

## CONTROL INTEGRADO DE LA MARCHITEZ BACTERIANA DE LA PAPA

S. Priou, P. Aley, E. Chujoy, B. Lemaga and E. French

## CONTROL INTEGRADO DE LA MARCHITEZ BACTERIANA DE LA PAPA

**Autores: S. Priou, P. Aley, E. Chujoy, B. Lemaga y E. R. French**

*Ralstonia solanacearum* es el agente causal de la Marchitez Bacteriana (MB) de la papa. Esta bacteria afecta a más de 30 especies de plantas, de las cuales la papa, el tomate, la berenjena, el tabaco, el pimiento, el plátano y el maní son los cultivos más afectados. La presencia del agente patógeno a nivel mundial se debe a su diseminación a través del tubérculo-semilla con infección latente. La marchitez bacteriana es el segundo factor limitante más importante para la producción de papa en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. La cuarentena, medida necesaria para evitar el ingreso de la enfermedad a las áreas no infectadas limita la producción de semilla de papa y la comercialización de papa para consumo entre los países así como entre regiones infectadas y no infectadas dentro de un mismo país. La limitada disponibilidad de semilla de alta calidad y la falta de conocimiento de los agricultores de las prácticas agronómicas adecuadas, amenazan la

sostenibilidad del cultivo de papa en el mundo en desarrollo. La incidencia de la MB sólo puede reducirse si se combinan diversos componentes de control. Esto incluye principalmente el uso de semilla sana en suelo libre del patógeno, variedades resistentes, rotación con cultivos no hospedantes y la aplicación de diversas prácticas agrícolas de saneamiento. Un buen manejo integrado de esta enfermedad puede conducir a la reducción significativa e incluso a la erradicación de la marchitez bacteriana.

2



### **DISTRIBUCION MUNDIAL DE *R. solanacearum* DE LA PAPA**

La marchitez bacteriana se ha diseminado a la mayoría de países productores de papa. Esta enfermedad se encuentra afectando en todo el centro y sur de África, y constituye una grave limitación para la producción en Uganda, Etiopía, Kenia, Madagascar, Ruanda, Burundi, Nigeria y Camerún. Aunque no es una enfermedad grave en Egipto, la infección latente de los tubérculos ha provocado la disminución de las exportaciones de papa hacia Europa. En el sur de Asia, la MB afecta a los cultivos ubicados a altitudes moderadas de los Himalayas en Pakistán, Nepal y

Bután; también a altitudes moderadas y planicies de la India, donde está siendo eficazmente controlada. En Indonesia, Filipinas, Vietnam del Sur, Laos, Japón y sur de China, ubicados en el oriente y sudeste de Asia, la MB constituye una enfermedad severa. A comienzos de los años noventa, la MB se convirtió en una grave amenaza para la producción de papa en los países europeos, incluyendo a Bélgica, Inglaterra, Francia, Países Bajos, España, Italia y Portugal. Se ha encontrado también en Rusia. En Suecia hubo una incidencia de MB pero se logró erradicar. En América Latina, se ha reportado la existencia de esta enfermedad en todos los países productores de papa con excepción de Ecuador. Su presencia en Australia y en el sudeste de los Estados Unidos ha estimulado las investigaciones sobre la enfermedad en estos países.

3



### **PROSPECCION Y DIAGNOSTICO**

La inspección de los campos de papa es de gran importancia para los esquemas de certificación de semilla. De esta manera se identifican las áreas infectadas donde los servicios nacionales de protección de cultivos darán las medidas necesarias sobre el

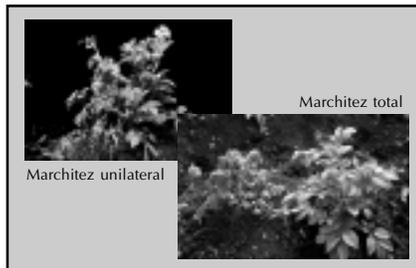
control y la cuarentena. Asimismo, el diagnóstico precoz de la enfermedad permite que los agricultores puedan definir una adecuada estrategia de manejo. El diagnóstico en los campos infestados con MB se puede realizar mediante la identificación de los síntomas en el follaje y tubérculos durante el período vegetativo o durante la cosecha.

4



### **Síntomas en el follaje**

5



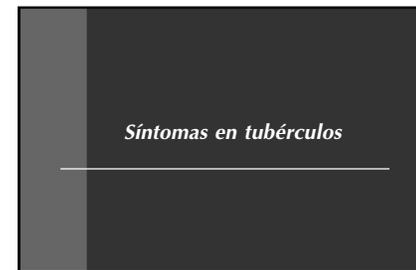
### **Marchitez unilateral y total de la planta de papa**

El síntoma característico de la enfermedad es la marchitez, y a veces un ligero amarillamiento. La marchitez puede iniciarse en un solo lado de la hoja, tallo o planta. Otro de los síntomas consiste en un oscurecimiento de los haces vasculares que se puede observar externamente o al hacer un corte transversal del tallo. Si el desarrollo de la enfermedad es rápido, toda la planta se marchita sin mostrar amarillamiento. O el tallo enfermo puede marchitarse

completamente y secarse, mientras que el resto de la planta permanece aparentemente sano.

### **Síntomas en el tubérculo**

6



7



### **Exudado bacteriano en los ojos del tubérculo**

Cuando la infección es grave los síntomas externos en el tubérculo son visibles durante la cosecha formando un exudado bacteriano que se concentra en los ojos del tubérculo o al extremo del estolón, ocasionando que la tierra se adhiera a las secreciones.

