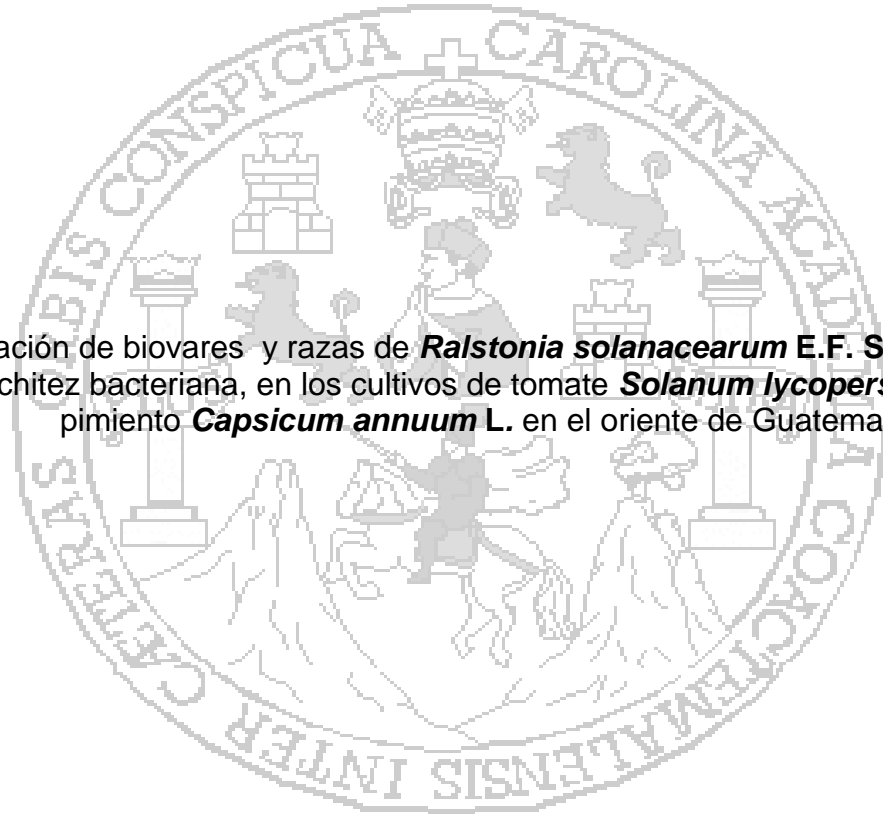


Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Agronomía
Instituto de Investigaciones Agronómicas
-IIA-

Determinación de biovars y razas de *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, asociados a la marchitez bacteriana, en los cultivos de tomate *Solanum lycopersicon* L. y chile pimiento *Capsicum annuum* L. en el oriente de Guatemala.



Deyssi Jeannette Rodríguez Martínez

Guatemala, octubre de 2007.

Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Agronomía
Instituto de Investigaciones Agronómicas
-IIA-

Determinación de biovares y razas de *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, asociados a la marchitez bacteriana, en los cultivos de tomate *Solanum lycopersicon* L. y chile pimiento *Capsicum annuum* L. en el oriente de Guatemala.

TESIS
PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
AGRONOMIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR
DEYSSI JEANNETTE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

En el acto de investidura como

INGENIERA AGRÓNOMA

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

EN EL GRADO ACADÉMICO DE

LICENCIADA

Guatemala, octubre de 2007.

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

RECTOR

Lic. Carlos Estuardo Gálvez Barrios

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	Ing. Agr. Francisco Javier Vásquez Vásquez
VOCAL PRIMERO	Ing. Agr. Waldemar Núfio Reyes
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr. Walter Arnoldo Reyes Sanabria
VOCAL TERCERO	Ing. Agr. Danilo Ernesto Dardón Ávila
VOCAL CUARTO	P. For. Mirna Regina Valiente
VOCAL QUINTO	P. Agr. Nery Boanerges Guzman
SECRETARIO	Ing. Agr. Edwin Enrique Cano Morales

Guatemala, octubre de 2007.

Guatemala, octubre de 2007.

**Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala**

Honorables miembros:

De conformidad con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de tesis titulado: **Determinación de biovares y razas de *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, asociados a la marchitez bacteriana, en los cultivos de tomate *Solanum lycopersicon* L. y chile pimiento *Capsicum annuum* L. en el oriente de Guatemala.**, como requisito previo a optar al título de Ingeniera Agrónoma en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciada.

Esperando que el mismo llene los requisitos necesarios para su aprobación, me es grato suscribirme,

Atentamente,

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

Deyssi Jeannette Rodríguez Martínez

Dedicatorias

A:

Dios:

Por darme la vida por medio de mis padres, por ser la fuente de luz divina en todo momento, Señor, mi corazón está dispuesto, para cantar y alabar tu nombre, en mis días de angustia y en mis días de gloria, afirma mi proceder eternamente y para siempre, en hechos de verdad y rectitud, para recordar que el principio de la sabiduría es el temor a mi creador, mi Dios todo terreno.

Mis padres:

Edgar Rubén Rodríguez Ramírez y Elvira Martínez Lemuz de Rodríguez, por ser mis benefactores de vida, por enseñarme que la mejor herencia que un padre puede dejar a un hijo, es su formación. “Por que el que ama la instrucción ama la sabiduría”, por ser mi ejemplo de “Hombre Virtuoso” y “Mujer Virtuosa, gracias infinitamente gracias, los amo.

Mis “Papitos

Maternos”

Q.E.P.D.

Maximiliano Martínez Morataya y Ana Mercedes Lemuz Ruiz de Martínez, por cuidarme, educarme en los primeros años de vida, por ser el rostro en mis amaneceres, por ser la luz en mis ojos y los ángeles que cuidan mi camino, que mi triunfo sea la pequeña semilla que retribuya tanta bondad. ¡Tú diste alegría a mi corazón, más que la de ellos en el tiempo que se multiplicó su grano!

Mi tía y nana

Blanca Dina Martínez Lemuz, mi yaya, gracias te doy por haberme tomado como tu hija, y cuidarme como el tesoro que Dios te quitó y te devolvió, hoy puedo decirte que la vida me da la oportunidad de darte la alegría de honrarte con mi éxito. Te amo.

Mis hermanas:

Ligia Mercedes Rodríguez Martínez de Catalán, Cinthia Carola Rodríguez Martínez, que bendición más grande compartir la vida con ustedes, gracias por ser mis pilares, mis estandartes, recordemos siempre que el hijo sabio alegra al padre, está atento a su sabiduría y a su inteligencia inclinemos nuestros oídos, para que guardemos consejo y nuestros labios conserven la ciencia. Las amo.

Mi novio:

Víctor Gonzalo Humberto López Guerrero. Eres la llama de amor que nace en mi corazón, y que nadie la puede apagar, doy gracias a Dios, por darme un hombre sencillo y virtuoso, que ha sobrevivido a inundaciones, sequías y tormentas, eres el camino de amor en mi vida. Que alegría poder compartir contigo este momento de metas cumplidas. Te amo.

- Mis sobrinos:** **Mercy Sofía y José Eduardo Catalán Rodríguez**, son la sonrisa en mis labios, y la ternura en mis ojos. Que Dios bendiga sus vidas y sean hijos que honren a su padre y madre. Los amo.
- Mi cuñado:** **José Ricardo Catalán Rodas**, gracias, que Dios le bendiga y construya su casa en roca firme.
- Mis “Abuelos Paternos”:** **Rubén Rodríguez y Olimpia Ramírez de Rodríguez**, gracias por dar vida al padre que Dios me dio, por formarlo como hombre temeroso de Dios, hombre de bien, hombre virtuoso. Los quiero.
- Toda mi familia** Especialmente a mis primos **Uriel y Denisse**. “Sigue a los pies del Señor y en su presencia encontrarás las respuestas, para que todo salga bien”. Que Dios les bendiga y multiplique todas sus bondades. Que la felicidad de momentos como este nos permita soñar y nos fortalezca en cada nueva meta que emprendamos; el éxito está en nuestras manos y sobre todo en las de Dios. Los quiero.
- Familia Marroquín Mendieta** “Pacientemente esperé en Dios y Él se inclinó a mí y escuchó mi clamor. Y me sacó del pozo de la desesperación, del lodo cenagoso; y puso mis pies sobre roca y enderezó mis pasos”. Gracias por mostrarme el camino de la luz.
- Mis amigos:** Teresa Guerra, Brenda García, Mónica Aldana, Nadia Ramírez, Alba Solares, Elizabeth Pérez, Londy Mejía, Melisa Rivas, Jenny Moscoso, Yuliza Díaz, Clara Díaz, Carmen Portillo, Alejandra Rodriguez, Jorge Arteaga, Byron Sagastume, David Mendieta, Jorge Mario Vargas, Luís Montes, Byron Fuentes, Vinicio García, Elmer Ovando, Víctor Véliz, Kelder Ortiz, Carrillo, Pedro Chacón, Francisco Aguilar, Mario Gómez, Enrique Bolaños, Gilberto Quijada, Milton Solís, Marco Tulio Díaz. Gracias por compartir risas y sonrisas en los momentos de alegría, abrazos y consuelo en momentos dolorosos, compañía y presencia en los momentos de dificultad, besos y felicitaciones en los momentos de éxito. Los quiero mucho.
- In memorian:** **Julio Cesar Kroker Vásquez, (Q.E.P.D)**. Dios me dio de regalo un ángel, un ángel hecho para mí. Déjame tus recuerdos junto al corazón, que el brillo de tus ojos, me ilumine el camino hasta la eternidad y que la sutileza de tus manos trace el nuevo camino de amor que Dios me dio. **Michael Baldwin (Q.E.P.D)**, por el amor sincero demostrado a la familia.

Agradecimientos

A:

**Liceo La Salle
Chiquimula**

Por ser el ente de formación moral, espiritual y científica para enfrentar nuevos retos y alcanzarlos. ¡Viva Jesús en nuestros corazones por siempre!

**Facultad de
Agronomía y
Cuerpo Docente**

Por brindarme los conocimientos científicos, que me formaron como profesional de las ciencias agrícolas. "***Id y enseñad a todos***"

Mis asesores:

Ph. D. Edín Orozco Miranda, Que dios le bendiga e ilumine, por sus conocimientos, le permita cosechar abundantes frutos de su buen trabajo.

MS c. Amilcar Sánchez, por ser la persona que me enseñó no solo conocimientos científicos, sino disciplina, responsabilidad, eficiencia, perseverancia, ética y profesionalismo. Mi escudo está en Dios, que salva a los rectos de corazón.

**Profesor Emeritus
Departamento de
Patología de Plantas
U. Wisconsin**

Douglas P. Maxwell. Gracias por su apoyo y valiosa recomendación.

**Mi compañero de
Línea de Investigación
Proyecto *Ralstonia***

0-41/2004 AGROCYT: Luís Fernando Izaguirre De León, por su apoyo y compañerismo en el desarrollo simultáneo de esta investigación, y que siempre coseche el fruto de su trabajo, capacidad, dedicación, ética y profesionalismo.

**Supervisor
y asesor de
EPS**

Ing. Agr. Fernando Rodríguez Bracamonte, un honor haber tenido la oportunidad de su guía durante la carrera y en el Ejercicio Profesional Supervisado, por brindarme calidad de enseñanza, por forjar en mí valores de sencillez y llevarlos a la práctica.

**FAO-PESA
Jocotán
2006**

Ente financiante, que me permitió desarrollar mis conocimiento en pro del desarrollo rural.

**Personal Lab.
Fitopatógenos
Cultivo de Tejidos
y Biotecnología**

Por su apoyo incondicional y los conocimientos compartidos. Y a todas las personas que directa e indirectamente brindaron sus aportes al desarrollo de esta investigación, doy gracias a Dios, por su amistad y colaboración.

Contenido general

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	v
RESUMEN.....	vi
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
3 MARCO TEÓRICO.....	5
3.1 Marco conceptual	5
3.1.1 Marchitez bacteriana en solanáceas	5
3.1.1.1 Descripción general de los cultivos de interés.....	5
3.1.1.2 Datos históricos de la enfermedad	8
3.1.1.3 Descripción de la enfermedad y síntomas.....	9
3.1.1.4 Características de la bacteria (patógeno)	10
3.1.1.5 Ambiente favorable para <i>Ralstonia solanacearum</i> E.F. Smith.....	12
3.1.1.6 Ciclo de la marchitez bacteriana	13
3.2 Patógeno y clasificación taxonómica.....	15
3.2.1 Taxonomía	15
3.2.2 Clasificación infraespecífica	16
3.2.3 Interrelación raza-biovar	18
3.2.4 Variabilidad de plantas hospederas.....	18
3.3 Caracterización de la bacteria	19
3.3.1 Importancia de la caracterización	19
3.4 Diagnóstico de campo	20
3.4.1 Fase de campo	20
3.4.2 Prueba del flujo bacteriano	20
3.5 Caracterización a nivel de laboratorio.....	23
3.5.1 Aislamiento de <i>Ralstonia solanacearum</i> E.F. Smith	23
3.5.1.1 Tinción de bacterias	24
3.5.1.2 Cultivo de bacterias.....	25
3.6 Caracterización molecular	25
3.6.1 Reacción en cadena de polimerasa (PCR)	25
3.6.1.1 Conceptualización de la técnica.....	27
3.7 Distribución y diversidad a nivel mundial de <i>R. solanacearum</i> E.F. Smith.....	29
3.8 Marchitez bacteriana en Guatemala, e investigaciones	33
4 MARCO REFERENCIAL	36
4.1 Área de estudio y colecta de material vegetal.....	36
4.1.1 Ubicación geográfica	36
4.1.2 Aspectos biofísicos	37

4.1.2.1	Condiciones climáticas.....	37
4.1.3	Consideraciones generales sobre el uso de la tierra (producción agrícola)	38
4.1.3.1	Producción de tomate y chile pimiento	39
5	OBJETIVOS	43
6	METODOLOGÍA	44
6.1	Selección de cultivos	44
6.2	Selección del área	44
6.2.1	Fase de campo	44
6.2.1.1	Colecta de material enfermo	44
6.2.2	Prueba de flujo bacteriano.....	45
6.3	Fase laboratorio.....	45
6.3.1	Aislamiento del patógeno	45
6.4	Pruebas de identificación rápida de <i>Ralstonia solanacearum</i> E.F. Smith.....	46
6.5	Siembra en medio de cultivo (CGP+Cloro Trifenil, TZC).....	46
6.6	Preservación de la bacteria	46
6.7	Determinación de la presencia de <i>Ralstonia solanacearum</i> E.F. Smith utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	47
6.8	Determinación de biovares de los aislamientos obtenidos de <i>Ralstonia solanacearum</i> E.F. Smith.....	49
6.9	Determinación e identificación de Raza 3 de <i>Ralstonia solanacearum</i> E.F. Smith utilizando la reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	50
6.10	Distribución geográfica de los biovares caracterizados	50
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
7.1	Fase de campo.....	51
7.1.1	Área muestreada y colecta de material vegetal	51
7.2	Fase laboratorio.....	53
7.2.1	Aislamiento del patógeno	53
7.3	Caracterización fenotípica.....	55
7.3.1	Caracterización morfológica	55
7.3.1.1	Siembra en medio de cultivo de Tetrazolio (CGP+Cloro Trifenil, TZC).....	55
7.4	Preservación de la bacteria	58
7.5	Determinación de la presencia de <i>Ralstonia solanacearum</i> utilizando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	58
7.6	Determinación de biovares de los aislamientos obtenidos e identificados de <i>Ralstonia solanacearum</i> E.F. Smith.....	60

7.7	Determinación e identificación de Raza 3 de <i>Ralstonia solanacearum</i> utilizando la reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	63
7.8	Digitalización de la distribución geográfica de los biovares caracterizados.....	64
7.8.1	Mapa de distribución geográfica en áreas de colecta de <i>Ralstonia solanacearum</i>	64
7.8.2	Mapa de distribución Biovar 3, Raza 1 de <i>R. solanacearum</i> E.F. Smith	65
8	CONCLUSIONES.....	66
9	RECOMENDACIONES	67
10	BIBLIOGRAFÍA.....	68

Índice de figuras

Figura 1. Comparación y clasificación de <i>Solanum sect. Lycopersicon</i> . Los números en paréntesis representan los rangos infraespecíficos entre subespecies, variedades y morfología. Las líneas enlazan los sinónimos en la clasificación taxonómica (Peralta y Spooner, 2005).	5
Figura 2. Distribución de <i>R. solanacearum</i> E. F. Smith , en los vasos del conducto xilémico; en donde P: Vaso de tejido primario, S: Vaso de tejido secundario. (Watanebe, 2006).	9
Figura 3. <i>Ralstonia solanacearum</i> E. F. Smith , extraída del sistema vascular de una planta. (Watanebe, 2006.).....	10
Figura 4. Ciclo de la marchitez bacteriana, ocasionada por <i>Ralstonia solanacearum</i> E.F. Smith según, Ministerio de Agricultura, Servicio Nacional de Sanidad Agraria, Republica del Perú (16).....	14
Figura 5. Síntomas de marchitez y flujo bacteriano de <i>Ralstonia solanacearum</i> E. F. Smith . (Watanebe, 2006.).....	21
Figura 6. Síntomas de marchitez por <i>Fusarium oxysporum</i> F.sp <i>lycopersici</i> . (Watanebe, 2006).....	22
Figura 7. Síntomas: (a) Marchitez provocada por <i>Verticillium dahliae</i> ; Daños: (b) ocasionados por nemátodos. (Watanebe, 2006)	22
Figura 8. Mapa de distribución cuarentenaria de <i>Ralstonia solanacearum</i> E.F. Smith , Raza 1, para Europa (USDA, 2006).	31
Figura 9. Mapa de distribución cuarentenaria de <i>Ralstonia solanacearum</i> E.F. Smith , Raza 3, para Europa (USDA, 2006).	32
Figura 10-11. Placa con colonias puras de 48 horas de <i>Ralstonia solanacearum</i> : (a) medio 5-2-3 incubación y (b) medio CGP+TZC resultados del proceso de caracterización morfológica y purificación.....	56
Figura 12-13. Colección de cepas aisladas (Ceparío).....	58
Figura 14. Producto amplificado mediante PCR utilizando los cebadores específicos 559 y 560 en la región 16S ARNr de <i>Ralstonia solanacearum</i> E.F. Smith , de 280-281 pb.....	59
Figura 15-16. Preparación y servido del medio basal de carbohidratos para la determinación bioquímica de <i>Ralstonia solanacearum</i> E. F. Smith ; 2006.	60
Figura 17-18. Tubos de ensayo con medio basal de Carbohidratos con una reacción negativa (verde) y reacción positiva (amarillo).....	60
Figura 19-20. Tratamientos positivos a la producción de ácido a partir de disacáridos (azúcares), correspondiente al biovar 3.....	61
Figura 21-22. Tratamientos positivos a la oxidación de alcoholes hexosa, correspondiente al.....	61
Figura 23-24. Producto amplificado mediante PCR utilizando los cebadores específicos 630 y 631 en la identificación de raza 3, de <i>R. solanacearum</i> E.F. Smith (Resultado negativo).....	63

- Figura 25. Mapa de muestreo dirigido (French, 1980) de la marchitez bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, en el oriente de Guatemala.....64
- Figura 26. Mapa de la distribución geográfica del Biovar 3 Raza 1, en parcelas de cultivo de tomate *Solanum lycopersicon* L. y chile pimiento *Capsicum annuum* L. de *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, en el oriente de Guatemala.65

Índice de cuadros

Cuadro 1. Características fisiológicas más importantes de <i>Ralstonia solanacearum</i> E.F. Smith, según (Goszczyńska <i>et al</i> ; 2000) (18).....	12
Cuadro 2. Criterio de biovares de <i>R. solanacearum</i> E.F. Smith de acuerdo a la producción de ácido a partir de azúcares y alcoholes, según Hayward (1954) (Orozco, 2004).....	17
Cuadro 3. Resumen de los resultados obtenidos de las pruebas de PCR, caracterización de biovar y caracterización filogenético de las diferentes muestras colectadas en Guatemala. (Sánchez 2006).....	34
Cuadro 4. Lista de localidades tomadas con GPS (Maguellan) con registro de presencia de bacteria <i>Ralstonia solanacearum</i> E.F. Smith para determinar biovares.	51
Cuadro 5. Procesamiento de muestras positivas previo purificación de los aislamientos y asignación de código para identificación de cepas.	53
Cuadro 6. Nomenclatura para preservación, análisis bioquímico y diagnóstico molecular (PCR).	57

Determinación de biovares y razas de *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, asociados a la marchitez bacteriana, en los cultivos de tomate *Solanum lycopersicon* L. y chile pimiento *Capsicum annuum* L. en el oriente de Guatemala.

Determination of biovars and races of *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith associated with bacterial wilt disease in *Solanum lycopersicon* L. and *Capsicum annuum* L. in the west of Guatemala.

RESUMEN

La marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, es una de las principales limitantes en la producción de solanáceas, especialmente papa y tomate a nivel mundial (Hartman, 1991). En la producción agrícola nacional, esta enfermedad causada por dicho patógeno ha sido el principal problema fitosanitario, en la producción de tomate *Solanum lycopersicon* L. y chile pimiento *Capsicum annuum* L., en la zona oriental del país.

