ARTÍCULO CIENTÍFICO

Dispersión de *Ralstonia solanacearum* en suelos cultivados con plátano en el Piedemonte Llanero

Aníbal L. Tapiero[1], Alexis Morales[2] y Sandra Milena Rodríguez[2]

ABSTRACT

Dispersion of *Ralstonia solanacearum* in soils cultivated with plantain in the 'Piedemonte Llanero' (Colombia)

In order to analyze the dispersion of 'Moko' disease in a commercial plantain cultivation, quadrants were defined conformed by the axes of eight plants from a removed diseased plant (focus). It was possible to identify *Ralstonia solanacearum* in samples of water and soil originated from 12 points per quadrant, in four samplings performed on days 0, 45, 90 and 135. The isolates that formed typical fluid colonies (F), small fluid rounds (SFR) and non-fluid variants (NFV), were subjected to biochemical tests, molecular analysis (PCR), hypersensitivity reactions on tobacco leaves and pathogenicity on young plantain plants. The disease increased from an average of 8 to 10, 12 and 38 plants per quadrant over sampling time. In three quadrants the incidence was restricted to the area closest to the focus, whereas in the other there was a greater dispersion. The average number of typical colonies (F) isolated varied from 54 at day 0 to 114, 142 and 90 in subsequent samplings. The number of forming colony units per gram of soil (FCU/g) of the types F and SFR was always less than for NFV colonies; those of type F tended to decrease from the third sampling (day 90) and then registered a slight increase in the fourth (day 135). On their part, the number of FCU/g of type SFR increased in the second and third samplings and decreased in the last. The number of FCU/g of type NFV, although ten times more abundant than the other types, presented a similar behavior to the type SFR and its decrease was more drastic at the end. Type F colonies were more frequent in the immediate focus areas, which coincided with the increase of diseased plants, whereas type NFV colonies predominated in intermediate areas. The amplification of DNA segments by PCR (*Oli1 – Y2*) confirmed the results of the biochemical, hypersensitivity and pathogenicity characterizations. Type F colonies showed a larger number of positive responses than SFR and NFV to each of the tests, including pathogenicity.

Key words: *Ralstonia solanacearum*, plantain, Moko disease.

Recibido: marzo 28 de 2007
Aceptado: junio 2 de 2007

1. Investigador principal. Centro de Investigación La Libertad, v Km 17 vía Puerto López, Villavicencio.
2. Ingenieros Agrónomos, Universidad Nacional de Colombia (Bogotá) y Universidad de Los Llanos (Villavicencio, Meta), respectivamente.

RESUMEN

La dispersión de la enfermedad del Moko en un cultivo comercial de plátano se determinó a partir de un análisis de la incidencia en cuadrantes conformados por ejes de ocho plantas a partir de una planta enferma erradicada (foco). Se identificaron colonias de *Ralstonia solanacearum* en muestras de agua y suelo procedentes de 12 puntos por cuadrante, en cuatro muestreos realizados los días 0, 45, 90 y 135. Los aislamientos que formaron colonias típicas fluidas (F), pequeñas redondas fluidas (SFR) y variantes afluidas (AFV), fueron sometidos a pruebas bioquímicas, análisis molecular (PCR), reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco y patogenicidad sobre plantas jóvenes de plátano. La enfermedad se incrementó de 8 a 10, 12 y 38 plantas en promedio por cuadrante y muestreo. En tres de los cuadrantes la incidencia se restringió al área más cercana al foco, mientras que en el otro hubo una dispersión mayor. El número promedio de colonias típicas (F) aisladas varió de 54 el día 0 a 114, 142 y 90 en los muestreos subsiguientes. El número de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (UFC/g) de los tipos F y SFR siempre fue menor que el de colonias AFV; las de tipo F tendieron a disminuir a partir del tercer muestreo (día 90) registrando un leve aumento en el cuarto (día 135). Por su parte, el número de UFC/g tipo SFR aumentó en los muestreos segundo y tercero y se redujo en el último. El número de UFC/g de tipo AFV, aunque 10 veces más abundante que los otros tipos, presentó un comportamiento similar al de las colonias SFR y su disminución fue más drástica al final. Las colonias tipo F fueron más frecuentes en cercanías del foco, lo que coincidió con el incremento de plantas enfermas, mientras que las colonias tipo AFV predominaron en las áreas intermedias. La amplificación de segmentos de ADN por PCR (*Oli1 – Y2*) confirmó los resultados de las caracterizaciones bioquímica, de hipersensibilidad y patogénica. Las colonias tipo F presentaron mayor número de respuestas positivas que las SFR y AFV a cada una de las pruebas, incluyendo la de patogenicidad.

Palabras clave: *Ralstonia solanacearum*, plátano, enfermedad del Moko.

INTRODUCCIÓN

Las 450.000 ha que se cultivaban hacia 1983 con plátano en Colombia se redujeron a 250.000 ha en 1990, fundamentalmente a causa del incremento en los costos de producción. En el Piedemonte Llanero esta situación de contracción del área sembrada llevó en 1995 a la pérdida de casi el 50% de las 50.000 ha que cultivaban unas 18.000 familias. Entre los años 2001 y 2004, los costos de producción en el departamento del Meta variaron de $3.830.000 a $5.731.000/ha, un incremento de 49,6% (Gobernación del Meta, 2005). El plátano se cultiva tradicionalmente como fuente de ingresos para pequeños y medianos agricultores en la región.

La región de los Llanos Orientales ocupa una gran parte de la provincia biogeográfica de la Orinoquia y constituye una unidad diferenciada claramente del resto del país, resultado de la influencia de factores inherentes a su proceso de conformación fisiográfica (IGAC, 2000). El ecosistema se caracteriza por coberturas vegetales de pastizales y vegetación herbácea con arbolado disperso y bosques freatófitos localizados a lo largo de los cuerpos de agua, con cauce estacional o permanente (Bustamante, 1999).

En su límite occidental, el Piedemonte Llanero constituye un paisaje caracterizado por formaciones de terrazas, abanicos y valles aluviales (denominados 'vegas') a lo largo de ríos de origen andino como el Ariari y el Arauca (IGAC, 2000). Las terrazas se dividen entre altas, medias y bajas. Las altas son bien drenadas y las bajas tienen tendencia al encharcamiento. La vegetación natural de selvas y sabanas fue transformada antrópicamente durante el curso del siglo XX y fue reemplazanda por pastos introducidos (1,3 millones ha) y cultivos agrícolas (300.000 ha). En la zona predominan los sistemas de producción bovina semi-extensivos, dedicados

© 2007 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

a la ceba y al doble propósito (carne y leche).