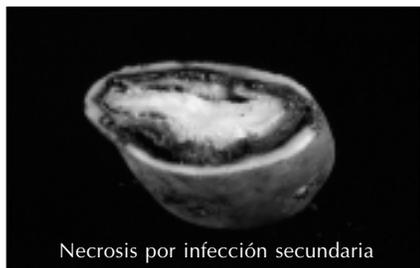
8



### **Exudado bacteriano del anillo vascular**

El síntoma del tubérculo se describe por lo general como pudrición parda. Un corte transversal en el tubérculo muestra una coloración marrón del anillo vascular y si se presiona ligeramente, exuda un mucílago lechoso.

9



También puede ocurrir que la exudación sea en forma natural sin necesidad de ejercer presión.

### Necrosis por infección secundaria

El anillo vascular o el tubérculo entero se pueden desintegrar completamente en las etapas más avanzadas de desarrollo de la necrosis. Esto a menudo incluye una infección secundaria con bacterias saprofitas (*Erwinia* spp., *Clostridium* sp.) u hongos (*Fusarium* sp., *Pythium* sp.).

10



### Diagnóstico en campo

11

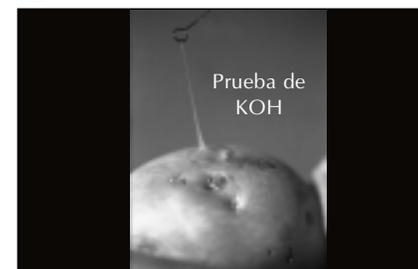


### Prueba del flujo vascular

Es necesario efectuar una prueba de diagnóstico ya que la marchitez de la planta causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum* puede confundirse con los síntomas inducidos por otros agentes patógenos como *Fusarium eumartii*, *Verticillium* sp., *Erwinia chrysanthemi*, por daños mecánicos o por los causados por insectos en la base del tallo. El diagnóstico en el campo se puede

realizar fácilmente: se corta un pedazo de 2-3 cm de largo de la base del tallo y se coloca en agua limpia en un recipiente de vidrio. Se puede sujetar el tallo con un clip abierto para mantener su posición vertical. En pocos minutos se observarán filamentos finos y lechosos que emanan del tallo cortado. Este exudado lechoso del tallo refleja la presencia de *R. solanacearum* en el sistema vascular.

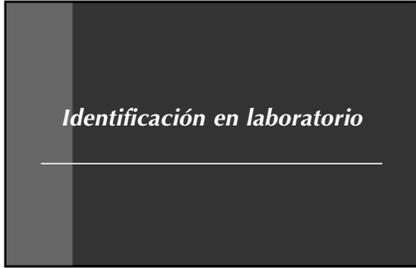
12



### Prueba de KOH

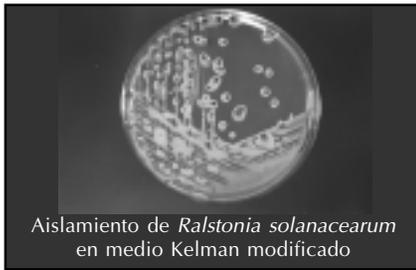
Los síntomas de la pudrición parda en los tubérculos se pueden confundir con los de la pudrición anular causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (antes llamada *Corynebacterium sepedonicum*). Se puede realizar una prueba diferencial y rápida directamente con el exudado bacteriano del tubérculo para diferenciar ambas bacterias. Se colocan dos gotas de hidróxido de potasio (KOH) al 3% en el exudado y se mezclan con una ansa o un mondadientes de madera durante 10 segundos. La formación de un hilo lechoso al levantar el mondadientes indica la presencia de *R. solanacearum* (bacteria Gramnegativa). En el caso de *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (bacteria Grampositiva), no se forma el hilo.

13



**Identificación en laboratorio**

14



Aislamiento de *Ralstonia solanacearum* en medio Kelman modificado

**Aislamiento de *R. solanacearum* en medio Kelman modificado**

El agente causal de la MB puede ser aislado de tubérculos o tallos infectados sembrando el exudado bacteriano del tubérculo o dos gotas de la suspensión obtenida en la prueba del flujo vascular en medio Kelman modificado (TZC con solo 2.5 g de dextrosa). Después de 48 h de incubación a 30°C, las colonias fluidas y ligeramente rojizas de *R. solanacearum* se distinguen fácilmente de otras bacterias saprofitas (colonias redondeadas y de color rojo oscuro).

15



**Prueba de patogenicidad**

Para confirmar la patogenicidad de *R. solanacearum* se inoculan plantas de tomate o de papa con un cultivo purificado en medio Kelman. Se inoculan los tallos de

plántulas jóvenes de papa o de tomate inyectando 20 µl (o sea una gota) de una suspensión bacteriana de *R. solanacearum* a 10<sup>8</sup> ufc/ml con una jeringa de propileno de un milímetro y con una aguja hipodérmica. Otro método de inoculación consiste en insertar un mondadientes con bacterias crecidas en medio Kelman en la axila de la tercera hoja. Las condiciones de invernadero que favorecen el desarrollo de la enfermedad son 28±4 °C, H.R. de 80-90%, y luz natural. Las plantas se riegan normalmente hasta un día antes de la inoculación. Si el aislamiento es un variante patogénico de *R. solanacearum*, la marchitez de las plántulas de tomate o de papa se puede iniciar en menos de una semana o, en todo caso, en cuatro semanas. Una vez que aparecen los síntomas, se puede realizar la prueba del flujo vascular y aislar nuevamente el agente patógeno según el procedimiento anteriormente descrito.