Según los agricultores que se dedican a la producción de estos cultivos, el desarrollo de marchitez bacteriana se reportó en la aldea, El Amatillo, perteneciente al municipio de Ipala, departamento de Chiquimula y posteriormente en la Aldea El Tempisque, municipio de Agua Blanca, Jutiapa, entre 1996-1997 (López, 2004).

Tomando como referencia, la existencia de dicho patosistema, se realizó esta investigación con el objeto de determinar el biovar, raza de la bacteria (patógeno), asociados a la enfermedad y su distribución geográfica.

El estudio consistió en inspecciones en los campos de cultivo de tomate y chile pimiento de la región oriental de Guatemala, utilizando el método de muestreo dirigido de **French, (1980)**, basado en el fundamento fitopatológico, en donde toda área de cultivo de tomate y chile pimiento con síntomas de la enfermedad fue incluida y muestreada. La caracterización de la bacteria se fundamentó en dos métodos de análisis: método bioquímico y molecular.

Se realizaron pruebas rápidas de campo (flujo bacteriano); posteriormente a nivel de laboratorio se procedió nuevamente a la extracción de flujo bacteriano, para la siembra de la bacteria, en cajas de petrí mediante estriados para la obtención de colonias en medio nutritivo: **5-2-3 Kado & Heskett (1970)**.

Para el manejo y preparación de los aislamientos o cepas, se les designó una nomenclatura y consecuente efectuar pruebas rápidas de identificación de la bacteria, tales como: prueba de **ELISA**, prueba de **KOH**, tinción de **Gram** y análisis de **caracteres morfológicos**. Seguidamente se procedió a la purificación y replicación de los aislamientos en medio de **CGP+Clorotrifetil (TZC)**, obteniéndose cepas puras para la caracterización y presencia de ***R. solanacearum* E.F. Smith**. Iniciándose el proceso de caracterización, a través de la **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**, con los cebadores **759** y **760** desarrollados por **Opina, (1997)** que amplifica un fragmento de **280 pb**. Posteriormente se identificó el biovar de la bacteria, con el **Método Bioquímico**, según **Hayward (1954)**, basado en la capacidad para producir ácido a partir de tres disacáridos (maltosa, lactosa y celobiosa), y la oxidación de tres alcoholes hexosa (manitol, dulcitol y sorbitol). Los resultados obtenidos fueron positivos para la utilización de los tres disacáridos y la reducción de los alcoholes, ubicándose en el **Biovar 3**.

Se realizó un **PCR** con los cebadores específicos **630** y **631** desarrollados por **Weller, (2000)** para identificar **Raza 3**, el cual fue negativo (sin amplificación de bandas) para todas las muestras. Se determinó la presencia de **Raza 1**, debido a la especialización patológica de la bacteria en atacar a determinada especie de planta de tomate y chile pimiento.

Señalando a los departamentos de El Progreso (municipio de Sanarate), Jutiapa (municipios de Agua Blanca y El Progreso), Chiquimula (municipios de Ipala, Jocotán y Camotán) como los más afectados. Para lo cual se recomienda, institucionalizar y crear una base de datos geográficos en un sistema nacional de monitoreo y cuarentena, vincular institucionalmente a los productores de áreas infestadas a laboratorios fitopatológicos y biotecnología, además de establecer convenios y programas con instituciones afines al desarrollo de alternativas tecnológicas, como el fitomejoramiento.

1 Introducción

La marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, es una de las principales limitantes en la producción de solanáceas, especialmente papa y tomate a nivel mundial (Hartman, 1991). La enfermedad se presenta como marchitez repentina y flácida de las plantas, observándose necrosamiento en yemas, desintegración de los haces vasculares y frecuentemente el tallo se aprecia hueco. Los frutos no llegan a desarrollarse o cuando están maduros se desprenden del pedúnculo con facilidad. La raíz se ve sana. Las siembras usualmente muestran color castaño a marrón cuando se observan desde una distancia mayor de 50 m (Delgado; García, García, 1999). Además, es importante considerar que este microorganismo sobrevive en asociación a la rizosfera de algunas plantas hospederas y algunas malezas, con o sin presencia de síntomas (Orozco, 1997).

En la producción agrícola nacional, especialmente en la zona oriente del país productora de tomate y chile pimiento, en los últimos años ha presentado esta problemática, según los agricultores que se dedican a la producción de estos cultivos, el desarrollo de marchitez bacteriana se reporta en la aldea El Amatillo, perteneciente al municipio de Ipala, departamento de Chiquimula y posteriormente en la Aldea El Tempisque, municipio de Agua Blanca, Jutiapa, entre 1996-1997 (López, 2004).

Tomando como referencia, la existencia de esta limitante en la producción de tomate y chile pimiento, se realizó esta investigación con el objeto de conocer el biovar, raza del patógeno, asociados a la enfermedad y su distribución geográfica, con el fin de contribuir y establecer las bases de un futuro programa para el manejo fitosanitario y medidas cuarentenarias.

El estudio consistió en inspecciones en los campos de cultivo de tomate y chile pimiento de la región oriental de Guatemala. Se colectaron plantas con síntomas de marchitez bacteriana durante el período vegetativo. Se realizaron pruebas rápidas de campo (flujo bacteriano); posteriormente a nivel de laboratorio se llevó a cabo el aislamiento de la bacteria, obteniéndose cepas puras para su caracterización. La caracterización de la bacteria se fundamentó en métodos de análisis: el método bioquímico y el método molecular.

Se inició el proceso de caracterización, con el método molecular de la **Reacción en Cadena de la Polimerasa** (PCR) para la determinación de la presencia de ***Ralstonia solanacearum***, posteriormente se identificó el biovar de la bacteria, con el método bioquímico, basado en la capacidad para producir ácido a partir de tres disacáridos (maltosa, lactosa y celobiosa), y la oxidación de tres alcoholes hexosa (manitol, dulcitol y sorbitol).

Posteriormente se recurrió nuevamente con los procesos moleculares de PCR, específicos para la identificación de la presencia de la **Raza 3**, de dicha bacteria. Los resultados para dicha prueba fueron negativos para los aislamientos estudiados. Se concluyó de este modo la determinación de la presencia del **Biovar 3, Raza 1** para los aislamientos colectados en el estudio de acuerdo a la asociación bacteria-especie botánica.

2 Planteamiento del problema

En Guatemala en los años de 1950, la United Fruit Company reportó el apareamiento de la enfermedad conocida como “Moko”, la cual tuvo efectos devastadores en plantaciones de banano en la costa norte y sur, posteriormente estudiadas por Sequeira en 1958. Teniendo como solución temporal, la eliminación de plantas enfermas, desinfección de herramientas y otras prácticas de saneamiento y control mecánico. Sin embargo entre 1983-1984 fue creado el manual técnico sobre **“Procedimientos para el Control de moko del Banano”**, en el departamento de Izabal específicamente en la Bananera de Guatemala, (BANDEGUA, 1984).

Sin embargo en el año de 1965, según Schieber, citado por Loarca, (1987), informó por primera vez el apareamiento de la bacteria *Ralstonia solanacearum*, en el municipio de Palencia, en áreas de cultivo de papa. Posteriormente fue diseminada en áreas de, Chimaltenango, Sololá, Huehuetenango y varias zonas de Quiché. En el oriente del país se reporta, según los agricultores que se dedican a la producción del cultivo de tomate y chile pimiento, en la aldea El Amatillo perteneciente al municipio de Ipala, departamento de Chiquimula entre 1996 y 1997. Desde entonces, ha sido uno de los principales problemas fitosanitarios para la producción de hortalizas, frutales (banano) y ornamentales (geranio) (29,30).

Esta bacteria tiene un amplio número de hospederos que incluye más de 450 especies de plantas pertenecientes a más de 50 familias botánicas; entre los hospedantes se incluyen cultivos como el maní, papa, tomate, plátano, tabaco, jengibre, algunas especies de árboles (Eucalipto) y arbustos de importancia económica (Denny y Hayward, 2001). De carácter heterogéneo, con facilidad de dispersión y supervivencia, son características que sitúan a esta bacteria de considerable importancia fitopatológica (Díaz, 1999).

De esta cuenta en países con condiciones favorables para el desarrollo de esta enfermedad como Guatemala, constituye una amenaza para cultivos susceptibles, tomando en consideración la existencia de esta nueva limitante en la producción de tomate y chile pimiento en el área oriental del país, la importancia y el peligro que la enfermedad representa para la continuidad de la producción hortícola de las especies susceptibles (solanáceas).

Debido a lo anterior, se realizó esta investigación con el objeto de conocer la distribución, biovares y raza de ***R. solanacearum***, en el oriente del país en tomate y chile pimiento. Ello pretende sustentar las bases de un programa o plan de manejo de la enfermedad a nivel regional o nacional, formando parte del proyecto de investigación No. **0-41/2004 AGROCYT**: "*Principales Aspectos epidemiológicos de la Marchitez bacteriana, causada por **R. solanacearum**, en el cultivo de tomate **Solanum lycopersicon L.** en el oriente de Guatemala*".

3 Marco teórico

3.1 Marco conceptual

3.1.1 Marchitez bacteriana en solanáceas

3.1.1.1 Descripción general de los cultivos de interés

A. Cultivo de tomate *Solanum lycopersicon* L.

- **Taxonomía** (Cronquist 1988)

Clase: Magnoliopsida
Subclase: Asteridae
Orden: Solanales
Familia: Solanaceae
Género: *Solanum*
Especie: *Solanum lycopersicon* L. (Knap, *et al*; 2005)

- **Caracterización morfológica y su relación con especies silvestres**

Los tomates silvestres (*Solanum* L. sect. *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.) son nativos de la parte sureste de Suramérica. Las diferentes clasificaciones que han tenido, se encuentran basadas en sus aspectos morfológicos o biológicos. El análisis molecular corresponde a sitios de restricción del ADN mitocondrial y los fragmentos de polimorfismo en el ADN a nivel de cloroplasto y la secuenciación más reciente de una copia sencilla del gen waxy o GBSSI que ha sido el más empleado para observar la relación infraespecífica entre las especies: figura 1 (Peralta y Spooner, 2005).

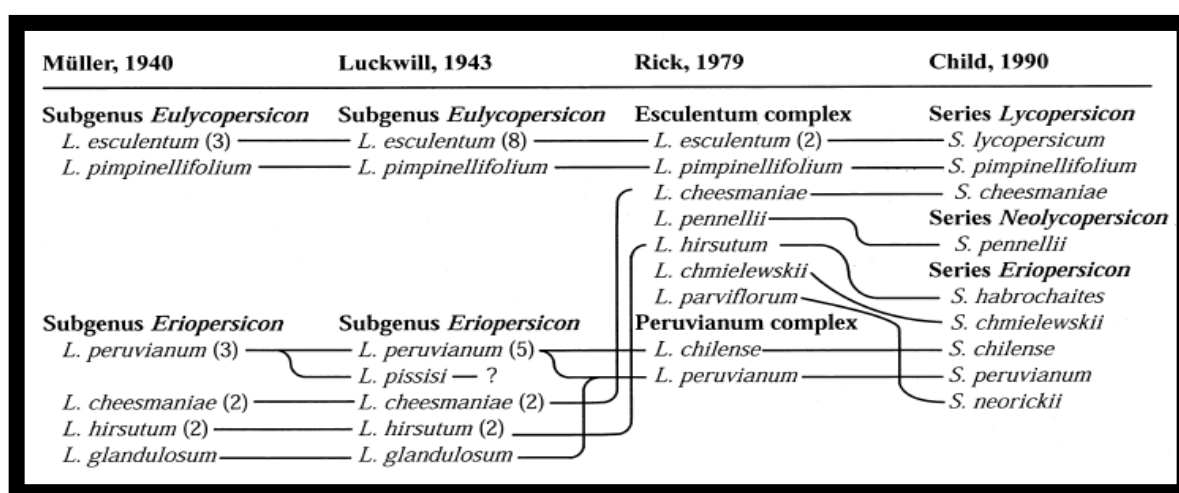


Figura 1. Comparación y clasificación de *Solanum* sect. *Lycopersicon*. Los números en paréntesis representan los rangos infraespecíficos entre subespecies, variedades y morfología. Las líneas enlazan los sinónimos en la clasificación taxonómica (Peralta y Spooner, 2005).

- **Generalidades**

El tomate, *Solanum lycopersicon* L. debió originarse, como las otras especies en su género, en la vertiente occidental de Los Andes, entre Perú y Ecuador. En América Central se encuentran variedades silvestres que aún no se explotan a nivel comercial. En Guatemala, es una de las hortalizas más importantes por su volumen de ventas y consumo.

Requerimientos edáficos y climáticos: el cultivo requiere suelos profundos, francos o franco-arcillosos, ricos en materia orgánica y suelos ligeramente ácidos, con pH entre 6 y 7. A pH menor de 5.5 o mayor de 7 se recomienda realizar las enmiendas necesarias al suelo, para aprovechar los nutrientes al máximo. Las variedades en producción en el país se adaptan mejor a altitudes entre 0 y 1,500 metros sobre el nivel del mar. La temperatura óptima para el desarrollo del cultivo se encuentra entre 16 y 25°C.

Selección del material por región: en adición a las características del suelo y clima, el material que se sembrará debe ser seleccionado por su rendimiento potencial, adaptabilidad a la zona, hábitos de crecimiento, tiempo de maduración y resistencia a plagas, particularmente patógenos. Entre las principales enfermedades que atacan al cultivo de tomate se encuentran: la mancha foliar causada por *Septoria lycopersici*, tizón tardío causada por *Phytophthora infestans*, tizón temprano *Alternaria solani*, marchitez vascular *Fusarium oxysporum*, moho de la hoja *Fulvia fulva*, marchitez bacteriana *Ralstonia solanacearum* E.F. Smtih, y un complejo de infecciones virales de las cuales se presentan el virus X de la papa *Potexvirus*, el virus Y de la papa *Potyvirus*, virus del mosaico del tabaco VMT y TMV, además de las infecciones por genovirus o geminivirus transmitido por *Bemisia tabaci*.(Villela, 1993).

B. Cultivo de chile pimiento *Capsicum annuum* L.

- **Taxonomía** (Cronquist, 1988)

Clase: Magnoliopsida
Subclase: Asteridae
Orden: Solanales
Familia: Solanaceae
Género: *Capsicum*
Especie: *Capsicum annuum* L.

- **Generalidades**

El pimiento es originario de la zona de Bolivia y Perú, donde además de *Capsicum annuum* L. se cultivaban al menos otras cuatro especies. En el siglo XVI ya se había difundido su cultivo en España, desde donde se distribuyó al resto de Europa y del mundo con la colaboración de los portugueses. Su introducción en Europa supuso un avance culinario, ya que vino a complementar e incluso sustituir a otro condimento muy empleado como era la pimienta negra *Piper nigrum* L., de gran importancia comercial entre Oriente y Occidente.

La mayoría de variedades de Chile, incluyendo al pimiento, pertenecen a la especie *Capsicum annuum* L. Algunas de las variedades picantes han sido clasificadas como *C. frutescens* L., aunque la clasificación actual es compleja, por la constante creación de nuevas variedades, mediante hibridación. El pimiento es uno de los chiles más grandes, con dimensiones que pueden sobrepasar los 10 cm. de largo y los 5 cm. de ancho, en el punto de corte. Se comercializa ya sea de color amarillo, rojo o verde, fresco o enlatado. El manejo racional de los factores climáticos de forma conjunta es fundamental para el funcionamiento adecuado del cultivo, ya que todos se encuentran estrechamente relacionados y la actuación sobre uno de estos incide sobre el resto. Los saltos térmicos (diferencia de temperatura entre la máxima diurna y la mínima nocturna) ocasionan desequilibrios vegetativos.

La coincidencia de bajas temperaturas durante el desarrollo del botón floral (entre 15 y 10°C) da lugar a la formación de flores con alguna de las siguientes anomalías: pétalos curvados y sin desarrollar, formación de múltiples ovarios que pueden evolucionar a frutos distribuidos alrededor del principal, acortamiento de estambres y de pistilo, engrosamiento de ovario y pistilo, fusión de anteras, etc.

Las bajas temperaturas también inducen la formación de frutos de menor tamaño, que pueden presentar deformaciones, reducen la viabilidad del polen y favorecen la formación de frutos partenocárpicos. Las altas temperaturas provocan la caída de flores y frutitos.

La humedad relativa óptima oscila entre el 50% y el 70%. Humedades relativas muy elevadas favorecen el desarrollo de enfermedades aéreas y dificultan la fecundación. La coincidencia de altas temperaturas y baja humedad relativa puede ocasionar la caída de flores y de frutos recién cuajados.

Los suelos más adecuados para el cultivo del pimiento son los franco-arenosos, profundos, ricos, con un contenido en materia orgánica del 3-4% y principalmente bien drenados. Los valores de pH óptimos oscilan entre 6,5 y 7 aunque puede resistir ciertas condiciones de acidez (hasta un pH de 5,5); en suelos enarenados puede cultivarse con valores de pH próximos a 8.

En cuanto al agua de riego el pH óptimo es de 5.5 a 7, es una especie de moderada tolerancia a la salinidad tanto del suelo como del agua de riego, aunque en menor medida que el tomate. Es importante el diagnóstico correcto de las enfermedades, ya que algunos síntomas generales (clorosis, marchitez, enanismo) pueden deberse al ataque de patógenos. Entre las principales enfermedades que atacan al cultivo de tomate se encuentran: la mancha foliar causada por ***Septoria lycopersici***, tizón tardío causada por ***Phytophthora infestans***, tizón temprano ***Alternaria solani***, marchitez vascular ***Fusarium oxysporum***, síndrome de marchitez fungosa ***Phytophthora capsici*** Leonina, moho de la hoja ***Fulvia fulva***, marchitez bacteriana ***Ralstonia solanacearum*** E.F. Smtih, y un complejo de infecciones virales de las cuales se presentan el virus X de la papa ***Potexvirus***, el virus Y de la papa ***Potyvirus***, virus del mosaico del tabaco **VMT** y **TMV**, además de las infecciones por genovirus o geminivirus transmitido por ***Bemisia tabaci***.

3.1.1.2 Datos históricos de la enfermedad

A nivel mundial, los primeros indicios de la enfermedad surgieron en Italia en el año 1882, de allí se considera la posible diseminación a otras partes del mundo como Asia, África del sur, La India, Indonesia, Japón, Norte de Australia (Ceilán) y consecuentemente Suecia y Holanda (López, 2004).

En 1896, se hace referencia a la primera descripción del patógeno ***Pseudomonas solanacearum***, como el causante de la Marchitez Bacteriana, por Edwin F. Smith, cuya nomenclatura dada, sufriría modificaciones de acuerdo a estudios consecuentes del mismo Smith (1914) (Orozco, 1997).

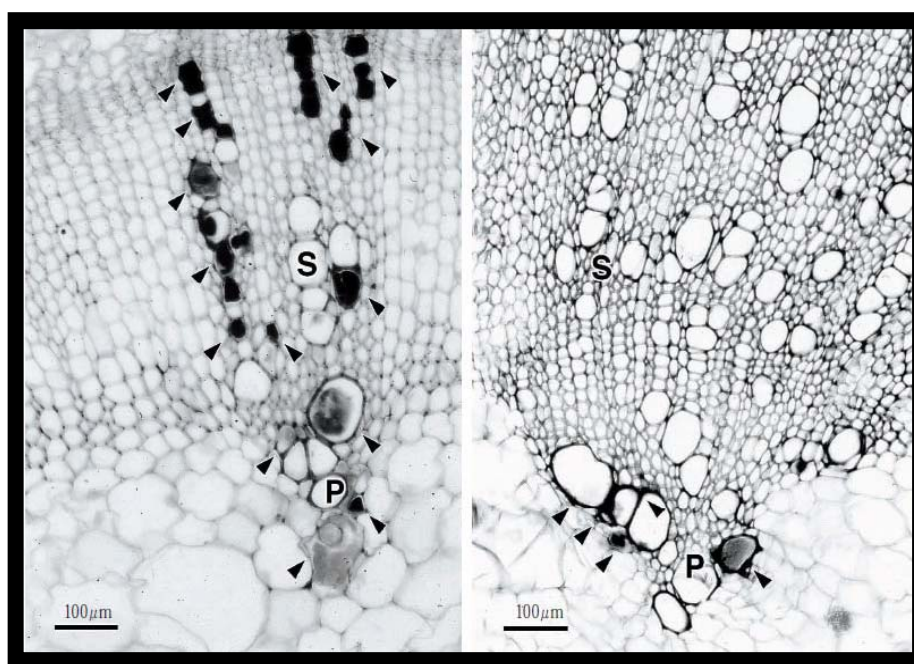
En América Latina, fue localizada en 1965, en áreas amazónicas de Sur América, sobre grandes altitudes en Perú y Costa Rica, en lo que respecta a Guatemala, surge en el municipio de Palencia, del cual fue colectada y aislada, procediéndose a la demostración de su patogenicidad (Loarca, 1987).

