

DISTRIBUCIÓN, INCIDENCIA Y VARIABILIDAD DE *Ralstonia solanacearum*, AGENTE CAUSAL DE LA MARCHITEZ BACTERIANA DE LA PAPA EN EL ESTADO MÉRIDA

Rosaima García¹, Alba García¹ y Luisa Delgado¹

RESUMEN

La marchitez bacteriana de la papa ocasionada por *Ralstonia solanacearum*, anteriormente conocida como *Burkholderia solanacearum* o *Pseudomonas solanacearum* E. F Smith, es una de las principales limitantes en la producción de este cultivo en el país, fundamentalmente cuando va dirigida a la obtención de tubérculos semilla. Con la finalidad de conocer exactamente la situación actual de la enfermedad, descartar suelos contaminados en la producción de semilla, e iniciar un programa de manejo de la misma en el estado Mérida, se realizó durante el período 1992-1996 un diagnóstico sobre distribución, incidencia y presencia de variantes patogénicas de *R. solanacearum* en las principales zonas productoras de papa. Se evaluaron 38 localidades tomando muestras de suelo, tejidos y/o tubérculos, los cuales fueron analizados en el laboratorio del CIAE-Mérida del FONAIAP mediante el uso del medio de cultivo Cloruro de Trifenil Tetrazolio, específico para el desarrollo de colonias de *R. solanacearum*, y para la determinación de biovares se realizaron pruebas bioquímicas de oxidación y/o utilización de azúcares. Los criterios usados para determinar la incidencia de la enfermedad, se fundamentaron en el porcentaje de área infestada por finca y el porcentaje de fincas infestadas por localidad. Se encontró que la bacteria estaba distribuida en 24 de las localidades muestreadas y zonas ubicadas desde 1167 msnm hasta 3000 msnm. En 14 localidades pertenecientes a los Municipios Rangel y Miranda no se encontró la enfermedad, las cuales en su mayoría coinciden con zonas de páramo ubicadas por encima de 3000 msnm. Asimismo, se observó un incremento aproximado del 15% en la enfermedad que fue desde 22% al inicio de la investigación, en el año 1992, hasta 37% al finalizarla en el año 1996; con una infestación variable por finca que osciló entre 5 y 75%. Se identificaron los Biovares I, II, y III de *R. solanacearum* en proporción de 6%, 82% y 12%, respectivamente, encontrándose la variante II específica de la papa, con mayor frecuencia que las demás y en la gran mayoría de las localidades infestadas.

Palabras clave adicionales: *Pseudomonas solanacearum*, biovares, tubérculos

ABSTRACT

Distribution, incidence and variability of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of bacterial wilt of potato, in Mérida state, Venezuela

The bacterial wilt of potato, caused by *Ralstonia solanacearum*, formerly known as *Burkholderia solanacearum* or *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith, is one of the major pest that limits potato production. To know the current situation of this disease, to discard contaminated soil for seed production and to initiate a program for pest management in the state of Mérida, Venezuela, a diagnostic of spread distribution, incidence and presence of pathogenic variants of *R. solanacearum* was performed in the main potato production zone from 1992 to 1996. Thirty-eight localities were evaluated, taking samples of soil, tissue and tubers, which were analyzed in FONAIAP CIAE-Mérida. Trifenil tetrazolium chloride media were used to determine cultural traits and the biovars were determined using biochemistry oxidation tests and/or utilization of sugars. The criteria used to determine the disease incidence were based on the percentage of infested area per farm and percentage of infested farms per locality. It was found that the bacteria is spreaded in 24 of the sampled localities, in zones between 1167 and 3000 meters above sea level. In 14 localities belonging to municipalites of Rangel and Miranda, the disease was not found; most of such localities are paramo zones located over 3000 meter above sea level. It was observed an increase of about 15% in the disease which went from 22% at the beginning of the research, in 1992, up to 37% at the end, in 1996, under a variable infestation per farm that varied between 5 and 75%. The I, II and III biovars of *R. solanacearum* were identified in proportion of 6%, 82% and 12%, respectively. Variant II, specific for potato, was found with higher frequency than the others and in most of the infested localities.

Additional key words: *Pseudomonas solanacearum*, biovars, tubers

INTRODUCCIÓN

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.), tiene gran impacto dentro de los sistemas

agrícolas en los cuales se desarrolla su producción, principalmente en la región andina, debido a que posee condiciones agroecológicas propicias para su desarrollo, aunado a su carácter

Recibido: Diciembre 2, 1998

¹ FONAIAP-CIAE Mérida. Apdo. 425. Mérida, Edo. Mérida, Venezuela

alimenticio que en términos de calorías es elevado; siendo un potencial para contribuir a solucionar problemas de escasez de alimento a corto plazo con mayor ventaja competitiva sobre otros productos tradicionales.

Hasta el año 1987, la papa ocupaba el cuarto lugar entre los principales cultivos alimenticios del mundo (Horton, 1987). En Venezuela, ha ocupado el octavo lugar por su producción total y el noveno lugar por el valor económico de su producción (Ortega, 1989). Para el estado Mérida es el principal rubro de explotación y de tradición hortícola, con una superficie sembrada de 6.234 ha y una cosechada de 5.508 ha, aportando 24,5 % al valor de la producción del estado con un rendimiento aproximado de 22,507 TM/ha (MAC, 1996).