En el gran paisaje denominado 'planicie aluvial' que se ubica a lo largo del curso de los ríos Upía, Guatiquía, Guayuriba, Meta, Humadea, Ariari, Güejar, Duda, Guayabero y Guaviare, así como en valles menores y estrechos que forman fajas alargadas, angostas y paralelas al cauce de caños grandes, se ubica una buena parte del área dedicada a la producción de plátano en el departamento del Meta. Al salir de la cordillera estos ríos pierden su capacidad de carga, los cauces se amplían y la profundidad disminuye, causando desbordamientos, inundaciones y cambios de curso. Los desbordamientos forman paisajes de mesas y terrazas de relieve plano a ligeramente plano, con pendiente de entre 0-3% (Figura 1).

Los suelos son profundos y bien drenados, de texturas medias a finas, fuertemente ácidos y de fertilidad baja (Gobernación del Meta, 2004). La precipitación anual oscila alrededor de 3.500 mm, la temperatura media entre 24 y 28 ºC y la temporada seca característica en la Orinoquia de diciembre y marzo es menos pronunciada en el Piedemonte (Figura 2).

Los factores climáticos y fisiográficos citados contribuyen significativamente con la viabilidad del ecosistema para el establecimiento de arreglos con cultivos de carácter perenne. Así también, dichas características facilitan la diseminación de patógenos que se dispersan por agua y tierra.

Como efecto de la reactivación de las actividades económicas lícitas en amplias áreas anteriormente dominadas por el conflicto armado (Granada, Lejanías, Mapiripán, Puerto Concordia, Uribe, Vistahermosa), el área sembrada con plátano se incrementó de 13.638 a 18.992 ha (39,3%) entre 2003 y el 2005. Sin embargo, la producción apenas aumentó de 284.306 a 335.570 t (18,1%), la mitad del incremento esperado por el ingreso de las áreas nuevas. Estas cifras tuvieron efecto en la productividad, la cual se redujo de 20.847 a 17.669 t ha^{-1}, una disminución del 15,2% durante el período analizado (Gobernación del Meta, 2005).

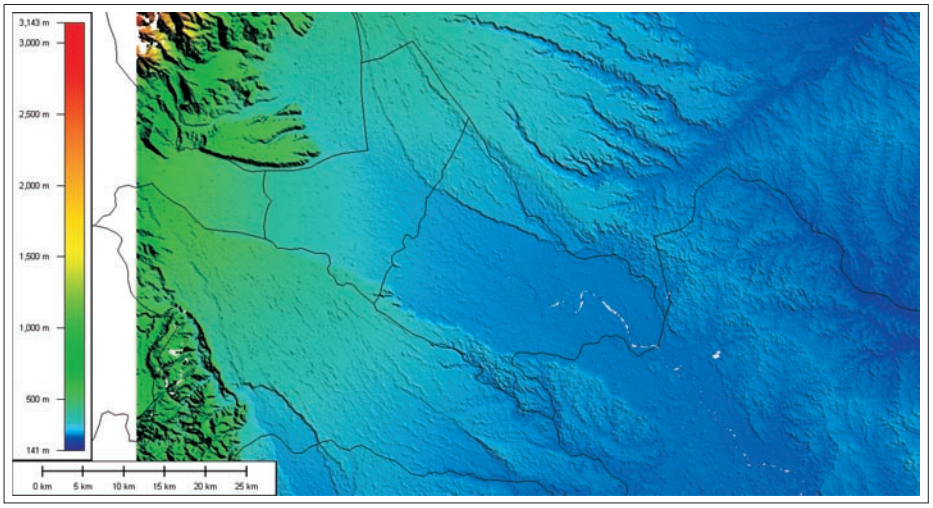

Figura 1. Imagen satelital SRTM del valle aluvial conformado por el cauce del río Ariari (centro) en los límites de los municipios de Fuente de Oro y Granada (Meta).

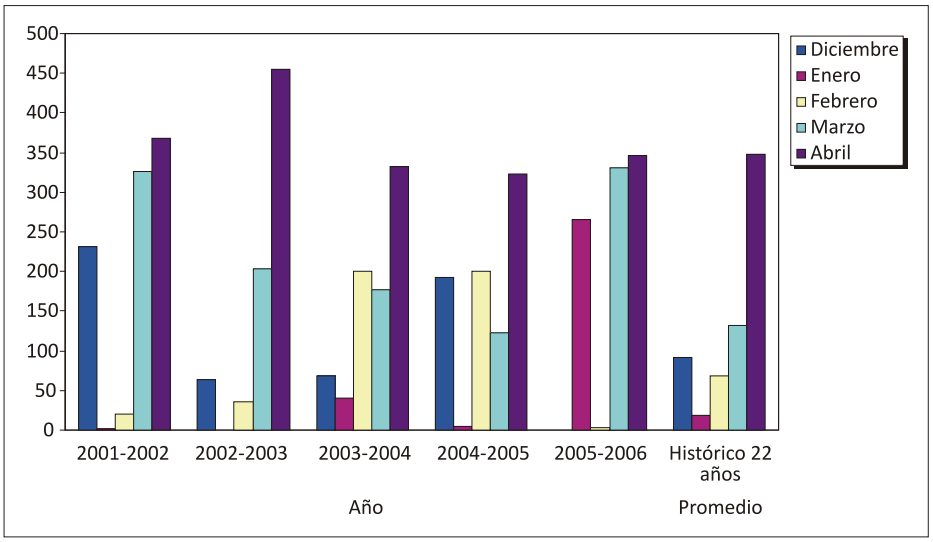

Figura 2. Precipitación promedio mensual en el Piedemonte Llanero, estación La Libertad (Villavicencio, Meta).

Durante el mismo período se observó un notable incremento en los costos de producción, atribuible en parte a los esfuerzos para controlar la incidencia de la 'Sigatoka negra', enfermedad causada por el ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet [anamorfo: *Paracercospora fijiensis* (Morelet), (Deighton)]. La Sigatoka negra, también conocida como 'Raya negra', ocasiona una reducción significativa del área foliar e induce a la maduración prematura de los racimos, lo cual es castigado fuertemente por el mercado (Salcedo, 2004).

Como efecto de la disminución en la rentabilidad, los agricultores modificaron el arreglo de los cultivos de plátano, anteriormente permanentes con 1 a 5 ha en asocio con otras especies bajo formas de economía campesina, a monocultivos con 3 a 50 ha que se renuevan completamente luego de una única cosecha, máximo dos, y a libre exposición bajo modalidades de economía agroempreearial. Pero aunque los arreglos 'anualizados' han contribuido con la disminución de la severidad de Sigatoka negra y han reducido los efectos de la incidencia de insectos (Picudo), también han favorecido la diseminación de la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Smith: 1896; Yabuuchi *et al*.: 1996) raza 2, biovar 1, agente causal de la enfermedad del Moko en el material de siembra (Salcedo, 2004).