3.1.1.3 Descripción de la enfermedad y síntomas

La marchitez bacteriana es una enfermedad de tipo vascular. Se caracteriza por la invasión primaria de la bacteria *R. solanacearum* (patógeno), a los vasos del tejido xilémico. Se propaga invadiendo internamente el tejido vascular, principalmente los vasos de las raíces y el tallo, sin embargo se presenta hasta la parte superior de las plantas infectadas (etapa final de la enfermedad).

a) Distribución del patógeno en el sistema vascular de la planta

Cuando *R. solanacearum*, infecta una planta, penetra por el sistema de absorción radicular y entra en el sistema vascular, distribuyéndose a los vasos del tejido xilémico (tubo conductor) de forma vertical u horizontal, según figura 2 (Watanebe, 2006).



a) vertical

b) horizontal

Figura 2. Distribución de *R. solanacearum* E. F. Smith, en los vasos del conducto xilémico; en donde **P**: Vaso de tejido primario, **S**: Vaso de tejido secundario. (Watanebe, 2006).

Produce taponamiento de los conductos, consecuentemente la planta sucumbe ante una falta de hidratación celular, ocasionando de esta forma un marchitamiento vascular y por ende sistémico (Robinson, s.f.; Mejía *et al*; 2006).

Estos pueden llenarse tanto con los microorganismos o sus productos del metabolismo, que el agua no alcanza a llegar a las hojas y la planta se marchitan rápidamente.

En el marchitamiento de las solanáceas se produce, entre otros síntomas, el marchitamiento, durante las horas más calurosas del día, intensificándose cada vez más hasta ocasionar la muerte.

Los síntomas son característicos en plantas jóvenes debido a su período de susceptibilidad dentro los 20 a 25 días después del trasplante o emergencia (González, 2000; Robinson, s.f.; Mejía *et al*; 2006).

3.1.1.4 Características de la bacteria (patógeno)

a) Morfológicas

Es una bacteria gram negativa, con forma de bastón de 0.5 – 0.7 μm de diámetro x 1.5 - 2.5 μm de largo, aeróbica, móvil, no forma espora ni cápsula, provoca reducción de nitratos y formación de amoniacó, según figura 3.



Figura 3. *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith, extraída del sistema vascular de una planta. (Watanebe, 2006.)

En medio de cultivo líquido la bacteria de tipo silvestre, es generalmente no móvil y carece de flagelo polar (Agrios, 1995; Denny *et al*; 2001). Además se puede realizar una observación microscópica o por simple inspección de la forma y consistencia de la colonia bacteriana pura.

Las características que se consideran son: rango de crecimiento, viscosidad, forma de la colonia, coloración entre otras.

R. solanacearum: produce colonias de crecimiento medio, blancas, de márgenes lisos, brillantes, circulares o irregulares y convexos. Varias cepas producen un pigmento castaño (melanina) que se difunde en el medio de cultivo (Becerra y Paredes 2007; Díaz, 1999; French y Hebert, 1980).

En cambio en variantes virulentas que se desarrollan en medio de cultivo son activamente móviles; las variantes virulentas silvestres tienen aspecto redondeado irregular, de color blanco con el centro tornando a rosa (Denny y Hayward, 2001).

R. solanacearum, no provoca la hidrólisis del almidón, es resistente a la desecación y su desarrollo en medio nutritivo; es inhibida por bajas concentraciones de sal (Budenhagen *et al* 1962; Denny y Hayward 2001).

Según Kelman (1954), refiere en cuanto a la morfología de esta bacteria que pueden observarse dos clases de colonias, una es fluida (mucoide) debido a la abundante producción de un polisacárido extracelular (EPS), de consistencia lisa, irregular y redonda; mientras que la otra clase, es una colonia mutante de apariencia seca, redonda, translúcida, rugosa no fluida.

b) Fisiológicas

Basado en los estudios de Goszczyńska (2000), ***R. solanacearum***, no crece a más de 40⁰ C, posee la capacidad de reducir nitrato, dependiendo del biovar, puede producir ácidos a partir de disacáridos y oxida alcoholes hexosa. Las características más importantes de esta bacteria, se resumen en el cuadro 1.

Cuadro 1: Características fisiológicas más importantes de *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, según (Goszczyńska *et al*; 2000) (18).

Prueba	Reacción
Coloración de Gram	Negativa
Gránulos de Poly- <i>B</i> -Hidroxybutirato	Positiva
Prueba de KOH 3%	Positiva
Prueba de oxidación de Glucosa	Positiva
Prueba de Oxidasa	Positiva
Tolerancia a soluciones de NaCl al 0.5%	Negativa
Tolerancia a soluciones de NaCl al 2%	Negativa
Tolerancia a soluciones de NaCl al 4%	Negativa
Prueba de Catalasa	Positiva
Prueba de Hidrólisis	Negativa
Prueba se Simmons Citrato	Positiva
Prueba de Hidrólisis de Almidón	Negativa
Prueba de Reducción de Nitratos	Positiva
Prueba de Arginina dihidrolasa	Positiva

3.1.1.5 Ambiente favorable para *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith

La supervivencia de la bacteria es afectada por la temperatura, la humedad del suelo y otros factores físicos y químicos del suelo, siendo más favorables las temperaturas altas de 28°C a 35°C. Por esta razón es que ocasiona mayores daños cuando se presenta en zonas de costa o en los valles abrigados de sierra (Coutinho, 2005).

En climas fríos (menos de 18°C), como en altitudes superiores a 2,500 msnm, la bacteria crece muy lentamente y convive con el cultivo, como infección latente, sin ocasionar daños aparentes ni presentar síntomas visibles.

En este caso, los restos de plantas, material vegetativo de propagación, se convierten en portadores asintomáticos de la bacteria que al ser sembrados en lugares más calurosos, desarrollan la enfermedad en el cultivo, la cual es severa (Coutinho, 2005; Delgado *et al*; 1999).

3.1.1.6 Ciclo de la marchitez bacteriana

La bacteria *R. solanacearum*, puede sobrevivir en el suelo (principalmente en restos de cosechas de plantas infectadas), en las raíces y en la tierra que las rodea (rizósfera) de muchas plantas hospedantes infectadas, en malezas; constituyéndose en fuentes de inóculo primario. A partir de los cuales y con ayuda del agua de riego, maquinarias, herramientas de los agricultores, son diseminados en el mismo campo y a otros campos vecinos produciendo nuevas infecciones. La bacteria penetra en las plantas a través de heridas producidas durante la emergencia de raíces secundarias (42, 16, 35).

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, facilitan el ingreso de la bacteria a la planta, iniciándose así un nuevo ciclo de la infección, según figura 4 (35).

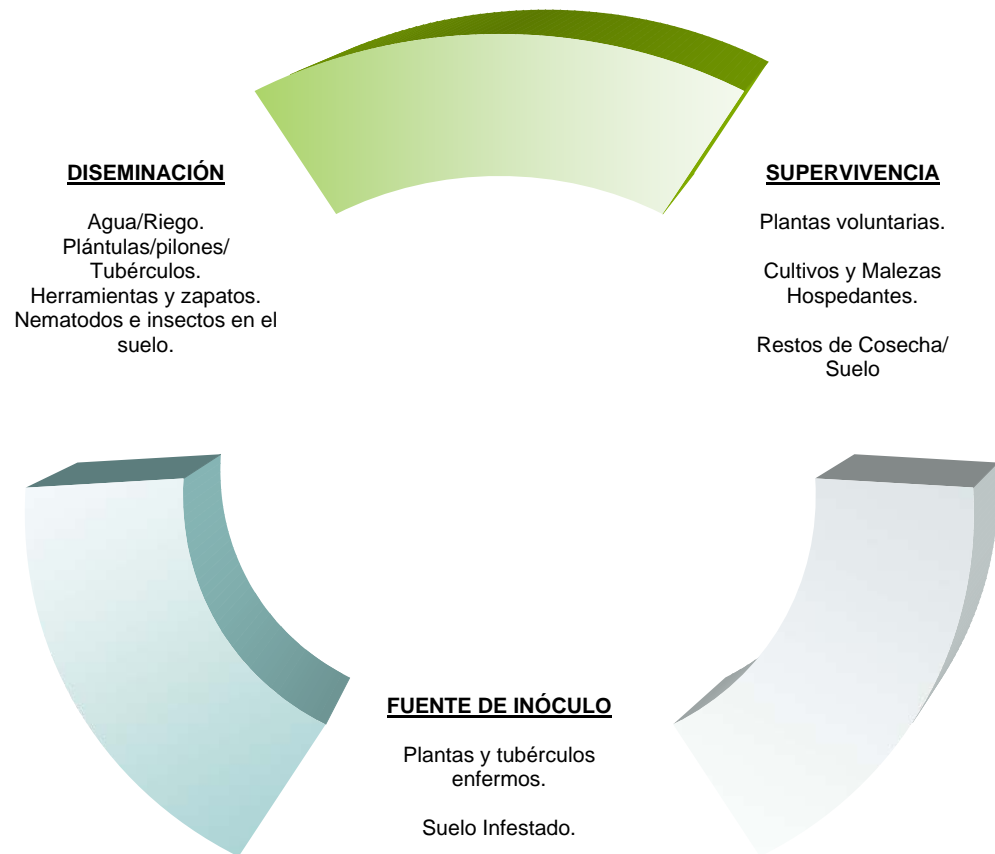


Figura 4. Ciclo de la marchitez bacteriana, ocasionada por *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith según, Ministerio de Agricultura, Servicio Nacional de Sanidad Agraria, Republica del Perú (16).

3.2 Patógeno y clasificación taxonómica

3.2.1 Taxonomía

***Ralstonia solanacearum*:**

Clase:	Betaproteobacteria
Orden:	Burkholderiales
Familia:	<i>Burkholderiaceae</i>
Género:	<i>Ralstonia</i>
Especie:	<i>Ralstonia solanacearum</i> E.F. Smith

Al nivel de especie, el agente causal de la marchitez bacteriana fue descrita por primera vez como ***Bacillus solanacearum*** (Smith, 1896). Desde entonces, ha sufrido modificaciones recibiendo denominaciones y la nomenclatura dada en 1914 por el propio Smith como ***Pseudomonas solanacearum*** (Smith) prevaleciendo por muchos años.

En 1992 según Yabuuchi, se transfirieron siete especies de bacterias al grupo II de homología del ARNr, incluyendo a ***P. solanacearum***; mientras que las ***Pseudomonas*** fluorescentes quedaron dentro del grupo I de homología del ARNr.

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

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

Las técnicas modernas de la biología molecular han facilitado la construcción de dendrogramas describiendo las relaciones evolutivas a diferentes niveles de profundización, con el consecuente cambio de género (Palleroni *et al.*, 1972).

Los patógenos de la marchitez bacteriana conforman un grupo filogenético heterogéneo con miles de cepas distintas que varían con respecto al intervalo del hospedero, distribución geográfica y fisiología (Taghavi *et al.*, 1996; Poussier *et al.*, 2000; Fegan & Prior, 2000). Algunas difieren entre sí hasta 30% a nivel de ADN, por lo que probablemente no pertenezcan a la misma especie, por lo tanto ***R. solanacearum***, es considerada un “complejo de especies”, un grupo de aislamientos emparentados que presentan más de una especie; una indicación de la amplia diversidad fenotípica y genética del grupo (Hayward, 1991 citado por Orozco, 2004).

3.2.2 Clasificación infraespecífica

A nivel infra-subespecífico ***R. solanacearum***, ha sido clasificada de acuerdo al hospedero, distribución geográfica, patogenicidad, relaciones epidemiológicas y propiedades fisiológicas; de lo cual se describen los conceptos de raza y biovar, con fines de clasificación (Hayward, 1991). Así, a través del tiempo fueron relatadas 5 razas basadas primariamente en la gama de hospederos que afectan (Buddenhagen *et al.*, 1962; Agrios, 1995). Y seis biovares definidas de acuerdo con la habilidad de utilizar y/u oxidar ciertos azúcares y alcoholes (Hayward, 1991 citado por Orozco, 1997; Orozco 2004).

a) Razas

El concepto de raza, se refiere a una clasificación con respecto a la especialización patológica de la bacteria en atacar a determinada especie de planta, convirtiéndose, en la gama de hospederos de la misma (Buddenhagen, 1962).

La **raza 1** ataca un gran número de plantas, incluyendo papa, tomate, berenjena, tabaco, jengibre, olivo, principalmente solanáceas en general y algunas malezas (Orozco, 1997). **La raza 2** ataca musáceas y heliconias.

La **raza 3** es considerada específica de la papa, pero esta asociada a algunas otras solanáceas, particularmente a tomate en ambientes fríos (Hayward, *et al.*, 1991; Orozco, 1997) sin embargo no es altamente virulenta en otros cultivos de solanáceas para designar cepas encontradas en la china que diferían de las biovares descritas por Hayward (1954), propusieron la **raza 4** siendo esta documentada infectando jengibre y **raza 5** afectando mora (*Morus alba L.*) (Hayward, 1994 citado por Orozco 1997; Orozco, 2004).

b) Biovar

Este concepto está, basada en la reacción de un subgrupo de una especie de bacteria *R. solanacearum* ante pruebas bioquímicas de laboratorio (Díaz, 1999, Menéndez, 2000; Orozco, 1997).

Este otro sistema de clasificación fue designado por Hayward en 1954, en donde define cuatro biotipos de la bacteria (I, II, III, y IV) en base a ciertas propiedades bioquímicas, con la habilidad de oxidar y/o utilizar ciertos azúcares y alcoholes.

Determinando las biovares de *R. solanacearum*, mediante las pruebas sobre la utilización de los disacáridos, celobiosa, lactosa y maltosa, y sobre oxidación de los alcoholes hexosa, dulcitol, manitol y sorbitol), de acuerdo a lo que se presenta en el cuadro 2 (Orozco, 2004).

Cuadro 2. Criterio de biovares de *R. solanacearum* E.F. Smith de acuerdo a la producción de ácido a partir de azúcares y alcoholes, según Hayward (1954) (Orozco, 2004).

BIOVARES	LACTOSA	MALTOSA	CELUBIOSA	MANITOL	SORBITOL	DULCITOL
I	-	-	-	-	-	-
II	+	+	+	-	-	-
III	+	+	+	+	+	+
IV	-	-	-	+	+	+

(+) = Positivo (Producción de ácidos)

(-) = Negativo

3.2.3 Interrelación raza-biovar

La raza 1 (biovares 1, 3 o 4) ataca un gran número de plantas, incluyendo papa, tomate, berenjena, tabaco, solanáceas en general y algunas malezas (Hayward, 1991 citado por Orozco, 1997).

La raza 2 (biovares 1, 3 o 4) ataca banano y similares. La raza 3 (biovar 2) es considerada específica de la papa, pero esta asociada a algunas otras solanáceas y malezas (tomate, geranio, quilete) (Hayward, 1991; Orozco, 1997).

Para designar cepas encontradas en la China que diferían de las biovares descritas por Hayward (1964), propusieron la raza 4 (Biovar 4) siendo esta relatada infectando jengibre y raza 5 infectando mora (*Morus alba* L.) (Hayward, 1994 citado por Orozco, 1997).

3.2.4 Variabilidad de plantas hospederas

R. solanacearum se caracteriza como una bacteria cosmopolita, extremadamente variable, adaptada a gran número de plantas, sobre las más variadas condiciones edafoclimáticas, principalmente en las regiones tropicales y sub-tropicales del mundo. (Agrios, 1995; Michel *et al.*, 1996; Persley, 1985; Middleton & Hayward, 1990; Lopes & Takatsu, 1997 citados por Orozco, 1997).

Centenares de especies de plantas pertenecientes a más de 50 familias botánicas han sido identificadas como hospederos (Buddenhagen & Kelman, 1964; Hayward, 1994) de las cuales las más afectadas por esta fitobacteria, son de importancia económica en el mundo siendo: papa, tomate, berenjena, chile pimiento, jengibre, banano entre otros. (Kelman, 1953; Hayward, 1991; Hayward, 1994; Lopes, 1994; Lopes & Takatsu, 1997; Michel *et al.*, 1996; Persley, 1986; Middleton & Hayward, 1990; Agrios, 1995; Eden-Green, 1994, citados por Orozco, 1997).

Con base en una exhaustiva revisión de plantas hospederas sobre la bacteria y la marchitez ocasionada por la misma, se clasifican en dos grupos de hospederas:

Grupo I: envuelve todas aquellas especies consideradas como hospederas verdaderas o que satisfacen uno o mas de los criterios siguientes: susceptibilidad en o sobre condiciones naturales; susceptibilidad a infección sobre condiciones de inoculación.

Grupo II: están las especies hospederas consideradas como verdaderas para las cuales, en la actualidad centenaes de especies de plantas pertenecientes a más de 50 familias botánicas han sido como hospederas susceptibles: siendo la familia Solanaceae (papa, tomate, berenjena, chile pimiento), presenta mayor número de especies afectadas, (Buddenhagen & Kelman, 1964; Bradbury, 1986; Hayward, 1994; Kelman, 1953; Lopes & Takatsu, 1997, citados por Orozco, 1997).

3.3 Caracterización de la bacteria

3.3.1 Importancia de la caracterización

El diagnóstico de una enfermedad bacteriana y la identificación de la bacteria son la forma más eficaz y segura de comprobar, que la bacteria asociada al hospedero, es en realidad el patógeno. Para la detección del patógeno (bacteria) puede ser realizada por exposición a medios físicos y químicos (reacciones serológicas) (Díaz, 1999).

De esta cuenta, el uso de técnicas serológicas avanzadas y específicas basadas en el principio de la composición química y carga genética de la bacteria, hacen posible su detección e identificación segura a nivel de laboratorio, aún cuando las poblaciones de bacterias en las plantas enfermas sean mínimas o se encuentren en condición de latencia (Díaz, 1999).

3.4 Diagnóstico de campo

3.4.1 Fase de campo

El diagnóstico de campo de las enfermedades de plantas, requiere de varios pasos consecutivos, que pueden variar según las circunstancias, pero generalmente consisten en los siguientes: **1.** Observación de síntomas, **2.** Determinación de las circunstancias particulares del caso; condiciones climáticas; relieve del terreno; distribución de la enfermedad en el campo; historial de los cultivos previo a la aplicación de fertilizantes, insecticidas, fungicidas, herbicidas y **3.** Observación de señas de patógenos (Arai, 2001; Díaz, 1999).

a) Sintomatología

Las enfermedades afectan cualquier órgano de la planta, según la metodología de observación de síntomas de French y Hebert (1980).

Enfocando esta metodología hacia la diagnosis de bacterias, se debe tomar en cuenta que éstas pueden ser reconocidas a simple vista en el campo, debido a que pueden formar exudados característicos, de esta cuenta, uno de los procedimientos rápidos es la observación de los exudados o flujo bacteriano (Arai, 2001; Díaz, 1999)

Es posible detectar la presencia de marchitez bacteriana en el cultivo de tomate y chile pimiento, en base a la sintomatología típica de marchitez unilateral que presentan las plantas afectadas (35).

En condiciones de almacenamiento los frutos de tomate y chile pueden ser expuestos a temperaturas de 25°C a 30°C por 1 a 2 semanas; esto permite activar el crecimiento y desarrollo de la bacteria ***R. solanacearum***, el mismo que se manifiesta reproduciendo los mismos síntomas descritos anteriormente (35).

3.4.2 Prueba del flujo bacteriano

Para este caso de estudio se presenta una bacteria vascular, que puede diagnosticarse por lo anteriormente descrito. Para observar el flujo a simple vista se realiza lo siguiente:

a) Metodología para la diagnosis de enfermedades

- Se realiza corte de un trozo de tallo o raíz de 1-2 cm de largo de una planta con marchitez no muy avanzada (de lo contrario puede haber presencia de bacterias secundarias).
- Se suspende ese mismo trozo en posición horizontal y sumergido en la parte superior de una columna de agua desmineralizada. Casi de inmediato, o a veces después de unos 5-10 minutos, comienza a fluir un hilo de bacterias de uno o más conductos del sistema vascular, que desciende dentro del agua (French y Hebert, 1980).

Este exudado lechoso del tallo refleja la posible presencia de *R. solanacearum* en el sistema vascular, evidenciada la presencia de la enfermedad, es necesario efectuar una prueba de diagnóstico, ya que la marchitez de la planta causada por la bacteria *R. solanacearum*, puede confundirse con los síntomas inducidos por otros agentes patógenos como: *Fusarium eumartii*, *Fusarium oysporum* f.sp *lycopersici*, *Verticillium dahliae*, *Erwinia chrysanthemi*, por daños de insectos y nemátodos, daños mecánicos, en la base del tallo, según figuras 5-7 (Díaz, 1999; French y Hebert, 1980).



Figura 5. Síntomas de marchitez y flujo bacteriano de *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith. (Watanebe, 2006.)



Figura 6. Síntomas de marchitez por *Fusarium oxysporum* F.sp *lycopersici*. (Watanebe, 2006)



Figura 7. Síntomas: (a) Marchitez provocada por *Verticillium dahliae*; Daños: (b) ocasionados por nemátodos. (Watanebe, 2006)

Después de constatar en el campo la presencia de flujo bacteriano es necesario la toma de muestra vegetal, la cual puede ser transportada y preservada en un sistema de cámara húmeda, cuyo propósito es el de crear o recrear condiciones favorables de humedad para el desarrollo rápido de la bacteria que puede estar relacionada en la producción del síntoma de la enfermedad.