16

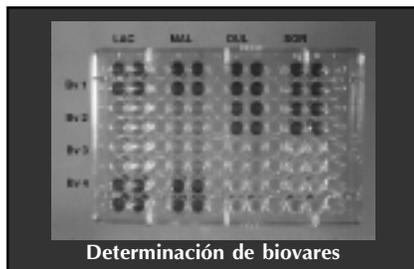
**Diferenciación de *R. solanacearum* en biovares**

PRUEBAS BIOQUIMICAS	BIOVARES				
	1	2	3	4	5
Utilización de : • lactosa, maltosa y celobiosa	-	+	+	-	+
Oxidación de : • manitol • sorbitol, dulcitol	-	-	+	+	+
	-	-	+	+	-

**Diferenciación de *R. solanacearum* en biovares**

Existen dos sistemas de clasificación para *R. solanacearum*: el sistema de razas y el sistema de biovares. El sistema de biovares consiste en

17



Determinación de biovares

### Determinación de biovares

Todas estas pruebas bioquímicas se pueden realizar juntas en placas de microtitulación. El uso de disacáridos o la oxidación del alcohol producen la acidificación del medio, expresada por el cambio de color del medio de verde (pH neutro) a amarillo (pH ácido).

pruebas bioquímicas basadas en la capacidad de la bacteria para utilizar tres disacáridos y/u oxidar tres alcoholes de hexosa. La clasificación de biovar se basa en: Bv 1 = reacción negativa para la utilización de los disacáridos y la oxidación de los alcoholes; Bv 2 = positivo para la utilización de los disacáridos, negativo para la oxidación de los alcoholes; Bv 3 = positivo para la utilización de los disacáridos y la oxidación de los alcoholes; Bv 4 = negativo para la utilización de los disacáridos, positivo para la oxidación de los alcoholes; Bv 5 = positivo para la utilización de los disacáridos, positivo solamente para la oxidación del manitol.

18

Razas	Biovares	Hospedantes	Distrib. geográfica
1	1, 3, 4	Solanáceas y otros	Zonas bajas de los trópicos
2	1, 3	Musáceas = Moko	América y Asia tropical
3	2A	Papa Tomate	Zonas frías
4	5	Morera	China
No conocida	2T	Numerosos	Principalmente en zonas bajas de sudamérica

### Equivalencia entre raza y biovar en *R. solanacearum*

El sistema de razas se basa en la gama de hospedantes en condiciones de campo. Se pueden distinguir cuatro razas:

- La raza 1 afecta a una amplia gama de solanáceas que incluyen a la papa y varias malezas. Algunos variantes pueden afectar al maní, el jengibre y al plátano diploide. Es común en las regiones bajas así como en los trópicos y subtrópicos.
- La raza 2 afecta a las plantas de la familia Musaceae, como el plátano triploide, platanillo y *Heliconia* spp. en los trópicos.
- La raza 3 afecta principalmente a la papa y ocasionalmente al tomate y otros cultivos y malezas solanáceas. Es común en zonas o latitudes mayores (climas fríos).
- La raza 4 afecta a la morera y sólo se presenta en la China.

Existe una equivalencia entre raza y biovar: la raza 3 coincide con el biovar 2A. La raza 1 coincide con los biovares 1, 3 y 4; el biovar 1 siendo el más común en papa. No se ha establecido ninguna raza para el biovar 2T, el cual se encuentra principalmente en las

19



### CICLO DE LA MARCHITEZ BACTERIANA

Papas infectadas (tubérculos-semilla, restos de cosecha o plantas infectadas), o suelos infestados, o ambos, constituyen las principales fuentes de inóculo. El patógeno puede sobrevivir en el suelo (principalmente en los desechos de planta) y en el sistema radicular y la rizósfera de muchos hospedantes (malezas, otros cultivos hospedantes, papas voluntarias, etc.). *R. solanacearum* se disemina principalmente por el movimiento de tubérculos-semilla infectados. Otros factores que contribuyen a la diseminación de la enfermedad son el agua de riego contaminada y el suelo infestado que se adhiere a los zapatos y herramientas de los agricultores. Las heridas producidas por las herramientas durante el cultivo después de la emergencia de la planta, así como las producidas por los nematodos e insectos del suelo contribuyen al ingreso de la bacteria en las raíces de la papa.

tierras bajas de la cuenca amazónica. Tiene numerosos variantes con una amplia gama de hospedantes al igual que la raza 1; sin embargo, los variantes del biovar 2T son menos agresivos.

20



CONTROL

21



### Manejo integrado de la marchitez bacteriana

El uso de semilla sana y la siembra en suelos libres del patógeno son los principales componentes para controlar y erradicar la marchitez bacteriana. Sin embargo, muchos son los factores adicionales que influyen en la incidencia de la bacteria tales como las condiciones ambientales (la temperatura y la humedad del suelo), la rotación con plantas no hospedantes, el uso de variedades menos susceptibles y de prácticas culturales (saneamiento y control de nematodos). Por lo tanto, sólo una estrategia de control integrado puede tener éxito para reducir la incidencia de la MB, e incluso erradicarla. Esta estrategia es específica para cada lugar. De los factores de control existentes y disponibles, se deben seleccionar los que son factibles, apropiados y

eficaces para una determinada localidad (ver la diapositiva N° 47). Además, se deben tener en cuenta los factores sociales y económicos que influyen en las decisiones de los agricultores dentro del esquema de manejo.