El proceso de producción del cultivo de la papa, presenta un conjunto de factores limitantes que inciden negativamente en la obtención de buenas cosechas y más aún en la producción de semilla de buena calidad fitosanitaria. En las zonas altas del estado Mérida, algunos insectos plagas y enfermedades como la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) juegan un importante papel al respecto.

La presencia de la marchitez bacteriana de la papa en las principales áreas productoras del estado Mérida, representa un riesgo para la producción del rubro, fundamentalmente de los tubérculos destinados a semilla. Se conoce que la bacteria tiene la particularidad de sobrevivir en el suelo por tiempo variable, y de transmitirse en éstos, pudiendo ir en forma latente y asintomática en los mismos (Hooker, 1980; Martín y French, 1985; García et al. 1993; García, 1995).

Ralstonia solanacearum afecta a más de 30 familias de plantas, tanto cultivadas como silvestres. Entre los cultivos más susceptibles está la papa y también puede afectar tomate y algunos *Solanum* spp. La bacteria limita el cultivo de papa en Asia, Africa, América Central y América del Sur, donde ocasiona severas pérdidas en los cultivos en las regiones de climas tropicales, subtropicales y templados. También puede ocurrir en climas más fríos como en altitudes relativamente grandes, en la zona tórrida o en latitudes mayores (Martín y French, 1985).

En el campo *R. solanacearum* causa dos tipos de síntomas. En la parte aérea, el marchitamiento inicial de sólo partes de la planta es característico,

también se presenta marchitez general, enanismo y amarillamiento del follaje en cualquier estado de desarrollo del hospedante. En los tallos jóvenes se pueden observar a través de la epidermis rayas oscuras y angostas que corresponden a los haces vasculares infectados que con una ligera presión, suelen exudar un mucílago lechoso si se hace un corte transversal. En la parte subterránea, la tierra se adhiere al exudado bacteriano en los ojos del tubérculo o en la cicatriz del estolón. Un tubérculo cortado transversalmente presenta a menudo una coloración parduzca en el anillo vascular. Una ligera presión hace salir del anillo vascular el mucílago típico, que tiene aspecto de “pus”, o el mucílago mana naturalmente. El anillo vascular, y más tarde todo el tubérculo, puede desintegrarse (Hooker, 1980; Martín y French, 1985).

Se conocen tres razas de *R. solanacearum*: la raza 1 que afecta solanáceas y otras plantas, la raza 2 bananos y heliconias, y la raza 3 que afecta papa. Dentro de éstas hay numerosos patotipos relacionados con las áreas geográficas (Buddenhagen et al., 1962).

El otro sistema de clasificación acuerda cuatro biotipos o biovares (I, II, III y IV), designados en base a ciertas propiedades bioquímicas (Hayward, 1964). Se conoce que los biovares (Bvs) y razas se correlacionan de la siguiente manera: los Bvs I, III y IV aislados de hospederos no musáceas pertenecen a la raza 1, el Bv II es la raza 3 (solamente variante del Bv 2-A de temperaturas frías); los aislamientos de musáceas que causan la marchitez bacteriana o la enfermedad del moco son raza 2, Bvs I ó III (Buddenhagen y Kelman, 1964), y el Bv V, aislado de la mora es raza 4 (He et al., 1983).

La marchitez bacteriana de la papa es causada, en más de 90% de los casos, por una “variante de la papa” de *Ralstonia solanacearum* (raza 3/biovar 2-A) adaptada al clima frío. Esta es principalmente una enfermedad con origen en la semilla, la papa es el principal hospedante, pero cuando este patógeno es favorecido por su alto potencial de inóculo y alta temperatura, puede infectar tomates (y raras veces, otros cultivos) cuando en circunstancia inusuales se usan éstos como cultivos de rotación. En ciertos lugares, son afectadas malezas específicas (French, 1994).

Debido a la importancia relevante de la marchitez bacteriana en la producción de tubérculos de papa, se realizó esta investigación

con el objeto de determinar la situación actual de la enfermedad, basado en un estudio de incidencia y distribución y variación de la bacteria causal, *R. solanacearum*, en las principales zonas productoras; y con el propósito de descartar localidades infestadas con la bacteria para la producción de semilla de papa, así como evaluar e incorporar las prácticas de manejo más efectivas para disminuir el inóculo de la misma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Distribución e incidencia de la enfermedad.

Se realizó un muestreo en fincas de producción tradicional de papa en el estado Mérida, pertenecientes a las localidades de El Valle, Monte Rey, Las Cuadras, La Culata, y El Morro del municipio Libertador (1995-3100 msnm), Jají y Ejido del municipio Campo Elías (1167-2000 msnm), La Trampa, Capaz y La Carbonera del municipio Sucre (2000-2200 msnm); Cacute, Mucurubá, Mucuchíes, La Toma, Mitirivó, Llano El Hato, Gavidia, Apartaderos y Mucubají, del municipio Rangel (2000-4000 msnm); La Venta, Chachopo, Timotes, Piñango, del municipio Miranda (2250-3500 msnm); Bailadores, Las Playitas, La M y Páramo La Negra, del municipio Rivas Dávila (1710-3100 msnm); Santo Domingo, El Efafiche y las Piedras, del municipio Cardenal Quintero (2179-2200 msnm); San Rafael, La Mucuy baja, Mucuy alta (1710-2200 msnm) del municipio Santos Marquina, y El Arbolito, Las Agujas, Musuy, La Culata y Pueblo Llano, del municipio Pueblo Llano (1170-3100 msnm).

