas marchitas; 3 = planta con tres hojas marchitas; 4 = planta con cuatro hojas marchitas y 5 planta con cinco hojas marchitas, siguiendo el comportamiento de una variable cuantitativa discreta. En trabajos preliminares realizados en el 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.

Se calculó el Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE) para la variable virulencia con base en el número de hojas marchitas, para cada una de las cuatro repeticiones por cepa de la bacteria y mediante el programa estadístico Statistix 8.0 se realizó un análisis de varianza para ABCPE. Para separar las cepas en grupos de acuerdo a su patogenicidad se realizó una prueba de separación de medias con Diferencia Mínima Significativa (DMS)  $\alpha = 0.5 \%$ , estableciendo grupos de acuerdo a su virulencia.

## 5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 5.7.1. Análisis de correlación

Se relacionaron las variables agresividad, reacción de hipersensibilidad, con el hospedero, tipo de tejido y origen geográfico de la muestra (Tabla 5), mediante análisis de correlación con el coeficiente de *Spearman* para variables categóricas ordinales, empleando el programa estadístico Statistical Analysis System (SAS).

### 5.7.2. Análisis de Correspondencia Múltiple

Con el fin de agrupar las cepas de acuerdo a las características que las identifica y debido a la necesidad de interpretar y observar mejor las relaciones entre las cepas de la bacteria, los datos de ABCPE fueron analizados mediante este tipo de análisis, el cual permitió obtener una visión más detallada de las relaciones que ocurren entre todos los individuos, al asociarlos con todas las características, (filas con columnas) y determinar el nivel de proximidad (asociación).

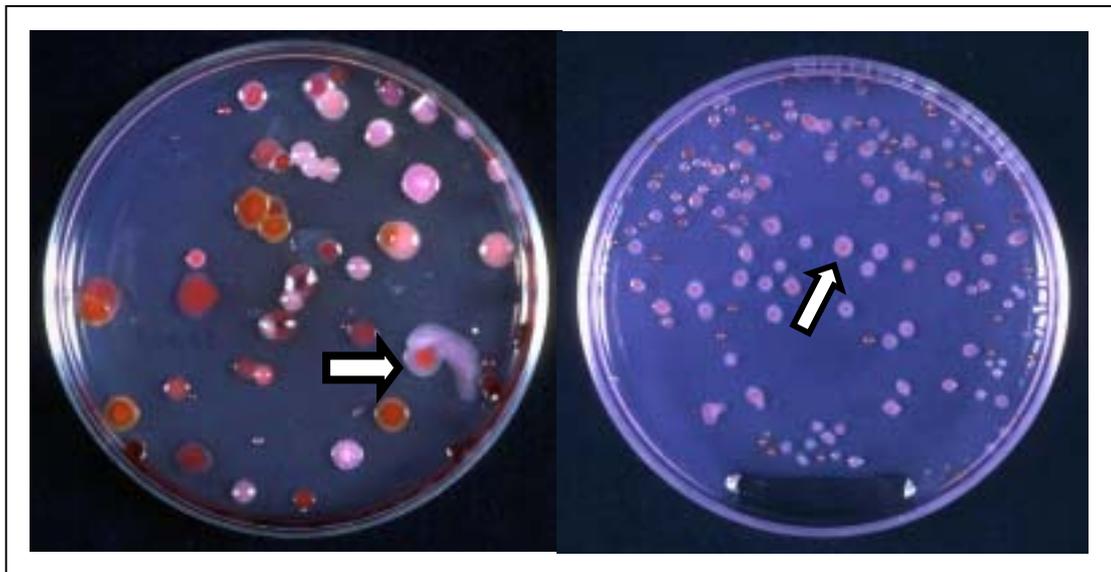
**Tabla 5.** Localidad, cultivo, fuente y reacción de hipersensibilidad (RH) con su respectiva variable numérica.

Localidad	No.	Cultivo	No.	Fuente	No.	RH	
Quindío	1	Plátano	1	Raquis	1	Típica	1
Antioquia	2	Banano	2	Pecíolo	2	Atípica	2
Valle del Cauca	3	Heliconia	3	Colino	3		
Caquetá	4			Fruto	4		
Meta	5			Rizoma	5		
Magdalena	6			Seudotallo	6		
Tolima	7			Suelo	7		

## 6. RESULTADOS

### 6.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS

A partir de las muestras de suelo de cultivos de plátano con Moko y fragmentos de tejido afectado, se seleccionaron colonias por su crecimiento en medio semiselectivo SMSA similar al control CIAT 1008, después de 48 horas de incubación a 28 °C, 189 cepas de bacterias Gram-negativas: 135 cepas de plantas de plátano, 20 cepas de banano y 3 procedentes de heliconias con síntomas de la enfermedad, junto con 29 cepas de suelo (Figura 10), una de *Talinum paniculatum* maleza conocida como “lechuguilla” y una de agua procedentes de fincas productoras de plátano de seis departamentos de Colombia, positivas a las pruebas de KOH al 3 % y oxidasa posiblemente del género *Ralstonia* o *Pseudomonas* sp. (Tabla 6) (Goszczyńska *et al.*, 2000).



**Tabla 6.** Cepas de *R. solanacearum* seleccionadas por su crecimiento en medio SMSA, y reacción de KOH y oxidasa positiva.

CEPA No.	PROCEDENCIA			CEPA No.	PROCEDENCIA		
	Departamento o Localidad	Cultivo	Fuente		Departamento o Localidad	Cultivo	Fuente
1	Quindío	Banano	Seudotallo	96	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo
2	Quindío	Banano	Seudotallo	97	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo
3	Quindío	Banano	Colino	98	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo
4	Quindío	Banano	Seudotallo	99	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo
5	Quindío	Plátano	Raquis	100	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo
6	Quindío	Plátano	Peciolo	101	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo
7	Quindío	Plátano	Peciolo	102	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo
8	Urabá (Antioquia)	Banano	Seudotallo	103	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo
9	Urabá (Antioquia)	Banano	Rizoma	104	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo
10	Urabá (Antioquia)	Banano	Fruto	105	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo
11	Urabá (Antioquia)	Banano	Raquis	106	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
12	Urabá (Antioquia)	Banano	Fruto	107	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
13	Urabá (Antioquia)	Banano	Fruto	108	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
14	Urabá (Antioquia)	Banano	Fruto	109	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
15	Quindío	Plátano	Suelo	110	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
16	Quindío	Plátano	Suelo	111	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
17	Quindío	Plátano	Suelo	112	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
18	Quindío	Plátano	Suelo	113	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
19	Quindío	Plátano	Suelo	114	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
20	Quindío	Plátano	Suelo	115	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
21	Quindío	Plátano	Suelo	116	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
22	Quindío	Plátano	Suelo	117	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
23	Quindío	Plátano	Suelo	118	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
24	Quindío	Plátano	Suelo	119	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
25	Quindío	Plátano	Suelo	120	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo
26	Quindío	Plátano	Suelo	121	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo
27	Quindío	Plátano	Suelo	122	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo
28	Cundinamarca	Plátano	Fruto	123	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo
29	Cundinamarca	Plátano	Seudotallo	124	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
30	Cundinamarca	Plátano	Fruto	125	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
31	Cundinamarca	Plátano	Seudotallo	126	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
32	Jamundí (Valle)	Plátano	Suelo	127	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
33	Jamundí (Valle)	Plátano	Colino	128	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
34	Quindío	Plátano	Suelo	129	Urabá (Antioquia)	Plátano	Rizoma
35	Quindío	Plátano	Suelo	130	Urabá (Antioquia)	Plátano	Rizoma
36	Quindío	Banano	Colino	131	Urabá (Antioquia)	Plátano	Rizoma
37	Quindío	Plátano	Peciolo	132	Urabá (Antioquia)	Plátano	Rizoma
38	Urabá (Antioquia)	Banano	Raquis	133	Urabá (Antioquia)	Plátano	Rizoma
39	Urabá (Antioquia)	Banano	Fruto	134	Urabá (Antioquia)	Plátano	Seudotallo
40	Quindío	Plátano	Suelo	135	Urabá (Antioquia)	Plátano	Seudotallo
41	Quindío	Plátano	Suelo	136	Urabá (Antioquia)	Plátano	Seudotallo
42	Quindío	Plátano	Suelo	137	Urabá (Antioquia)	Plátano	Seudotallo
43	Quindío	Plátano	Suelo	138	Urabá (Antioquia)	Plátano	Seudotallo
44	Quindío	Plátano	Suelo	139	Urabá (Antioquia)	Plátano	Seudotallo
45	Caquetá	Plátano	Seudotallo	140	Urabá (Antioquia)	Plátano	Seudotallo