El Moko o Maduraviche se ha convertido en la enfermedad bacterial más limitante en la mayoría de las áreas geográficas que cultivan plátano. Muchas regiones de Colombia han sido afectadas pudiendo presentarse pérdidas de hasta el 100% de la producción (Belalcazar *et al*., 1991). Su incidencia es muy grave en los Llanos Orientales, principalmente en los departamentos de Meta y Arauca. Una evaluacion de pérdidas realizada en cinco municipios del Meta indicó su presencia en por lo menos 1.890 ha, las cuales correspondieron al 68% del total del área evaluada. El municipio de Fuente de Oro, en el Ariari medio, resultó ser el área más afectada con 49,82% de incidencia en fincas (Salcedo, 2004). La enfermedad afecta al plátano y las heliconias en las áreas productoras de América tropical y ha ocasionado el abandono y desaparición de cultivos en regiones tropicales y subtropicales alrededor de todo el mundo.

Los aislamientos de *R. solanacearum* difieren en cuanto a su rango de hospederos, distribución geográfica, patogenicidad, relaciones epidemiológicas y propiedades fisiológicas. Debido a su alta heterogeneidad intraespecífica ha sido necesario distinguir entre razas y biovares. La clasificación tradicional distingue cinco razas, descritas de acuerdo al hospedero u hospederos afectados, y cinco biovares, que se diferencian por su utilización de varios disacáridos y alcoholes hexosa (Buddenhagen, Sequeira y Kelman, 1962; Hayward, 1964, citado por Martins, 2000; Hayward, 1991; Kelman, 1953, citado por Hayward, 1991). La raza 1 afecta solanáceas y otras plantas, entre las cuales se cuentan algunas especies diploides de banano; la raza 2 afecta bananos, plátano y heliconias; la raza 3, la papa y el tomate; la raza 4, el jengibre y la raza 5 infecta la mora. Tan sólo la raza 2 afecta más de 200 especies de plantas musáceas, entre las cuales se reportan plátanos, bananos triploides y *Heliconia* spp. Otros linajes de la misma raza causan al menos dos enfermedades en banano cuyos síntomas son similares al Moko: 'Blood disease' y 'Bugtok disease' en el sudeste asiático. Por estas razones, más que una especie única, a *Ralstonia* hay que considerarla un complejo de especies.

Recientemente se ha discutido el bajo impacto de la clasificación tradicional de *Ralstonia* por razas y biovares en lo atinente a una correcta caracterización epidemiológica y a su utilidad para el manejo de las enfermedades que causa. A efectos de superar esta limitación se ha propuesto la adopción de un nuevo sistema de clasificación que consiste en la determinación de filotipos y secuevares a partir de la amplificación del ADN de aislamientos de *Ralstonia* mediante PCR y la posterior secuenciación de segmentos específicos (Fegan y Prior, 2005). Utilizando una técnica denominada 'multiplex PCR', en una sola reacción se amplifican y caracterizan filogenéticamente los aislamientos, lo cuales pueden ser posteriormente secuenciados para agruparlos de una manera mucho más rigurosa. Desde una perspectiva epidemiológica, la nueva caracterización agrupa sectores de la población de *Ralstonia* según hospederos definidos y en ambientes determinados.

La mayoría de la información sobre la supervivencia de *R. solanacearum* en el suelo se deriva de la interpretación de su capacidad de infección luego de la siembra y resiembra de plantas indicadoras a diferentes intervalos de tiempo en áreas infestadas (Belalcazar, 1976; Granada, 1996; Rojas, 1992). También se ha evaluado, tomando como referencia la capacidad de infección al cabo de diferentes periodos de rotación (Jackson y González, 1981; Van Elsas *et al*., 2000), la persistencia de la bacteria en residuos de cosecha (Graham, Jones y Lloyd, 1979) y en suelos infestados artificialmente (Mc Carter, 1976; Van Elsas *et al*., 2000). De los resultados se ha deducido que la persistencia de la bacteria en el suelo puede variar entre 6 y 48 meses, pero las diferencias dependen en gran medida de la metodología que se utilice en su determinación.

La longevidad del inóculo primario es importante para el éxito de la infección y depende de la habilidad que tiene el patógeno para escapar o resistir condiciones adversas del ambiente. La supervivencia varía con la clase de inóculo primario que el patógeno adopte y depende también de factores externos y de características intrínsecas del microorganismo (Shuster y Coiné, 1974). Los principales medios para la diseminación de la bacteria son: semilla contaminada (cormos procedentes de fincas con focos de Moko), contacto entre raíces (Kelman y Sequeira, 1965), agua de escorrentía y de riego, insectos (abejas, avispas), maquinaria, herramientas contaminadas, partículas de tierra infestada y animales (Granada, 2002). Con el descubrimiento de mecanismos de señalización utilizados por algunas bacterias para censar la concentración de especímenes de la misma especie denominados '*quorum sensing*' (Winans, 2005), se ha sugerido que la activación de genes de virulencia procede en forma diferente según el nicho, dependiendo de la densidad de la población y de las posibles especies hospedero presentes. Comportamientos como este explicarían también la razón de las diferencias en la determinación de la longevidad del inóculo.

Entre 2004 y 2005 se evaluó la presencia y persistencia de la bacteria *R. solanacearum* en el suelo y las aguas que conforman el flujo freático de cultivos de plátano del municipio de Fuente de Oro, en el Piedemonte Llanero. Durante el curso de la investigación se caracterizaron muestras de *R. solanacearum* por morfología y reacción a pruebas bioquímicas y moleculares (PCR) y se determinó el progreso de la incidencia del Moko a partir de un foco. Los resultados de la investigación permitieron determinar la eficacia de la rotación de cultivos como estrategia de manejo de la enfermedad en un área infestada.

MATERIALES Y MÉTODOS

En un cultivo comercial de plátano 'Hartón' (*Musa* cv. AAB) de cinco meses de edad, localizado en la vereda El Porvenir del municipio de Fuente de Oro (departamento del Meta), se seleccionaron cuatro plantas con síntomas de Moko, que para fines de este estudio constituyeron los focos. A partir de cada una de estas plantas se seleccionaron 12 puntos de muestreo, tres por eje de las coordenadas cartesianas norte, sur, oriente y occidente. La distancia entre cada punto fue de 2, 4 y 8 plantas a partir del origen o foco (Figura 3).