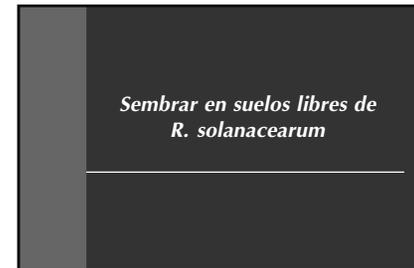
22



### **Uso de semilla sana**

Los tubérculos-semilla infectados constituyen el medio principal para la diseminación de *R. solanacearum* (en particular para los variantes de la raza 3). En climas fríos por encima de los 2500 m, las plantas infectadas pueden no mostrar síntomas, sin embargo pueden albergar a la bacteria y transmitirla a los tubérculos en los cuales se mantienen en forma latente, produciendo severos brotes de la enfermedad, cuando estos tubérculos se siembran en lugares cálidos. En los procesos de certificación de semillas la incidencia de MB debe ser 0%. Para la producción de semillas, sólo se deben usar tubérculos-semilla libres de MB provenientes de áreas no infectadas. El material de siembra usado en el programa de multiplicación de semilla (tubérculos-semilla básicos y pre-básicos) debe ser sometido a una prueba de detección de infección

23



latente para descartar la presencia de *R. solanacearum*. En las áreas endémicas, donde hay escasez de tubérculos-semilla sanos, una alternativa es el uso de semilla sexual de papa (TPS) o esquejes provenientes de micropropagación bajo condiciones controladas.

### **Sembrar en suelos libres de *R. solanacearum***

Si un cultivo ha sido infectado con MB, se debe evitar la siembra de papa u otros cultivos hospedantes por lo menos durante dos años. Se puede efectuar una rotación con cereales o pastos para eliminar el inóculo del suelo. La duración de la rotación necesaria para eliminar el inóculo varía, ya que la supervivencia de *R. solanacearum* en el suelo depende de las condiciones ambientales (temperatura, humedad) y de las características del suelo (factores bióticos y abióticos). Algunos suelos son supresivos, en los cuales la bacteria no sobrevive por periodos largos, sin embargo, los mecanismos responsables de esta inhibición son desconocidos.

24



### **Resistencia de la planta**

La siembra de variedades resistentes es el medio más efectivo para controlar la MB. Sin

embargo, aunque se ha encontrado muchas variedades de papa que tienen cierto grado de resistencia, sin embargo, continúan transmitiendo la infección latente a su progenie. Por lo tanto, el uso de variedades moderadamente resistentes debe ser incluido en un programa de semilla que proporcione tubérculos-semilla libres de MB. La resistencia es específica para cada variante y no es efectiva cuando las condiciones ambientales son más favorables al desarrollo de la MB (temperatura elevada, alta humedad del suelo, heridas en las raíces y estolones, etc.). Un paso esencial en el desarrollo de variedades resistentes es la evaluación local. Las variedades que se siembran localmente deben ser estudiadas para determinar su tolerancia a la MB ya que algunas variedades, sin que hayan sido mejoradas para resistencia a la MB, son menos susceptibles a esta enfermedad (por ejemplo, var. Achat en Brasil, Cruza 148 en África oriental y Perú).

### **Saneamiento y prácticas culturales**

El saneamiento y las prácticas de cultivo tienen como fin evitar o limitar la supervivencia y

diseminación del patógeno. Por lo general, estas mismas medidas se usan para controlar otras enfermedades y plagas de la papa.

25



26



### **Eliminación de rastrojos**

Después de la cosecha de un cultivo infectado con MB, se deben eliminar del campo los rastrojos de papa y quemarlos o enterrarlos en el fondo de las pendientes, pero en lugares alejados de los canales de riego.

27



### **Eliminación de los tubérculos podridos**

Después de la cosecha, se debe eliminar los restos de cosecha y destruirlos siguiendo el procedimiento anteriormente señalado.

28



### **Eliminación de malezas**

*R. solanacearum* sobrevive en ciertas especies de malezas, por lo tanto, deben ser eliminadas antes de sembrar papa y cualquier otro cultivo incluido en la rotación.

29



### Eliminación de plantas voluntarias de papa

Las plantas voluntarias constituyen otro medio para la supervivencia de *R. solanacearum* por lo tanto deben ser eliminadas poco después de su emergencia.

30



### Eliminación de plantas marchitas

Si la incidencia de MB es baja, las plantas marchitas de papa deben ser eliminadas del campo tan pronto como se observe su aparición para evitar que contagien a las plantas sanas. Estas plantas deben ser eliminadas cuidadosamente y destruidas siguiendo el mismo procedimiento que para los rastrojos de papa.

31



### Desinfestación de herramientas

Para prevenir el movimiento de suelo de un campo infestado a un campo libre del patógeno, todas las herramientas deben ser desinfectadas con agua e hipoclorito de calcio (o cualquier otro bactericida) o esterilizadas con fuego.

32



### Desinfestación de la maquinaria

La maquinaria, los vehículos, los cascos de los animales usados para la tracción y los zapatos del personal que provienen de un campo infestado deben ser lavados por lo menos con agua antes de ingresar a otro campo.