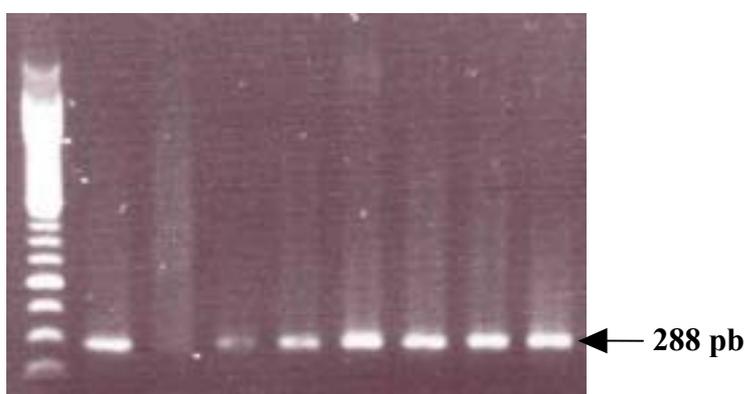
CEPA		PROCEDENCIA		CEPA		PROCEDENCIA	
No.	Departamento o Localidad	Cultivo	Fuente	No.	Departamento o Localidad	Cultivo	Fuente
46	Caquetá	Plátano	Seudotallo	141	Urabá (Antioquia)	Plátano	Seudotallo
47	Caquetá	Plátano	Raquis	142	Montenegro (Quindío)	Plátano	Seudotallo
48	Quindío	Plátano	Suelo	143	Montenegro (Quindío)	Plátano	Seudotallo
49	Quindío	Plátano	Suelo	144	Montenegro (Quindío)	Plátano	Seudotallo
50	Quindío	Plátano	Suelo	145	Montenegro (Quindío)	Plátano	Peciolo
51	Quindío	Plátano	Suelo	146	Montenegro (Quindío)	Plátano	Raquis
52	Quindío	Plátano	Suelo	147	Montenegro (Quindío)	Plátano	Raquis
53	Quindío	Plátano	Suelo	148	Montenegro (Quindío)	Plátano	Rizoma
54	Granada-Meta	Plátano	Seudotallo	149	Montenegro (Quindío)	Plátano	Seudotallo
55	Granada-Meta	Plátano	Seudotallo	150	Montenegro (Quindío)	Plátano	Fruto
56	Granada-Meta	Plátano	Suelo	151	Montenegro (Quindío)	Plátano	Raquis
57	Granada-Meta	Plátano	Suelo	152	Calarcá (Quindío)	Plátano	Fruto
58	Granada-Meta	Caño	Agua	153	Calarcá (Quindío)	Plátano	Seudotallo
59	Granada-Meta	Lechuguilla	Tallo	154	Calarcá (Quindío)	Plátano	Colino
60	Armenia (Quindío)	Plátano	Fruto	155	Calarcá (Quindío)	Plátano	Raquis
61	Armenia (Quindío)	Plátano	Fruto	156	La Tebaida (Quindío)	Plátano	Fruto
62	Armenia (Quindío)	Plátano	Fruto	157	La Tebaida (Quindío)	Plátano	Fruto
63	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	158	La Tebaida (Quindío)	Plátano	Rizoma
64	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	159	La Tebaida (Quindío)	Plátano	Seudotallo
65	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	160	Montenegro (Quindío)	Plátano	Peciolo
66	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	161	Montenegro (Quindío)	Plátano	Peciolo
67	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	162	Montenegro (Quindío)	Plátano	Peciolo
68	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Colino	163	Montenegro (Quindío)	Plátano	Raquis
69	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Peciolo	164	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Peciolo
70	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	165	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Rizoma
71	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Peciolo	166	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Raquis
72	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Peciolo	167	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Rizoma
73	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Peciolo	168	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Seudotallo
74	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	169	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Rizoma
75	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Peciolo	170	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Raquis
76	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	171	Armenia (Quindío)	Plátano	Colino
77	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Peciolo	172	Armenia (Quindío)	Plátano	Seudotallo
78	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	173	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Peciolo
79	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	174	Armenia (Quindío)	Plátano	Fruto
80	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	175	Armenia (Quindío)	Plátano	Seudotallo
81	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Peciolo	176	Armenia (Quindío)	Plátano	Fruto
82	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	177	Armenia (Quindío)	Plátano	Seudotallo
83	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	178	Armenia (Quindío)	Plátano	Seudotallo
84	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	179	Armenia (Quindío)	Plátano	Fruto
85	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	180	Magdalena	Banano	Seudotallo
86	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	181	Magdalena	Banano	Seudotallo
87	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	182	Magdalena	Banano	Seudotallo
88	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	183	Armenia (Quindío)	Plátano	Peciolo
89	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	184	Magdalena	Banano	Seudotallo
90	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	185	Magdalena	Banano	Rizoma
91	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	186	Magdalena	Banano	Colino
92	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	187	Palmira (Valle)	Heliconia	Seudotallo

CEPA		PROCEDENCIA			CEPA		PROCEDENCIA		
No.	Departamento o Localidad	Cultivo	Fuente	No.	Departamento o Localidad	Cultivo	Fuente		
93	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	188	Palmira (Valle)	Heliconia	Rizoma		
94	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	189	Palmira (Valle)	Heliconia	Rizoma		
95	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo						

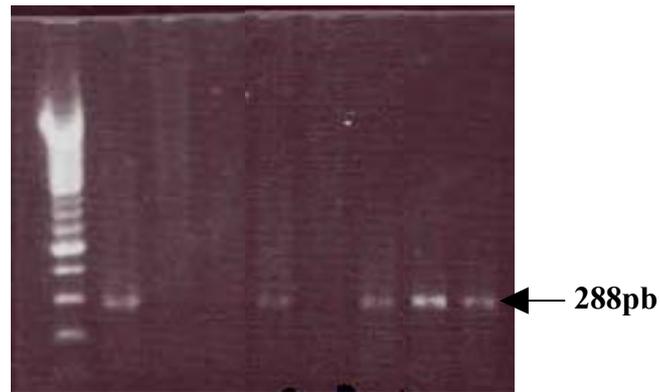
## 6.2. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Ralstonia solanacearum*

Mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, se detectó una banda de 287 - 288 pb, en 106 de las 189 cepas seleccionadas, generada por amplificación con el cebador específico OLI 1 y el cebador no específico Y2. El fragmento ubicado en el gen 16S ARNr permitió identificarlas como *R. solanacearum* (Tabla 7) (Figura 11, 12 y 13).

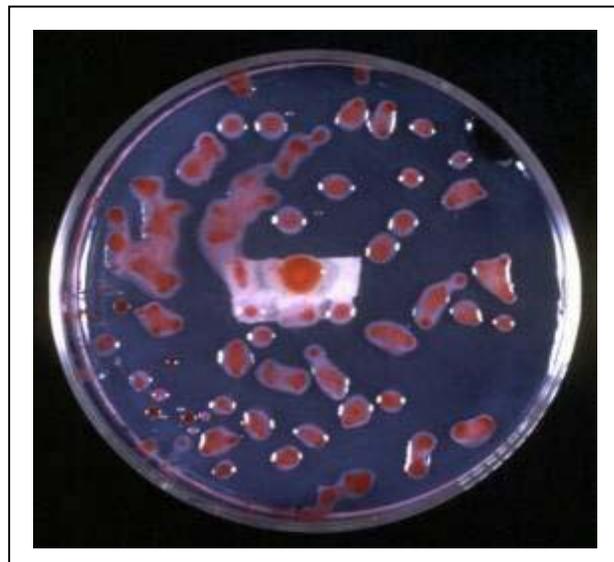
Las cepas de *R. solanacearum* incluidas en la prueba como testigos G 175, G 216 y CIAT 1004 pertenecientes al Biovar 3, también fueron claramente identificadas por PCR.



**Figura 11.** Producto amplificado mediante PCR, utilizando los cebadores OLI 1 y Y2 en la región 16S ARNr de *Ralstonia solanacearum*, de 288 pb. M= marcador 100 pb, carril 1 = control positivo CIAT 1008; carril 2 = control negativo H<sub>2</sub>O grado Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés); carril 3 a 5 = cepas de Quindío; carril 6 a 8 = cepas de Urabá. Se indica la banda de 288 pb, característica de la bacteria.



**Figura 12.** Producto amplificado mediante PCR, utilizando los cebadores OLI 1 y Y2 en la región 16S ARNr de *Ralstonia solanacearum*, de 288 pb. M= marcador 100 pb, carril 1 a 3 cepas No. 60, 61 y 62 aisladas de fruto plátano procedente de Armenia - Quindío; carril 4 cepa No. 22 aislada de suelo de plátano procedente de Quindío; carril 5 control negativo H<sub>2</sub>O grado HPLC; carril 6 control positivo CIAT 1008; carril 7 y 8 cepas No. 63 y 64 aisladas deseudotallo de plátano procedente del municipio Fuente de oro – Meta.



**Figura 13.** Colonias características de *R. solanacearum* en medio SMSA, identificadas mediante PCR.

### 6.3. CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS

Las cepas identificadas como *R. solanacearum* se almacenaron mediante criopreservación en glicerol 60 % para evitar pérdida de patogenicidad; un tubo se utilizó para pruebas posteriores y el otro se almacenó permanentemente (Figura 14) (Denny y Hayward, 2001).