Lo esencial en la cámara húmeda es mantener separado el material vegetal del agua; estas pueden ser cámaras de germinación de semillas, bandejas de plástico con tapadera, cajas de plástico para especímenes, cajas de repostería y hasta bolsas de polietileno, el material enfermo que se introduzca a la cámara debe estar lo más limpio posible. La observación microscópica y la tinción en laboratorio, son esenciales para comprobar la presencia de una bacteria específica (Denny y Hayward, 2001).

3.5 Caracterización a nivel de laboratorio

El proceso de caracterización, a nivel de laboratorio, comprende toda una sucesión de procesos y metodologías encaminadas al aislamiento y purificación del patógeno (bacteria), para el efecto de considerar características, morfológicas, fisiológicas, químicas y patológicas, ya que pueden existir similitudes entre un patógeno (bacteria), en la morfología y aspectos de identificación, que resulta no ser tan sencillo, a diferencia de otros patógenos (hongos y nemátodos) (Denny y Hayward, 2001).

3.5.1 Aislamiento de *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith

Luego de realizar un diagnóstico de campo, basado en la observación de síntomas en la plantación o planta específica, apoyada con resultados de pruebas rápidas como flujo bacteriano se procede a aislar la bacteria (Arai, 2001; Denny y Hayward, 2001).

Primero: se procede a la selección de material representativo, para la obtención del exudado de la bacteria previo desinfección (alcohol al 70%) del material designado (tallos) y la utilización de tubos de ensayo y agua estéril, para el efecto (Arai, 2001; Denny y Hayward, 2001).

Segundo: luego de la obtención del flujo bacteriano, se procede a realizar estriados en medios de cultivo para bacterias (medio 5-2-3), en caja de petrí, para la siembra de la bacteria mediante estriados que diluyen la concentración de la misma en el medio en direcciones contrarias y en giros hasta de 180°. Esto se realiza dentro de una cámara de flujo laminar (Arai, 2001; Denny y Hayward, 2001).

Tercero: colocar en la incubadora previamente calibrada dentro de los 28°C para dar la condición óptima para el crecimiento de las colonias de bacterias, con un período de 48-72 horas.

Cuarto: se inicia el proceso de purificación de la bacteria, seleccionando colonias que correspondan con las características morfológicas y propias de la bacteria, para su posterior replicación en el medio nutritivo idóneo (medio 5-2-3) (Arai, 2001; Denny y Hayward, 2001).

3.5.1.1 Tinción de bacterias

Las bacterias que permanecen teñidas de color azul se denominan gram-positivas; las que se destiñen con la solución de alcohol etílico-acetona y luego se tornan rojas con la fucsina se denominan gram-negativas (Arai, 2001).

a) Prueba de KOH

Se puede realizar una prueba diferencial y rápida directamente con el exudado bacteriano del tallo, para diferenciar la bacteria en estudio. Esta reacción corresponde a la interacción de la membrana de la célula con respecto al KOH dándose una reacción de saponificación entre el medio y la bacteria, formando un hilo lechoso al levantar el aza, indica un resultado positivo para las bacterias gram-negativas (positivo para la presencia de *R. solanacearum*) de lo contrario, la bacteria pertenece a las gram-positivas (Agrios, 1995; Arai, 2001, Delgado *et al.*, 1999)

3.5.1.2 Cultivo de bacterias

a) Medios 5-2-3 Kado & Heskett (1970)

Corresponde a un medio nutritivo específico para el crecimiento de bacterias fitopatógenas, debido al contenido de nutrientes en solución, con un rango de pH de 5.5 a 7.5, para el desarrollo de las colonias (Denny y Hayward, 2001; Hayward, 1991; Orozco, 1997).

Para la preparación para 1000 ml se mezclan los ingredientes de la siguiente forma: dextrosa 5 gramos, caseína hidrolizada 4 gramos, 2 gramos de extracto de levadura, 2 gramos de K_2HPO_4 , 3 ml $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 20 gramos de Agar y por último se agregan 1000 ml de H_2O destilada.

b) Medio de tetrazolio

Este medio es útil para distinguir *R. solanacearum*, colonias virulentas dando una coloración fucsia en forma de estrías dentro de la formación de la colonia resultando positivo mediante la reacción del tetrazolio con el citocromo de la bacteria que produce los pigmentos ya referidos. (Denny y Hayward, 2001) citado por Orozco, (1997).

3.6 Caracterización molecular

3.6.1 Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

La **reacción en cadena de la polimerasa**, conocida como **PCR** por sus siglas en inglés "*Polymerase Chain Reaction*", es una técnica de biología molecular descrita en 1985 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento (Arai, 2001, Denny y Hayward, 2001; Sánchez *et al.*, 2006).

Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN. Tras la amplificación, resulta mucho más fácil identificar con una alta probabilidad virus o bacterias causantes de una enfermedad, huellas genéticas, clonación de genes, mutagénesis, análisis de ADN fósil, genotipado de mutaciones específicas, identificación de especies, etc. (Arai, 2001; Hirano, 2000, Sánchez *et al.*, 2006).

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las enzimas ADN polimerasa para replicar fragmentos de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para ser duplicadas.

Puesto que las temperaturas del ciclo (94 ° C en algunos momentos) suponen la inmediata desnaturalización de toda proteína, se emplean ADN polimerasas termoestables, extraídas de microorganismos adaptados a vivir a esas temperaturas, restrictivas para la mayoría de los seres vivos. Dichos microorganismos son: ***Thermus aquaticus*** (polimerasa Taq), ***Pyrococcus furiosus*** (Pfu), ***Thermococcus litoralis*** (Vent) y ***Thermus thermophilus*** (Tth) (Robinson y Ramos (s.f.)).

Para realizar la técnica se necesita:

- Desoxinucleótidos trifosfato (**dNTPs**), el sustrato para polimerizar nuevo ADN.
- Dos **cebadores “primers”**, oligonucleótidos, que cada uno es complementario a una de las dos fragmentos del ADN. Son secuencias cortas, de entre seis y cuarenta nucleótidos, normalmente de 18 a 22, que se usan para iniciar la reacción. Deben estar situados enfrentados y a no mucha distancia (no más de 4 kb/ Delimitan la zona de ADN a amplificar.
- Iones de magnesio (Mg^{2+}), agregado comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$).
- Una **solución tampón** que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.
- **ADN polimerasa** o mezcla de polimerasas.
- **ADN molde**, que es la muestra que se va a amplificar.
- **Termociclador**, el aparato que va a mantener la temperatura necesaria en cada paso del ciclo.
- Detección de ADN por **electroforesis** de gel (Hirano 2000; Kelman, 1954).

3.6.1.1 Conceptualización de la técnica

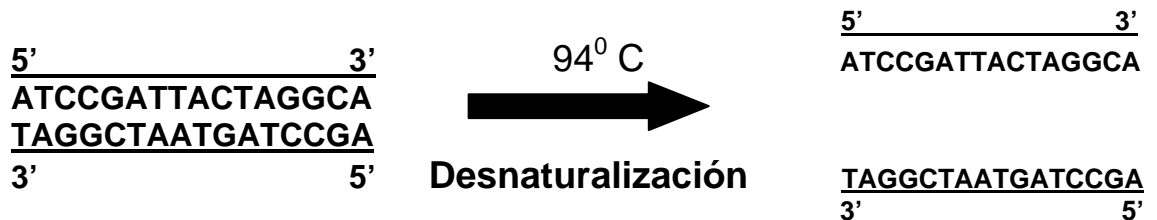
Los dNTPs, se pueden definir como la materia prima para la replicación por medio de “primers”, los cuales corresponden a grupos de 5 a 10 nucleótidos que tienen apareamiento preciso en una determinada parte de una banda de ADN. En cuanto a la ADN polimerasa se refiere, es una enzima que se utiliza para sintetizar una nueva cadena de ADN; el termociclador es un aparato usado para amplificar una cadena de ADN determinado (Hirano, 2000; Kelman, 1954).

a) Ciclo de amplificación

- **Desnaturalización**

Primeramente el ADN se desnaturaliza a una temperatura aproximada de 94°C , a esta temperatura existe una separación de las dos cadenas de ADN, ya que los enlaces de hidrógeno se rompen (Hirano, 2000).

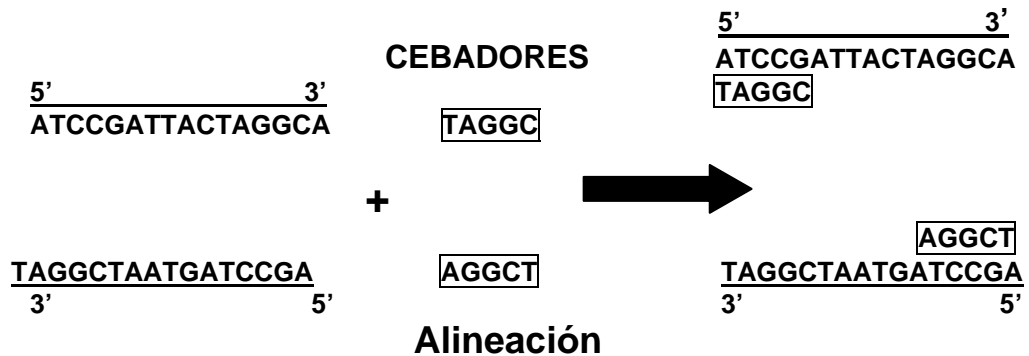
Ejemplo:



- **Unión del cebador (alineación)**

Una vez separada cada una de las dos cadenas del ADN, el termociclador reduce automáticamente la temperatura entre 35°C y 65°C , en la cual sucede el alineamiento de los cebadores a sus secuencias complementarias en las cadenas del molde (Hirano, 2000).

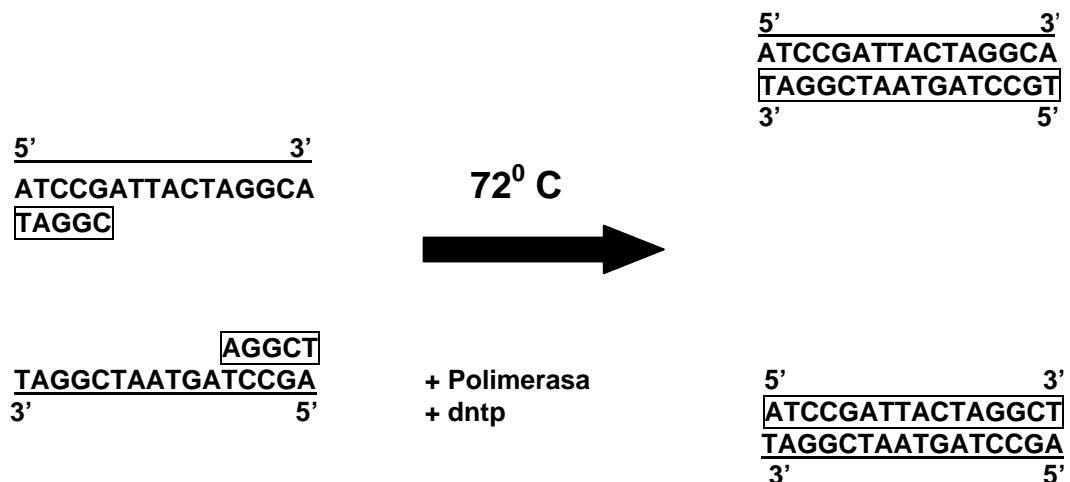
Ejemplo:



- **Extensión de la cadena**

Seguidamente el termociclador eleva la temperatura aproximada de 72⁰ C y se da la extensión de los cebadores mediante la acción de una ADN polimerasa termoestable, es decir que la ADN polimerasa añade nucleótidos trifosfatos a la cadena molde y así se replicará la cadena de ADN (Hirano, 2000).

Ejemplo:



- **Extensión**

Este paso (desnaturalización-hibridación-extensión) se repetirá un número de veces dependiente de la cantidad de fragmentos amplificados que se desee, generalmente son de 25-30 ciclos, ya que un número mucho mayor de ciclos no implica un mayor rendimiento y la cantidad de dobles cadenas serán más de 100 mil veces de las que había en la etapa inicial (Denny y Hayward, 2001; Hirano, 2000).

Para el caso de *R. solanacearum* este método se basa principalmente en un análisis molecular, por medio del cual se ha determinado que ha nivel más alto *R. solanacearum*, es un miembro de la beta subdivisión de la clase Proteobacteria, según Hayward, como especie (Denny y Hayward, 2001).

b) Electroforesis para visualización de bandas de ADN

El proceso de electroforesis es un método conveniente para analizar las combinaciones de macromoléculas vitales como ADN y proteínas. Se crea un campo eléctrico, para mover los fragmentos de ADN, por un gel poroso de agarosa o polyacrilamida (Hirano, 2000).

Los fragmentos pequeños migran más rápidamente que los grandes, de modo que se puede estimar su tamaño comparando sus posiciones en los geles, con los de una molécula de ADN, de tamaño conocido denominado marcador molecular (Hirano, 2000).

3.7 Distribución y diversidad a nivel mundial de *R. solanacearum* E.F. Smith

La marchitez bacteriana *R. solanacearum* 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 (SENASA, 2005).

En el sur de Asia, la marchitez bacteriana 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 esta siendo eficazmente controlada (SENASA, 2005).

En Indonesia, Filipinas, Vietnam del Sur, Japón y Sur de China, ubicado en el oriente y sudeste de Asia, la marchitez bacteriana constituye una enfermedad severa (Robinson (s.f)).

En Japón existen 2 razas (1 y 3) de la cuales se han aislado de 29 especies de 14 familias de plantas de importancia económica: ***Cucúrbita máxima*** (calabaza), ***Cucumis sativus*** (pepino), ***Strelitzia reginae*** (ave del paraíso), ***Limonium spp.***, ***Perilla ocymoides*** L. (perilla) y ***Eustoma russellianum*** (genciana de pradera) según estudios.

Las cepas japonesas han sido divididas en 5 grupos, basados en la patogenicidad en las especies de solanáceas. Según esta investigación se demostró que corresponden a el biovar1/ estirpes 1-4, biovar asiático 3, 4 y 5; constatando que la raza 3/biovar 2 estirpe japonesa, es similar a las estirpes de biovar 1 americano y las bacterias de la enfermedad del moko del plátano y banano. (Orozco, 1997, Orozco, 2004).

En los Países Bajos, se ha evidenciando que la bacteria, puede sobrevivir a la sequía, siendo necesarios la identificación de tratamientos en la industria de la papa y plantas de purificación de agua municipales (Robinson (s.f)).

A comienzos de los años noventa la marchitez bacteriana, se convirtió en una gran amenaza para la producción de papa de los países europeos incluyendo a Bélgica, Inglaterra, Francia, Portugal, Países Bajos, España e Italia (Delgado *et al.*, 1999, Robinson (s.f.)).

En América se ha reportado la presencia de esta enfermedad en todos los países productores de papa excepto en Ecuador. Su presencia en Australia y Estados Unidos ha incentivado investigaciones sobre la enfermedad en estos países (Delgado *et al.*, 1999, Robinson (s.f.)).

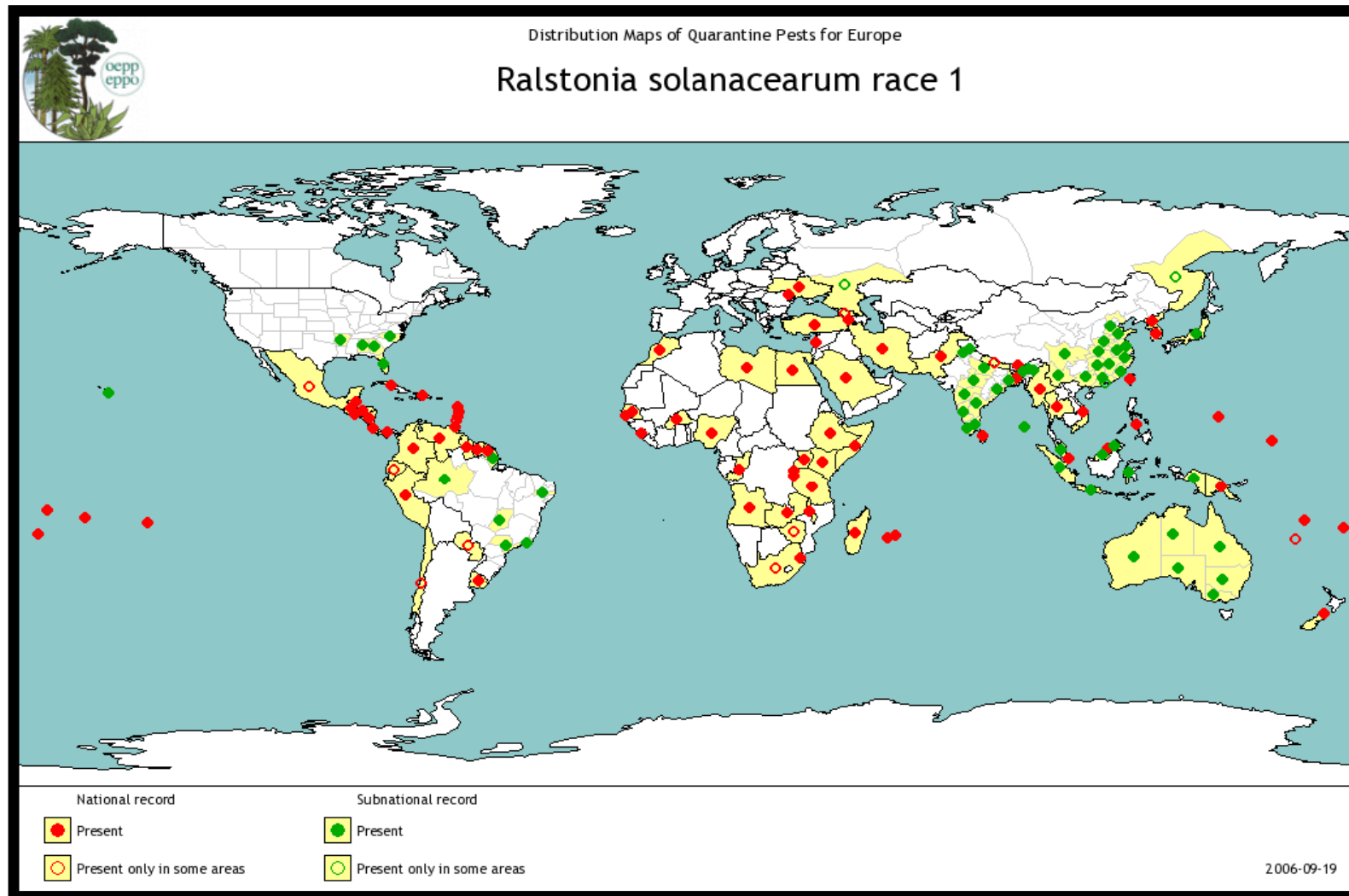


Figura 8. Mapa de distribución cuarentenaria de *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, Raza 1, para Europa (USDA, 2006).

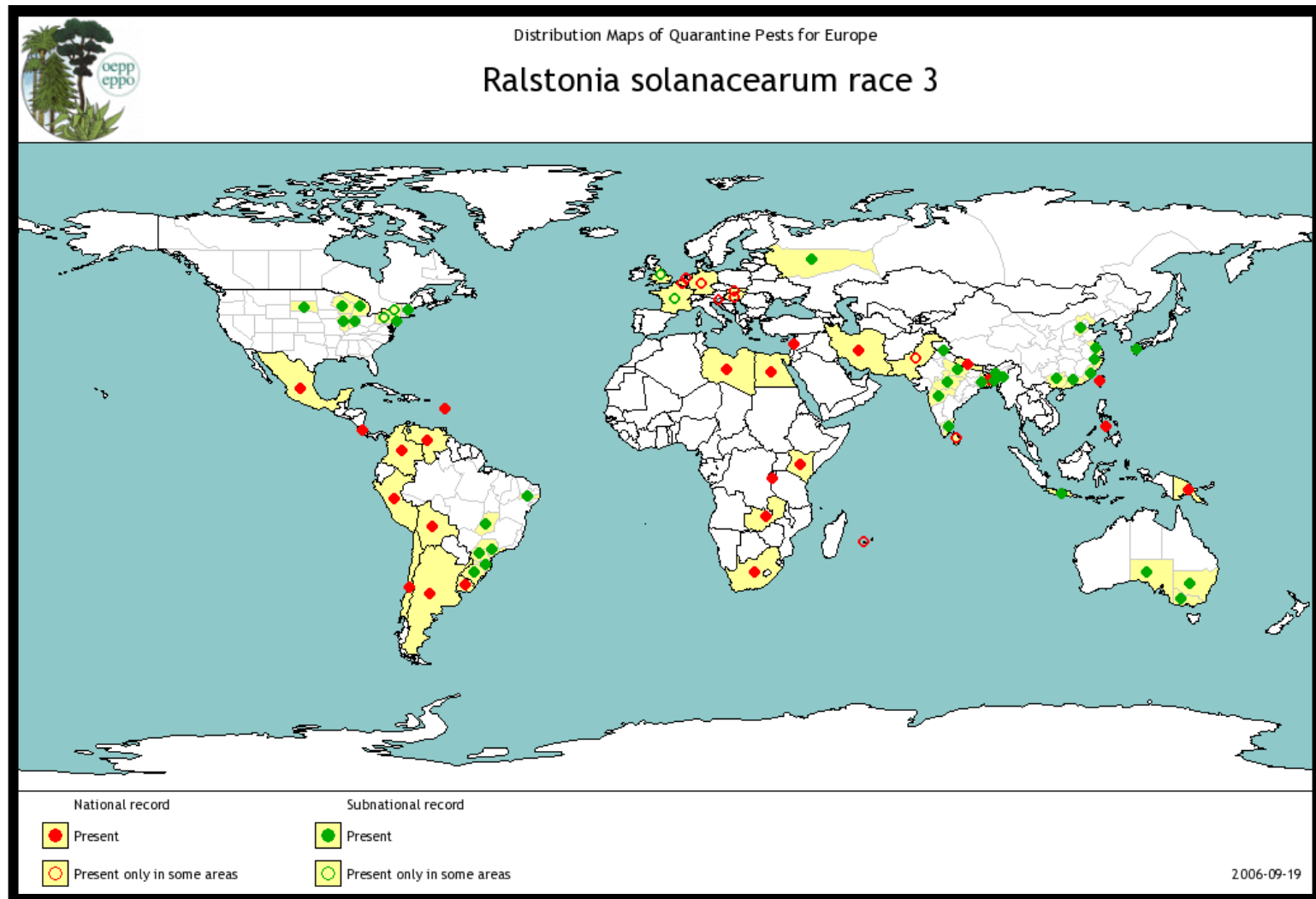


Figura 9. Mapa de distribución cuarentenaria de *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, Raza 3, para Europa (USDA, 2006).