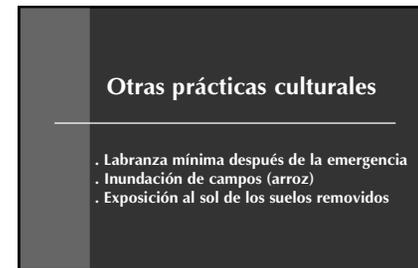
33



### Uso de agua no contaminada

Se debe evitar el flujo del agua de un campo infestado hacia los campos vecinos. En las áreas infestadas, es preferible usar el agua de pozo en vez de las aguas provenientes de los ríos o canales de irrigación.

34



### Otras prácticas culturales

- Se recomienda hacer un solo aporque durante el período vegetativo para evitar el daño a las raíces. También es preferible el deshierbo a mano.
- La inundación de campos especialmente los de arroz (en los países asiáticos), reduce significativamente las poblaciones de *R. solanacearum* en el suelo.
- En las áreas cálidas, el barbecho o la exposición al sol de los suelos removidos también reduce el nivel poblacional de la bacteria.

35



### Rotación

La rotación con plantas no hospedantes es una manera efectiva para disminuir la población de *R. solanacearum* en el suelo, siempre que las plantas voluntarias sean continuamente extraídas del campo a medida de que ellas emerjan.

36



### Rotación con cereales

La rotación con cereales y pastos disminuye rápidamente el potencial del inóculo en el suelo. Sin embargo, el tiempo necesario para la erradicación debería ser determinado para cada localidad.

37



### Rotación con liliáceas y brasicáceas

Se pueden sembrar cebolla, ajo, poro, coliflor y repollo después de que un campo de papa ha sido infectado con MB.

38



### Rotación con leguminosas

Las leguminosas (fabáceas) como frejol, arveja y haba pueden ser utilizadas como cultivo de rotación para la papa. Además, tienen el beneficio adicional de incrementar la fertilidad del suelo fijando el nitrógeno atmosférico. También la

39



asociación de frejol con maíz reduce el potencial del inóculo en el suelo.

### Rotación con cucurbitáceas

Las cucurbitáceas (calabaza, pepino, zapallito italiano) no son plantas hospedantes para *R. solanacearum* por lo que pueden ser utilizadas para la rotación de cultivos.

40



### Evitar el cultivo del tomate

Se debe evitar el cultivo del tomate ya que es altamente susceptible a la MB causada por todos los variantes de *R. solanacearum*.

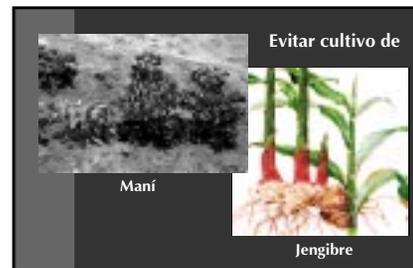
41



### Evitar otros cultivos de solanáceas

No se debe sembrar berenjena, pimiento o tabaco después de que un campo de papa haya sido infestado con *R. solanacearum*.

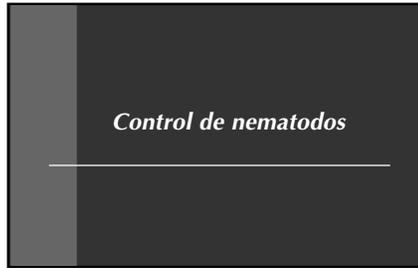
42



### Evitar el cultivo de jengibre y maní

No se debe sembrar jengibre ni maní en un campo de papa en el que prevalezca la raza 1 de *R. solanacearum* (trópicos bajos).

43



**Control de nematodos**

Los nematodos abren el camino para que las bacterias ingresen a la planta a través de lesiones en las raíces. Por consiguiente, deben controlarse para evitar su interacción con *R. solanacearum*. La fumigación de los suelos, la rotación con cereales, la aplicación de cantidades altas de enmiendas orgánicas (libres de *R. solanacearum*) y la siembra de variedades resistentes a nematodos constituyen los principales componentes de control.

44



**Síntomas causados por el nematodo del nudo de la raíz**

El nematodo más importante en la interacción con MB es el nematodo del nudo de la raíz (*Meloidogyne incognita*), que predomina principalmente en climas cálidos y suelos arenosos.

45



**Cuarentena**

Una vez que se haya detectado la enfermedad en un área, debe ser declarada en cuarentena para evitar la diseminación de la MB hacia zonas no infectadas. Las medidas cuarentenarias restringen la producción de semilla de papa y prohíben la comercialización de papa de consumo hacia los países

46



o regiones que no han sido afectadas con MB. Esta situación afecta la economía de las regiones en cuarentena.

**Evitar el transporte de tubérculos-semilla infectados a zonas no contaminadas**

Se debe evitar el transporte de tubérculos-semilla o papa de consumo provenientes de áreas infectadas para evitar la diseminación de la enfermedad. Aunque muchas veces es difícil controlar la comercialización de papa, ésta es una de las mejores medidas disponibles de prevención.