**Figura 14.** Conservación de las cepas - 80 °C

**Tabla 7.** Cepas identificadas como *R. solanacearum* mediante PCR con los cebadores OLI 1 y Y2.

CEPA No.	PROCEDENCIA			CEPA No.	PROCEDENCIA		
	Departamento o Localidad	Cultivo	Fuente		Departamento o Localidad	Cultivo	Fuente
1	Quindío	Plátano	Raquis	53	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo
2	Quindío	Plátano	Peciolo	54	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo
3	Quindío	Plátano	Peciolo	55	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo
4	Urabá (Antioquia)	Banano	Seudotallo	56	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
5	Urabá (Antioquia)	Banano	Rizoma	57	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
6	Urabá (Antioquia)	Banano	Fruto	58	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
7	Urabá (Antioquia)	Banano	Raquis	59	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo
8	Urabá (Antioquia)	Banano	Fruto	60	Urabá (Antioquia)	Plátano	Rizoma
9	Quindío	Plátano	Suelo	61	Urabá (Antioquia)	Plátano	Rizoma
10	Quindío	Plátano	Suelo	62	Urabá (Antioquia)	Plátano	Rizoma
11	Quindío	Plátano	Suelo	63	Urabá (Antioquia)	Plátano	Rizoma
12	Jamundí (Valle)	Plátano	Suelo	64	Urabá (Antioquia)	Plátano	Rizoma
13	Jamundí (Valle)	Plátano	Colino	65	Urabá (Antioquia)	Plátano	Seudotallo
14	Caquetá	Plátano	Seudotallo	66	Urabá (Antioquia)	Plátano	Seudotallo
15	Caquetá	Plátano	Seudotallo	67	Urabá (Antioquia)	Plátano	Seudotallo
16	Caquetá	Plátano	Raquis	68	Urabá (Antioquia)	Plátano	Seudotallo
17	Quindío	Plátano	Suelo	69	Montenegro (Quindío)	Plátano	Seudotallo
18	Quindío	Plátano	Suelo	70	Montenegro (Quindío)	Plátano	Raquis
19	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Suelo	71	Montenegro (Quindío)	Plátano	Raquis
20	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Suelo	72	Montenegro (Quindío)	Plátano	Rizoma
21	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	73	Montenegro (Quindío)	Plátano	Seudotallo
22	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	74	Montenegro (Quindío)	Plátano	Fruto
23	Armenia (Quindío)	Plátano	Seudotallo	75	Quindío	Plátano	Fruto
24	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	76	Quindío	Plátano	Seudotallo
25	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	77	Quindío	Plátano	Colino
26	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	78	Calarcá (Quindío)	Plátano	Raquis
27	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	79	La Tebaida (Quindío)	Plátano	Rizoma
28	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	80	La Tebaida (Quindío)	Plátano	Seudotallo
29	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	81	Montenegro (Quindío)	Plátano	Peciolo
30	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	82	Montenegro (Quindío)	Plátano	Peciolo

CEPA No.	PROCEDENCIA			CEPA No.	PROCEDENCIA		
	Departamento o Localidad	Cultivo	Fuente		Departamento o Localidad	Cultivo	Fuente
31	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	83	Montenegro (Quindío)	Plátano	Raquis
32	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	84	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Peciolo
33	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	85	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Raquis
34	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	86	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Rizoma
35	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	87	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Seudotallo
36	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	88	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Rizoma
37	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	89	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Raquis
38	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	90	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Seudotallo
39	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	91	Armenia (Quindío)	Plátano	Colino
40	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	92	Armenia (Quindío)	Plátano	Seudotallo
41	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	93	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Peciolo
42	Fuente de oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	94	Armenia (Quindío)	Plátano	Fruto
43	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo	95	Armenia (Quindío)	Plátano	Seudotallo
44	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo	96	Armenia (Quindío)	Plátano	Fruto
45	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo	97	Armenia (Quindío)	Plátano	Peciolo
46	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo	98	Magdalena	Banano	Seudotallo
47	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo	99	Magdalena	Banano	Rizoma
48	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo	100	Magdalena	Banano	Rizoma
49	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo	101	Magdalena	Banano	Colino
50	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo	102	Palmira (Valle)	Heliconia	Seudotallo
51	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo	103	Palmira (Valle)	Heliconia	Rizoma
52	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo	104	Palmira (Valle)	Heliconia	Rizoma

#### 6.4. DETERMINACIÓN DE BIOVARES

De 106 cepas identificadas como *R. solanacearum*, 72 cepas (8 de suelo y 64 de tejido) se seleccionaron de acuerdo a su procedencia, tipo de tejido y cultivo hospedero (Tabla 9). En la evaluación de esta prueba para la actividad metabólica de las 72 cepas no se observó alteración de viraje en el color del medio en el cual crecieron en ninguna de las lecturas realizadas 1, 3, 7, 14 y 28 días después de la inoculación. Por lo tanto, el resultado negativo de esta prueba confirmó que la población pertenece al biovar 1. Las tres cepas de *R. solanacearum* incluidas en la prueba como controles G 175 de berenjena, G 216 de tabaco y CIAT 1004 de papa pertenecientes al Biovar 3 (Figura 15), presentaron formación de ácidos a partir de los azúcares (Celobiosa, Lactosa y Maltosa) y oxidación de los alcoholes hexosa (Dulcitol, Manitol y Sorbitol) (Tabla 8).

**Tabla 8.** Clasificación de *R. solanacearum* en biovares, según su habilidad para utilizar disacáridos y oxidar alcoholes hexosa, produciendo ácido para reacción positiva +.

<b>Cantidad de cepas</b>	<b>Cultivo</b>	<b>M</b>	<b>C</b>	<b>L</b>	<b>Mt</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>Biovar</b>
54	Plátano	-	-	-	-	-	-	1
7	Banano	-	-	-	-	-	-	1
8	Suelo	-	-	-	-	-	-	1
3	Heliconia	-	-	-	-	-	-	1
1	Control plátano	-	-	-	-	-	-	1
1	Tabaco	+	+	+	+	+	+	3
1	Papa	+	+	+	+	+	+	3
1	Berenjena	+	+	+	+	+	+	3
	H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	-	
	Tubos sin inocular	-	-	-	-	-	-	

**M** – Maltosa, **C** – Celobiosa, **L** – Lactosa, **Mt** – Manitol, **D** – Dulcitol, **S** – Sorbitol  
 + : reacción positiva, - : reacción negativa

**Tabla 9.** Patogenicidad de 72 cepas de *Ralstonia solanacearum* raza 2, aisladas de cultivos de plátano, banano y heliconia inoculadas en plantas de plátano variedad ‘África’ (*Musa* cv. AAB).