3.8 Marchitez bacteriana en Guatemala, e investigaciones

Han existido datos sobre los brotes de marchitez bacteriana tanto en empresas grandes dedicadas a cultivos ornamentales, como también en las zonas de producción de hortalizas de tomate, papa y chile pimiento (USDA, 2004).

En los años de 1950, la United Fruit Company reportó que la enfermedad conocida como “Moko” tuvo efectos devastadores en plantaciones de banano en la costa norte y sur, posteriormente estudiadas por Sequeira en 1958.

En el año de 1965, según Schieber, citado por Loarca (1987) informó por primera vez el apareamiento de la bacteria en el municipio de Palencia, en áreas de cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.). Posteriormente fue diseminada en otras áreas de, Palencia, Chimaltenango, Sololá, Huehuetenango y varias zonas de Quiché.

Entre 1983-1984 por el apareamiento de la enfermedad denominada entonces, Moko del banano, en el departamento de Izabal específicamente en la Bananera de Guatemala, (BANDEGUA), el Departamento Experimental de la misma, realizó un Manual Técnico sobre Procedimientos para el control del Moko (BANDEGUA, 1984).

El desarrollo de *R. solanacearum*, en el oriente del país se reporta, según los agricultores que se dedican a la producción del cultivo de tomate y chile pimiento, en la aldea El Amatillo perteneciente a el municipio de Ipala, departamento de Chiquimula entre 1996 y 1997 (Menéndez, 2000).

Para ese entonces la utilización de maquinaria agrícola (tractor) que se empleaba en la zona, era rentada por la mayoría de los agricultores de la zona, sin embargo la maquinaria también era utilizada en El Tempisque, municipio de Agua Blanca, Jutiapa, resultando, que en la segunda temporada de siembra, (época de invierno) aparecieron las primeras plantas infectadas (síntomas), siempre en el año 1997 (Menéndez, 2000; Orozco, 1997).

En 1998 el problema fue mayor, reportando pérdidas de un 20% hasta 70% de la producción, en donde se empleó como alternativa de control, la aplicación de bactericidas existentes, siendo ineficientes para el caso, quedándose como solución la erradicación de plantas infectadas o bien el cambio de áreas de siembra (López, 2004, Menéndez, 2000).

La investigación más reciente sobre *R. solanacearum*, en el país, es la investigación realizada por Sánchez, (2006). que consta del *Estudio Filogenético y Distribución de la Bacteria R. solanacearum en Guatemala*. En donde la bacteria fue aislada en diferentes estratos altitudinales siendo estos descritos en el cuadro 3, caracterizada en grupos filogenéticos basados en la secuencia del gen de la endoglucanasa y la región intergénica 16S-23S, usando este sistema de clasificación, *R. solanacearum* se divide en 4 grupos filogenéticos el cual coincide con su origen geográfico.

Cuadro 3. Resumen de los resultados obtenidos de las pruebas de PCR, caracterización de biovar y caracterización filogenético de las diferentes muestras colectadas en Guatemala. (Sánchez 2006).

Altitud	Hospedero	Filotipo	Sequevar	Biovar-Raza	Origen
0 - 250 msnm.	Banano	II	VI	Biovar 3-raza 2	América
250 – 1, 200 msnm.	Tomate Berenjena Quilete	I	XIV	Biovar 1-raza 1	Asia
Mayor a 1, 600	Papa Tomate Quilete	II	I	Biovar 2-raza 3	América

Lo que ha provocado que en años recientes, en Guatemala los productores de tomate, se den a la búsqueda de nuevas áreas de cultivo, tratando de escapar de problemas causados por virosis y la marchitez bacteriana, movilizándose a altitudes mayores de 1600 msnm, encontrando en algunos casos problemas de marchitez bacteriana, probablemente proveniente de las áreas de producción de papa.

Recientemente se han monitoreado focos de infección de *R. solanacearum* que corresponden a la raza 3 biovar 2, en cultivo de geranio (ESQUEJES S.A., Jalapa, Guatemala) en diciembre de 2003, según las detecciones, del departamento de ESTADOS UNIDOS del servicio de Inspección de Sanidad Animal y de Plantas (APHIS) (USDA, 2004).

Existen también, otros estudios de peso, realizados por profesionales guatemaltecos enfocados principalmente, a la detección de la enfermedad, sus problemas, y el desarrollo de material vegetal genéticamente resistente a esta enfermedad. Siendo el caso de Mejía (1998), cuyo trabajo esta dirigido al mejoramiento fitogenético, (resistencia genética a virosis y *R. solanacearum*) derivada de especies silvestres emparentados con *Solanum lycopersicon* L. Como parte de la investigación Proyecto **AGROCYT-FAUSAC 041-2004**; realizado por Orozco (2007), se generó esta línea de investigación.

4 Marco referencial

4.1 Área de estudio y colecta de material vegetal

La investigación se realizó en el oriente del país, zona que se caracteriza por su producción de tomate *Solanum lycopersicon* L. y chile pimiento *Capsicum annuum* L. abarcando los siguientes departamentos: El Progreso, Jalapa, Jutiapa, Chiquimula y Zacapa. En los cuales se ha reportado por los agricultores del área, el aparecimiento de la enfermedad denominada “marchitez”, desde el año de 1996 a la fecha.

4.1.1 Ubicación geográfica

Los Departamentos de El Progreso, Jalapa, Jutiapa, se encuentran situados en la región IV o Sur Oriente en la República de Guatemala. El Progreso, colinda al norte con los departamentos de Baja Verapaz y Alta Verapaz; al este con los de Zacapa y Jalapa; al sur y al oeste con el de Guatemala. **Cabecera:** Guastatoya **Altura:** 517 msnm. **Extensión:** 1,922 km². **Coordenadas:** 14° 51'18'' Latitud 90° 04'12'' Longitud. Jalapa, colinda al norte con los departamentos de El Progreso y Zacapa; al este con el de Chiquimula; al sur con los de Jutiapa y Santa Rosa; al oeste con el de Guatemala. **Cabecera:** Jalapa. **Altura:** 1,352 msnm. **Extensión:** 2,053 km². **Coordenadas:** 14°37'58'' Latitud 89° 59'20'' Longitud Jutiapa, colinda al norte con los departamentos de Jalapa y Chiquimula; al este con la República de El Salvador; al sur con el océano Pacífico y Santa Rosa; al oeste con Santa Rosa. **Cabecera:** Jutiapa. **Altura:** 905 msnm. **Extensión:** 3,219 Km² **Coordenadas:** 14° 17'49'' Latitud 89° 53'41'' Longitud.

Los Departamentos de Chiquimula y Zacapa se encuentran situados en la región III o Nororiente en la República de Guatemala. En donde Chiquimula, colinda al norteeeste con Zacapa y la República de Honduras; al este con el departamento de Jalapa; al sur con Jutiapa. **Cabecera:** Chiquimula, **Altura:** 424 msnm, **Extensión:** 2,375 km², **Coordenadas:** 14° 47'05'' Latitud 89° 32'48'' Longitud.

El Departamento de Zacapa, limita al Norte con los departamentos de Alta Verapaz e Izabal; al Sur con los departamentos de Chiquimula y Jalapa; al Este con el departamento de Izabal y la República de Honduras; y al Oeste con el departamento de El Progreso. **Cabecera:** departamental es Zacapa, **Coordenadas:** Latitud 14° 58' 21", Longitud: 89° 31' 42", **Extensión territorial:** 2,690 km².

4.1.2 Aspectos biofísicos

En Guatemala se han identificado 14 zonas de vida vegetal que comprenden desde zonas húmedas hasta zonas secas y que van desde zonas frías a zonas cálidas con altitudes que varían de los 0 a más de 4,000 msnm.

Con respecto a lo anteriormente descrito, el área de estudio para esta investigación se encuentra predominantemente ubicada en cuatro zonas de vida: Bosque Húmedo Subtropical Templado **bh-S (t)**; Bosque Seco Subtropical **bs-S**; Bosque Seco Tropical **bs-T**; Monte Espinoso subtropical **me-S**. Condicionando variables climáticas como humedad, precipitación, temperatura y estacionalidad época seca-húmeda.

4.1.2.1 Condiciones climáticas

El **me-S**, abarca un área que va desde la aldea el Jícaro en el Valle del Río Motagua, hasta la aldea El Tempisque, Jutiapa, cruzando hacia la Fragua, Zacapa, hasta llegar a Chiquimula, las condiciones climáticas están representadas por una temperatura que oscila de 24 a 26 °C, una escasa precipitación anual de 400-600 mm y una evapotranspiración de 1.30 %.

La topografía corresponde a terrenos de relieve plano a ligeramente accidentado, cuya elevación varía entre 180 y 400 msnm. El **bs-T**, abarca Laguna de Retana, Lago de Guija, Jutiapa y Frontera con la República de El Salvador, las condiciones climáticas se caracterizan por una temperatura de 24 °C, la precipitación alrededor de los 1,300 mm, la evapotranspiración de 1.25 %.

La topografía corresponde a terrenos de relieve plano a ondulado; la elevación varía entre 440 y 600 msnm. El **bs-S**, abarca una franja angosta, que rodea el monte espinoso del Valle del Motagua, baja hacia el sur por el Valle de Jocotán y Camotán, abarcando también parte de Chiquimula hasta Quezaltepeque e Ipala, en las planicies de Monjas, San Luís Jilotepeque (Jalapa), Santa Catarina Mita, Asunción Mita hasta San Cristóbal Frontera con El Salvador (Jutiapa); las condiciones climáticas registran una temperatura de media de 19 a 24 °C, precipitación de 855 mm y evapotranspiración de 1.50 %. La topografía presenta terrenos de relieve plano hasta accidentado en la parte baja de la Sierra de Las Minas; la elevación desde 0 hasta 440 msnm.

El **bh-S (t)**, abarca por lo menos la mitad del departamento de Jutiapa, en Jalapa y Chiquimula: Aguiatú, Agua Caliente frontera con El Salvador y El Florido, frontera con Honduras. Las condiciones climáticas se destacan por una temperatura entre 18 a 26 °C, la precipitación oscila entre 1,100 a 1,349 mm, la relación de evapotranspiración es de alrededor 1.00 %. La topografía presenta relieves ondulado a accidentado y escarpado, cuya elevación varía entre 650 msnm arriba del municipio de Camotán (Chiquimula) y hasta 1,700 en la aldea de Estanzuela (Zacapa).

La estacionalidad verano-invierno, registra un período de lluvias para las zonas de vida mencionadas, generalmente finalizando el ciclo de época seca en el mes abril, e inicia época lluviosa en el mes de mayo y culminando en el mes de noviembre, señalando que los meses de mayor intensidad de precipitación se reportan para finales del mes de mayo, luego de julio a octubre.

4.1.3 Consideraciones generales sobre el uso de la tierra (producción agrícola)

Las tierras de las zonas de vida, del área de estudio, generalmente son utilizadas y pueden ser en cultivos con regadío, siendo los cultivos predominantes: sandía ***Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai var. *Lanatus***, melón ***Cucumis melo* L.**, tomate ***Solanum lycopersicon* L.**, Chile ***Capsicum* sp.**, tabaco ***Nicotiana tabacum* L.**, pepino ***Cucumis sativus* L.**, cebolla ***Allium cepa* L.**, yuca ***Manihot esculentum* L.**, frijol ***Phaseolus vulgaris* L.**, maíz ***Zea mays* L.**

4.1.3.1 Producción de tomate y chile pimiento

Según el Instituto Nacional de Estadística (INE, 2002), la producción de tomate y chile pimiento, por departamentos y municipios oscila de la siguiente manera (mayor a menor producción/rendimiento):

a) Departamento de El Progreso: en el cultivo de chile pimiento, Sanarate 5,587 qq, con un rendimiento de 209.87 qq/mz (equivalente a 13,544.80 kg/ha), situándolo como el mayor productor del departamento, sin embargo con un rendimiento por área menor.

El Júcaro, una producción de 1,690 qq, con un rendimiento de 330.85 qq/mz (equivalente a 21,352.73 kg/ha), colocándolo como el municipio con el mayor rendimiento del área.

Guastatoya 861 qq, con un rendimiento de 215.13 qq/mz (equivalente a 13,884.27 kg/ha), es importante señalar que pese a su producción, posee un rendimiento relativamente promedio en comparación de los dos primeros productores.

En el cultivo de tomate: San Antonio la Paz 39,941qq, de producidos, con un rendimiento de 399.05 qq/mz (equivalente a 25,754.21 kg/ha), situándolo como el principal productor del cultivo en el departamento.

Sanarate 23,232 qq, producidos, con un rendimiento de 324.57 qq/mz (equivalente a 20,947.42 kg/ha), lo cual indica que es el segundo productor potencial en el departamento, sin diferir significativamente en el rendimiento con el anterior.

Morazán 17,248 qq, de producción, con un rendimiento de 346.26 qq/mz (equivalente a 22,347.27 kg/ha), siendo el tercer potencial en el departamento manteniéndose en el promedio, tanto de producción como de rendimiento (INE 2002).

b) Departamento de Jalapa: En el cultivo de chile pimiento, el municipio de Jalapa, cuenta con una producción de 2,414 qq con un rendimiento de 174.91 (equivalente a 11,288.51 kg/ha), colocándolo en primer plano en la producción de chile pimiento del departamento.

Mataquescuintla posee una producción de 1,425 qq, con un rendimiento de 133.68 (equivalente a 8,627.57kg/ha), situándolo en el segundo productor de importancia del cultivo, siendo un poco más del cincuenta por ciento de la producción del municipio anterior.

Monjas aporta 491 qq, de chile pimiento, con un rendimiento de 140.35 (equivalente a 9058.04 kg/ha), destacando como el tercer productor de importancia para el área. En el cultivo de tomate: Monjas en este caso es el principal productor del cultivo en mención con una producción de 54,621 qq, con un rendimiento de 402.33 (equivalente a 25,965.97 kg/ha).

Jalapa, este municipio produce 34, 636 qq de tomate con un rendimiento de 316.07 (equivalente a 20,398.84 kg/ha), siendo el segundo de importancia del departamento.

Mataquescuintla produce 8,405 qq, con un rendimiento de 240.92 (equivalente a 15,548.73 kg/ha), para colocarse en el tercer productor de importancia del área, es importante destacar el rendimiento alto, con respecto a su producción (INE, 2002).

c) Departamento de Jutiapa: En el cultivo de chile pimiento, El Progreso con una producción de 15,037 qq, con un rendimiento de 322.06 (equivalente a 20,785.43 kg/ha), situándolo como el principal productor del cultivo en el departamento.

Sta. Catarina Mita, presenta 4,912 qq, con un rendimiento medio de 115.85 (equivalente a 7,476.84 kg/ha), por lo cual se considera como el segundo productor del área.

Asunción Mita, corresponde a 1,874 qq, con un rendimiento de 217.24 (equivalente a 14,020.45 kg/ha), así también el municipio de Atescatempa, posee una producción similar de 1,820 qq, difiriendo en el rendimiento menor sobre el anterior, de 160.88, sin embargo se sitúan como el tercer productor de importancia para el departamento. En el cultivo de tomate: El Progreso con 192,304 qq, producidos con un rendimiento de 486 (equivalente a 31,365.95 kg/ha), siendo el principal productor del departamento.

Seguidamente Sta Catarina Mita posee 93,779 qq, de tomate, con un rendimiento de 279.08 qq (equivalente a 18,011.54 kg/ha), es importante señalar que el rendimiento en comparación con el anterior, es casi más del cincuenta por ciento del rendimiento de la producción más alta.

Agua Blanca cuenta con una producción de 31,061, rindiendo 419.39 qq (equivalente a 27,067.01 kg/ha) un valor alto para casi un tercio de la producción de los mayores productores del área (INE, 2002).

d) Departamento de Chiquimula: es notable, la baja producción de chile pimiento, el municipio de Esquipulas presenta una producción de 7,311 qq con un rendimiento de 228.74 (equivalente a 14,762.65 kg/ha), siendo la producción más alta y el principal proveedor para el área. La cabecera departamental, Chiquimula posee una producción de chile pimiento de 5,672 qq, con un rendimiento de 226.74 (equivalente a 14,633.57 kg/ha), similar con el municipio de Esquipulas. En tercer lugar se presenta a Concepción Las Minas con 1,025 qq, producidos con un rendimiento 224.63 (equivalente a 14,497.39 kg/ha) sin contrastar con el rendimiento de los dos anteriores, no así en la cantidad producida. Sin embargo es destacable la producción de tomate: Esquipulas con 81,636 qq, con un rendimiento de 470.15 (equivalente a 30,343.01 kg/ha); sin mayor diferencia en la producción el municipio de Ipala presenta 80,246 qq, con un rendimiento superior al anterior de 500.95 (equivalente a 32,330.81 kg/ha), por lo que sitúa a estos dos municipios como los mayores productores del departamento.

El municipio de Chiquimula, representa el segundo productor de importancia en el área con 14,899 qq, y con 352.57 (equivalente a 22,754.51 kg/ha) de rendimiento. Olopa y Camotán presentan producciones similares alrededor de 6,723 qq y 6,233 qq, con rendimientos totalmente distintos de hasta casi el cincuenta por ciento entre ambos, siendo de 601.74 (equivalente a 38,835.69 kg/ha) para el primero y 377.49 (equivalente a 24,362.83 kg/ha) para el segundo en mención, igualmente representan la tercera opción producción para este cultivo (INE, 2002).

e) Departamento de Zacapa: En el cultivo de chile pimiento, para el municipio de Estanduela la producción es de 3,234 qq, con un rendimiento de 206.16 (equivalente a 13,305.36 kg/ha), como principal productor del área, en segundo término se encuentra, Gualán con 1,700 qq, con el 147.44 (equivalente a 9,515.63 kg/ha) de rendimiento y por último el municipio de Teculután produciendo, 802 qq con un rendimiento de 200.34 (equivalente a 13190.90 kg/ha), valor relativamente alto para la cantidad producida. En el cultivo de tomate: El municipio de Gualán presenta la producción más alta para este cultivo con 61,476 qq, y un rendimiento de 484.20 (equivalente a 31,249.78 kg/ha), principal productor para este departamento.

Seguidamente la cabecera departamental (Zacapa) con 29,532 qq producidos y con el 371.20 (equivalente a 23,956.88 kg/ha) de rendimiento; por último se toma el municipio de Río Hondo con un 10,002 qq de tomate y un rendimiento de 625.13 (equivalente a 40,345.26 kg/ha), destacando su alto valor en el rendimiento para una producción de aproximadamente la sexta parte del primero y $\frac{1}{2}$ de la segunda producción (INE, 2002).

5 Objetivos

General

- Caracterizar aislamientos de cepas puras de *Ralstonia solanacearum* E.F. **Smith** asociados a marchitez bacteriana en los cultivos de tomate *Lycopersicon solanum* y chile pimiento *Capsicum annuum*, en las principales zonas productoras del oriente de Guatemala.

Específicos:

- Determinar e Identificar las biovares de *Ralstonia solanacearum* asociadas a marchitez bacteriana en tomate y chile pimiento y su distribución geográfica en los departamentos de El Progreso, Jalapa, Jutiapa, Zacapa y Chiquimula.
- Determinar las razas de *Ralstonia solanacearum* asociadas en tomate y chile en los departamentos de El Progreso, Jalapa, Jutiapa, Zacapa y Chiquimula.

6 Metodología

6.1 Selección de cultivos

Fueron seleccionados los cultivos de tomate y Chile pimiento debido a la susceptibilidad que presentan a la marchitez bacteriana *R. solanacearum* E.F. Smith, en varias áreas de los departamentos del oriente del país.