Para ello se tomaron muestras de suelo, tallos y/o tubérculos de plantas sintomáticas y asintomáticas, en forma de zigzag y siguiendo a la diagonal. Se evaluó también el área afectada por superficie y la forma de aparición de la enfermedad (si estaba sectorizada o dispersa), tomando muestras puntuales de suelo a diferentes distancias. La severidad de la enfermedad se midió siguiendo la metodología de French descrita en 1982, a través de una escala que va desde 1 hasta 5, donde 1 corresponde a una planta saludable y 5 una planta marchita o muerta. Los criterios usados para determinar la incidencia de la enfermedad se fundamentaron en el porcentaje de área infestada por finca y en el porcentaje de fincas infestadas por localidad. De los suelos se

hicieron diluciones desde 10 g de tierra en 100 cc de agua destilada y estéril, hasta llegar a una proporción de 1: 10.000 y se sometieron a agitación por 1 hora.

Los pedazos de tallos y rodajas de tubérculos fueron desinfectados con alcohol isopropílico al 80% y flameados, para luego ser macerados dentro de bolsas plásticas donde se les agregó agua destilada estéril. Las siembras se realizaron en placas petri que contenían el medio de cultivo Cloruro de Trifenil Tetrazolio descrito por Kelman (1954), específico para *R. solanacearum*; se incubaron a temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 horas y luego se dejaron por 24 horas a temperatura ambiente (entre 20 a 25°C) hasta complementar la nitidez de las colonias. El desarrollo de colonias color blanco cremoso, con una puntuación de rosada a rojo claro en el centro y de bordes irregulares, indicaban resultados positivos para *R. solanacearum*. Estas colonias aisladas se sembraban tres veces en el medio Kelman sin Tetrazolio hasta lograr la purificación completa. Para verificar la especie causante de la enfermedad se siguió la metodología descrita por Schaad (1988), sembrando en los medios extracto de carne-dextrosa-carbonato de calcio (YDC), B de King y cristal violeta pectato (CVP); medio anaeróbico de Hugh y Leifson (1953), reducción de nitratos, gelatinasa, producción de NH_3 , reacción rápida de Gram en KOH al 3 %, arginina dihidrolasa y crecimiento a 30°C y 41°C . Asimismo se les determinó características culturales (color, elevación y superficie) y morfológicas (forma y tamaño).

Los aislamientos obtenidos se hicieron reaccionar siguiendo la prueba serológica de Elisa sobre membranas de nitrocelulosa (NCM- Elisa), específico para detección de *R. solanacearum* proveniente del Centro Internacional de la Papa, descrita por Gutarra y Gamboa (1995). Los aislamientos fueron conservados en agua destilada y estéril en tubos de ensayos con tapón de malaquita para realizar pruebas posteriores.

Pruebas de patogenicidad

Se realizaron sobre plantas de papa var Granola, desarrolladas en bolsa de polietileno de 5Kg de capacidad, las cuales se llenaron con sustrato a base de fibra de coco, arena y tierra negra de páramo en proporción 1:1:2 y esterilizado a 90°C durante 2 horas.

Los inóculos se prepararon con suspensiones de células bacterianas de concentración de 10^6 células/ml (Do. = ± 1) a partir de un cultivo de dos días en el medio Kelman sin Tetrazolio. Las inoculaciones se realizaron con inyectoras finas sobre la axila de la hoja media de plantas de 1,5 meses de edad, con más de tres hojas verdaderas, luego fueron provistas de una bolsa plástica con dos pequeñas perforaciones y colocadas a temperatura de 25 °C en un cuarto con techo de lámina transparente. Una vez que las plantas presentaron los síntomas característicos de marchitez flácida se les practicó la prueba del flujo para detección de *R. solanacearum* entre los siguientes 5 a 10 días, descrito por Martín y French (1985).

Caracterización de Biovares.

Para la determinación de Bvs de *R. solanacearum* se realizaron las pruebas sobre utilización de los disacáridos celobiosa, lactosa y maltosa y sobre oxidación de los alcoholes hexosas dulcitol, manitol y sorbitol, siguiendo la metodología descrita por French et al. (1995) y Hayward (1964). Los disacáridos se esterilizaron por tinalización (calentamiento con vapor a 100°C durante 20 minutos por tres días consecutivos) y se colocaron 4 ml de suspensión de inóculo de células bacterianas de 10^6 células/ml (Do = aproximadamente -0,1) de concentración proveniente de un cultivo de 48 horas de edad como máximo. Para cada aislamiento se hicieron dos repeticiones y dos testigos, uno sin hidrato de carbono e inoculado y otro con hidrato de carbono pero sin inocular.

Luego se incubaron a 30° C y se observaron las reacciones después de 3, 7 y 14 días. Con el cambio de color de verde oliva a amarillo, de arriba hacia abajo, se detectaba la producción de ácidos por la bacteria a partir de estos compuestos.