Cepa No	Procedencia			Patogenicidad			Cepa No	Procedencia			Patogenicidad		
	Departamento o Localidad	Cultivo	Fuente	ABCPE <sup>1</sup>	Grupo <sup>2</sup>	Hipersen <sup>3</sup>		Departamento o Localidad	Cultivo	Fuente	ABCPE <sup>1</sup>	Grupo <sup>2</sup>	Hipersen <sup>3</sup>
1	Quindío	Pl.	Ra.	18.00	3	+	79	Montenegro (Quindío)	Pl.	Riz	66.88	2	+
2	Quindío	Pl.	Pe.	69.38	2	+	80	Montenegro (Quindío)	Pl.	Seu.	67.88	2	+
3	Quindío	Pl.	Pe.	49.00	2	+	81	Montenegro (Quindío)	Pl.	Fr.	10.88	4	+
4	Urabá (Antioquia)	Ban.	Seu.	43.13	3	-	83	Quindío	Pl.	Fr.	55.00	2	+
5	Urabá (Antioquia)	Ban.	Riz	38.75	3	-	84	Quindío	Pl.	Seu.	61.00	2	+
6	Urabá (Antioquia)	Ban.	Fr.	31.83	3	-	85	Quindío	Pl.	Col.	68.38	2	+
7	Urabá (Antioquia)	Ban.	Fr.	62.17	2	-	86	Calarcá (Quindío)	Pl.	Ra.	59.75	2	+
15	Quindío	Pl.	Sue.	37.63	3	+	88	La Tebaida (Quindío)	Pl.	Riz	61.75	2	+
17	Jamundí (Valle)	Pl.	Sue.	69.50	2	+	89	La Tebaida (Quindío)	Pl.	Seu.	60.38	2	+
18	Jamundí (Valle)	Pl.	Col.	42.50	3	+	90	Montenegro (Quindío)	Pl.	Pe.	19.25	3	-
32	Caquetá	Pl.	Seu.	33.88	3	+	91	Montenegro (Quindío)	Pl.	Ra.	19.38	3	+
33	Caquetá	Pl.	Seu.	40.38	3	+	92	Quimbaya (Quindío)	Pl.	Pe.	63.13	2	+
34	Caquetá	Pl.	Ra.	27.63	3	+	94	Quimbaya (Quindío)	Pl.	Ra.	47.25	2	+
38	Quindío	Pl.	Sue.	59.50	2	+	95	Quimbaya (Quindío)	Pl.	Riz	65.63	2	+
39	Quindío	Pl.	Sue	62.00	2	+	96	Quimbaya (Quindío)	Pl.	Seu.	33.00	3	+
40	Quimbaya (Quindío)	Pl.	Sue.	15.75	4	+	97	Quimbaya (Quindío)	Pl.	Riz	28.63	3	+
41	Quimbaya (Quindío)	Pl.	Sue.	56.25	2	+	98	Quimbaya (Quindío)	Pl.	Ra.	59.50	2	+
42	Fuente de Oro (Meta)	Pl.	Seu.	28.00	3	+	99	Quimbaya (Quindío)	Pl.	Seu.	40.25	3	+
43	Fuente de Oro (Meta)	Pl.	Seu.	20.75	3	+	100	Armenia (Quindío)	Pl.	Col.	71.88	1	+
48	Armenia (Quindío)	Pl.	Fr.	37.13	3	+	101	Armenia (Quindío)	Pl.	Seu.	58.50	2	+
54	Fuente de Oro (Meta)	Pl.	Seu.	36.25	3	+	102	Quimbaya (Quindío)	Pl.	Pe.	1.38	4	+
55	Fuente de oro (Meta)	Pl.	Seu.	55.25	2	+	104	Armenia (Quindío)	Pl.	Fr.	41.25	3	+
57	Fuente de oro (Meta)	Pl.	Seu.	45.63	2	+	106	Armenia (Quindío)	Pl.	Seu.	24.75	3	+
58	Fuente de oro (Meta)	Pl.	Seu.	56.63	2	+	107	Armenia (Quindío)	Pl.	Fr.	68.25	2	+
59	Fuente de oro (Meta)	Pl.	Seu.	0.00	4	+	109	Armenia (Quindío)	Pl.	Pe.	45.13	2	+
60	Fuente de oro (Meta)	Pl.	Seu.	47.25	2	+	110	Magdalena	Ban	Seu.	63.25	2	+
63	Granada (Meta)	Pl.	Seu.	50.69	2	+	111	Magdalena	Ban	Riz	34.38	3	+
64	Granada (Meta)	Pl.	Seu.	46.13	2	+	112	Magdalena	Ban	Col.	29.50	3	-
65	Granada (Meta)	Pl.	Seu.	47.63	2	+	113	Palmira (Valle)	Hel.	Seu.	40.50	3	+
66	Granada (Meta)	Pl.	Seu.	69.75	2	+	114	Palmira (Valle)	Hel.	Riz	40.38	3	+
67	Fuente de oro (Meta)	Pl.	Seu.	41.63	3	+	115	Palmira (Valle)	Hel.	Riz	33.63	3	+
69	Granada (Meta)	Pl.	Seu.	27.00	3	+	160	Quindío	Pl.	Sue.	12.38	4	+
70	Granada (Meta)	Pl.	Seu.	5.75	4	+	161	Quindío	Pl.	Sue.	1.75	4	+
71	Urabá (Antioquia)	Pl.	Riz	21.25	3	-	588	Fuente de Oro (Meta)	Pl.	Pe.	71.25	2	+
72	Urabá (Antioquia)	Pl.	Seu.	10.75	4	-	CIAT 1008 <sup>4</sup>	Ibagué (Tolima)	Pl.		65.13	2	+
73	Urabá (Antioquia)	Pl.	Seu.	10.75	4	-							
76	Montenegro (Quindío)	Pl.	Seu.	61.88	2	+							
78	Montenegro (Quindío)	Pl.	Ra.	73.38	1	+							

DMS  $\alpha=5\%$   
28.33

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



### **6.5. REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD**

La reacción de hipersensibilidad (RH) observada en hojas de tabaco indicó que 63 cepas causaron una reacción típica de hipersensibilidad en hojas de tabaco, 48 horas después de la inoculación (Figura 16), mientras que nueve cepas indujeron amarillamiento, reacción de hipersensibilidad atípica para esta raza (Figura 17). Ocho de las nueve cepas que mostraron reacción atípica de hipersensibilidad, se obtuvieron de la costa atlántica (siete de Urabá - Antioquia y una de Magdalena); además de una cepa de plátano de Quindío (Tabla 9).



## 6.6. EVALUACIÓN DE PATOGENICIDAD

El análisis de patogenicidad se llevó a cabo con base en el resultado de las evaluaciones de agresividad realizadas diariamente a partir del cuarto día después de la inoculación durante 18 días a las plantas de plátano inoculadas con las 72 cepas de *R. solanacearum* (8 de suelo y 64 de diferentes tipos de tejido) (Figura 18 y 19).



Se realizó un análisis de varianza a la variable ABCPE cuyo coeficiente de variación fue 48.09 %, observando diferentes niveles de la enfermedad en las plantas afectadas por las cepas estudiadas ANEXO 1. De acuerdo con la prueba de separación de medias, estimada mediante DMS ( $\alpha=5\%$ ) para los valores ABCPE, se agruparon las cepas en cuatro grupos de acuerdo a su patogenicidad, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre las cepas evaluadas, observando que no había relación con su origen geográfico, tipo de tejido o cultivo del cual se aislaron (Tabla 9).



El grupo 1 de patogenicidad contiene dos cepas de plátano de Quindío. En el grupo 2 hay una cepa de banano de Antioquia y una de Magdalena, junto con una cepa de Valle del Cauca, 20 de Quindío, una de Tolima y nueve de Meta aisladas de plátano. El grupo 3 de igual forma conformado por dos cepas de banano de Antioquia y Magdalena; además de una cepa de plátano de Antioquia, dos del Valle del Cauca, tres de Caquetá, diez de Quindío y cinco de Meta, junto con las cepas de heliconia del Valle del Cauca. El cuarto grupo lo conforman cinco cepas de plátano de Quindío, dos de Antioquia y dos de Meta.

Para las cepas aisladas de plátano distribuidas en los cuatro grupos de acuerdo a su agresividad, los valores mas altos de ABCPE (Tabla 10), corresponden a las cepas No. 78 y 100 de los municipios de Montenegro y Armenia en Quindío respectivamente. A su vez, la cepa 59 aislada de seudotallo de plátano y procedente de Fuente de oro (Meta), no reprodujo síntomas de la enfermedad en ninguna de las repeticiones.

**Tabla 10.** Grupos obtenidos mediante prueba de separación de medias. DMS ( $\alpha=5\%$ ) para los valores ABCPE.

<b>Grupo</b>	<b>ABCPE</b>
1	71.8 - 73.38
2	45.13 - 71.25
3	18 - 43.13
4	0 - 15.75

De las cepas aisladas de banano dos mostraron agresividad alta y cinco mostraron agresividad media al igual que las tres cepas aisladas de heliconia. De rizoma y raquis se obtuvieron cepas más agresivas que de los otros tejidos. Por origen geográfico hay claras diferencias entre la agresividad de las cepas de Caquetá y Valle del Cauca pertenecientes al grupo 2, a diferencia de las cepas de Quindío, Antioquia, Meta y Magdalena, las cuales corresponden a los grupos 1, 2 y 3.

En cuanto a agresividad, la población difiere estadísticamente entre sí; sin embargo 71 de las 72 cepas probadas de *R. solanacearum* biovar 1 en este trabajo, fueron patogénicas en la variedad de plátano ‘África’ (*Musa* cv. AAB).

## **6.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

### **6.7.1. Análisis de correlación**

Se relacionaron las variables hospedero, origen geográfico, tipo de tejido, ABCPE y reacción de hipersensibilidad empleando el coeficiente de *Spearman* para variables categóricas, mediante el programa estadístico Statistical Analysis System (SAS). A cada una de las categorías de cada variable se les asignó un número para poder calcular la correlación.

Se observó una correlación débil entre ABCPE y origen ( $r = -0.11$ ;  $P = 0.34$ ), cultivo ( $r = -0.06$ ;  $P = 0.60$ ), fuente ( $r = -0.10$ ;  $P = 0.38$ ) y reacción de hipersensibilidad ( $r = -0.25$ ;  $P$