6.2 Selección del área

Se seleccionaron las principales áreas productoras de tomate y chile del oriente del país, en los departamentos de Jutiapa, Jalapa, Chiquimula, El Progreso y Zacapa, enmarcándose las principales áreas productoras de tomate como por ejemplo: Agua blanca, Ipala, Laguna de Retana, La Fragua, Asunción Mita, márgenes del Río Motagua desde Sanarate y así sucesivamente, de cual se seleccionaron agricultores que reportaron antecedentes de problemas con esa enfermedad. Sin descartar las áreas contempladas para cada departamento según la información referida, procedente del Instituto Nacional de Estadística (INE), del IV Censo Agropecuario.

6.2.1 Fase de campo

6.2.1.1 Colecta de material enfermo

Para esta fase se emplearon mapas (localizando zonas de producción y/o con presencia de sintomatología de la enfermedad) donde se estableció las áreas de muestreo, basados en el método de Muestreo Dirigido (French, 1980):

- Basado en fundamentos fitopatológicos: Toda área de cultivo de tomate y chile pimiento con síntomas de la enfermedad fue incluida y muestreada.
- Para el muestreo se tomaron de 2 a 3 plantas con síntomas de la enfermedad
- Se realizó una prueba rápida para detectar la presencia de la bacteria, en este caso una prueba rápida de flujo bacteriano.
- Se tomaron coordenadas para la localización del área muestreada con ayuda de GPS, valiéndose de una boleta de campo (identificación y reconocimiento de las muestras), para la posterior digitalización de la información recolectada.

6.2.2 Prueba de flujo bacteriano

Esta prueba se realizó, con el objetivo de rectificar la presencia de la bacteria, indicando recolecta o toma de muestra para el análisis seguido de laboratorio.

Las colectas de material con síntomas de la enfermedad fueron realizadas en campo, en terrenos de agricultores de cultivos afectados por la marchitez bacteriana; previa entrevista con el agricultor que manifestó presencia de la enfermedad con base a sintomatología. La sintomatología se enmarcó dentro del marchitamiento y muerte de plantas, necrosis vascular de los cultivos (32,33).

6.3 Fase laboratorio

6.3.1 Aislamiento del patógeno

- Se procedió a la obtención del exudado de la bacteria del material vegetal colectado (tallos), utilizando tubos de ensayo y agua estéril.
- Se realizó la siembra de la bacteria mediante estriados que diluyeron la concentración de colonias en el medio.

Esto se llevó a cabo dentro de una cámara de flujo laminar, y sobre medio nutritivo para la bacteria (5-2-3) Según Kado & Heskett (1970) citado por Orozco (1997).

- Se procedió a la colocación de las cajas petrí, en una incubadora previamente calibrada dentro de los 28⁰C para dar la condición optima para el crecimiento de las colonias de bacterias, con un período de 48 a 72 horas (Orozco, 1997).
- Se inició el proceso de purificación de la bacteria, seleccionando colonias que correspondían con las características morfológicas y serológicas propias de la bacteria, para su posterior replicación en el medio nutritivo idóneo (medio 5-2-3) Kado & Heskett (1970) citado por Orozco (1997).
- Medio 5-2-3 Kado & Heskett (1970) citado por Orozco (1997): preparación para/1000 ml: Dextrosa 5 gramos, Caseína hidrolizada 4 g, Extracto de Levadura 2 g, K₂HPO₄ 2 g, MgSO₄.7H₂O 3 ml., Agar 20 g, y completar con agua destilada.

6.4 Pruebas de identificación rápida de *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith

Se realizaron pruebas rápidas de identificación de la bacteria, las cuales fueron: prueba de ELISA, prueba de KOH, tinción de Gram y análisis de caracteres morfológicos (Arai, 2001; Orozco, 1997; Orozco, 2004).

6.5 Siembra en medio de cultivo (CGP+Cloro Trifenil, TZC)

Se preparó la cantidad necesaria de medio CGP+Cloro Trifenil, TZC para el llenado de cajas Petri, para el reaislamiento, de la bacteria. Medio CGP para 1000 cc.: Dextrosa 10 g., Peptona 10 g., Caseína ácida 1 g, Agar-agar 18 g, Agua 1000 ml. y Triphenyl tetrazolium chloride (TZC) 0.5 ml (se coloca posterior al proceso de esterilización en autoclave).

Este medio es útil para distinguir *Ralstonia solanacearum*, y colonias virulentas positivas, cuyas características, fue la formación de estrías de coloración fucsia. Todos estos procedimientos se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología (FAUSAC).

6.6 Preservación de la bacteria

Luego de completar el ciclo de purificación, se realizó la preservación de la misma conformando un cepario.

Los ceparios que se realizaron constaron de dos metodologías: Conservación en agua y Conservación en seco (mediante tiras de papel.) (Díaz 1999; Orozco, 1997).

- Conservación en agua: se utilizó agua esterilizada, los procedimientos se llevaron a cabo con la ayuda de una cámara de flujo laminar, para evitar la contaminación del medio, tomando con un aza, una alícuota de la colonia purificada, diluyéndola, en tubos de ensayos conteniendo 10ml de agua esterilizada, procedimientos efectuados con cada una de las muestras (Orozco, 1997; Orozco, 2004).
- Conservación en seco (tiras de papel), según método de Takatsu (1980): se llevara acabo mediante dos soluciones concentradas de Glucosa-agar-agar (sol. A) y Gelatina-agua (sol. B), que fue vertida en pequeños tubos Eppendorf de 1.5 ml de capacidad (Orozco, 1997; Orozco, 2004).

- Posteriormente, se tomaron siembras en cajas de petrí de no más de 42 horas, utilizando una cámara de flujo laminar, se procedió a mezclar las dos soluciones referidas con anterioridad y se depositaron, sobre la siembra pequeños papeles de aproximadamente 1.5 cm de largo por 0.5 cm de ancho, generando contacto y absorción de la mezcla que conservaron colonias viables de la bacteria, para su posterior reactivación por hidratación.

6.7 Determinación de la presencia de *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Esta prueba se realizó basándose en el principio de la reacción en cadena de la polimerasa, que se compone de ciclos de desnaturalización, alineamiento de oligonucleótidos y síntesis de fragmentos de ADN (extensión), para la ratificación de que las cepas aisladas y purificadas pertenecen a la especie *R. solanacearum* se procedió de la siguiente forma:

- a. Se realizaron copias de las cepas aisladas en medio selectivo (CGP+TZC) para la propagación de células viables de *R. solanacearum*, con un periodo de crecimiento de 48 horas idóneas para la obtención de ADN para la realización de la PCR.
- b. Se preparó la mezcla con los cebadores generales ((0.5 μ M), (0.2mM de nucleótidos, dNTP), (2.5 U por 100 μ l de taq polimerasa)), con un total de 25 a 100 μ l por cada muestra, cuya secuencia corresponde (Opina 1997):
759 (5'-GTCGCCGTCAACTCACTTTCC-3')
760 (5'-GTCGCCGTCAGCAATGCGGAATCG-3')
- c. Se amplificaron las reacciones de PCR en un termociclador PTC.-200, bajo las siguientes condiciones: un inicio de 96°C durante 3 minutos, seguidos de 30 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C, completando la reacción con 5 minutos a 72°C. (Procesos completos de desnaturalización, alineación y extensión) (Becerra y Paredes 2007; Denny y Hayward 2001; Hirano, 2000).

- d. Con la reacción en cadena de la polimerasa completada se efectuó el corrido de las cadenas de ADN, en un gel de agarosa a 1.5% llevándose a cabo el procedimiento de electroforesis:
- Pesar y preparar la solución de agarosa.
 - Fundir la solución de agarosa en un horno de microondas (sin rebalses de hervor).
 - Enfriar la solución a una temperatura de 50⁰ C. Colocar la solución en un recipiente o molde de gel (nivelado horizontalmente), colocar el molde de los pozos (peine) o celdas.
 - Reposar para solidificación (30 minutos).
 - Colocar el gel sólido sobre la cámara de electroforesis, agregar buffer (0.5 x TBE o 1 x TAE), hasta 1 cm sobre el gel (Hirano, 2000).
 - Adicionar 1/5 de volumen de buffer de cargador (azul de bromofenol, xilencianol, glicerol) por muestra de ADN.
 - Llenar los pozos o los agujeros del gel, cuidando de no contaminar las muestras.
 - Proveer la fuente de poder a la cámara, determinando el voltaje de acuerdo a la solución buffer que se esté utilizando: TAE 50V/gel de 10 cm de longitud. TBE 100V/gel de 10 cm de longitud.
 - Terminar la electroforesis cuando el color del cargador (azul de bromofenol) haya recorrido aproximadamente 2/3 de la longitud total del gel.
 - Tinción con bromuro de etidio: terminado el trabajo en la cámara de electroforesis se retira el gel y se sumerge en una solución de Bromuro de Etidio y Buffer, durante un tiempo aproximado de 30 minutos con agitación, con el objetivo de que el gel se tiña a temperatura ambiente (100 ml de buffer agregar 1 μ m de bromuro de etidio).
 - Colocar sobre un trasiluminador y observar con luz ultravioleta (usar equipo de protección en los ojos).
 - Detectar las bandas y fotografiar (Hirano, 2000).

6.8 Determinación de biovars de los aislamientos obtenidos de *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith

Apoyándose en la información recabada sobre los métodos de caracterización de la bacteria, presentada en el marco teórico, se utilizó la metodología de Hayward (1954), correspondiente en la identificación de las biovars 1, 2, 3, y 4 descritos por este autor sobre la base de la capacidad de oxidar y/o producir ácidos a partir de los azúcares: lactosa, maltosa, celubiosa, manitol, sorbitol y dulcitol tal como relata Orozco (1997).

La elaboración de los azúcares y alcoholes como medio se realizó de forma separada, para cada uno de ellos, posteriormente se prepararon las muestras contenidas en el cepario previo a la siembra en cada uno de los medios.

- Medio de “Carbohidratos” para la determinación de biovars *R. solanacearum*, según Hayward, (1954 y 1976) citado por Orozco 1997.

Reactivos: $\text{NH}_4 \text{H}_2 \text{PO}_4$ (Fosfato de amonio hidrogenado) 1.0 g, KCl (Cloruro de Potasio) 0.2g, Sulfato Magnesium ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.2g, Peptona 1.0g, Azul de bromotimol 0.03g y Agar 3.0g.

A este medio basal se le agregó la solución de azúcares y alcoholes de previo filtración de la siguiente manera: 1g (azúcar) + 5ml H_2O y 1 g (alcohol) + 5ml de agua destilada.

- Inoculación: se efectuó con las cepas conservadas en agua, en tubos de ensayo estériles de 10 ml, conteniendo 5 ml del medio basal semisólido con (azúcares y alcoholes), con la ayuda de una cámara de flujo laminar, y una micropipeta 20-200 μl para la inoculación de 30 μl de la bacteria.
- Incubación: Los tubos inoculados fueron incubados a temperatura de 28°C ,
- Observaciones: se tomaron lecturas en un período de 48 horas, durante tres semanas, de acuerdo a el uso del disacárido o la oxidación del alcohol que la cepa (bacteria) produjo, siendo la acidificación del medio, expresada por el cambio de color del medio de verde (pH neutro), a amarillo (pH ácido) (7).
- Luego se aplicaron los conceptos de determinación de biovars de *R. solanacearum* de acuerdo a la producción de ácido a partir de azúcares y alcoholes, según Hayward (1954), descrito en el cuadro siguiente:
- Metodología de Hayward 1954, cuadro 1.

6.9 Determinación e identificación de Raza 3 de *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, utilizando la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Cumpliendo de nueva cuenta los procesos y principios de PCR. Se procedió de la siguiente forma:

- a. Se realizaron copias de las cepas aisladas en medio selectivo (CGP+TZC) para la propagación de células viables de *R. solanacearum*, con un periodo de crecimiento de 48 horas idóneas para la obtención de ADN para la realización de la PCR.
- b. Se preparó la mezcla con los cebadores específicos para raza 3 en tubos Eppendorf ((0.5 µl), (0.25 µl de nucleótidos, dNTP), (2.5 U por 100 µl de taq polimerasa)), con un total de 25 a 100 µl por cada muestra, cuya secuencia corresponde a (Weller, 2000):

630 (5'-ATACAGAATTTCGACCGGCAC-3')

631 (5'-AATCACATCCAATTCGCCTACG-3')

- c. Se amplificaron las reacciones de PCR en un termociclador PTC-200 las siguientes condiciones: un inicio de 96°C durante 3 minutos, seguidos de 30 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C, completando la reacción con 5 minutos a 72°C. (Procesos completos de desnaturalización, alineación y extensión).
- d. Con la reacción en cadena de la polimerasa completada se efectuó el corrido de las cadenas de ADN, en un gel de agarosa a 1.5% llevándose a cabo el procedimiento de electroforesis (Buffer 0.5 x TBE) durante un promedio de 20 minutos.
- e. Seguidamente la gel fue colocada y sumergida en Bromuro de Etidio para la tinción de ADN, visualizándose las bandas del mismo con luz ultravioleta (Becerra y Paredes, 2007; Hirano, 2000).

6.10 Distribución geográfica de los biovares caracterizados

Luego de tener completada la caracterización de los biovares, se procedió a la digitalización de las coordenadas de los puntos de muestreo, por medio de software diseñados para el efecto, en la unidad Sistemas de Información Geográfica (S.I.G.) de la Facultad de Agronomía.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Fase de campo

7.1.1 Área muestreada y colecta de material vegetal

Basados en el método de Muestreo Fitopatológico Dirigido (French, 1980), se obtuvo el listado de localidades con presencia de la bacteria *R. solanacearum*, según cuadro 4.

Cuadro 4. Lista de localidades tomadas con GPS (Maguellan) con registro de presencia de bacteria *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith para determinar biovares.

Departamento	Localidad	Coordenadas UTM		Presencia (+) Ausencia (-) de Enfermedad	Cultivo
El Progreso	Los Llanos	801517	1632834	+	Tomate/Chile
	Los Llanos	799709	1633609	+	Tomate/Chile
	San Miguel Conacaste	797194	1639560	-	
	San Miguel Conacaste	796222	1637771	-	
	El Upayón	798022	1637321	-	
	El Upayón	799276	1638119	-	
	Los Cerritos (Sansare)	810062	1633533	-	
	Los Planes (Sn. Antonio, La Paz)	793598	1628946	+	Tomate
	Los Planes (Sn. Antonio, La Paz)	793464	1629087	+	Tomate
Jalapa	Aldea El Obraje (Monjas)	836662	1608455	-	
	Aldea Chaguite (Monjas)	822100	1624970	-	
	San Antonio (Monjas)	827634	1606767	+	Tomate/Chile
	San Antonio (Monjas)	830002	1607750	+	Tomate
	Aldea La Campana (Monjas)	837695	1601556	-	
	Aldea Culima San Luís Jilotepeque	856852	1618745	-	

Jutiapa	Aldea El Obrajuelo (Agua Blanca)	862829	1600867	-	
	Aldea La Acequia	838537	1585364	+	Tomate
	Aldea La Esperanza	859456	1608655	+	Tomate
	Guayavias (Agua Blanca)	859168	1600699	-	
	Aldea La Tuna (Agua Blanca)	857993	1599456	-	
	Aldea El Tempisque (Agua Blanca)	863459	1604694	+	Tomate/Chile
	Aldea El Tempisque (Agua Blanca)	863326	1604921	+	Tomate/Chile
	Laguna de Retana (El Progreso)	840171	1593991	+	Tomate
	Laguna de Retana (El Progreso)	838650	1594886	-	
	Laguna de Retana (El Progreso)	841335	194886	-	
	Laguna de Retana (El Progreso)	841693	1595468	-	
	Asunción Mita	855006	1586953	-	
	Atescatempa	851828	1569334	-	
	San Cristóbal Frontera	859863	1570640	-	
	El Jicaro (Yupiltepeque)	848893	1571768	-	
	Yupiltepeque	846298	1571768	+	Tomate
Aldea El Tobón (Agua Blanca)	863451	1598665	-		
Chiquimula	Aldea El Volcán (Jocotán)	893424	1649610	+	Tomate
	Aldea El Barbasco (Jocotán)	895251	1650594	+	Tomate/Chile
	Aldea Shupá (Camotán)	892081	1660386	+	Tomate/Chile
	Aldea Shupá (Camotán)	892532	1643987	+	Tomate/Chile
	Aldea La Libertad (Camotán)	892564	1645841	+	Tomate/Chile
	Aldea La Coronada (Ipala)	868508	1619305	+	Tomate
	Aldea La Coronada (Ipala)	868790	1619819	+	Tomate
Zacapa	La Fragua (Zacapa)	871171	1656446	+	Tomate
	La Fragua (Zacapa)	872247	1655209	+	Tomate
	San Jorge (Zacapa)	871912	1684989	+	Tomate/Chile
	La Jigua (La Unión)	892513	1652325	+	Tomate

Fuente: Base de datos proyecto **AGROCYT 0-41-2004** "Principales Aspectos epidemiológicos de la Marchitez bacteriana, causada por *R. solanacearum*, en el cultivo de tomate *Solanum lycopersicon* L. en el oriente de Guatemala".

7.2 Fase laboratorio

7.2.1 Aislamiento del patógeno

El flujo bacteriano de las muestras colectadas con anterioridad, fueron sometidos a el Test de ELISA (reacción en membranas de nitrocelulosa), específico para la detección de *R. solanacearum*; las muestras que reaccionaron positivamente se procedió a darles una nomenclatura o código de aislamiento (cuadro 5), obteniendo los siguientes resultados para el proceso de pruebas rápidas de identificación, fueron sembradas por estriación, en placas o cajas de petrí, en medio nutritivo 5-2-3 de Kado & Heskett (1970), citado por Orozco (1997).

Cuadro 5. Procesamiento de muestras positivas previo purificación de los aislamientos y asignación de código para identificación de cepas.

Departamento	Localidad	Código de Aislamiento
El Progreso	Los Llanos	M1
	Los Llanos	M2
	San Miguel Conacaste	M3
	San Miguel Conacaste	M4
	El Upayón	M5
	El Upayón	M6
	Los Cerritos (Sansare)	M7
	Los Planes (Sn. Antonio, La Paz)	M8
	Los Planes (Sn. Antonio, La Paz)	M9
Jalapa	Aldea El Obraje (Monjas)	M10
	Aldea Chaguite (Monjas)	M11
	San Antonio (Monjas)	M12
	San Antonio (Monjas)	M13
	Aldea La Campana (Monjas)	M14
	Aldea Culima San Luís Jilotepeque	M15
Jutiapa	Aldea El Obrajuelo (Agua Blanca)	M16
	Aldea La Acequia	M17
	Aldea La Esperanza	M18
	Guayavias (Agua Blanca)	M19

	Aldea La Tuna (Agua Blanca)	M20
	Aldea El Tempisque (Agua Blanca)	M21
	Aldea El Tempisque (Agua Blanca)	M22
	Laguna de Retana (El Progreso)	M23
	Laguna de Retana (El Progreso)	M24
	Laguna de Retana (El Progreso)	M25
	Laguna de Retana (El Progreso)	M26
	Asunción Mita	M27
	Atescatempa	M28
	San Cristóbal Frontera	M29
	El Jicaro (Yupiltepeque)	M30
	Yupiltepeque	M31
	Aldea El Tobón (Agua Blanca)	M32
Chiquimula	Aldea El Volcán (Jocotán)	M33
	Aldea El Barbasco (Jocotán)	M34
	Aldea Shupá (Camotán)	M35
	Aldea Shupá (Camotán)	M36
	Aldea La Libertad (Camotán)	M37
	Aldea La Coronada (Ipala)	M38
	Aldea La Coronada (Ipala)	M39
Zacapa	La Fragua (Zacapa)	M40
	La Fragua (Zacapa)	M41
	San Jorge (Zacapa)	M42
	La Jigua (La Unión)	M43

Código de aislamiento: (M)= muestra, (No.)= numeración correlativa, en relación a la colecta y área (cuadro 4) y el procesamiento a nivel de laboratorio.

7.3 Caracterización fenotípica

7.3.1 Caracterización morfológica

En cuanto a morfología pueden ser observaron dos tipos de colonias: **1)** fluida (mucoide) debido a la producción del polisacárido extracelular (EPS), lisa, irregular y redondeada; **2)** Se identificó a una colonia mutante con apariencia seca, traslúcida, rugosa y no es fluida.

7.3.1.1 Siembra en medio de cultivo de Tetrazolio (CGP+Cloro Trifenil, TZC)

En el proceso de identificación de la bacteria, se siguió la metodología descrita, determinando en las colonias características del crecimiento (color, elevación, superficie), la morfología y las respuestas a las pruebas fisiológicas (crecimiento a 30⁰ C y 41⁰ C).

En el medio CGP+TZC, las colonias normales virulentas, son lisas, fluidas irregulares, blancas o levemente rojas, en el centro de la colonia y las mutantes avirulentas son completamente opuestas. Las diferencias entre los tipos de colonias y niveles de virulencia están relacionadas con la presencia y cantidad del mucopolisacárido extracelular que produce la bacteria (Kelman, 1965).

Este patógeno presentó gran variación en la mayoría de las cepas, debido a que su tasa de mutación a un tipo de colonia avirulenta puede ser muy rápido, de acuerdo a los estudios realizados por French *et al*; 1995.