Para diferenciar los fenotipos de Bv² de *R. solanacearum* en 2-A y 2-T se empleó la metodología de Hayward (1994), Hayward et al. (1991) y French et al. (1995), mediante la utilización del mismo medio basal usado para determinar Bvs a través de la detección de actividad metabólica sobre producción de acidez a partir de los azúcares D(-) ribosa y D(+) trehalosa;

así como degradación de pectato por medio de siembras en el medio CVP y la patogenicidad a la papa a 25°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Distribución e incidencia de marchitez bacteriana

En el Cuadro 1 se presentan los resultados obtenidos del muestreo realizado en 38 localidades ubicadas en los nueve municipios productores de papa de importancia en el estado Mérida. Se puede observar que la enfermedad está distribuida en 24 de las localidades muestreadas ubicadas en alturas que van desde 1167 msnm en Ejido del municipio Campo Elías hasta 3000 msnm en Mucuchíes del municipio Rangel. Se encontraron 14 localidades libres de la bacteria, los cuales están ubicadas por encima de 3.000 msnm, donde se destacan: La Culata (3100 msnm) del municipio Libertador, La Toma (3500 msnm), Mitirivó (3200 msnm), Llano El Hato (3200 msnm), Gavidia (3300 msnm), Apartaderos (3800 msnm) y Mucubají (4000 msnm) del municipio Rangel; La Venta (3050 msnm), Chachopo (3200 msnm) y Piñango (3500 msnm) del municipio Miranda; La M (2500 msnm) y Páramo La Negra (3800 msnm) del municipio Rivas Dávila; y La Musuy (2000 msnm), La Culata (3100 msnm) del municipio Pueblo Llano.

En evaluaciones previas, se ha señalado la presencia de marchitez bacteriana en Mucubají y Pinango aunque en incidencias inferiores al 16 % (Paz, B. Datos no publicados).

Entre los municipios que presentan mayor cantidad de localidades infestadas están: Sucre, Cardenal Quintero, Santos Marquina y Campo Elías con 100%, le sigue El Libertador, con 75%, Pueblo Llano con 60% y Rivas Dávila con 50%. Los municipios Miranda y Rangel presentan un menor porcentaje de localidades infestadas con 25% y 33% respectivamente. Lo anterior coincide con lo expuesto por French (1994), quien señala que *R. solanacearum* es una bacteria adaptada a pisos altitudinales menores de 2800 msnm.

Cuadro 1. Distribución e incidencia de *Ralstonia solanacearum* en diferentes localidades paperas del estado Mérida. 1992-1996.

Municipio	Localidad	Incidencia (%)				
		1992	1993	1994	1995	1996
Libertador	El Valle (1995 msnm)	82	88	81	75	75
	Monte Rey (2800 msnm)	-	-	-	30	30
	Las Cuadras (2000 msnm)	-	-	-	80	80
	La Culata (3100 msnm)	0	0	0	0	0
	El Morro (2000 msnm)	0	0	0	95	95
Sucre	La Trampa (2200 msnm)	-	-	30	50	75
	Capaz (2000 msnm)	-	-	0	45	60
	Carbonera (2200 msnm)	-	-	-	75	80
Rangel	Cacute (2000 msnm)	-	-	-	75	75
	Mucurubá (2300 msnm)	-	-	20	25	33
	Mucuchíes (3000 msnm)	57	36	35	50	22
	La Toma (3500 msnm)	0	0	0	0	0
	Mitirivó (3200 msnm)	0	0	0	0	0
	Llano El Hato (3200 msnm)	-	0	0	0	0
	Gavidia (3300 msnm)	-	0	0	0	0
	Apartaderos (3800 msnm)	0	0	0	0	0
	Mucubají (4000 msnm)	0	0	0	0	0
Miranda	La Venta (3050 msnm)	0	0	0	0	0
	Chachopo (3200 msnm)	0	0	0	0	0
	Timotes (2250 msnm)	54	55	70	58	58
	Piñango (3500 msnm)	0	0	0	0	0
Cardenal Quintero	Sto Domingo (2179 msnm)	82	80	65	70	70
	El Efafiche (2000 msnm)	-	50	75	70	60
	Las Piedras (2200 msnm)	80	90	83	85	80
Rivas Dávila	Bailadores (1744 msnm)	52	45	75	85	38
	Las Playitas (2000 msnm)	65	65	70	85	35
	La M (2500 msnm)	0	0	0	0	0
	Páramo La Negra (3800 msnm)	0	0	0	0	0
Santos Marquina	San Rafael (1710 msnm)	-	-	50	50	65
	La Mucuy baja (2000 msnm)	-	-	40	45	45
	La Mucuy alta (2200 msnm)	13	15	70	75	60
Pueblo Llano	El Arbolito (2500 msnm)	20	20	25	30	35
	Las Agujas (2000 msnm)	25	25	22	30	30
	La Musuy (2000 msnm)	0	0	0	0	0
	La Culata (3100 msnm)	0	0	0	0	0
	Pueblo Llano (1710 msnm)	40	45	40	36	40
Campo Elías	Ejido (1167 msnm)	0	0	0	100	100
	Jají (2000 msnm)	0	0	0	45	50
Promedio general		22	21	25	39	37

En la Figura 1 se puede apreciar que la distribución de la marchitez bacteriana se ha incrementado en un 17%, desde 46% en el año 1992 cuando se inició el estudio, hasta 63% de infestación en el año 1996 cuando finalizó el mismo.

La diseminación de la bacteria parece estar directamente relacionada con la utilización de tubérculos-semilla de papa contaminada de varias generaciones y del traslado sin control de semilla

infectada de una localidad a otra; e incluso de áreas enfermas hasta áreas que se encontraban libre de la enfermedad, tal es el caso del movimiento de semilla desde El Valle y Santo Domingo hacia localidades del municipio Rangel, El Morro, La Carbonera y Capaz y viceversa. Esto, aunado a la capacidad que tiene *R. solanacearum* de sobrevivir en el suelo, incrementa día a día la distribución de la enfermedad.