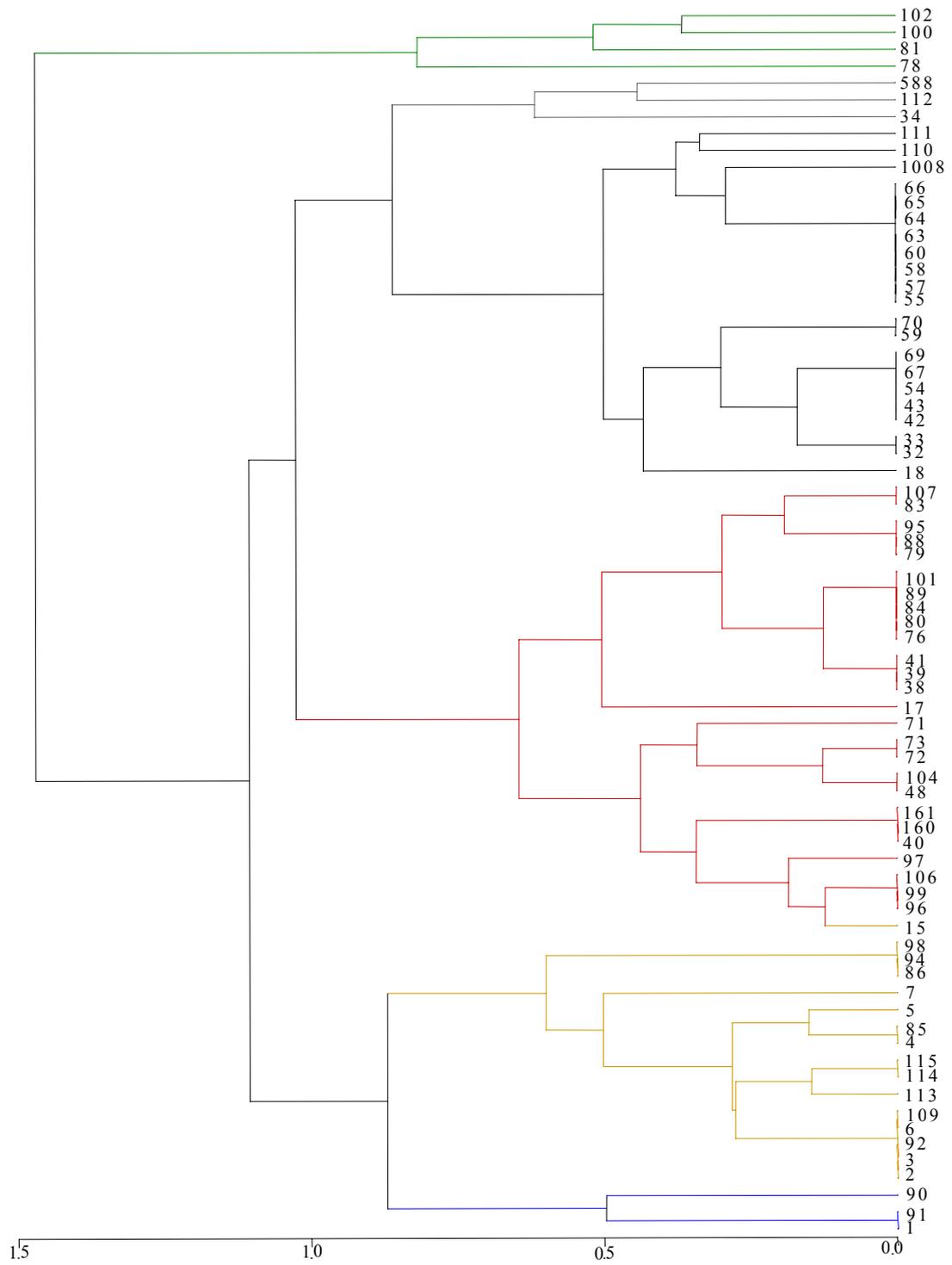
= 0.02). Hubo relación entre HR y tipo de cultivo de donde se aisló la cepa ( $r = 0.43$ ;  $P = 0.00$ ).

### **6.7.2. Análisis de correspondencia múltiple**

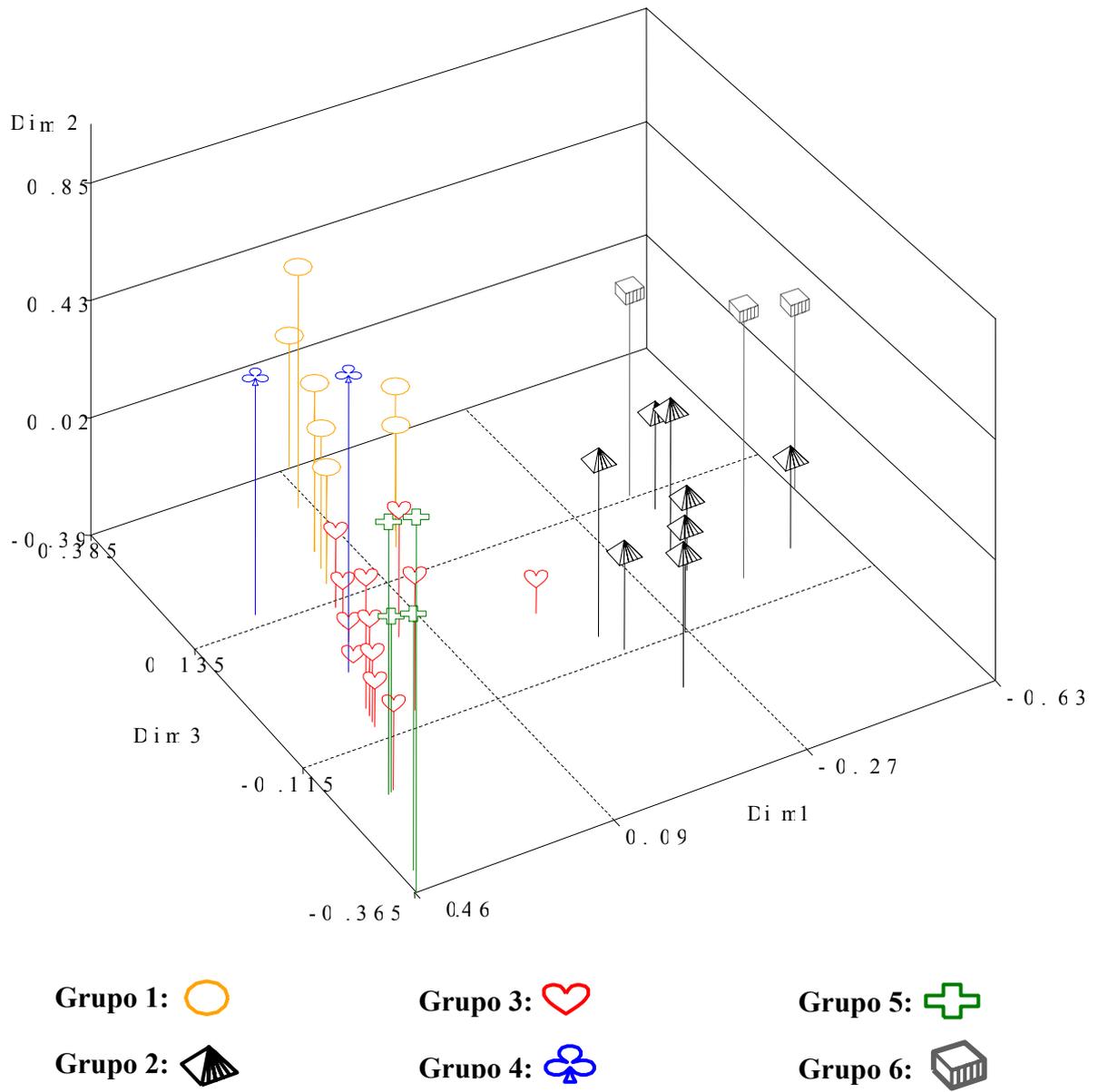
En el fenograma de la figura 20 se observan los grupos de cepas conformados con base en el análisis de correspondencia múltiple, obtenidos de acuerdo al análisis de agrupamiento (clusters) realizado para las variables hospedero, origen geográfico, tipo de tejido, ABCPE y RH. Con una similitud entre las cepas del 80%, el análisis diferenció la población en seis grupos, de los cuales los grupos 1, 2 y 3 presentaron el mayor número de individuos.

Con un total de 15 cepas, el grupo No. 1 fue el más heterogéneo con respecto al cultivo y origen, ya que incluyó cuatro cepas de banano de Antioquia, ocho plátano de Quindío y tres de heliconia del Valle del Cauca. El grupo 2 conformado en su mayoría por las 15 cepas de plátano del Meta, además de una del Valle del Cauca, dos de Caquetá y dos de banano de Magdalena. El grupo 3 con el mayor número de cepas ubica 23 aisladas de plátano del departamento de Quindío de las cuales las ocho provenientes de suelo, están dentro de este grupo. De igual forma tres cepas de plátano provenientes de Antioquia hacen parte de este grupo. Las cepas restantes aisladas de plátano del departamento de Quindío se ubicaron en los grupos 4 y 5. El grupo 6 fue conformado por tres cepas, una de banano de Magdalena junto con una de Meta y la otra de Caquetá aisladas de plátano.

La gráfica de la figura 21 presenta la distribución de los grupos formados por el análisis en tres dimensiones: posiciones que amplían la representación obtenida con el fenograma. Puede observarse que en la dimensión 3 todos los individuos del grupo 1 se encuentran dispersos junto con los del grupo 3, 4 y 5; lo anterior sugiere que las cepas de plátano de Quindío y heliconia Valle del Cauca están más relacionadas con las cepas de plátano y banano de Antioquia que con las cepas de banano de Magdalena y las de plátano de Meta y Caquetá.



**Figura 20.** Fenograma del Análisis de Correspondencia Múltiple de 73 cepas de *R. solanacearum*.



**Figura 21.** Representación espacial del Análisis de Correspondencia Múltiple de 73 cepas de *R. solanacearum*.

## 7. DISCUSIÓN

La técnica de BIO-PCR reportada por Schaad *et al.* (1995), utilizando los cebadores OLI 1 y Y2, y el medio semiselectivo SMSA resultó apropiada facilitando aislar e identificar células viables de *R. solanacearum* especialmente de suelo, donde el porcentaje de detección de este patógeno fué bajo (8%). Los mecanismos de supervivencia en suelo son complicados y poco estudiados, se cree que una de las razones por las cuales el patógeno no fue ampliamente detectado en las muestras de suelo es debido a que las poblaciones de este patógeno en suelo decaen progresivamente en el tiempo hasta un nivel indetectable (Coutinho 2005).