Con base a lo descrito, los resultados de los 23 aislamientos que se presentan en el cuadro 4, se obtuvieron resultados positivos al aislamiento y presencia de flujo bacteriano ante la prueba rápida de ELISA. En las pruebas serológicas en medio nutritivo 5-2-3 y CGP+TZC, los resultados fueron positivos para 11 aislamientos, presentando colonias lisas, fluidas, irregulares, de color blanco levemente rojizas o fucsias, formando estrías en el centro de las mismas; en lo que se refiere al crecimiento, respecto a la temperatura, satisfactorios y positivos en las características desde los 28⁰C.

De esta cuenta, se procedió a dar una nueva nomenclatura, en la cual se asignó la letra "A"= aislamiento o colonia pura, conservando el numeral indicando lugar de colecta y posicionamiento geográfico, continuando con el preservado y posteriormente a las pruebas bioquímicas y diagnóstico molecular.

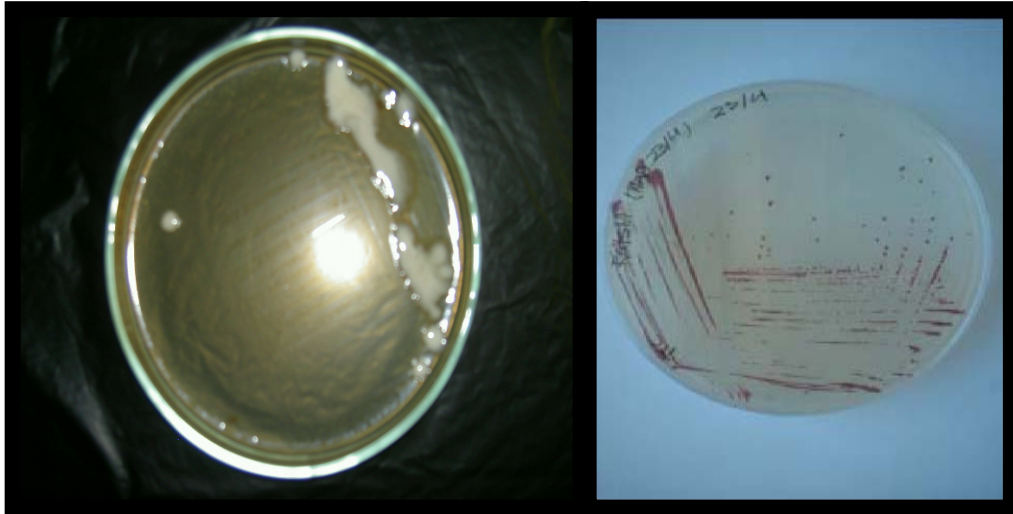


Figura 10-11: Placa con colonias puras de 48 horas de *Ralstonia solanacearum*: (a) medio 5-2-3 incubación y (b) medio CGP+TZC resultados del proceso de caracterización morfológica y purificación.

El cuadro 6, presenta la nueva nomenclatura de acuerdo a los resultados positivos de la caracterización morfológica y purificación, correspondiente a procesos serológicos, además de identificar el rango de hospederos, para la determinación de raza.

Cuadro 6: Nomenclatura para preservación, análisis bioquímico y diagnóstico molecular (PCR).

Código de Aislamiento	Departamento	Localidad	Hospedero
A1	El Progreso	Los Llanos (Sanarate)	Tomate
A2	El Progreso	Los Llanos (Sanarate)	Tomate/Chile pimiento
A3	Jalapa	Sn. Antonio (Monjas)	Tomate/Chile pimiento
A4	Jutiapa	Aldea El Tempisque (Agua Blanca)	Tomate
A5		Laguna de Retana (El Progreso)	Tomate y chile pimiento
A6	Chiquimula	Aldea La Coronada (Ipala)	Tomate
A7		Aldea Talquezal-Barbasco (El Volcán, Jocotán)	Tomate
A8		Aldea Shupá (Camotán)	Tomate/Chile pimiento
A14	Control Positivo/biovar 2-raza 3		Papa
A15		Aldea Shupá (Camotán)	Tomate/Chile Jalapeño
A21		Aldea La Libertad (Camotán)	Tomate/Chile Jalapeño
A31	Zacapa	La Jigua (La Unión)	Tomate

Estas pruebas resultaron apropiadas, facilitando aislar e identificar células viables de *R. solanacearum*, especialmente del material vegetal colectado (Tallos de plantas con síntomas de la enfermedad) en las zonas productoras de tomate *Solanum lycopersicon* L. y chile pimiento *Capsicum annuum* L. del oriente de Guatemala.

7.4 Preservación de la bacteria

Conservación en agua: Se utilizó agua destilada y autoclaveada, los procedimientos se realizaron en una cámara de flujo laminar, para evitar la contaminación del medio, tomando con una punta de micropipeta, una alícuota de la colonia purificada, diluyéndola, en tubos eppendorf conteniendo 500 μ l de agua esterilizada, procedimientos efectuados con cada una de las muestras.

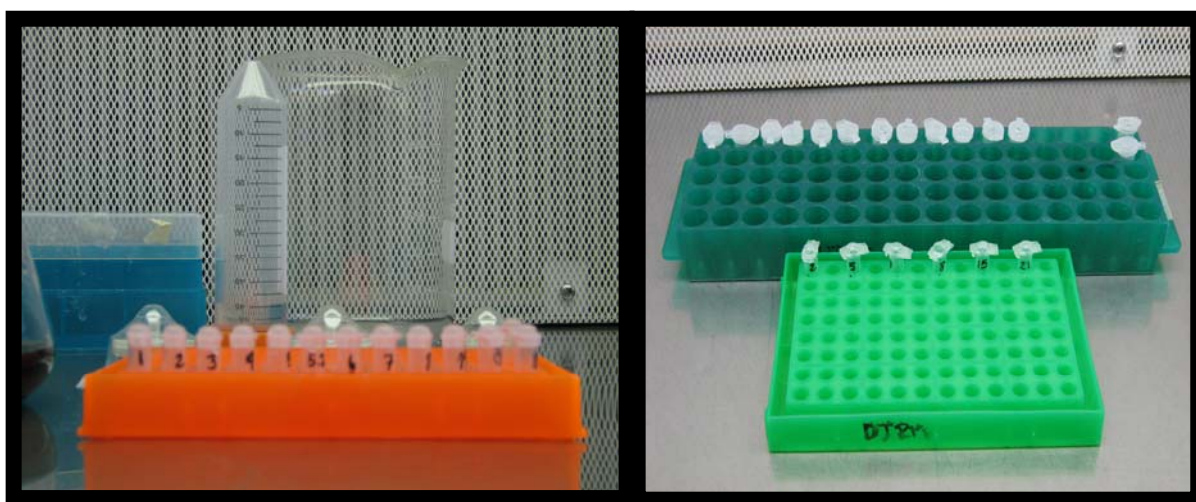


Figura 12-13. Colección de cepas aisladas (Ceparío).

Sobre este procedimiento se fundamentó la realización del ceparío para las consecuentes pruebas de la investigación por su versatilidad (Bioquímica y PCR). En la figura 12 de muestra la colección utilizada para el diagnóstico de PCR y la figura 13 muestra el ceparío utilizado para la prueba bioquímica.

7.5 Determinación de la presencia de *Ralstonia solanacearum* utilizando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% se detectó la banda de 280-281 pb en los 12 aislamientos generada por amplificación con el cebador general 759 y 760. El fragmento de tamaño de 280 pares de bases permitió identificarlas como *R. solanacearum*.

- Diagnóstico realizado en el Laboratorio de Biotecnología, de la FAUSAC, figura 14.

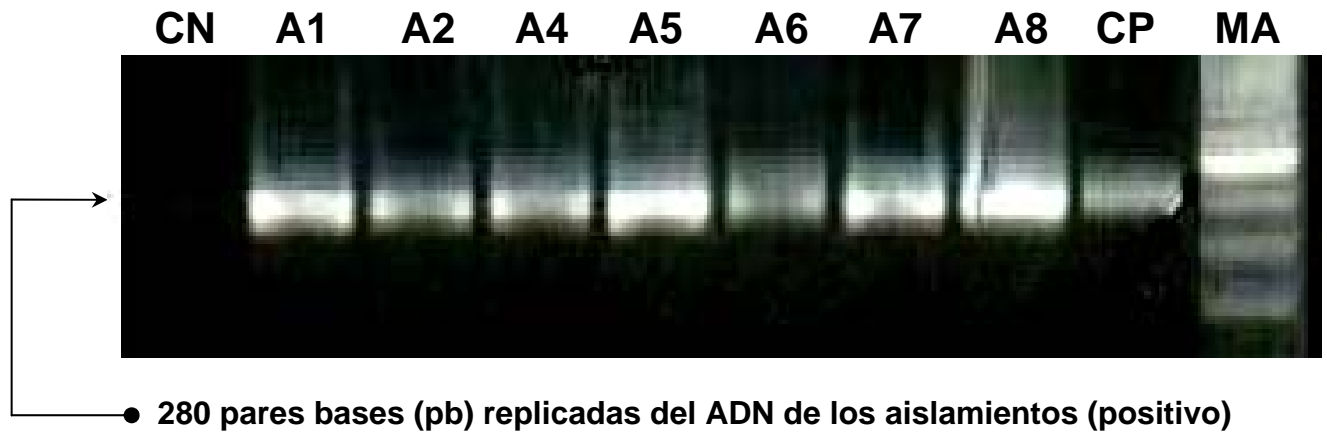


Figura 14. Producto amplificado mediante PCR utilizando los cebadores específicos 559 y 560 en la región 16S ARNr de *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, de 280-281 pb.

Se cumple con el principio de identificación de *R. solanacearum*, con la amplificación, de la banda de 280 pb. con un marcador específico, la visualización de bandas con luz ultravioleta (resultado positivo) de 280 y 281 pares de bases, lo cual indica que las 12 cepas obtenidas (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A14, A15, A21, A31) corresponde a *R. solanacearum* y entre los controles positivos (CP), contrario a la no visualización de bandas, en el control negativo (CN). Por lo tanto, la eficiencia de este procedimiento en la identificación de la especie de la bacteria en estudio, es determinante y exacto.

7.6 Determinación de biovares de los aislamientos obtenidos e identificados de *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith

Se observó la habilidad de *R. solanacearum* de oxidar, el cual se pudo observar por el cambio de color del medio basal de carbohidratos inoculado en la bacteria: medio de color verde oliva, reacción negativa; cambio de color verde a amarillo de arriba hacia abajo, reacción positiva, con producción de ácidos a partir de disacáridos u oxidación de los alcoholes hexosa Figuras 15-22.



Figura 15-16. Preparación y servido del medio basal de carbohidratos para la determinación bioquímica de *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith; 2006.

- Controles o testigos

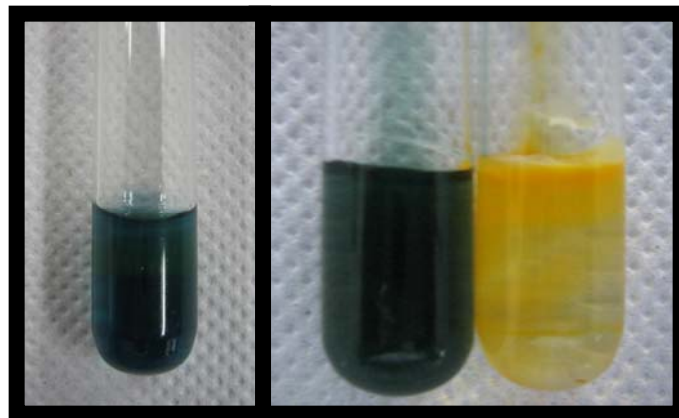


Figura 17-18. Tubos de ensayo con medio basal de Carbohidratos con una reacción negativa (verde) y reacción positiva (amarillo).

- Resultados

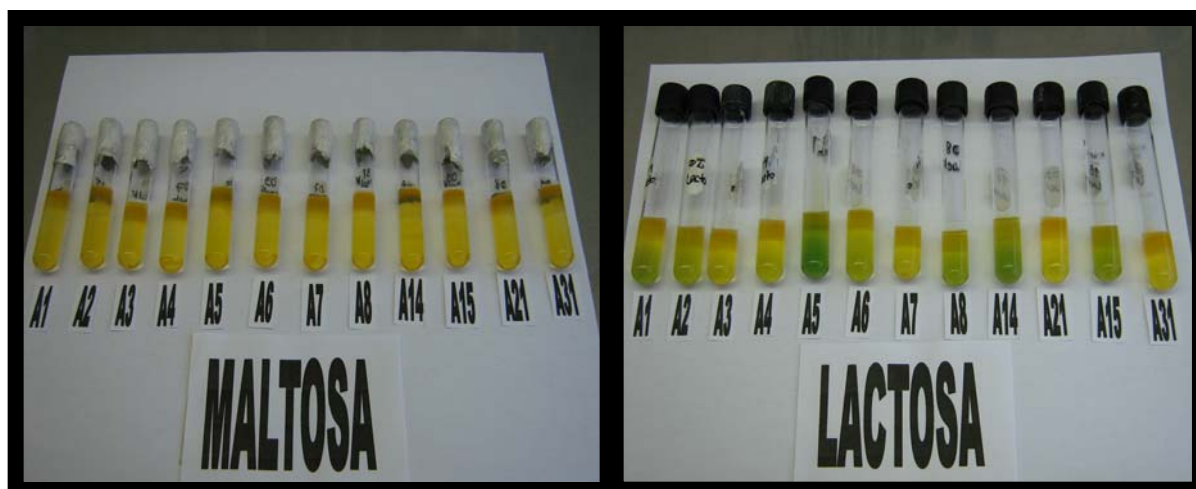


Figura 19-20. Tratamientos positivos a la producción de ácido a partir de disacáridos (azúcares), correspondiente al biovar 3.

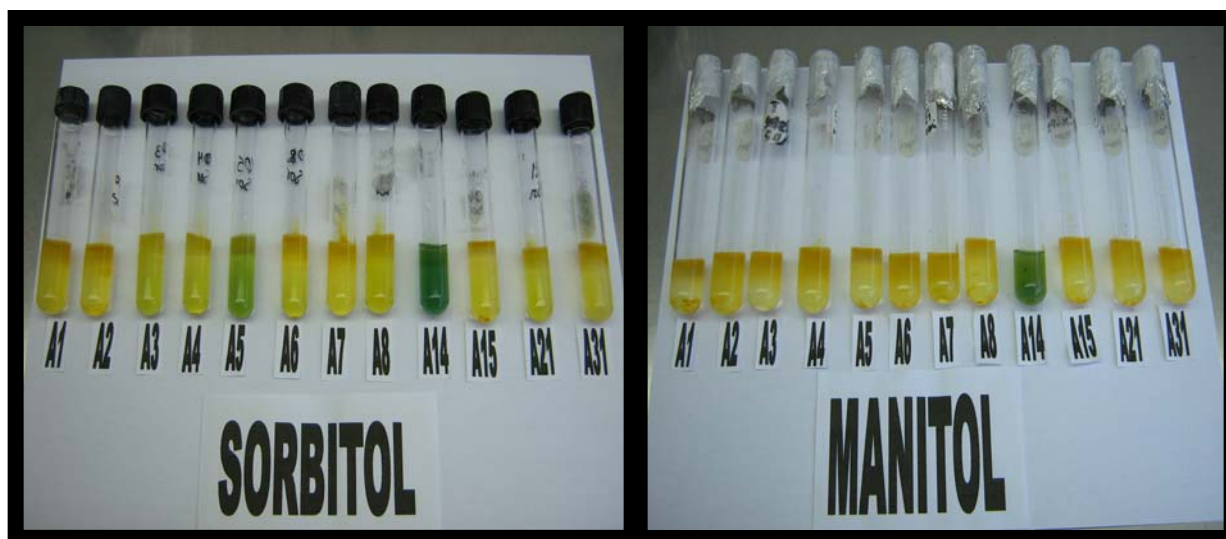


Figura 21-22. Tratamientos positivos a la oxidación de alcoholes hexosa, correspondiente al biovar 3.

Los resultados obtenidos de las cepas seleccionadas previamente e identificadas como *R. solanacearum*, con los cebadores específicos se clasifican en Biovar: Bv 3 = positivo para la utilización de los disacáridos y la oxidación de los alcoholes, para los 11 aislamientos evaluados del área de estudio.

A través del análisis bioquímico realizado se comprueba que *R. solanacearum*, contiene abundantes enzimas, por ejemplo aquellas que inician la degradación de substratos como la glucosa, o la transformación de compuestos inorgánicos como los nitratos, además de las reacciones de oxido reducción de alcoholes. Lo que destaca a este biovar caracterizado, es su proliferación a alta temperatura (rango 28-35 °C) y humedad relativa alta (55-65%), lo que nos lleva a ratificar, que el desarrollo de la marchitez bacteriana y su patógeno, dependen principalmente de temperaturas altas.

Se evidenció la variante del aislamiento, **A14** positivo para la utilización de los disacáridos (formación de ácidos), negativo para la oxidación de los alcoholes: cumpliendo con la finalidad de **control positivo para biovar 2-raza 3 (papa)**.

Al igual que las pruebas de identificación rápida de la bacteria, el análisis bioquímico de cepas, se encuentra directamente ligado con características que posee la membrana celular de la bacteria.

7.7 Determinación e identificación de Raza 3 de *Ralstonia solanacearum* utilizando la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% no se detectaron en los 12 aislamientos, la banda de control positivo (aislamiento donado por Sánchez, (2006) del cepario de estudio filogenético y de distribución de la bacteria *R. solanacearum*) generada por amplificación con el cebador específico 630 y 631.

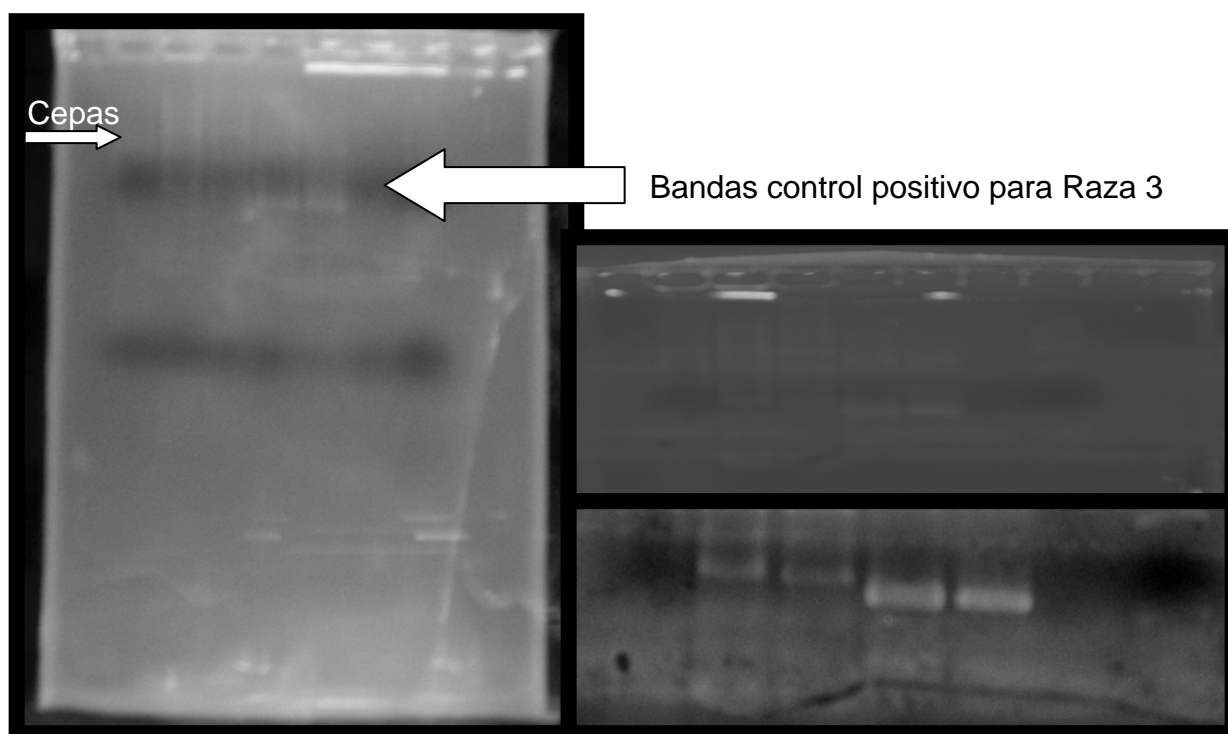


Figura 23-24. Producto amplificado mediante PCR utilizando los cebadores específicos 630 y 631 en la identificación de raza 3, de *R. solanacearum* E.F. Smith (Resultado negativo).

Es importante mencionar que los resultados obtenidos en esta fase, coinciden con las muestras aisladas de tomate en Sanarate, Agua Blanca, el Asintal, Monjas Jalapa, Ipala; muestras aisladas de quilete colectado en Sanarate, berenjena colectado en Estanzuela, Zacapa, por Sánchez, (2006), en el **Estudio Filogenético y Distribución de la Bacteria *R. solanacearum*, en Guatemala**, en el cual, resulta positivo para el cebador general de PCR, para la presencia de la bacteria, negativo para PCR del cebador específico de **Raza 3**, clasificándose en **filotipo I, Secuevar 14**, cuyo origen es **Asia**.