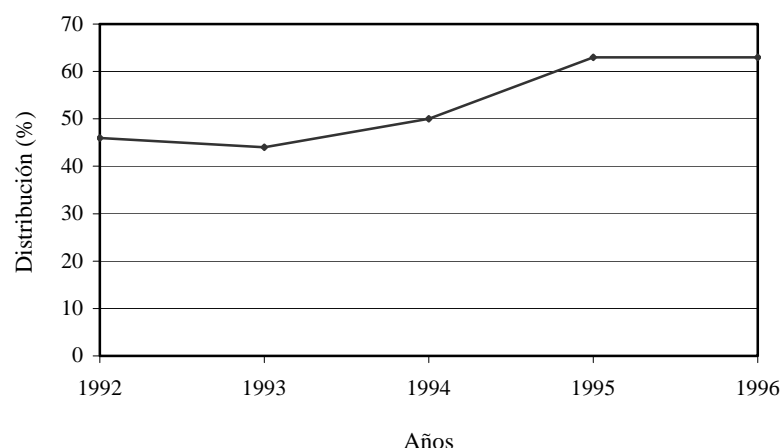


Figura 1. Distribución porcentual de la marchitez bacteriana de la papa en el estado Mérida durante el período 1992-1996.

En el Cuadro 1, se observa el incremento en cuanto a incidencia de la marchitez bacteriana en un 15 %, que va desde 22 % en el año 1992, hasta 37 % de infestación en el año 1996.

En el Cuadro 2 se muestra que los niveles de infestación de la enfermedad según sintomatología observada en campo, son variables, fluctuando entre 5% y 75%. Las localidades donde se encontró mayor infestación fueron Cacute, Las Piedras y Ejido con 75%; La Carbonera con 65%, La Trampa con 60%, El Valle y Capaz con 55% y El Efaciche con 45%. En localidades de Timotes, San Rafael de Tabay y Mucuchíes se encontraron niveles bajos de incidencia; con 10% para las dos primeras y 5% para esta última.

Los altos niveles de incidencia en las localidades mencionadas, según testimonios de los productores, coinciden con el uso de semilla de baja calidad fitosanitaria y proveniente de campos infestados. En este sentido la enfermedad no se desarrolló por focos en forma sectorizada (Hooker, 1980), sino que se presentó generalizada

en los campos. Los bajos niveles observados en San Rafael de Tabay y Timotes se explican por la aplicación de sistemas de rotación de cultivos con hortalizas como crucíferas y/o plantas ornamentales como crisantemos, claveles y estatis; lo cual ha contribuido en gran medida en la reducción de la concentración de inóculo de la bacteria en el suelo, luego de haber sido contaminado con la siembra de semilla infectada. Esto corrobora lo encontrado por Lloyd (1976), cuando logró erradicar la variante de la papa de *R. solanacearum* en mesetas de Dorrigo, del Norte de Nueva Gales del Sur, Australia, con una rotación de plantas de 2,5 años como mínimo. También Devaux et al. (1987) haciendo una rotación de papa con otros cinco cultivos producidos en Ruanda, lograron reducir significativamente la enfermedad. Experiencias similares se han encontrado en Colombia (Navarro y Granada, 1978), así como en Honduras, Burundi, Mindanao y Filipinas (French, 1994). En Venezuela, Alcalá et al.

(1995) reportaron que cuando se rota la papa con incidencia de la marchitez bacteriana en el estado cultivos hortícolas o cereales, disminuyó la Lara.

Cuadro 2. Porcentaje de infestación de *Ralstonia solanacearum* en diferentes localidades paperas del estado Mérida. 1992 - 1996.

Localidad	Intensidad de infestación	Superficie promedio de parcela (ha)	Superficie infestada promedio (ha)	Infestación %	Grado promedio de marchitez
El Valle	***	1,5	0,825	55	5
Monte Rey	**	0,6	0,15	25	4
Las Cuadras	**	0,25	6,25	25	5
La Culata	o	0	0	0	1
El Morro	**	2,0	5,8	29	5
La Trampa	***	1,0	0,6	60	5
Capaz	***	0,5	0,275	55	5
Carbonera	***	2	1,3	65	5
Cacute	***	0,25	0,19	75	5
Mucurubá	**	0,5	0,1	20	5
Mucuchíes	*	1	0,05	5	2
Mitirivó	o	1,0	0	0	1
La Toma	o	1,0	0	0	1
Llano El Hato	o	0,5	0	0	1
Gavidia	o	0,25	0	0	1
Apartaderos	o	0,5	0	0	1
Mucubají	o	10	0	0	1
La Venta	o	1,0	0	0	1
Chachopo	o	1,0	0	0	1
Timotes	*	1,0	0,1	10	4
Piñango	o	10	0	0	1
Santo Domingo	**	2,0	0,84	30	5
El Efafiche	***	2,0	0,90	45	5
Las Piedras	***	1,0	0,75	75	5
Bailadores	**	1,0	0,40	40	4
Las Playitas	**	1,0	0,30	30	4
La M	o	1,0	0	0	1
Páramo La Negra	o	0,5	0	0	1
S. Rafael de Tabay	*	1,0	0,1	10	4
Mucuy baja	**	0,25	0,063	25	5
Mucuy alta	**	2,0	0,6	30	5
El arbolito	**	0,25	0,063	25	5
Las Agujas	**	0,5	0,15	30	5
La Musuy	o	0,5	0	0	1
La Culata	o	0,5	0	0	1
Pueblo Llano	**	0,25	0,075	30	4
Ejido	***	0,25	0,19	75	5
Jají	**	0,5	0,145	29	4

*** Altamente Infestadas.

** Medianamente Infestadas.

* Poco Infestadas.

o No Infestadas.