47

DEFINICION DE UNA ESTRATEGIA DE CONTROL		
Factores para formular una estrategia de control	Raza 3	Raza 1
Tubérculos-semilla libres de <i>R. solanacearum</i>	7	7
Variedades resistentes	4	2
Suelo no infestado con <i>R. solanacearum</i>	7	7
Suelo supresivo	2	2
Rotación con plantas no hospedantes	5	3
Eliminación de plantas marchitas	4	3
Eliminación de plantas voluntarias	4	2
Control de malezas	2	2
Eliminación de restos de cosecha	3	3
Uso de agua no contaminada	2	1
Labranza mínima post-emergencia	4	4
Control de nematodos	3	3
Desinfección de las herramientas, cuacos de animales y zapatos	2	1
Exposición al sol de los suelos removidos	1	3
Inundación de campos (arroz)	1	3

**DEFINICION DE UNA ESTRATEGIA DE CONTROL**

Se han definido los componentes más eficientes para el control de la MB. En base a esta información, en el siguiente cuadro se enumeran los principales factores que se deben considerar para el desarrollo de una estrategia para el control de la enfermedad causada por las razas 1 ó 3. Cada factor varía en una escala del 1 al 7. Mientras más alto sea el número para un determinado factor, éste se considera más efectivo para el control de la enfermedad. El valor asignado

para cada factor puede cambiar según la importancia del factor dado en cada localidad. La suma de valores debe alcanzar por lo menos 14 para asegurar un buen control o la erradicación de la MB.

Factores para formular una estrategia de control	Raza 3	Raza 1
Tubérculos-semilla libres de <i>R. solanacearum</i>	7	7
Varietades resistentes	4	2
Suelo no infestado con <i>R. solanacearum</i>	7	7
Suelo supresivo	2	2
Rotación con plantas no hospedantes	5	3
Eliminación de plantas marchitas	4	3
Eliminación de plantas voluntarias	4	2
Control de malezas	2	2
Eliminación de restos de cosecha	3	3
Uso de agua no contaminada	2	1
Labranza mínima post-emergencia	4	4
Control de nematodos	3	3
Disinfestación de las herramientas, cascotes de animales y zapatos	2	1
Exposición al sol de los suelos removidos	1	3
Inundación de campos (arroz)	1	3

48



## METODOS DE DETECCION

49



## Detección en tubérculos con infección latente

El método clásico para detectar una infección del tubérculo consiste en incubarlo durante 3 a 4 semanas a 30°C, y observar si existe o no exudado en los ojos o cortar el tubérculo transversalmente para observar la presencia de exudado en el anillo vascular. Sin embargo, este método toma mucho tiempo y espacio y puede que no detecte las infecciones leves. Por esta razón, el CIP ha desarrollado una técnica simple, sensible, rápida y económica para detectar la infección latente en el tubérculo: ELISA-NCM (prueba inmunoenzimática en la membrana de nitrocelulosa). El kit se está distribuyendo a los programas de semilla en todo el mundo.

50



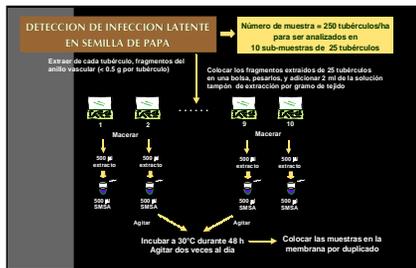
## Esquema de detección de *R. solanacearum* en tubérculos con infección latente

Los principales pasos para la detección de *R. solanacearum* en tubérculos con infección latente son:

- 1) Preparación de los extractos a partir del tejido del anillo vascular de los tubérculos;
- 2) Proceso de enriquecimiento: incubación de los extractos de

- los tubérculos durante 48 h a 30°C en un caldo semi-selectivo (SMSA); y
- Colocación (dot-blotting) de las muestras enriquecidas sobre la membrana de nitrocelulosa (NCM) y prueba serológica (ELISA).

51



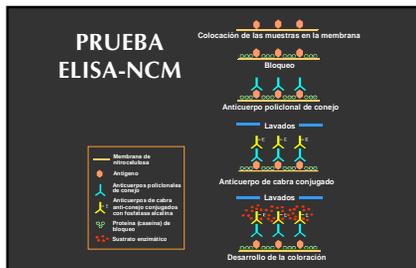
### Detección de la infección latente en semilla de papa

El número mínimo de muestras que se necesita es de 250 tubérculos por hectárea (muestreo a la cosecha o en el almacén) para ser analizarlas en 10 sub-muestras de 25 tubérculos. Los tejidos del anillo vascular sacados de cada uno de los 25 tubérculos se maceran en una bolsa individual después de añadir el volumen del tampón de extracción correspondiente al doble del peso de los tejidos. Para cada sub-muestra, se mezcla 0.5 ml (500 µl) de extracto de los tubérculos con el mismo volumen del caldo SMSA en un tubo Eppendorf y se incuba durante 48h a 30°C agitándolo dos veces al día. Por cada extracto enriquecido se colocan dos muestras sobre la membrana.

### Prueba ELISA-NCM

ELISA-NCM es un ensayo inmunoenzimático. Utiliza una membrana de nitrocelulosa en

52



26

lugar de una placa de microtitulación como soporte para las muestras y reactivos. La prueba consiste en:

- Colocar una pequeña cantidad del extracto de los tubérculos (20 µl) sobre una membrana de nitrocelulosa con una micropipetta (dot-blotting);
- Bloquear con caseína de leche el área de la membrana donde no están colocadas las muestras (1 hora de incubación);
- Añadir los anticuerpos de conejo específicos de *R. solanacearum* (2 horas de incubación);
- Añadir los anticuerpos de cabra anti-conejo conjugados con fosfatasa alcalina (1 h de incubación); y
- Añadir el sustrato que reacciona con la enzima y produce una reacción de coloración (de 5 a 20 minutos).