Las 72 cepas de *R. solanacearum* seleccionadas no fueron capaces de utilizar alguno de los tres azúcares u oxidar los tres alcoholes hexosa de las pruebas bioquímicas realizadas. Contrario a lo ocurrido con los testigos G 175, G 216 y CIAT 1004 pertenecientes al Biovar 3, los cuales produjeron ácidos a partir de los azúcares y los alcoholes hexosa probados, mostrando validez para la clasificación propuesta por (Hayward 1964; citado por Denny y Hayward, 2001 y He *et al.*, 1983), la cual agrupa las cepas negativas a esta prueba como biovar 1 y las positivas como biovar 3, evidenciado mediante el viraje de color en el medio.

Se determinó RH de las cepas de *R. solanacearum* mediante infiltración en hoja de tabaco bajo condiciones ambientales controladas. Todas las cepas RH positivas fueron avirulentas en tabaco y patogénicas en plátano a excepción de la cepa 59, la cual no causó enfermedad en plátano. La correlación entre HR y cultivo ( $r = 0.43$ ;  $P = 0.00$ ) sugiere que las cepas RH atípica (-) y no patogénicas en tabaco pueden estar limitadas a las cepas de banano y plátano de la Costa Atlántica, aunque este supuesto debe ser verificado con una mayor cantidad de cepas aisladas de Antioquia y Magdalena.

De las 72 cepas de *R. solanacearum* seleccionadas, 71 corresponden a la raza 2 y sólo la cepa 59 aislada deseudotallo de plátano Dominicó - Hartón en Fuente de oro (Meta) difiere de las demás, según la clasificación subespecífica propuesta por Buddenhagen *et al.* (1962) para razas. Esto debido a la posible expresión de algún gen de avirulencia el

cual determina la especificidad de la raza del patógeno limitando el rango de variedades hospederas o especies hospederas (Robertson *et al.* 2005). Aunque *Musa* cv. AAB es hospedero susceptible para las cepas de *R. solanacearum* provenientes de Colombia, la falta de virulencia de la cepa 59 en esta variedad de plátano y las diferencias en cuanto agresividad de la población pueden deberse probablemente a las diferencias en las variedades de plátano y la interacción del patógeno con un genotipo de plátano diferente (Infomusa 1999).

Los resultados de la prueba de separación de medias con la variable ABCPE revelaron aspectos interesantes, indicando que ciertas cepas son más agresivas en el momento de colonizar la planta.

Como puede observarse en la figura 21, aunque las cepas de *R. solanacearum* comparten una misma raza y forman cuatro grupos de acuerdo a su agresividad "dato determinante en la separación de los grupos mediante ACM", se evidencia que las cepas no pueden agruparse dentro de grupos por procedencia o tipo de cultivo y estos grupos de agresividad permanecen juntos dentro de los diferentes grupos de ACM, contrario a lo descrito en el informe anual CIAT (2005) en donde pueden observarse grupos de acuerdo al tipo de cultivo del cual se aislaron mediante la técnica molecular RAMS para 53 de estas cepas.

La variabilidad en cuanto agresividad para las 72 cepas biovar 1, es una evidencia de que ocurre diversidad natural en cuanto a la patogenicidad de la bacteria, debido a que posiblemente todas las cepas son originarias de regiones geográficas diferentes, con fuertes cambios en las condiciones edafoclimáticas y con diferencias genéticas entre sí, como lo confirma el reciente estudio realizado con 53 de 72 cepas utilizadas en este trabajo mediante análisis con la técnica RAMS, el cual demuestra que hay cambios a nivel infrasub-específico (intra e interespecífico) para cepas provenientes de musáceas (CIAT 2005)

Los resultados también revelaron que las cepas obtenidas de cultivos de banano y heliconia no se diferenciaron de las obtenidas de plátano, con relación a la patogenicidad en la variedad de plátano 'África' (*Musa* cv. AAB), pero sí difirieron en cuanto a agresividad. Las variaciones encontradas en cuanto a agresividad pueden explicar

diferencias epidemiológicas existentes entre las diversas áreas estudiadas o especie hospedera de la cual se aisló, reforzando la necesidad de hacer una identificación de nuevas especies vegetales que no sean hospederas susceptibles y establecer estrategias para el control de Moko a nivel regional, trabajando con las cepas locales (Martins *et al.* 2001).

Con base en los resultados de los ensayos presentados en este trabajo, y mediante el análisis de correlación no se observó relación entre la agresividad y otras características del patógeno como origen, cultivo, fuente y reacción de hipersensibilidad, lo que evidencia que independientemente de su procedencia, la bacteria tiene un comportamiento diferente, posiblemente a que su patogenicidad no depende de su hábitat; y los cambios en su comportamiento se deban posiblemente a pequeñas modificaciones genotípicas con repercusiones fenotípicas, según lo observado en el trabajo de variabilidad genética con RAMS para 53 de estas cepas (CIAT 2005), en el cual no solamente se tienen en cuenta los genes de patogenicidad que abarcan una pequeña fracción del genoma sino que estudia la variabilidad de la bacteria involucrando todo el genoma de la bacteria.

La agresividad entre las cepas es independiente del tipo de tejido del cual se aislaron ( $r = -0.10$ ;  $P = 0.38$ , dependiendo del aislamiento), posiblemente porque existen mecanismos de resistencia diferentes dependiendo del tejido, como lo mencionan Witsenboer *et al.* (1989), en su trabajo con *Alternaria* en tomate y tabaco.

La gran diversidad genética y patogénica de las cepas (Gómez 2005; CIAT 2005), explica la posible dificultad para producir variedades de plátano resistente a la enfermedad, razón por la cual las diferencias en cuanto a agresividad pueden ser un beneficio para la búsqueda de materiales resistentes a la enfermedad y adaptables a diferentes regiones, sin embargo en el momento en que se presente la enfermedad en el cultivo la expresión de los síntomas en cuestiones de tiempo y consecuencias puede ser impredecible.

El método de evaluación en invernadero permitió evaluar un amplio número de cepas, empleando una técnica eficiente, económica y con la cual se obtienen resultados en poco tiempo. Por lo tanto, puede ser promisorio para aplicar en futuros trabajos con cepas de características diferentes o en busca de variedades de plátano resistentes. Sin embargo se

corre el riesgo de cometer errores subjetivos por el uso de la escala en el momento de la evaluación (Orozco *et al.*, 2004).

## 8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio permitieron obtener las siguientes conclusiones:

La implementación de la técnica de BIO-PCR, mediante el uso de medio semiselectivo SMSA facilitó el aislamiento, detección e identificación de células viables del patógeno en suelo y plantas debido a la reducción en el crecimiento de bacterias saprófitas y cambios morfológicos de las colonias en el medio.

Las pruebas de rutina para identificación de bacterias, KOH y oxidasa, utilizadas en la selección de bacterias provenientes de SMSA produjeron los resultados esperados, ayudando a la selección de cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Ralstonia*, para posteriormente continuar con su identificación mediante PCR.

Todas las cepas evaluadas obtenidas de plátano afectado corresponden al biovar 1, por lo que se concluye al no encontrar diferencias de biovars entre las cepas evaluadas provenientes de los departamentos de Caquetá, Meta, Valle del Cauca, Quindío, Magdalena, ausencia del biovar 3 también presente en musáceas, en las cepas de Colombia evaluadas.

Los síntomas típicos de la enfermedad del Moko se reprodujeron inoculando la variedad de plátano 'África' (*Musa* cv. AAB) bajo condiciones de invernadero, con las cepas de Colombia, mostrando susceptibilidad a las cepas de *R. solanacearum* raza 2 biovar 1.

Los valores de ABCPE obtenidas para la población de la bacteria estudiada mostraron diferencias considerables formando cuatro grupos con respecto a la agresividad, sin mostrar relación con respecto al origen, cultivo y tejido, lo que indica que la patogenicidad de las cepas es independiente de su procedencia.

La caracterización y diferencias encontradas en la colección de cepas de *R. solanacearum* conformada en este trabajo son fundamentales para predecir la patogenicidad de las cepas o ayudar al control de la enfermedad en Colombia.

Dentro de cada uno de los grupos del ACM, no se presentó ningún agrupamiento con respecto a la patogenicidad, por lo tanto se puede decir que para esta característica existe diversidad entre las cepas de *R. solanacearum* raza 2 aisladas de Colombia.

## **9. RECOMENDACIONES**

Es necesario realizar ensayos en campo para identificar las especies y variedades más adecuadas, con el fin de buscar fuentes de resistencia y nuevas estrategias para el control de la enfermedad. Estos ensayos deben ser realizados, en diferentes áreas o regiones, trabajando en suelos naturalmente infectados.

Un ensayo con un gran número de variedades podrá confirmar los resultados obtenidos en este trabajo y generará mayor información para un manejo adecuado de la enfermedad, evaluando además la sobrevivencia de la bacteria en campo y en otros cultivos reportados como no hospederos de la bacteria.

## 10. REFERENCIAS

ANONYMOUS. 1999. Workshop on banana cultivar names in and synonyms Southeast Asia. Infomusa 8. pg. 37 - 39

AGRIOS, G. N. 1997. [Plant pathology](#). 4. ed. Academic Press, San Diego, CA, USA. 635 p.