Al momento de la delimitación del área de trabajo se revisó que ninguna de las 288 plantas restantes ubicadas dentro del cuadrante formado por los extremos de los ejes tuviera síntomas de la enfermedad. Con el fin de adquirir cultivos puros de colonias típicas de *R. solanacearum*, de la planta central (foco) se tomaron mues-

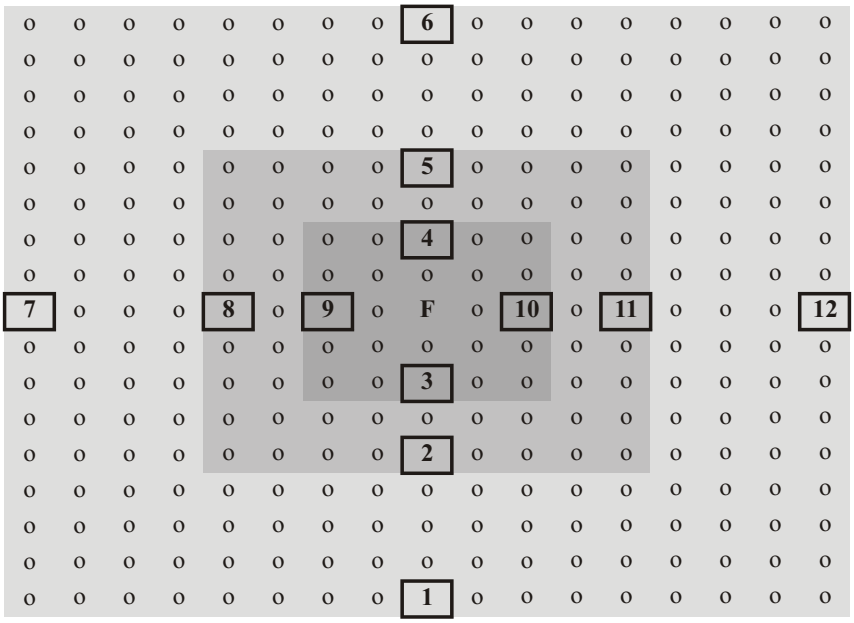

Figura 3. Esquema del diseño para la toma de muestras de agua y suelo en un lote de plátano con un foco de Moko (F) al centro. Los números de 1 a 12 representan los puntos en los que se realizó la toma de muestras y las áreas sombreadas, los diferentes sub-cuadrantes delimitados.

tras de tejido de pseudotallo antes de erradicarla *in situ*, mediante inyección con una solución de glifosato al 30%. Dentro del cuadrante formado por los cuatro ejes se definieron tres sub-cuadrantes correspondientes a las áreas delimitadas por cada uno de los 3 puntos de muestreo. Los cuatro muestreos se realizaron cada 45 días (0, 45, 90 y 135) a partir del 16 de agosto de 2004.

El cultivo correspondió a un arreglo 'anualizado' cuyo cultivo imediatamente precedente había sido de arroz. Estaba ubicado en un suelo de vega (Inceptisol) de topografía plana, con textura franco-limosa (22,8% de arena, 53% de limo y 24,20% de arcilla) y densidad aparente de 1,47 $g \cdot cm^{-3}$, pH 4,4, aluminio intercambiable 1,2 meq/100g y 2,6% de materia orgánica.

En todos los puntos de muestreo identificados para cada cuadrante se evaluaron muestras de suelo y agua. Las de suelo estaban constituidas por aproximadamente 500 g conformados por la mezcla de 6 submuestras obtenidas en un radio de 30 cm alrededor de la planta. Cada sub-muestra fue tomada a una profundidad de 25 cm, usando un barreno de 3 cm de diámetro que se desinfectaba con alcohol al 70% para evitar posible contaminación con las muestras; el punto central se muestreaba de último. Las muestras de agua fueron obtenidas de baldes plásticos con las paredes perforadas entre 10 y 20 cm desde el borde, colocados al lado de cada uno de los sitios donde se realizaron los muestreos de suelo.

De cada muestra de suelo se tomaron 10 g, a los cuales se le adicionaron 90 mL de solución buffer TE, procediendo seguidamente a hacer un esquema de diluciones hasta 10^{-3}. De las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} se sembraron tres cajas de Petri con medio semi-selectivo Sur África (SMSA-E), (Englebrecht, 1994 y Elphinstone, *et al*. 1996, citados por Martins, 2000), dejándolas en incubación a 28°C por 72 horas, al cabo de las cuales se procedió al conteo e identificación de las colonias según su morfología (Woods, 1984) usando un contador de colonias (Darkfield Colony Counter - Reichert®). Se identificaron tres tipos de colonias: fluidas (F), pequeñas fluidas redondas (SFR) y variantes afluidas (AFV) (Figura 4). Luego de un conteo del número de colonias formadas por concentración de la dilución, para efectos del análisis de abundancia sólo se tomaron los resultados obtenidos de la dilución 10^{-2}. Con las muestras de agua se siguió el mismo procedimiento de diluciones realizado con las muestras de suelo.

De las cajas de Petri sembradas por cada dilución se escogió una donde predominaran colonias F sin contaminación, a fin de seleccionar una colonia para su purificación. Si en la caja de Petri no se encontraban colonias F se tomó una SFR y, en caso extremo, una AFV. En total se sembraron 78 cajas de Petri por foco y se purificaron 26 colonias, para un total de 312 cajas por muestreo y 104 cultivos puros. De éstos, se seleccionaron 52 colonias, las cuales fueron transferidas a una caja con agar nutritivo para las pruebas bioquímicas y otra con agar nutritivo +

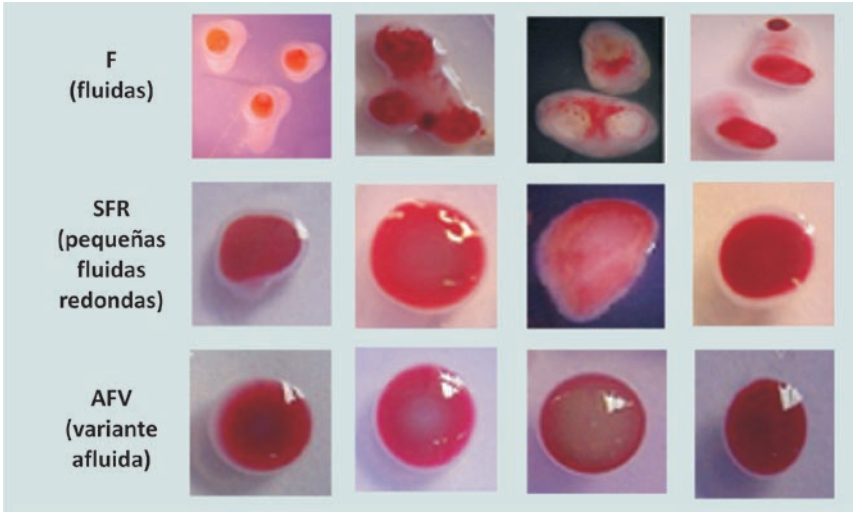

Figura 4. Tipos morfológicos de colonias de *Ralstonia solanacearum.*

sucrosa para su conservación. Aquellas colonias que resultaron positivas a todas las pruebas bioquímicas de actividad de la catalasa, la oxidasa y el KOH (Goszczynka, Serfontein y Serfontein, 2000) se conservaron en medio de agar + sucrosa y se les realizaron pruebas de hipersensibilidad en hojas de tabaco (Lozano y Sequeira, 1969). Los aislamientos que resultaron positivos a estas pruebas fueron conservados y utilizados para las pruebas de amplificación mediante PCR con los cebadores específicos *Oli1 - Y2* (Martins, 2000) en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y para pruebas de patogenicidad sobre plantas de plátano de dos meses de edad (Lozano y Sequeira, 1969).