53



### Sensibilidad de la prueba ELISA-NCM sin y con enriquecimiento

Una coloración morada revela la presencia de *R. solanacearum* en las muestras (todos los variantes pueden ser detectados con los anticuerpos policlonales). La intensidad de la coloración es proporcional a la concentración de bacterias. Después del

27

enriquecimiento (o sea la multiplicación de la población de bacterias en el extracto), se puede llegar a detectar hasta un mínimo de 10 bacterias por ml del extracto de los tubérculos (células/ml), mientras que se necesitan  $10^7$  ó más células/ml si no se realiza el enriquecimiento antes de llevar a cabo el ensayo inmunoenzimático. Por lo tanto, el enriquecimiento aumenta la sensibilidad de la prueba serológica un millón de veces, permitiendo la detección de *R. solanacearum* en tubérculos de papa (o tallos) que están infectados en forma latente, es decir con niveles de infección muy bajos que no producen ningún síntoma visible.

### Detección de *R. solanacearum* en el suelo

#### Bioensayo con tomate

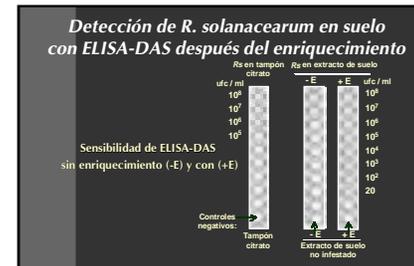
Debido a la alta susceptibilidad del tomate a la MB a temperaturas altas, el ensayo biológico del tomate es la prueba más fácil para evaluar la infestación del suelo con *R. solanacearum*. Sin embargo, necesita espacio en el invernadero y toma tiempo, pues sólo la observación del desarrollo de los síntomas puede demorar hasta seis semanas. También se puede realizar en el campo sembrando surcos de tomate y

observando el desarrollo de la MB. Para las pruebas en el invernadero, se colocan 2 kg de tierra en una bandeja de plástico y se trasplantan 50 plántulas de tomate de dos semanas (alrededor de 10 cm de altura). Para cada muestra de tierra, se trasplantan 100 plántulas (en dos bandejas), y se riegan normalmente. Desde los 7 días hasta los 45 días se registra el porcentaje de plantas marchitas dos veces a la semana. La prueba del flujo vascular y KOH confirma que la marchitez ha sido causada por *R. solanacearum* y no por otros patógenos de suelo como *Pythium* sp., *Verticillium* sp. y *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

54



55

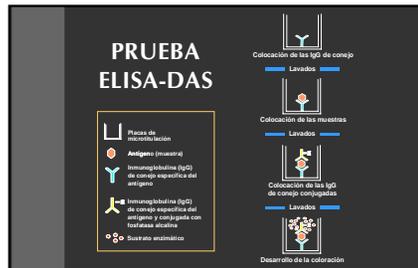


### Detección de *R. solanacearum* en suelo con ELISA-DAS después del enriquecimiento

En el CIP, se ha desarrollado un kit para detectar niveles bajos de población de *R. solanacearum*. El método se basa en la preparación sencilla de los extractos de suelo mezclando 10 g de suelo con 90 ml de la solución tampón PBS. Después de una agitación constante durante 30 minutos, se deja que la solución decante por un minuto y se retira 2 ml del sobrenadante, el cual se mezcla en un frasco estéril conteniendo

38 ml de caldo SMSA complementado con caldo de papa e incubado durante 48 h a 30°C con agitación (proceso de enriquecimiento). Los extractos enriquecidos se analizan en un “Doble-antibody sandwich”(DAS-ELISA) en placas de microtitulación. Se puede detectar hasta un mínimo de 20 bacterias por gramo de suelo. Para una semi-cuantificación de las poblaciones, los extractos del suelo pueden diluirse antes de su enriquecimiento.

56



### Prueba ELISA-DAS

El “Double-antibody sandwich” (DAS-ELISA) es un ensayo inmunoenzimático que se realiza en placas de microtitulación. Consiste en los cuatro pasos siguientes:

- 1) Cubrir los hoyos de la placa de microtitulación con inmunoglobulinas (IgG) de conejo específicos de *R. solanacearum* (3 h de incubación);
- 2) Colocar las muestras en los hoyos (incubación toda la noche);
- 3) Colocar las IgG de conejo específicos de *R. solanacearum* y conjugadas con fosfatasa alcalina (3 h de incubación);

- 4) Desarrollar la reacción de coloración añadiendo el sustrato de la enzima (1 h).

57



### METODOS DE EVALUACION DE LA RESISTENCIA A MB

#### Evaluación en campo

La evaluación de la resistencia de la papa a la MB requiere de un campo con un nivel moderado y razonablemente uniforme de infestación (entre 30 y 50% de incidencia de marchitez en el cultivo anterior de papa). Se debe identificar la raza/biovar de los variantes presentes en el campo (las razas 1 y 3 pueden estar presentes juntas). El diseño del lote debe seleccionarse según el número de tubérculos por clon que se va a analizar y la uniformidad de la diseminación del inóculo en el campo pero con por lo menos 20 tubérculos por genotipo (en 4 repeticiones de 5 tubérculos). Durante el periodo vegetativo, se registra el número de plantas marchitas una vez por semana a partir de los 40 hasta los 80 días después de la emergencia. Durante la cosecha, también se registra la infección visible de los tubérculos (e infección latente si no se ha producido marchitez durante el periodo vegetativo) y el rendimiento de los tubérculos con tamaño comercial.