7.8 Digitalización de la distribución geográfica de los biovares caracterizados.

7.8.1 Mapa de distribución geográfica en áreas de colecta de *Ralstonia solanacearum*.

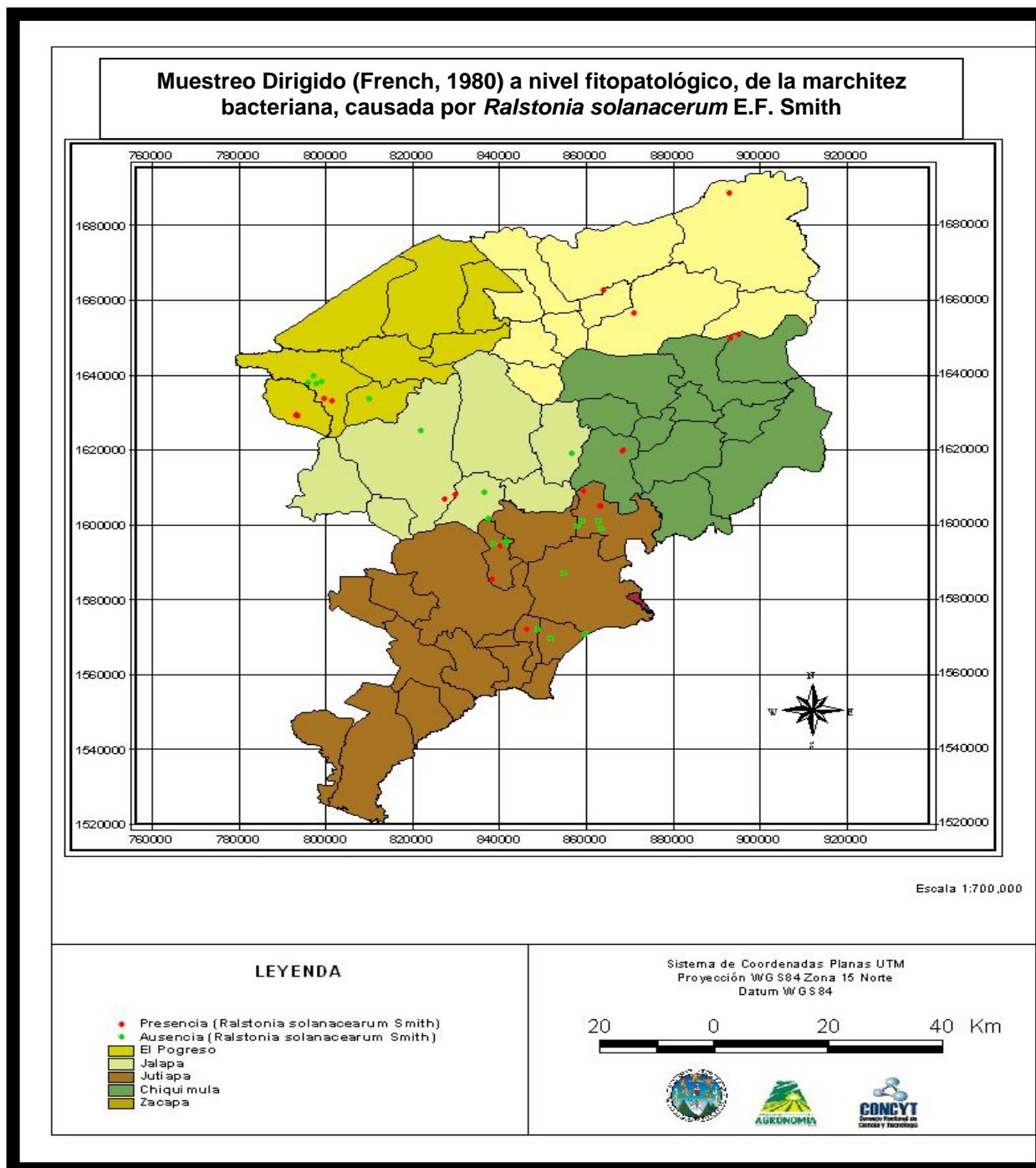


Figura 25. Mapa de muestreo dirigido (French, 1980) de la marchitez bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, en el oriente de Guatemala.

7.8.2 Mapa de distribución Biovar 3, Raza 1 de *R. solanacearum* E.F. Smith

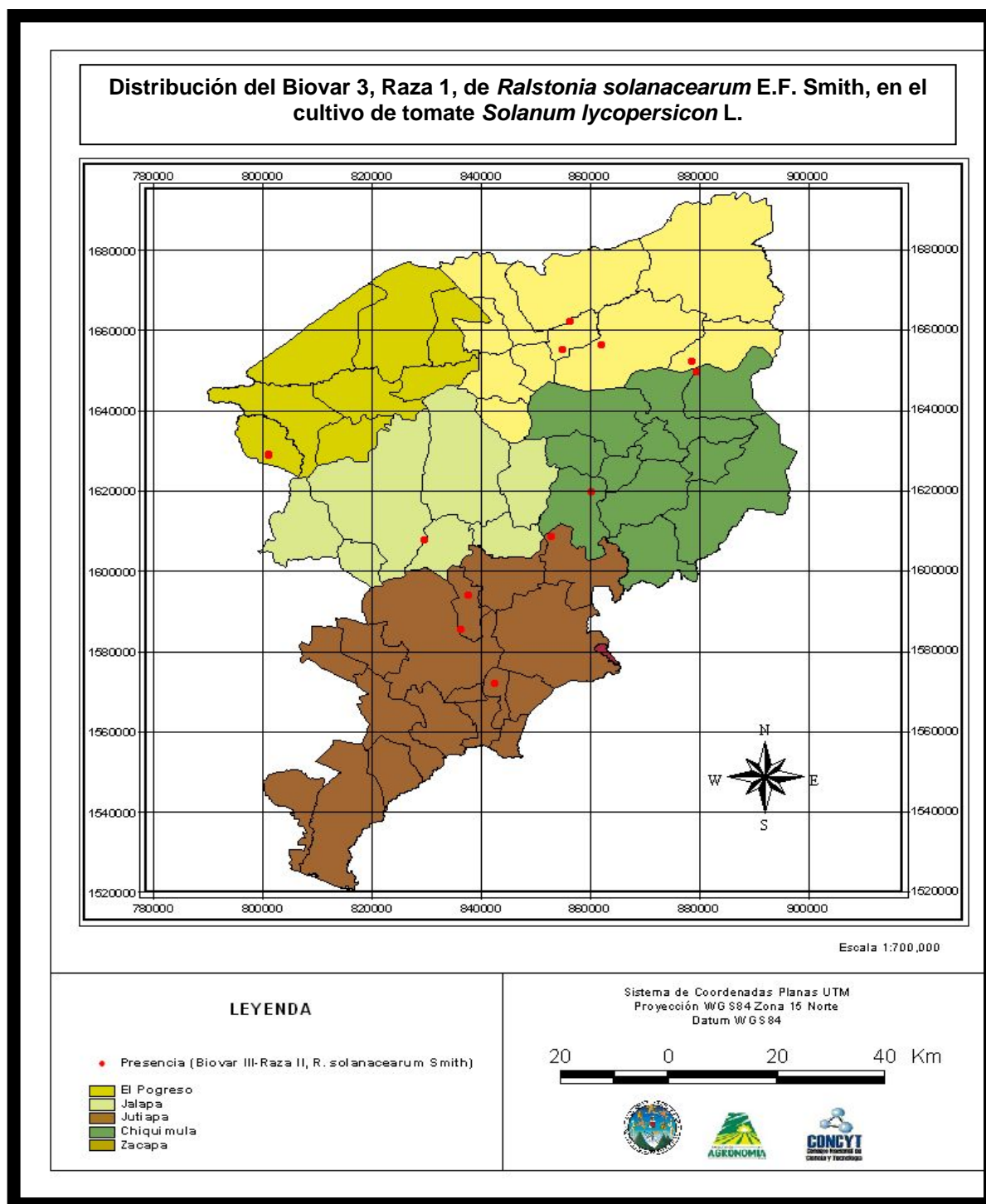


Figura 26. Mapa de la distribución geográfica del Biovar 3 Raza 1, en parcelas de cultivo de tomate *Solanum lycopersicon* L. y chile pimienta *Capsicum annum* L. de *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, en el oriente de Guatemala.

8 Conclusiones

- Basado en la caracterización bioquímica de los aislamientos se identificó el **biovar 3**, como el causante de la marchitez bacteriana en el cultivo de tomate *Solanum lycopersicon* L. y la relación de hospedante en el cultivo de chile pimiento *Capsicum annuum* L.
- De acuerdo al rango de hospederos, con respecto a la especialización patológica de la bacteria en atacar a determinada especie (tomate *Solanum lycopersicon* L. y chile pimiento *Capsicum annuum* L.) se determinó para el área de estudio, la presencia de la **raza 1** como predominante ante el análisis específico en solanáceas.
- La distribución geográfica del biovar 3 de *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, se estableció a través de mapas digitalizados de acuerdo a las coordenadas UTM tomadas en la fase de campo, señalando los departamentos de El Progreso (municipio de Sanarate) y Jutiapa (municipios de Agua Blanca y El Progreso), Chiquimula (municipios de Ipala, Jocotán y Camotán) como los más afectados por el biovar 3-raza 1 del patógeno.

9 Recomendaciones

- Institucionalizar y crear una base de datos geográficos en un sistema nacional de monitoreo y cuarentena, de áreas infestadas con ***Ralstonia solanacearum* E.F. Smith**. Para la creación de un ente de inspección de las mismas, correlativamente en las épocas de siembra, desarrollo vegetativo y producción, estratificándose esta misma base de acuerdo con la tecnología que el agricultor o productor emplee y realizar un historial de cada monitoreo con respecto a la tenencia de la tierra, historial, rotación de cultivos, volúmenes de producción y los mercados destino.
- Víncular institucionalmente, a los productores de áreas infestadas a Laboratorios fitopatológicos y biotecnología, por ejemplo, el Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación-**MAGA**-, Facultad de Agronomía de la **USAC**, con el fin de desarrollar diagnósticos sobre ***R. solanacearum* E. F. Smith**.
- Desarrollar e implementar un sistema nacional de divulgación, capacitación y manejo de la enfermedad a través de instituciones gubernamentales como el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación-**MAGA**-, a los agricultores, de cultivos susceptibles.
- Establecer convenios y programas con instituciones afines al desarrollo de alternativas tecnológicas, como el fitomejoramiento de especies, dirigido al problema de marchitez bacteriana, causado por ***R. solanacearum* E. F. Smith**.

10 Bibliografía

1. Agrios, GN. 1995. Fitopatología. 2 ed. México, Limusa. 821 p.
2. Álvarez, A; Van de Wiel, C; Smuldres, M. 2001. Use of microsatellites to evaluate genetic diversity and species relationship in the genus *Lycopersicon*. Theor. Appl. Genet. 103:1283-1292.
3. Arai, N. 2001. Procedimiento simplificado para la identificación de bacterias fitopatógenas. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía, Voluntarios Japoneses en Cooperación Técnica con el Extranjero. p. 148.
4. BANDEGUA (Bananera de Guatemala, Departamento Experimental, GT). 1984. Manual técnico sobre procedimientos para el control del moko. Izabal, Guatemala. 9 p.
5. Becerra V, V; Paredes C, M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética (en línea). Agricultura Técnica. Consultado 20 feb 2007. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0365-28072000000300007&script=sci_arttext
6. Breto, M; Asins, M; Carbonell, E. 1993. Genetic variability in *Lycopersicon* species and their genetic relationships. Theor. Appl. Genet. 86:113-120.
7. Buddenhagen, I; Kelman, A; Sequeiro, L. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 52:706.
8. CABI, UK. 2003. Crop protection compendium. 5 ed. UK. p. 18. 2 CD
9. Coutinho, TA. 2005. Introduction and prospectus on the survival of *R. solanacearum*. In Allen, C; Prior, P; Hayward, AC. (eds). 2005. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. St. Paul, MN, US, The American Phytopathological Society. p. 29-38.
10. Cronquist, A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. US, The New York Botanical Garden. p. 9.
11. Delgado, L; García, A; García, R. 1999. Marchitez bacteriana del tomate causado por el Biovar 2^a de *Ralstonia solanacearum* en algunas localidades del estado MERIDA, Venezuela. Forest. 43(2):183-189.
12. Denny, TP; Hayward, AC. 2001. Gram-negative bacteria. In Schaad, NW; Jones, JB; Chun, W. (eds). 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St. Paul, MN, US, The American Phytopathological Society. p. 151-173.

13. Díaz B, JU. 1999. Manejo de *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith con enmiendas y microorganismos antagonistas en tomate. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 111 p.
14. French, ER; Gutarra, L; Alley, P; Ephilstone, J. 1995. Culture media for *Ralstonia solanacearum*, isolation, identification and maintenance. Fitopatología 30(3):126-130.
15. French, ER; Hebert, TT. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. San José, Costa Rica, IICA. p. 16. (Serie: Libros y Materiales Educativos no. 43).
16. García, R; Delgado, L; García, A. 1999. Distribución, incidencia y variabilidad, de *Ralstonia solanacearum*, agente causal de la marchitez bacteriana de la papa en el estado de Mérida (en línea). Venezuela. Consultado 15 abr 2005. Disponible en: <http://pegasus.ucla.edu.ve/BIOAGRO/archivobioagro.pdf>
17. González, A. 2000. La pared bacteriana (en línea). Argentina, Hipertextos de Biología. Consultado 22 mayo 2007. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/nutric~2.htm>
18. Goszczynska, T; Serfontein, JJ; Serfontein, S. 2000. Introduction to practical phytobacteriology. South Africa, Safrinet Pretoria. 83 p.
19. Harlow, WM; Harrar, E. 1958. Text book of dendrology. 4 ed. US, McGraw-Hill. 551 p.
20. Hartman, GL; Hong, WF; Wang, TC. 1991. Survey of bacterial wilt on fresh market hybrid tomatoes in Taiwan. Plant Protection Bulletin (Taiwan) 33:197-203.
21. Hayward, AC. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 29:64-87.
22. Hirano, R. 2000. Manual de biología molecular para principiantes (fundamentos teóricos y prácticos para manipulación de ADN vegetal). Guatemala, USAC, Dirección General de Investigación. 45 p.
23. Iáñez, E. 2000. Nutrición bacteriana (en línea). Argentina, Hipertextos de Biología. Consultado 22 mayo 2007. Disponible en <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/micro4.htm#pared>
24. IGN (Instituto Geográfico Nacional, GT). 2003. Datos meteorológicos de la región oriental de Guatemala. Guatemala, IGN, Departamento de Geografía, Sección Cartografía, Hidrogeología. s.p.
25. INE (Instituto Nacional de Estadística, GT). 2003. IV censo nacional agropecuario: producción obtenida de cultivos anuales o temporales. Guatemala. 1 CD.

26. INIA (Instituto Nacional e Investigación Agropecuaria, UR). 2006. Caracterización de aislamientos de ***Ralstonia solanacearum*** en Uruguay e implementación de herramientas moleculares para su detección a partir de muestras de suelo y tubérculos (diapositivas). Uruguay. 19 diapositivas.
27. INSIVUMEH (Instituto Nacional de Sismología, Vulcanología, Meteorología e Hidrología, GT). 2004. Atlas Climatológico. Guatemala, INSIVUMEH, Departamento de Investigación y Servicios Meteorológicos. 1 CD.
28. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in the ***Pseudomonas solanacearum*** to colonies appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:57-61.
29. Kelman, A; Sequeira, L. 1965. Root-to-root spread ***Pseudomonas solanacearum*** to colonies appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 55:304-309.
30. Knapp, S; Peralta, I; Spooner, D. 2005. Comparison of AFLPs with other for phylogenetic inference in wild tomatoes (***Solanum*** L. section ***lycopersicon*** (Mill.) Wettst.) *Taxon*. 54(1):43-60.
31. Leandro, G; Fusikovssky Zac, L. 1982. Efecto de algunos pesticidas sobre ***Pseudomonas solanacearum***, en papa. Chapingo, México, Editorial. 100 p.
32. Loarca M, JL. 1987. Estudio del patosistema ***Solanum-Pseudomonas*** y alternativas de control químico aplicado a semilla, en dos municipios del departamento de Quetzaltenango. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 64 p.
33. López T, JG. 2004. Evaluación del solarizado para el control de ***Ralstonia solanacearum***, en el cultivo de tomate ***Lycopersicum esculentum***, en la aldea El Tempisque, Agua Blanca, Jutiapa. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 43 p.
34. Menéndez G, LA. 2000. Evaluación de solarizado para el control de ***Ralstonia solanacearum***, en tomate ***Lycopersicum esculentum***, en Patulul, Suchitepéquez. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 47 p.
35. Ministerio de Agricultura, Servicio Nacional de Sanidad Agraria, PE. 2003. Marchitez bacteriana de la papa (en línea). Perú. Consultado 24 mar 2005. Disponible en: http://www.senasa.gob.pe/sanidad_vegetal/programas_fitosanitarios/cip_papa/aspectos_generales.htm
36. Opina, N; Tavner, F; Hollway, G; Wang, JF; Li, TH; Maghirang, R; Fegan, M; Hayward, AC; Krishnapilai, V; Hong, WF; Holloway, BW; Timmis, J. 1997. A novel method for development of species and strains-specific DNA probes and PCR primers for identifying ***Burkholderia solanacearum*** (formerly ***Pseudomonas solanacearum***). *Asia Pacific J. Mol. Biol. Biotch.* 5:19-30.
37. Orozco M, EF. 1997. Colonização de raízes de plantas daninhas por ***Ralstonia solanacearum*** "in vitro" e em casa de vegetação. Tesis MSc. Brasilia, DF, Brasil, Universidad de Brasília. p. 3-18.

38. Orozco M, EF. 2004. Colonización de raíces de malezas por ***Ralstonia solanacearum***, biovares 1, 2 y 3. *In* Métodos moleculares para diagnóstico de patógenos y mejoramiento para resistencia en vegetales. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. p. 4-19.
39. Peralta IE, Spooner DM. 2005. Morphological Characterization and Relationships of wild tomatoes (*Solanum* L. SECT. *Lycopersicon*). St. Paul, MN, US, The American Phytopathological Society (APS). p. 32.
40. Palleroni, NJ; Kunizawa, R; Contopoulov, R; Doudoroff, M. 1972. Nucleic acid homologies in the genus ***Pseudomonas***. *Int. J. Syst. Bacteriol* 23:333-339.
41. Prior, PH; Allen, C; Elphinstone, JG. 1998. Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects. FR, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). *In* Allen, C; Prior, P; Hayward AC. (eds). 2005. Bacterial wilt disease and the ***Ralstonia solanacearum*** species complex. St. Paul, MN, US, The American Phytopathological Society (APS). p. 14.
42. Prior, PH; Allen, C; Hayward, AC. 2005. Bacterial wilt disease and the ***Ralstonia solanacearum***: species complex. St. Paul, MN, US, The American Phytopathological Society. 510 p.
43. Priou, S; Barea, B; Aley, P. 2006. Potato / bacterial wilt / manejo integrado de la marchitez bacteriana de la papa (en línea). Perú, CIP. Consultado 24 mar 2005. Disponible en: http://www.cipotato.org/potato/pests_diseases/bacterial_wilt/sintomas.asp
44. Robinson, RA; Ramos, AH. s.f. Estudios de la marchitez bacteriana (***P. solanacearum***) en Kenya. s.n.t. s.p.
45. Sáenz, P. 2000. Pared bacteriana (en línea). Argentina, Hipertextos de Biología. Consultado 22 mayo 2007. Disponible en <http://www.biologia.edu.ar>
46. Sánchez, A; Mejía, L; Allen, C. 2006. Estudio filogenético y de distribución de la bacteria ***Ralstonia solanacearum*** en Guatemala. *Tikalía* 24(1):17-33.
47. Sarasola, AA. 1999. Fitopatología, curso moderno: bacteriosis y virosis. Cautelar, Argentina, Centro de Investigaciones en Ciencias Agronómicas / Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. tomo 3, p. 11.
48. Sequeira, L. 1998. Bacterial wilt: the missing element in international banana improvement programs. *In* Allen, C; Prior, P; Hayward, AC. (eds). 2005. Bacterial wilt disease and the ***Ralstonia solanacearum*** species complex. St. Paul, MN, US, the American Phytopathological Society. p. 6-14.
49. Stephens, JM. 1997. Manual of minor vegetables. Gainesville, US, Florida Cooperation Extension Service. p. 5.

50. USDA (Department of Agriculture, US). 2004. New pest response guidelines. US. 1 CD.
51. USDA (Department of Agriculture, US). 2006. New pest response guidelines. US. 1 CD.
52. Villela, J. D. 1993. El cultivo del tomate. PDA (MAGA-AID), Guatemala. 143 p.
53. Watanebe, J. 2006. Informe final de apoyo al laboratorio de biotecnología de la FAUSAC. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 50 p.
54. Weller, SA; Elphinstone, JG; Smith, NC; Boonham, N; Stead, D. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with quantitative, multiplex, real-time fluorogenic PCR (TaqMan) assay. Appl. Environ. Microbiol. 66:2853-2858.
55. Yabuuchi, E; Kosato, Y; Yano, I; Hotta, H; Nishiuchi, Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (*Ralstonia*, *Palleroni* and Duodoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1986) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. Microbiol. Immunol. 39:897-904.