El análisis estadístico del número de UFC/g aisladas de las muestras de suelo y agua fue realizado mediante los *software* SAS® y Sisvar® con los cuales se analizaron de manera independiente los muestreos, los focos, los cuadrantes y los puntos de muestreo. Ello permitió estudiar 'factores dentro de factores', como por ejemplo muestreos dentro de focos y viceversa, en cada una de las variables, según corresponde a un diseño anidado. También se midieron las distintas interacciones y efectos entre estos factores. Para la comparación de medias de cada uno de ellos se aplicó la prueba de Tukey al 5%. Con respecto a las curvas de incidencia acumulada por focos y por cuadrantes, se aplicaron líneas de tendencia logarítmica, a fin de determinar el valor de la pendiente (*b*), que indica la medida de dispersión de cada foco o cuadrante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La incidencia de plantas con síntomas de Moko registró un incremento sostenido durante el tiempo del ensayo en el área de muestreo. En promedio, la incidencia en la segunda, tercera y cuarta fecha de muestreo fue de 2, 4 y 6 plantas respectivamente (Figura 5). La incidencia en el cuadrante 3 fue estadísticamente superior (Tukey, $\alpha = 0,05$) a las demás (13%, comparado con 4% en promedio de los otros tres). En consecuencia, una vez determinada la medida de dispersión como el valor *b* (pendiente) de la línea que representa la tendencia logarítmica de la curva de incidencia [$y = a + b.ln(X)$], se

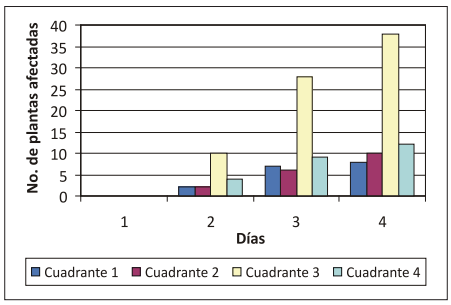

Figura 5. Incidencia de la enfermedad del Moko en un área delimitada dentro de un cultivo de plátano del Piedemonte Llanero por cuadrantes y fechas de evaluación (Fuente de Oro, Meta).

observa que ocurre una mayor dispersión de la enfermedad en el cuadrante 3 (Figura 6). El valor de b = 9,57 estimado para este cuadrante fue seguido por el del cuadrante 4 con b = 3,01 mientras que en los restantes cuadrantes los valores de b fueron 2,12 y 2,40, respectivamente.

Comparando los valores de la incidencia en cada sub-cuadrante, se observó que la infección se concentró tanto en los sub-cuadrantes más cercanos como en los más lejanos al foco (1 y 3, respectivamente). Sin embargo, durante los muestreos a los 45 y 90 días no se registró diferencia estadística significativa alguna entre ellos, a excepción del cuadrante 3 (Tukey, $\alpha = 0,05$) en relación con el número de plantas afectadas (Figura 7). La incidencia registrada en el área central (sub-cuadrante 2) fue mínima. Esto coincide con la apreciación de que el inóculo se encuentra disperso por toda el área de cultivo, producto de la diseminación realizada con el agua de escorrentía y las frecuentes inundaciones por desborde durante las temporadas de lluvia. No obstante, la influencia del foco —como punto a partir del cual ocurre la diseminación del inóculo— no se percibe con claridad.

Las diferencias entre colonias típicas y colonias no típicas en medio SMSA-E fueron fácilmente establecidas. Las características morfológicas de las colonias no típicas fueron muy variadas y consistieron principalmente de formas rizoides con borde color azul y centro rosado o redon-

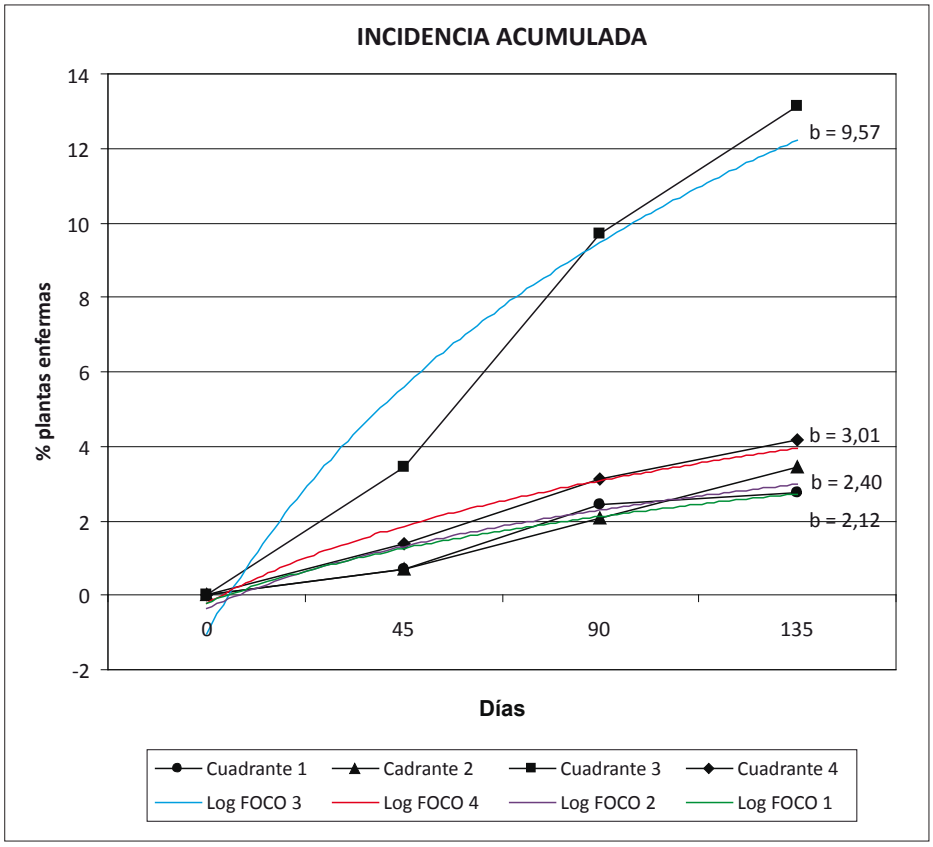

Figura 6. Dispersión de la enfermedad del Moko en un eje cartesiano a partir de un foco en un área delimitada dentro de un cultivo de plátano (Fuente de Oro, Meta).