### Inoculación en invernadero

Los esquejes apicales de las plantas de papa o los esquejes de los tubérculos brotados se siembran en macetas pequeñas conteniendo un sustrato adecuado (por ejemplo una mezcla de suelo, muzgo y arena a la proporción 2:1:1). Sin embargo, los mejores resultados se han obtenido usando el sustrato Promix BX® (Premiers Brands, INC, Stamford, Canadá). A la siembra se debe aplicar un fertilizante completo (N-P-K 20-20-20 diluido al 0.5% en agua). Cuando las plantas alcanzan aproximadamente 15 cms de altura se llevan al invernadero un día antes de la inoculación. Las condiciones del invernadero que favorecen el desarrollo de la enfermedad son 28±4 °C, y 85-90% H.R. Las plantas se riegan diariamente, excepto un día antes de la inoculación. Cada maceta, conteniendo una planta se inocula con 25 ml de suspensión bacteriana de *R. solanacearum* a 10<sup>8</sup> células/ml. Se inoculan 20 plantas por genotipo. Las plantas se incuban durante 30 días y los índices de la enfermedad se registran cada semana en base a la siguiente escala:

- 1 = planta sin síntomas;
- 2 = planta una hoja marchita;
- 3 = planta con hasta el 50% de marchitez;

- 4 = planta con hasta el 75% de marchitez;
- 5 = planta completamente marchita.

Los cultivares Cruza 148 (resistente a la marchitez pero que arbora infección latente en tallo y tubérculos), Molinera (tolerante), Revolución e Yungay (susceptibles) se usan como testigos en el CIP de Lima. Como mínimo se debe usar la variedad Cruza 148 como testigo menos susceptible, junto con una variedad local susceptible.

## REFERENCIAS

- Aley, P., French, E. R. and Nydegger, U. (1994) Methods of greenhouse inoculation with *Pseudomonas solanacearum* to select resistant potato clones. *Fitopatología* 29:20 (Abstract).
- Anonymous. (1994) Bacterial wilt: the disease and its causative agent *Pseudomonas solanacearum* (eds. Hayward, A. C. and Hartman, G. L.). 259 p. CAB International, Wallingford (UK).
- Anonymous. (1998) Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects (eds. Prior, Ph., Allen, C. and Elphinstone, J.) 447 p. INRA edn, Springer Verlag, Berlin (Germany).
- Commonwealth Mycological Institute. (1977) Distribution maps of plant diseases: *Pseudomonas solanacearum* (E. F. Smith) E. F. Smith on potato (*Solanum tuberosum*), tobacco (*Nicotiana tabacum* and banana (*Musa*) etc. Map No. 138 Edition 5.
- Elphinstone, J. G., Hennessy, J., Wilson, J. K. and Stead, D. E. (1996) Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) in potato tuber extracts. *EPPPO/ OEPP Bulletin*, 26 :663-678.
- French, E.R. (1986) Field-screening CIP clones developed for resistance to bacterial wilt. *Technology Evaluation Series No. 1982-6*, 9 p. International Potato Center, Lima (Peru).
- French, E.R. (1994) Strategies for integrated control of bacterial wilt of potatoes. In *Bacterial wilt: the disease and its causative agent Pseudomonas solanacearum* (eds. Hayward, A. C. and Hartman, G. L.) p. 199-207, CAB International, Wallingford (UK).
- French, E. R., Gutarra, L., Aley, P. and Elphinstone, J. (1995) Culture media for *Ralstonia solanacearum* isolation, identification and maintenance. *Fitopatología* 30 (3): 126-130.

Hayward, A.C. (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 29, 65-87.

Hayward, A. C., El-Nashaar, H. M., de Lindo, L. and Nydegger, U. (1991) The use of microtiter plates in the phenotypic characterization of phytopathogenic Pseudomonads. Proc. 7<sup>th</sup> Int. Conf. Plant Pathog. Bact., Budapest, Hungary, pp 593-598.

Janse, J. D. (1996) Potato brown rot in Western Europe –history, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 26:679-695.

Kelman, A. (1954) The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 64:693-695.

Martin, C. and French, E.R. (1985) Bacterial wilt of potato: *Pseudomonas solanacearum*. Technical Information Bulletin 13, 8 p. International Potato Center, Lima (Peru).

Priou, S., Gutarra, L. (1998) Video demonstration on the use of CIP NCM-ELISA kit for the detection of *Ralstonia solanacearum* in latently infected tubers. English, Spanish and Chinese versions, 37 min, International Potato Center, Lima (Peru).

Priou, S., Gutarra, L. and Aley, P. (1999) Highly sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in latently infected potato tubers by post-enrichment ELISA on nitrocellulose membrane. EPPO/OEPP Bulletin 29 (1), in press.

Priou, S., Gutarra, L., Fernandez, H. and Aley, P. (1999) Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in latently infected potato tubers and soil by postenrichment ELISA. CIP Program Report 1997-98, in press, International Potato Center, Lima, Peru.

Priou, S., Gutarra, L., Fernandez, H. and Aley, P. (1999) Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* (race 3) in soil by post-enrichment DAS-ELISA. ACIAR Bacterial Wilt Newsletter 16: 10-13