Los bajos niveles de infestación observados en Mucuchés se explican por la altura de la zona y las bajas temperaturas, encontradas durante todo el año, de 11°C promedio (Ramos y Moreno, 1996), lo cual no le permite a la bacteria sobrevivir y desarrollarse hasta expresar los síntomas en el cultivo. Esto coincide con lo reportado por Martín y French (1985) donde explican que el desarrollo de la marchitez depende principalmente de la temperatura, necesitando temperaturas altas para su desarrollo, es decir cuando la temperatura diurna es superior a 20 °C y la del suelo está en un promedio de 14 °C, reduciéndose las poblaciones bacterianas en suelos fríos.

En relación a los resultados de las evaluaciones hechas en cuanto a severidad de la marchitez bacteriana en campo, se encontró con alta frecuencia puntajes entre 4 y 5; es decir la mayoría de las plantas enfermas en las plantaciones llegaban a la última fase de la enfermedad (más de dos terceras partes de la plantas marchitas); lo cual indica que la enfermedad es bastante severa en la gran mayoría de las zonas estudiadas, dado por el inadecuado manejo de la misma y a la susceptibilidad de las variedades sembradas en la zona (García et al., 1995).

Pruebas de patogenicidad.

Las plantas de papa mostraron los síntomas a los cinco días de ser inoculados con los aislamientos de *R. solanacearum*, iniciándose con una sola hoja marchita hasta llegar a los ocho días, donde se observó marchitez completa de todas las plántulas. La prueba del exudado resultó positiva, observándose un hilo continuo lechoso de células bacterianas a través del agua en el tubo.

Características culturales, morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de los aislamientos.

En el Cuadro 3 se muestran los resultados de estas pruebas. De las siembras realizadas se obtuvo 199 aislamientos puros, los cuales resultaron ser blanco cremoso con el centro rosado, semejantes a un helado, de bordes irregulares, haciéndose visible a partir de las 48 horas. Se desarrollaron completamente a las 72 horas, luego de haber sido sometidas a un choque

de temperatura, es decir de 30°C a 22°C (medio ambiente de laboratorio), ésto en el medio TZC.

En el medio YDC las colonias tuvieron un color blanco cremoso, convexas, de superficie lisa y borde irregular. En el medio B. King no produjeron pigmentos fluorescentes. Las bacterias son de forma abastionada, con un penacho de flagelos en sus extremos, no forman esporas ni cápsulas, son Gram-negativas, reducen nitratos, forman amoníaco, son aeróbicas y licúan la gelatina muy lentamente o no del todo. El desarrollo óptimo de los aislamientos se realizó a incubación de 30 °C; las mismas no crecen a 41°C. En las pruebas serológicas reaccionaron positivamente tomando una coloración violácea intensa.

Estas son características que identifican a la especie bacteriana *R. solanacearum* E. F. Smith, Hayward (1964); Kelman (1953, 1954).

Caracterización del Bv y/o raza.

En el Cuadro 3 se destaca el aislamiento de tres tipos de la bacteria: las primeras que utilizaron solamente como fuente de carbono la D (+) trehalosa y no tuvieron capacidad de utilizar la celobiosa, lactosa ni maltosa; ni tampoco oxidaron los alcoholes dulcitol, manitol ni sorbitol. Degradaron lentamente el pectato y presentaron patogenicidad moderada en la papa. Las reacciones demuestran que estos aislamientos pertenecen al Bv 1. Los segundos aislamientos, utilizaron como fuente de carbono la celobiosa, lactosa y maltosa; pero no D(-) ribosa, ni D(+) trehalosa. No oxidaron los alcoholes dulcitol, manitol ni sorbitol. Asimismo degradaron la pectona y mostraron alta patogenicidad en papa a 25°C. Las reacciones demuestran que los aislamientos señalados pertenecen al Bv 2A, específico de la papa. Los otros aislamientos utilizaron las cinco fuentes de carbono señaladas anteriormente, oxidaron los tres alcoholes y tuvieron capacidad de degradar la pectona, y fueron patogénicos en papa a 25 °C. Las reacciones demuestran que estos aislamientos son Bv 3.

Estos resultados coinciden con los presentados por autores como Buddenhagen y Kelman (1964), French et al. (1993), Hayward (1964) y Hayward et al. (1991).

Cuadro 3. Resultados de las pruebas para la caracterización de los tres tipos de aislamientos de *R. solanacearum* provenientes de zonas paperas del estado Mérida.