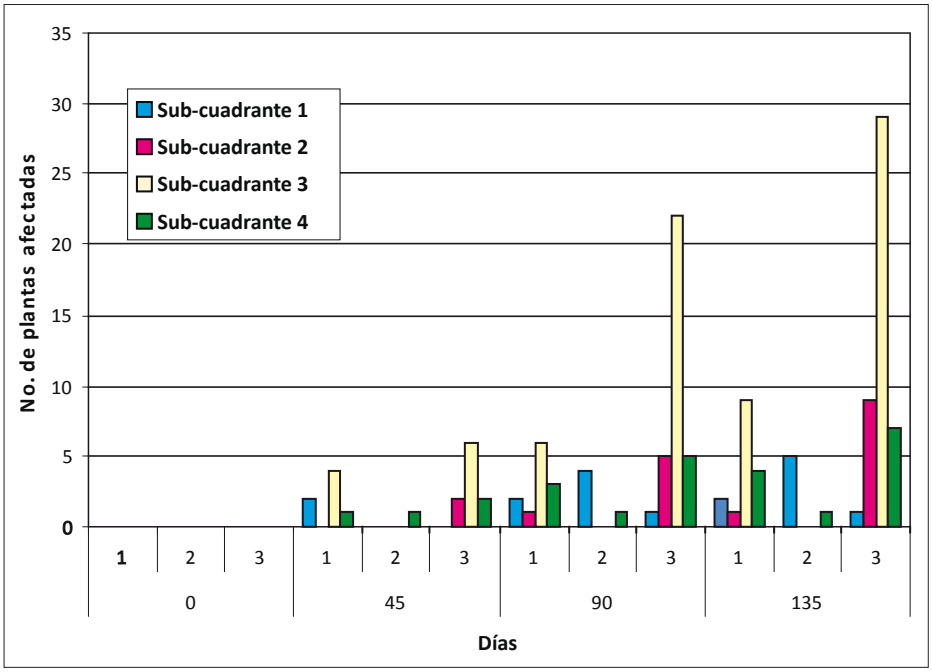

Figura 7. Dispersión de la enfermedad del Moko por sub-cuadrante y fecha de evaluación, en un área delimitada dentro de un cultivo de plátano en el Piedemonte Llanero (Fuente de Oro, Meta).

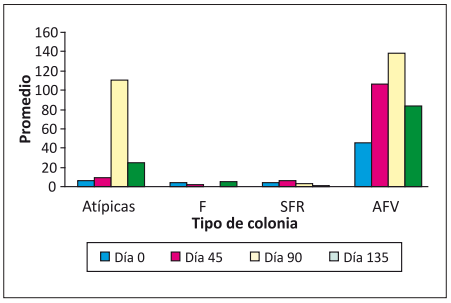

Figura 8. Promedio de colonias por tipo morfológico identificadas de muestras de suelo en un cultivo de plátano en Fuente de Oro, Meta.

La identificación de unidades formadoras de colonia en muestras de agua y suelo por fecha de evaluación siguió una tendencia semejante en ambos sustratos (Figura 9). La bacteria puede ser aislada abundantemente de cultivos de plátano en el área, en cualquier época.

De un total de 208 colonias aisladas y sometidas a las pruebas bioquímicas y patogénicas, menos de la mitad pasaron positivamente cualquier tipo de evaluación (Tabla 2). Entre las tipo F, 48% superaron la prueba bioquímica, 38% la de hipersensibilidad en hojas de tabaco y solo 25% la de patogenicidad en plátano. Ape-

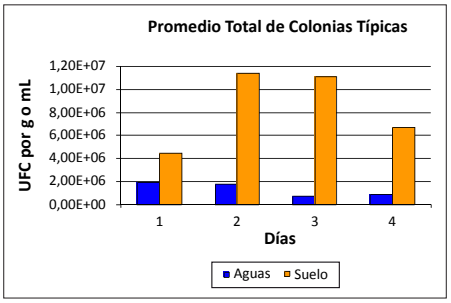

Figura 9. Promedio de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) identificadas en muestras de agua y suelo en un cultivo de plátano de Fuente de Oro, Meta.

das de color anaranjado o morado intenso. Las colonias tipo F presentaron forma irregular, elevación plana, superficie opaca, aspecto mucoide, con bordes gruesos color crema, pigmentación central roja difusa y dimensiones de 4 x 6 mm, en promedio. Las colonias tipo SFR exhibieron una forma ovalada más definida, con bordes más o menos enteros, definidos y mucho más delgados que el de las F. Las mismas presentaron elevación convexa, superficie lisa, fluidez baja, aspecto menos mucoso que las F y con más amplia y definida coloración roja en el centro, con dimensiones de 4 x 5 mm, aproximadamente. Las AFV mostraron una marcada estructura redondeada, elevación convexa, bordes muy delgados, color crema casi imperceptible, superficie lisa brillante, coloración roja intensa y sus dimensiones fueron de 3 mm aproximadamente.

El número total de colonias con morfología típica, identificadas de agua y suelo dentro del área delimitada fue 62.414 y el de colonias con morfología atípica 23.460. Entre las colonias con morfología típica 1.909 correspondieron a las tipo F, 2.339 a las SFR y 58.166 AFV. Por fecha de evaluación (0, 45, 90 y 135 días), el número de colonias típicas aisladas varió de 180 el primer día (88,1% del total aislado en la misma fecha) a 458 (92,5%), 443 (49,7%) y 269 (73,9%) en cada uno de los restantes muestreos (Tabla 1). De éstas, en la primera evaluación se aislaron 22 colonias tipo F, en la segunda 11, en la tercera 3 y en la cuarta 21. La tendencia a la disminución en el número de colonias tipo F aisladas entre la primera y la tercera fecha de evaluación (0, 45 y 90 días), y su posterior incremento hacia la cuarta fecha (Figura 8), coincidió con un comportamiento inverso de las colonias atípicas (24, 37, 449 y 95, respectivamente). Siempre se observó una mayor proporción de colonias tipo AFV (45, 106, 138 y 83 por fecha de muestreo, en promedio) que las tipo F y SFR (4, 2, 1, 5 y 5, 6, 3, y 1 en promedio, respectivamente). La relación formas típicas/total siempre fue igual o estuvo por encima de 50%, indicando una amplia dispersión de formas típicas o fuente de inóculo de la bacteria en el área de evaluación.

Tabla 1. Número promedio de colonias de *Ralstonia solanacearum* identificadas en las áreas delimitadas alrededor de cuatro focos de Moko en una explotación de Fuente de Oro, Meta.

Evaluación (día)	Tipo de colonias					
	Atípicas	F	SFR	AFV	Total típicas	% típicas
0	24,2	22,3	18,5	138,8	179,6	88,1
45	37,2	11,1	23,6	423,1	457,8	92,5
90	449,1	2,8	13,7	426,6	443,1	49,7
135	95,1	20,9	5,6	242,3	268,8	73,9
Total	605,6	57,1	61,3	1230,8	1349,2	69,0

F: fluidas, SFR: pequeñas redondas fluidas, AFV: variantes afluidas.

Tabla 2. Colonias de *Ralstonia solanacearum* aisladas de áreas delimitadas en un cultivo de plátano con reacción positiva a diferentes pruebas bioquímicas y de patogenicidad.