BUDDENHAGEN, I., SEQUEIRO, L., KELMAN, A. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 52, 706.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT). 2005. Crop and agroecosystem management health. En edición.

COOK, D. AND L. SEQUEIRA. 1994. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum*: Detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. Mol. Plant-Microbe Interact. 2:113-121.

COUTINHO, T. A. 2005. Introduction and prospectus on the survival of *R. Solanacearum*. Páginas 29-38 en: ALLEN, C; PRIOR, P; HAYWARD, A. C. (eds.). Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. The American Phytopathological Society (APS). St Paul, MN, USA.

DE OLIVEIRA E SILVA, S. DE MELLO VERAS, S. GASPAROTTO, L. RIRES DE MATOS, A. MACIEL CORDEIRO, J. Z. BOHER B. 2000. Evaluación de Musa spp. para la resistencia a la enfermedad de Moko (*Ralstonia solanacearum*, raza 2). INFOMUSA. 9 (1): 19-20.

DENNY, T.P. HAYWARD, A.C. 2001. GRAM-NEGATIVE BACTERIA. Páginas 151-173 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.

DRISTIG, M. C. G., DIANESE, J. C. 1990. Characterization of *Pseudomonas solanacearum* biovars based on membrane protein patterns. *Phytopathology*. 80: 641-646.

EDEN-GREEN<sup>a</sup>, S.J. 1994. Diversity of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria in South East Asia: new direction for moko disease. Páginas 24 – 25 en: *Bacterial wilt: the disease and its causative organism, Pseudomonas solanacearum*, A.C. Hayward and G.L. Hartman, eds. CAB international, Wallingford, UK.

EDEN-GREEN<sup>b</sup>, S.J. 1994. Mancha rojiza del pseudotallo del banano o “Blood Disease”. Inibap. Enfermedades de *Musa*. Hoja divulgativa No. 3.

ENGELBRECHT, M. C. HATTING, M. J. 1989. Numerical analysis of phenotypic features of *Pseudomonas solanacearum* isolated from tobacco and other hosts in South Africa. *Plant Disease*. 73: 839-898.

(EPPO) EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION. ORGANIZATION 1990. Quarantine procedure No. 26. *Pseudomonas solanacearum*. Inspection and test methods. *Bulletin* 20: 255-262.

FENG, J.; ZHANG, M.; BAI, X.; HAN, B.; LIU, T.; FAN, M.; TANG, J. M. A. Q. 1992. One specific DNA piece in *Pseudomonas solanacearum* affecting *Arachis hypogaea*. INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, Kaoshiung, Proceedings. Kaoshiung: ACIAR, 1992: 245-251.

FRENCH, E.B.GUTARRA, L. ALEY, P. ELPHINSTONE, J. 1995. Culture Media for *Ralstonia solanacearum* Isolation, Identification and Maintenance. *Fitopatología*. 30 (3): 126-130.

GÓMEZ, E. A., ÁLVAREZ, E. y LLANO, G. 2005. Identificación y caracterización de cepas de *Ralstonia solanacearum* raza 2, agente causante del Moko de plátano en Colombia. *Fitopatología Colombiana*. Vol. 28 (2): 71-75.

GOSZCZYNSKA, T. SERFONTEIN, J. J. SERFONTEIN, S. 2000. Introduction to Practical Phyto bacteriology. First edition. Safrinet. Pretoria – South Africa. 83p.

HAYWARD, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology. 29: 64-87.

HERRERA, J. W. ARISTIZÁBAL, M. 2003. Caracterización del crecimiento y producción de híbridos y cultivariedades de plátano en Colombia. *INFOMUSA*. 12 (2): 22-24.

HE, L.Y. SEQUEIRA, L. KELMAN, A. 1983. Characteristics of Strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. Plant Disease. 67 (12): 1357-1361.

INFOAGRO (2005). El cultivo del plátano. *Infoagro* [en línea]: *Enfermedades: Enfermedades tropicales: El cultivo del plátano*. <[http://www.infoagro.com/frutas-frutas\\_tropicales/platano.htm](http://www.infoagro.com/frutas-frutas_tropicales/platano.htm)> [Consulta: 4 de Marzo. 2005].

ITO, S. USHIJIMA, Y. FUJII, T. TANAKA, S. KAMEYA-IWAKI, M. YOSHIWARA, S.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.

JONES, D. R., LOCKHART B. E. L. 1993. Enfermedad causada por el virus del rayado del banano (Banana Streak Virus). Inibap. Enfermedades de *Musa*. Hoja divulgativa No. 1.

KANGIRE, A. RUTHERFORD, M. 2001. Desorden parecido al marchitamiento en los bananos de Uganda. Inibap. Enfermedades de *Musa*. Hoja divulgativa No. 10.

KELMAN, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanaearum* to coloni appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology. 44: 693-695.

KELMAN, A., SEQUEIRA, L. 1965. Root-to-root spread of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 55:304-9.

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

MARTINS, O. L. 2000. Polymerase Chain reaction in the diagnosis of bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* Georg-August University, Göttingen, Germany. 127 págs.

MARTINS, J. M., TAKATSU, A., UESUGI, C. 2001. Colonizacáo radicular de plantas cultivadas por *R. solanacearum* biovares 1, 2 e 3. *Scientia Agrícola*, v.58, n3. 497-500.

MOLINA A. 1999. Enfermedades de la podredumbre de las frutas de los bananos en el Sudeste de Asia. *INFOMUSA* — Vol 8, N° 1

MOORE, N.Y. BENTLEY, S. PEGG, K. G. JONES, D. R. 1995. Marchitamiento del banano ocasionado por *Fusarium*. Inibap. Hoja divulgativa No. 5.

ORGANISMO INTERNACIONAL REGIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA “OIRSA” (2001: El Salvador). *OIRSA* [En línea]: *Sanidad vegetal: El cultivo del plátano: Plagas que lo atacan. Septiembre, 2001*. El Salvador: Roger A. Landaverde Toruño. <<http://www.oirsa.org/DTSV/Manuales/Manual10/Cultivo-del-Platano-01.htm>> [Consulta: 4 de Marzo. 2005].

OROZCO E. F., TAKATSU A., UESUGI C. H. 2004. Colonizacáo de raízes de plantas daninhas cultivadas *in vitro* e em vasos por *Ralstonia solanacearum*, biovares 1, 2 e 3. *Fitopatología Brasileira* 29 (2) 121-127.

QUINON V. L., ARAGAKI M., ISHII M. 1964. Pathogenicity and serological relationships of three strains of *Pseudomonas solanacearum* in Hawaii. *Phytopathology* 54:1096-9.

ROBERTSON, A. E.; FORTNUM, B. A.; WECHTER, W. P. DENNY, T. P.; KLUEPFEL, D. A. 2005. Introduction and prospectus on the survival of *R. Solanacearum*. Páginas 29-38 en: ALLEN, C; PRIOR, P; HAYWARD, A. C. (eds.). *Bacterial wilt disease*

and the *Ralstonia solanacearum* species complex. The American Phytopathological Society (APS). St Paul, MN, USA.

RODRÍGUEZ, J. L. RODRÍGUEZ, A. 2001. Aspectos socioeconómicos del cultivo del plátano en Colombia. *INFOMUSA*. 10 (1): 4-9.

ROLDÁN, D. SALAZAR, M. TEJADA, M. PEÑA, Y. Febrero, 2002 Actualizado: Abril 2004. CARACTERIZACIÓN DE LA CADENA DE PLÁTANO EN COLOMBIA. DOCUMENTO DE TRABAJO No. 10 Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá, Colombia. <<http://www.agrocadenas.gov.co>> [Consulta: 4 de Marzo. 2005}

SEAL, S. E. ELPHINSTONE, J. G. 1994 Advances in identification and detection of *Pseudomonas solanacearum*. Pages 35 – 57 in: A. C. Hayward and G. L. Hartman, eds., Bacterial wilt: The disease y its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum* . CAB International, Wallingford.

SEAL, S. E. TAGHAVI, M. FEGAN, N. HAYWARD, A. C. FEGAN, M. 1999. Determination of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* rDNA subgroups by PCR test. *Plant Pathology* 48: 115 – 120.

SCHAAD, N.W. CHEONG, S.S. TAMAKI, S. HATZILOUKAS, E. PANOPOULOS, N.J. 1995. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology*. 85 (2): 243 – 248.

THOMAS, J.E. ISKRA-CARUANA, M-L. JONES, D.R. 1994. Enfermedad del cogollo racemoso del banano o “Banana bunchy top disease”. Inibap. Enfermedades de *Musa*. Hoja divulgativa No. 4.

VANDERPLANK, J. E. 1984. Disease resistance in plants. Orlando: Academic.

VARGAS SÁNCHEZ, J. E. GALINDO ÁLVAREZ, J. R. BUITRAGO GALLEGO, É.  
VARGAS SÁNCHEZ, L. A. 2002. XV reunión internacional acorbat “Manejo integrado del Moko del plátano en el Quindío-Colombia”. Pagina 320.