Pruebas	Biovares		
	I	II	III
Características culturales:			
- Borde	Irregular	Irregular	Irregular
- Elevación	Conexa	Conexa	Conexa
- Color	Blanca cremosa	Blanca cremosa	Blanca cremosa
- Superficie	Lisa	Lisa	Lisa
Características morfológicas:			
- Forma	Bacilar	Bacilar	Bacilar
- Presencia de Flagelo	1 ó > Polar	1 ó > Polar	1 ó > Polar
- Producción de hilo KOH al 3%	+	+	+
Características fisiológicas:			
- Desarrollo de colonias características en el medio TZC (Kelman)	+	+	+
	Cremosa centro rosado	Cremosa centro rosado	Cremosa centro rosado
- Desarrollo de colonias amarillas en YDC	-	-	-
- Fluorescencia en B.de King	-	-	-
- Crecimiento en CVP	±	±	±
- Nitrato Reductosa	+	+	+
- NH ₄	+	+	+
- Oxidasa	+	+	+
- Arginina dihidrolasa	+	+	+
- Crecimiento medio anaeróbico	-	-	-
- Gelatinasa	±	±	±
- Crecimiento 30°C	+	+	+
- Crecimiento a 41°C	-	-	-
Uso para su crecimiento de:			
- Celobiosa	-	+	+
- Lactosa	-	+	+
- Maltosa	-	+	+
- D (-) ribosa	-	-	+
- D (+) trehalosa	+	-	+
- Dulcitol	-	-	+
- Manitol	-	-	+
- Sorbitol	-	-	+
- Degradación de Pectato	±	+	±
- Patogenicidad a Papa (25°C)	±	+	+
- Reacción serológica en NCM-Elisa	+	+	+

+ = Reacción positiva

- = Reacción negativa

± = Reacción variable entre diferentes aislamientos

En el Cuadro 4 se observa que el Bv II es el de mayor frecuencia, con un 82% del total analizado y está presente en todas las zonas paperas de importancia. También se encontró el Bv III con un 12% y el Bv I con 6%. La presencia de estos Bvs coincide con zonas donde además de papa se cultivan otras solanáceas como tomate, pimentón y ají, en los alrededores de las fincas paperas o en rotación con ésta. Un ejemplo claro se muestra en

las localidades de Timotes donde están presentes los biotipos mencionados en frecuencias de 10, 10 y 14 para los biotipos I, II, III, respectivamente. El Bv IV no se encontró en los análisis realizados. La aparición con mayor frecuencia del variante II se explica claramente por ser éste específico de la papa, el cual es el rubro de mayor importancia sembrado en el estado.

Cuadro 4. Frecuencia de Biovares de *R. solanacearum* presentes en zonas paperas del estado Mérida. 1996.

Localidad	No. de Muestras	Tipo de muestra	Biovares			
			I	II	III	IV
El Valle	22	Suelo-Tallo-Tub	0	22	2	0
Monte Rey	2	Tub	0	2	0	0
Las Cuadras	3	Suelo-Tub	0	3	0	0
El Morro	2	Tub	0	2	0	0
La Trampa	3	Suelo-Tub	0	3	0	0
Capaz	15	Tub-Tallo	0	13	2	0
Carbonera	3	Tub-Suelo	0	3	0	0
Cacute	2	Tub	0	2	0	0
Mucurubá	1	Tub-semilla	0	1	0	0
Mucuchfes	13	Tub-semilla	0	13	0	0
Pico El Aguila	4	Tub-semilla		4		
Chachopo	21	Suelo-tub-semilla		21		
Timotes	14		10	10	14	
Sto. Domingo	21	Suelo-tallo	0	21	0	0
El Efafiche	3	Suelo-Tub	0	3	0	0
Las Piedras	2	Suelo-tub	0	2	0	0
Bailadores	3	Tallo-suelo	0	0	3	0
Las Playitas	2	Suelo-Tub	0	2	0	0
S. Rafael de Tabay	2	Tub	01	1	0	0
Mucuy baja	1	Tallo	01	0	0	0
Mucuy alta	2	Tallo-tub	0	2	0	0
El arbolito	3	Suelo-tub-tallo	0	3	0	0
Las Agujas	2	Suelo-tallo	0	2	0	0
Pueblo Llano	16	Tallo-Tubb	0	16	0	0
Ejido	12	Suelo-tallo (tomate)	0	12	0	0
Jají	3	Tallo-Suelo (tomate)	0	0	3	0
TOTAL	199		12	163	24	0
Porcentaje			6	82	12	0

Tub= Tubérculo

Lo anterior corrobora que la alta incidencia y distribución de la enfermedad se debe al uso de semilla infectada, siendo ésta la fuente principal de inóculo de la enfermedad. Es importante señalar que debido a la exposición de la papa en las tierras subtropicales y tropicales más cálidas, se han presentado casos de marchitez en tierras bajas causada por la raza 1 (Bvs I, III y IV) y por las variantes del Bv 2-T, sin designación de raza (French et al., 1993).

Los resultados anteriores señalan que la marchitez bacteriana de la papa, causada por *R. solanacearum*, se encuentra ampliamente distribuida en localidades productoras de importancia en el estado Mérida ubicados en altitudes de 1167 msnm hasta 3000 mnm.

Debido a la capacidad que tiene la bacteria de variar y sobrevivir en forma latente en los tubérculos, se debe evitar la introducción de

tubérculos-semilla infectados en las localidades libres de ésta como: La Culata, El Valle municipio Libertador); La Toma, Mitirivó, Llano El Hato, Gavidia, Apartaderos y Mucubají (municipio Rangel); La Venta, Chachopo y Piñango (municipio Miranda); La M y El Páramo Negra (municipio Rivas Dávila) y La Musuy y La Culata (municipio Pueblo Llano). Estas son zonas de gran importancia que pueden garantizar la producción de semilla libre de la enfermedad.