Prueba	Tipo de colonias							
	F	%	SFR	%	AFV	%	Total	%
Aisladas	100	100	88	100	20	100	208	100
Bioquímica	48	48	24	21	8	40	80	38,5
Hipersensibilidad	38	38	10	11	7	35	55	26,4
Patogénicas	25	25	4	5	0	0	29	13,9

F: fluidas, SFR: pequeñas redondas fluidas, AFV: variantes afluidas.

nas 5% de las SFR superaron finalmente la prueba de patogenicidad. Ninguna AFV fue patogénica en plátano, a pesar de que poco menos de la mitad superaron positivamente las pruebas bioquímicas y de hipersensibilidad en tabaco.

La amplificación con *Oli1 – Y2* del ADN extraído de los 14 aislamientos escogidos (cuatro por fecha de evaluación) confirmó la caracterización realizada mediante las pruebas bioquímicas de hipersensibilidad y de patogenicidad. La visualización de los productos de ADN amplificados mediante PCR permitió observar una banda migrando a una posición de aproximadamente 287-288 pb, correspondiente a lo comúnmente observado de protocolos de amplificación de *R. solanacearum* (Figura 10). Dos aislamientos (S32a y S32d) dieron resultados negativos y corresponden a aislamientos que en todas las pruebas previamente realizadas habían resultado positivos, excepto en la de patogenicidad. El aislamiento S42d, cuyo ADN resultó degradado, corresponde a un sitio donde la planta de plátano presentó síntomas de la enfermedad y había resultado positivo en todas las pruebas, incluyendo la de patogenicidad.

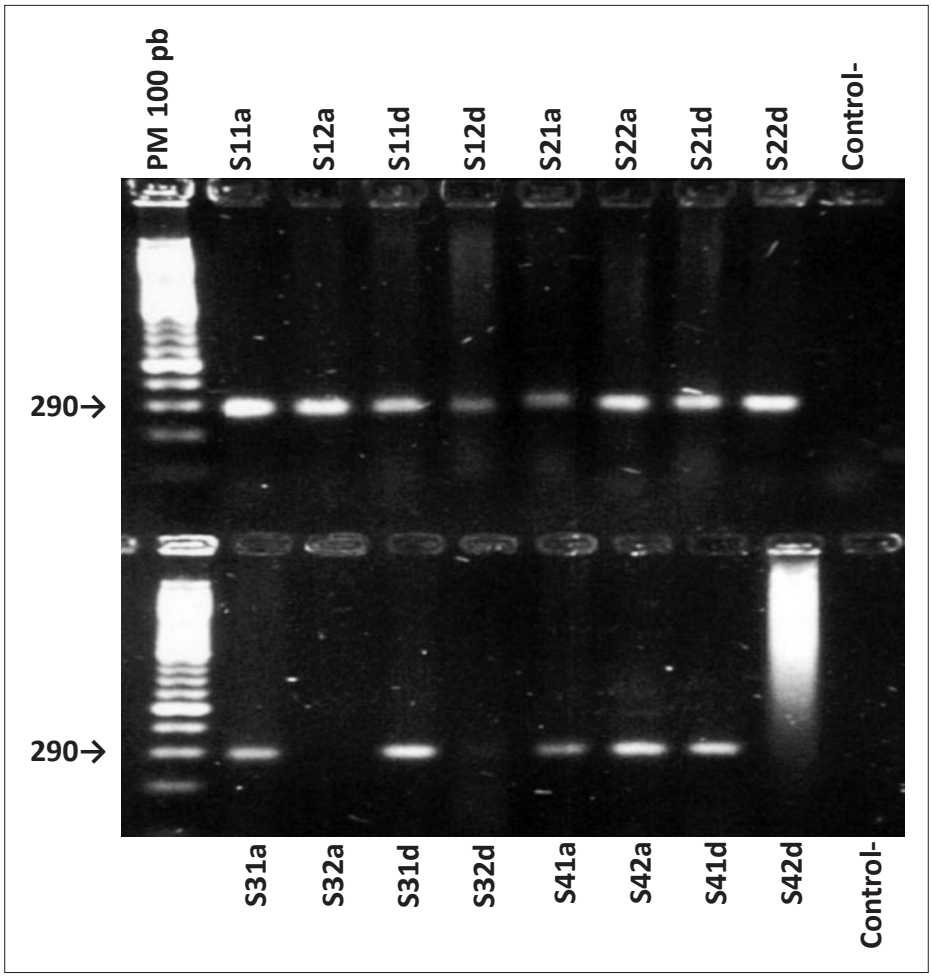

Figura 10. Visualización de los productos de la amplificación por PCR (*Oli1 – Y2*) del ADN de aislamientos de *Ralstonia solanacearum* obtenidos en muestras de suelo en un cultivo de plátano de Fuente de Oro, Meta.

CONCLUSIONES

El incremento sostenido de la incidencia de plantas con síntomas de Moko en las áreas de cultivo mencionadas indica la presencia y sobrevivencia del inóculo de *R. solanacearum* en los los suelos cultivados con plátano en el Piedemonte Llanero. A pesar de la implementación de prácticas de rotación de cultivos la enfermedad se establece por focos y se dispersa a partir de plantas infectadas temprano en el cultivo. Otros focos van apareciendo con el transcurso del tiempo en sitios diferentes a los de las primeras plantas infectadas identificadas. La aparición de nuevos focos está determinada por infestaciones anteriores e indica la extensión de la dispersión de la bacteria en los suelos de las áreas de cultivo de plátano.

Aunque efectiva para disminuir la velocidad de dispersión del patógeno, la sola práctica de erradicación de plantas infectadas parece no estar contribuyendo a la reducción de la diseminación de la enfermedad en la región. La rotación de cultivos y la selección rigurosa de la semilla contribuyen efectivamente con la reducción de la incidencia en etapas tempranas del cultivo. Sin embargo, estas prácticas deben ir acompañadas con otras medidas de previsión fitosanitaria como la cuarentena de las áreas infectadas (focos), la desinfección de herramientas y la regulación a la circulación de personal de trabajo en las áreas de cultivo.

Los protocolos de diagnóstico en campo comúnmente utilizados son suficientes para la determinación de incidencia en las áreas de cultivo. Los procedimientos de laboratorio permiten la identificación de formas patogénicas del inóculo, aunque son más demandantes en recursos económicos y tiempo. Formas típicas y atípicas de la bacteria se identifican fácil-

mente y se pueden caracterizar mediante pruebas bioquímicas y de hipersensibilidad, pero su correspondencia con la definición de patogenicidad es limitada. La amplificación del ADN mediante PCR con (*Oli1 – Y2*) es de utilidad para confirmar la presencia de la bacteria y es correspondiente con la determinación de la patogenicidad del inóculo, aunque limitada en cuanto la definición de su importancia epidemiológica.