WINSTEAD, N. N., KELMAN, A. 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 42:628-634.

WITSENBOER, H. H. A., GRIEND, E.G. VAN DE, TIERSMA, J.B., NIJKAMP, H.J. and HILLE, J. 1989. Tomato resistance to *Alternaria* stem canker: Localization in host genotypes and functional expression compared to non-host resistance. *Theoretical and Applied Genetics* 78 (4): 457 – 462.

YU, Q. ALVAREZ, A.M. MOORE, P.H. ZEE, F. KIM, M.S. DE SILVA, A. HEPPELY, P.R. MING, R. 2003. Molecular Diversity of *Ralstonia solanacearum* Isolated from Ginger in Hawaii. *Phytopathology*. 93 (9): 1124-1130.

YABUUCHI, E., Y. KOSATO, I. YANO, H. HOTTA, Y. NISHIUCHI. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1986) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 39: 897-904.

## 11. ANEXOS

### Anexo 1. Análisis de varianza para la agresividad de las 72 cepas de *R. solanaceum* aislados de cultivos de plátano, banano y heliconia en Colombia

#### Randomized Complete Block AOV Table for ABCPE

Source	DF	SS	MS	F	P
REPET	3	3594	1197.96		
AISLAMENT	73	167061	2288.51	5.48	0.0000
Total	335				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 42.504 CV 48.09

Relative Efficiency, RCB 1.02

#### Means of ABCPE for AISLAMENT

AISLAMENT	N	Mean	SE	AISLAMENT	N	Mean	SE
1	4	18.000	10.220	78	4	73.375	10.220
2	4	69.375	10.220	79	4	66.875	10.220
3	4	49.000	10.220	80	4	67.875	10.220
4	4	43.125	10.220	81	4	10.875	10.220
5	4	38.750	10.220	83	4	55.000	10.220
6	3	33.104	11.801	84	4	61.000	10.220
7	3	63.437	11.801	85	4	68.375	10.220
15	4	37.625	10.220	86	4	59.750	10.220
17	4	69.500	10.220	88	4	61.750	10.220
18	4	42.500	10.220	89	4	60.375	10.220
32	4	33.875	10.220	90	4	19.250	10.220
33	4	40.375	10.220	91	4	19.375	10.220
34	4	27.625	10.220	92	4	63.125	10.220
38	4	59.500	10.220	94	4	47.250	10.220
39	4	62.000	10.220	95	4	65.625	10.220
40	4	15.750	10.220	96	4	33.000	10.220
41	4	56.250	10.220	97	4	28.625	10.220
42	4	28.000	10.220	98	4	59.500	10.220
43	4	20.750	10.220	99	4	40.250	10.220
48	4	37.125	10.220	100	4	71.875	10.220
54	4	36.250	10.220	101	4	58.500	10.220
55	4	55.250	10.220	102	4	1.3750	10.220
57	4	45.625	10.220	104	4	41.250	10.220
58	4	56.625	10.220	106	4	24.750	10.220
59	4	1.56E-13	10.220	107	4	68.250	10.220
60	4	47.250	10.220	109	4	45.125	10.220
63	8	50.688	7.227	110	4	63.250	10.220

64	4	46.125	10.220	111	4	34.375	10.220
65	4	47.625	10.220	112	4	29.500	10.220
66	4	69.750	10.220	113	4	40.500	10.220
67	4	41.625	10.220	114	4	40.375	10.220
69	4	27.000	10.220	115	4	33.625	10.220
70	4	5.7500	10.220	160	4	12.375	10.220
71	4	21.250	10.220	161	4	1.7500	10.220
72	4	10.750	10.220	200	23	0.4679	4.262
73	4	10.750	10.220	588	4	71.250	10.220
76	4	61.875	10.220	1008	23	65.598	4.262

**Anexo 2.** Correlación de las variables origen, cultivo, tipo de tejido (fuente), ABCPE y RH, mediante el coeficiente de Spearman.

The SAS System

The CORR Procedure

6 Variables: origen cultivo fuente area garea hiper

Simple Statistics

Variable	N	Mean	Std Dev	Median	Minimum	Maximum
origen	73	2.52055	1.87164	1.00000	1.00000	7.00000
cultivo	73	1.17808	0.48139	1.00000	1.00000	3.00000
fuelle	73	4.76712	1.88945	6.00000	1.00000	7.00000
area	73	43.04068	20.12467	43.13000	0	73.38000
garea	73	1.71233	0.79021	2.00000	1.00000	4.00000
hiper	73	1.12329	0.33104	1.00000	1.00000	2.00000

Spearman Correlation Coefficients, N = 73

Prob > |r| under H0: Rho=0

	origen	cultivo	fuelle	area	garea	hiper
origen	1.00000	0.31388 0.0068	0.24565 0.0362	-0.11211 0.3450	0.01915 0.8723	0.11064 0.3514
cultivo	0.31388 0.0068	1.00000	-0.07486 0.5290	-0.06125 0.6067	0.11428 0.3357	0.43063 0.0001
fuelle	0.24565 0.0362	-0.07486 0.5290	1.00000	-0.10213 0.3899	0.01506 0.8994	-0.10631 0.3707
area	-0.11211 0.3450	-0.06125 0.6067	-0.10213 0.3899	1.00000	-0.74258 <.0001	-0.25905 0.0269
garea	0.01915 0.8723	0.11428 0.3357	0.01506 0.8994	-0.74258 <.0001	1.00000	0.23614 0.0443
hiper	0.11064 0.3514	0.43063 0.0001	-0.10631 0.3707	-0.25905 0.0269	0.23614 0.0443	1.00000

**Anexo 3.** Resultados del Análisis de Correspondencia Múltiple para las variables origen, cultivo, tipo de tejido (fuente), ABCPE y RH.

The SAS System  
The CORRESP Procedure

Inertia and Chi-Square Decomposition

Singular Value	Principal Inertia	Chi-Square	Percent	Cumulative Percent	10	20	30	40	50
0.28703	0.08239	67.968	50.07	50.07	-----+-----+-----+-----+-----+--	*****	*****	*****	*****
0.23312	0.05435	44.835	33.03	83.10	*****	*****	*****	*****	*****
0.14393	0.02072	17.091	12.59	95.69	*****	*****	*****	*****	*****
0.08423	0.00709	5.853	4.31	100.00	**	**	**	**	**
Total	0.16454	135.747	100.00						

Degrees of Freedom = 288

The CLUSTER Procedure  
Average Linkage Cluster Analysis

Cluster History

NCL	--Clusters Joined---		FREQ	SPRSQ	RSQ	ERSQ	CCC	PSF	PST2	Norm RMS Dist
28	CL49	CL43	5	0.0012	.995	.	.	305	.	0.1907
27	CL37	CL32	8	0.0037	.991	.	.	191	56.1	0.2764
26	CL27	CL31	11	0.0034	.987	.	.	148	6.7	0.2822
25	CL39	1008	9	0.0021	.985	.	.	135	.	0.29
24	CL34	CL28	13	0.0065	.979	.	.	98.7	35.3	0.2973
23	CL30	CL58	9	0.0036	.975	.	.	89.6	22.5	0.2989
22	110	111	2	0.0015	.974	.	.	90.0	.	0.3338
21	CL33	71	5	0.0025	.971	.	.	87.8	16.8	0.3404
20	CL29	CL40	8	0.0057	.966	.	.	78.1	33.7	0.3423
19	100	102	2	0.0018	.964	.	.	79.6	.	0.3641
18	CL25	CL22	11	0.0047	.959	.	.	75.5	11.8	0.375
17	18	CL23	10	0.0042	.955	.	.	73.8	7.1	0.4313
16	CL20	CL21	13	0.0120	.943	.	.	62.6	13.6	0.4379
15	112	588	2	0.0027	.940	.	.	65.0	.	0.4407
14	CL52	90	3	0.0046	.935	.885	6.97	65.8	.	0.4971
13	CL17	CL18	21	0.0276	.908	.875	3.73	49.3	30.3	0.499
12	CL26	7	12	0.0058	.902	.864	4.12	51.1	7.2	0.5019
11	17	CL24	14	0.0059	.896	.851	4.61	53.5	8.3	0.5028
10	81	CL19	3	0.0043	.892	.836	5.44	57.8	2.3	0.5153
9	CL12	CL48	15	0.0212	.871	.818	4.56	53.9	20.2	0.5997
8	34	CL15	3	0.0061	.865	.797	5.59	59.3	2.3	0.6153
7	CL16	CL11	27	0.0596	.805	.770	2.34	45.4	41.2	0.6443
6	78	CL10	4	0.0123	.793	.737	3.56	51.2	4.0	0.8162
5	CL13	CL8	24	0.0405	.752	.694	3.41	51.6	16.6	0.8589
4	CL14	CL9	18	0.0429	.709	.634	4.15	56.1	17.4	0.8702
3	CL7	CL5	51	0.2759	.433	.474	-1.5	26.8	71.2	1.0249
2	CL4	CL3	69	0.2689	.164	.272	-3.9	14.0	32.9	1.1051
1	CL2	CL6	73	0.1645	.000	.000	0.00	.	14.0	1.4692