LITERATURA CITADA

1. Alcalá, D., D. Narváez y A. Pire. 1995. Desarrollo de la marchitez bacteriana de la papa (*Pseudomonas solanacearum*) bajo diferente manejo del cultivo en el estado

- Lara. Revista Forestal Venezolana 1:153-154 (Abstract).
2. Buddenhagen, I. W y A. Kelman. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 2:203-230.
 3. Buddenhagen, I. W., L. Sequeira, y A. Kelman. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 52-726 (Abstract).
 4. Devaux, A., D. Michelante y M. Bicamumpaka. 1987. Combination of rotation and resistance to control bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) in Rwanda. European Association Potato Research. X Triennial Conference Abstracts. pp. 100-101.
 5. French, E.R. 1982. Evaluación de campo para clones del Centro Internacional de la Papa (CIP) mejorados por resistencia a marchitez bacteriana. Serie de Evaluación Tecnológica No. 2. CIP. Lima, Perú. pp. 1-9.
 6. French. E. R.1994. Control integrado de la marchitez bacteriana de la papa. Circular del Centro Internacional de la Papa (CIP) 20 (2): 8 - 11
 7. French, E. R., P. Aley., R. Torres y U. Nydegger. 1993. Diversity of *Pseudomonas solanacearum* in Perú and Brazil. In: Harmant, G. L. y A. C. Hayward (eds.). Bacterial Wilt. Australian Center for International Agricultural Reserch (ACIAR). Proceedings No. 45. Canberra, Australia. pp. 70-77.
 8. French E., L. Gutarra y P. Aley. 1995. Medios de cultivo para el aislamiento, mantenimiento e identificación de *Pseudomonas solanacearum*. Centro Internacional de la Papa (CIP). Memorias del Taller Internacional sobre Control de Marchitez Bacteriana de la Papa para Centroamérica y El Caribe. Lima, Perú. 4p.
 9. García, R., B. Paz y L. Díaz. 1993. Estudio de la marchitez bacteriana causada por *Pseudomonas solanacearum*. Fitopatología Venezolana 6(2):23.
 10. García, R. 1995. Incidencia y distribución de la marchitez bacteriana causada por *Pseudomonas solanacearum* en las principales zonas paperas del estado Mérida. Venezuela. Resúmenes de XVII Reunión de Asociación Latinoamericana de la Papa (ALAP) Mérida, Venezuela. p. 74.
 11. García R., R. León y L. Meneses. 1995. Selección de clones de papa por resistencia a candelilla tardía y marchitez bacteriana. Fonaiap Divulga 8:38-40.
 12. Gutarra L. y Gamboa S. 1995. Detección Serológica de *P. Solanacearum* por NCM-Elisa. Centro Internacional de la Papa (CIP). Memorias del Taller Internacional sobre Control de Marchitez Bacteriana de la Papa para Centroamérica y El Caribe. Lima, Perú. 5p.
 13. Hayward, A. C. 1964. Characteristic of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 27: 265-277.
 14. Hayward, A. C. 1994. Systematics and phytoogy of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: Hayward, A. C. y G. L. Hartman (eds.) Bacterial Wilt. The Disease and its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB International. Wallingford, U.K. pp. 23-125.
 15. Hayward, A. C., L. Sequeira, E. R. French, H. El Nashaar y U. Nydegger. 1991. Tropical variant of Biovar 2 of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 82: 608 (Abstract.)
 16. He, L. Y., L. Sequeira y A. Kelman. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. Plant Disease 67: 1357-1361.
 17. Hooker, W. J. 1980. Compendio de enfermedades de la papa. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. pp. 37-42.
 18. Horton, D. 1987. Underground crops: Long-term trends in production of root and tubers. Winrock Internacional. Morriton, AR. 10 p.

19. Hugh, R. y Leifson E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. *Journal Bacterial* 66: 24-26.
20. Kelman, A. 1953. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin 99. 194p.
21. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44: 693-695.
22. Lloyd, A. B. 1976. Bacterial wilt in a cold-temperature climate of Australia. Planning Conference and Workshop on the Ecology and Control of Bacterial Wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. North Carolina State University, Raleigh. pp. 134-135.
23. Martin, C. y E. French. 1985. Bacterial wilt of potato: *Pseudomonas solanacearum*. Technical Information Bulletin 13. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. 16 p.
24. Ministerio de Agricultura y Cría (MAC). 1996. Anuario Estadístico Agropecuario. Dirección General Sectorial de Planificación y Políticas. Caracas, Venezuela. 48 p.
25. Navarro, R. y G. A. Granada. 1978. Problemas de marchitez bacterial en el departamento de Antioquia Colombia. Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Asociadas (ASCOLFI) Informa 4 (2): 7-8.
26. Ortega, C. E. 1989. Producción de semilla de papa en Venezuela. Curso sobre Producción de Papa. Estado Lara. Programa Andino Cooperativo de Investigación en Papa (PRACIPA). Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Barquisimeto. Venezuela. 43 p.
27. Ramos, G. y J. Moreno. 1996. Boletín Agroclimático Anual. Estación Experimental de Mucuchíes. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Barquisimeto. Venezuela Mucuchíes, Mérida. Venezuela pp. 2-6.
28. Schaad, N. W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2^o Edition. APS Press. St. Paul, Minnesota. 81 p.