La identificación de los diferentes tipos de colonia típicas de *R. solanacearum* (F, SFR y AFV) en agua y suelo extraídos del área delimitada en cualquier fecha de evaluación indica la extensión de la dispersión y la persistencia de la bacteria en el campo. El efecto de la presencia constante y abundante de formas patogénicas de la bacteria (colonias tipo F) se relaciona con el poco éxito de las medidas fitosanitarias adoptadas para reducir los efectos de la enfermedad en la región. El nivel de contaminación de aguas y suelo en las áreas de cultivo es determinante para la definición de prácticas de manejo agronómico y fitosanitario de los cultivos de plátano en el Piedemonte Llanero. En efecto, las inundaciones por desborde de caños y el uso de los reservorios para el riego están contribuyendo de manera directa con la diseminación del inóculo con las aguas contaminadas.

La rotación de cultivos, el manejo de arvenses, la escogencia más rigurosa del material vegetal utilizado como semilla, la erradicación de plantas infectadas en estados tempranos de desarrollo del cultivo, la cuarentena de sitios infestados (focos), la adopción de prácticas de manejo con carácter preventivo para las labores agronómicas y el manejo de herramientas siguiendo consideraciones fitosanitarias, serán plenamente efectivos si se acompañan con tratamientos de remediación sanitaria de suelos y aguas. En tal sentido, sería conveniente adelantar una evaluación más rigurosa del efecto de prácticas alternativas de manejo, como tratamientos al suelo con lixiviados obtenidos del raquis del racimo y roca fosfórica, cuyos efectos positivos han sido demostrados en diferentes zonas de cultivo.

La determinación del intervalo de tiempo más adecuado para la rotación de cultivos y la selección más rigurosa de las especies a utilizar debería adoptarse a partir de un mejor proceso previo de caracterización de la composición filogenética de la bacteria en la región. Alternativas más eficaces a la rotación de cultivos para reducir la persistencia de *R. solanacearum* podría surgir de la determinación de la posible ocurrencia de mecanismos de señalización '*quorum sensing*' en la población del patógeno. Con la interpretación del mencionado mecanismo cabría la posibilidad de intervenir en el proceso de reconocimiento de hospederos de la bacteria.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a las diferentes personas de las instituciones que hicieron posible la realización del proyecto de investigación: a la agencia local de la Agencia de Cooperación del Japón –JICA- por su contribución en la financiación del proyecto, al Centro Internacional de Agricultura Tropical –CIAT- y, en particular, a la doctora Elizabeth Álvarez y su equipo de colaboradores por su permanente asesoría y colaboración en el proceso de caracterización molecular; así mismo, al doctor Alfonso Martínez G. y la Doctora Celsa García D. por su confianza para con el autor principal en el direccionamiento científico de los estudiantes involucrados con el proyecto, al señor Adelmo Martínez, por permitir el desarrollo del trabajo de campo en cultivos de su propiedad y a todos los amigos y colaboradores involucrados permanente y transitoriamente con el laboratorio de fitopatología del Centro de Investigaciones La Libertad de CORPOICA, en particular al I.A. Hernán Javier Monroy y a Ferney G. López, por su permanente acompañamiento y calor humano.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Belalcázar, S., O. Jaramillo y J.C. Toro. 1991. Aspectos agro-económicos del plátano en el trópico. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Comité Departamental de Cafeteros del Quindío. Cid – Inabap – ICA.

Belalcázar, S.L. 1976. El cultivo del plátano en el trópico. Manual de asistencia técnica No. 50. Inabap. pp. 93-102.

Buddenhagen, I., L. Sequeira y A. Kelman. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 52: 706.

Bustamante, C. 1999. La zonificación ambiental como estrategia para la planificación de los sistemas agroforestales y la recuperación y conservación de los recursos naturales. Programa Nacional de Agroecosistemas, CORPOICA, C.I. Tibaitatá.

Fegan, M. y P. Prior. 2005. How complex is the "*Ralstonia solanacearum* Sspecies complex? The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 46 p.

Gobernación del Meta, 2004. El Meta: un territorio de oportunidades, medio magnético.

Gobernación del Meta, 2005. Meta estadístico 2005, medio magnético.

Goszczynka, T., J. Serfontein y S. Serfontein. 2000. Introduction to practical phytobacteriology. 1st. ed., Safrinet, Pretoria, South Africa, 83 p.

Graham, J., D. Jones y A. Lloyd. 1979. Survival of *Pseudomonas solanacearum* race 3 in plant debris and latently infected potato tubers. Phytopathology 69: 1100-1103.

Granada, G. 1996. Supervivencia de *Pseudomonas solanacearum* raza 2 bajo condiciones de zona platanera del departamento del Quindío. Tecnología del Eje Cafetero para la siembra y explotación rentable del cultivo del plátano. 3er informe técnico 1994-1996. Armenia, Colombia. 95 p.

Granada, G. 2002. Manejo integrado del Moko en cultivos de banano y plátano. Taller sobre alternativas al uso de bromuro de metilo para el control del Moko en banano. Ministerio del Medio Ambiente, Bogotá, 13 p.

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

IGAC - Instituto Geográfico Agustín Codazzi**.** 2000. Estudio general de suelos y zonificación de tierras. Departamento de Meta, medio magnético.

Jackson, M. y L. González. 1981. Persistence of *Pseudomonas solanacearum* (race 1) in a naturally infested soil in Costa Rica. Phytopathology 71: 690-693.

Kelman, A y Sequeira, L. 1965. Root-to-root spread of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 55, 304-309.

Lozano, J. y L. Sequeira, L. 1969. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infiltration technique. Phytopatology 60: 833-838.

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

Mc Carter, M. 1976. Persistence of *Pseudomonas solanacearum* in artificially infested soils. Phytopathology 66: 998-1000.

Rojas, S. 1992. Supervivencia de la bacteria *Pseudomonas solanacearum* E.F Smith, en el suelo bajo diferentes formas de manejo. Resúmenes de investigaciones en el Piedemonte Amazónico. ICA- C.I. Macagual, Caquetá. pp. 5, 6.

Salcedo, N.N. 2004. Distribución e incidencia de la enfermedad conocida como Moko o Ereke causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum* raza 2 en el cultivo del plátano (*Musa* AAB Simmonds) en el departamento del Meta. Tesis de Grado, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C. 59 p.

Shuster, L.M. y D.P. Coiné. 1974. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. Ann. Rev. Phytopath. 12: 199-221.

Stephen, C.W. 2005. Microbiology: bacterial speech bubbles. Nature 437: 422-425.

Van Elsas, J., P. Kastelein, P. van Bekkum, J. van der Wolf, P. de Vries y L. van Overbeek. 2000. Survival of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2, the causative agent of potato brown rot in field and microcosm soils in temperate climates. Phytopathology 90: 1358-1366.

Woods, A. 1984. Moko disease: Atypical symptoms induced by afluidal variants of *Pseudomonas solanacearum* in banana plants. Phytopathology 74: 972-976.