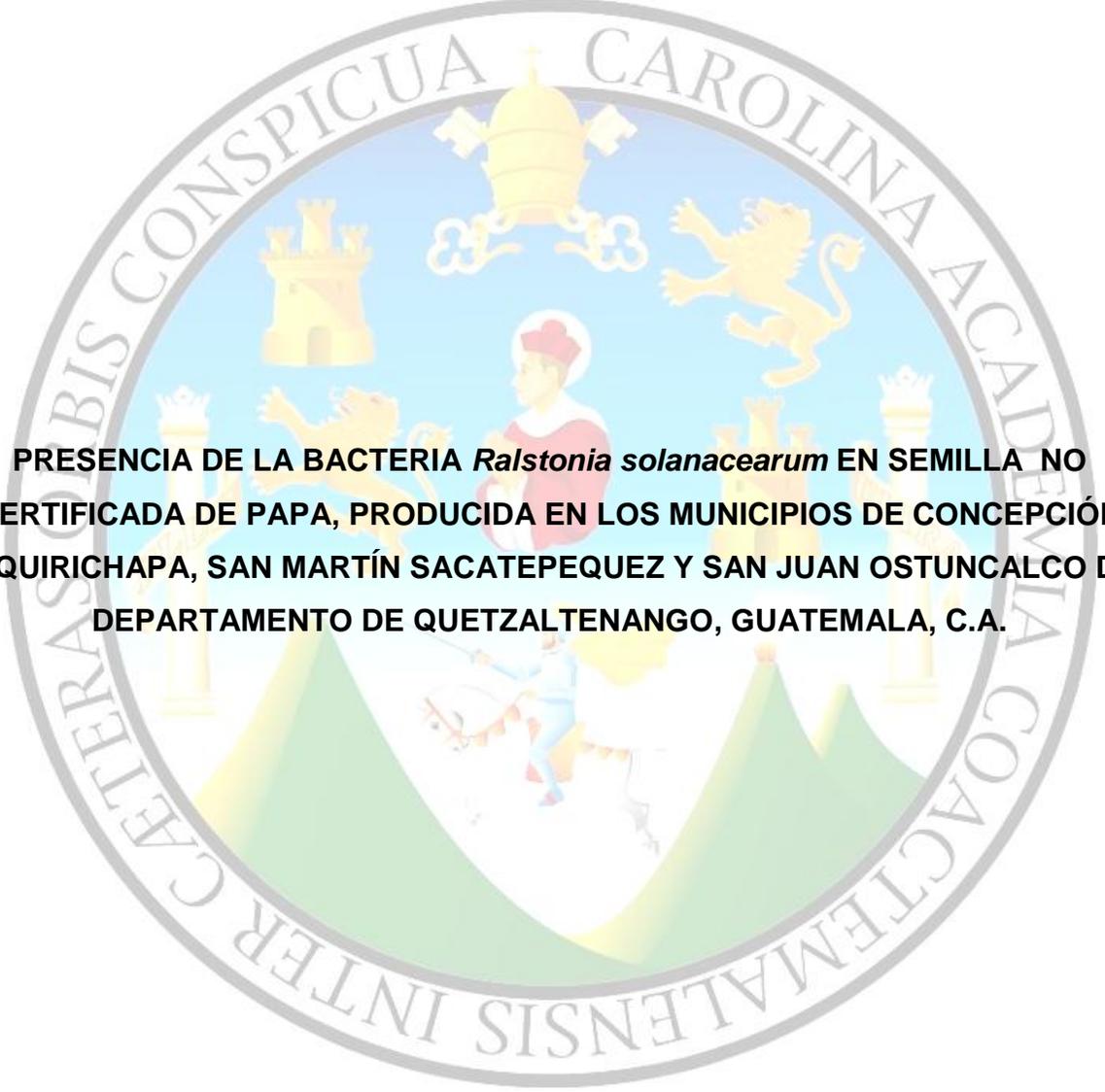


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a man in a red and white robe, possibly a saint or scholar, holding a book. Above him is a golden crown. To the left is a golden castle, and to the right is a golden lion rampant. Below the central figure is a landscape with green hills and a white path. The entire scene is set against a light blue background. The seal is surrounded by a grey border containing the Latin text "UNIVERSITAS CAROLINA ACCADEMIA COACTEMALENSIS INTER CÆTERAS QUIBUS CONSPICUA".

**PRESENCIA DE LA BACTERIA *Ralstonia solanacearum* EN SEMILLA NO
CERTIFICADA DE PAPA, PRODUCIDA EN LOS MUNICIPIOS DE CONCEPCIÓN
CHIQUIRICHAPA, SAN MARTÍN SACATEPEQUEZ Y SAN JUAN OSTUNCALCO DEL
DEPARTAMENTO DE QUETZALTENANGO, GUATEMALA, C.A.**

ANA VICTORIA MANSILLA GARCÍA

Guatemala, febrero de 2012

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA



RECTOR

Lic. Carlos Estuardo Gálvez Barrios

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO

Dr. Lauriano Figueroa Quiñones

VOCAL PRIMERO

Dr. Ariel Abderramán Ortíz López

VOCAL SEGUNDO

Ing. Agr. MSc. Marino Barrientos García

VOCAL TERCERO

Ing. Agr. MSc. Oscar René Leiva Ruano

VOCAL CUARTO

Br. Lorena Carolina Flores Pineda

VOCAL QUINTO

P. Agr. Josué Antonio Martínez Roque

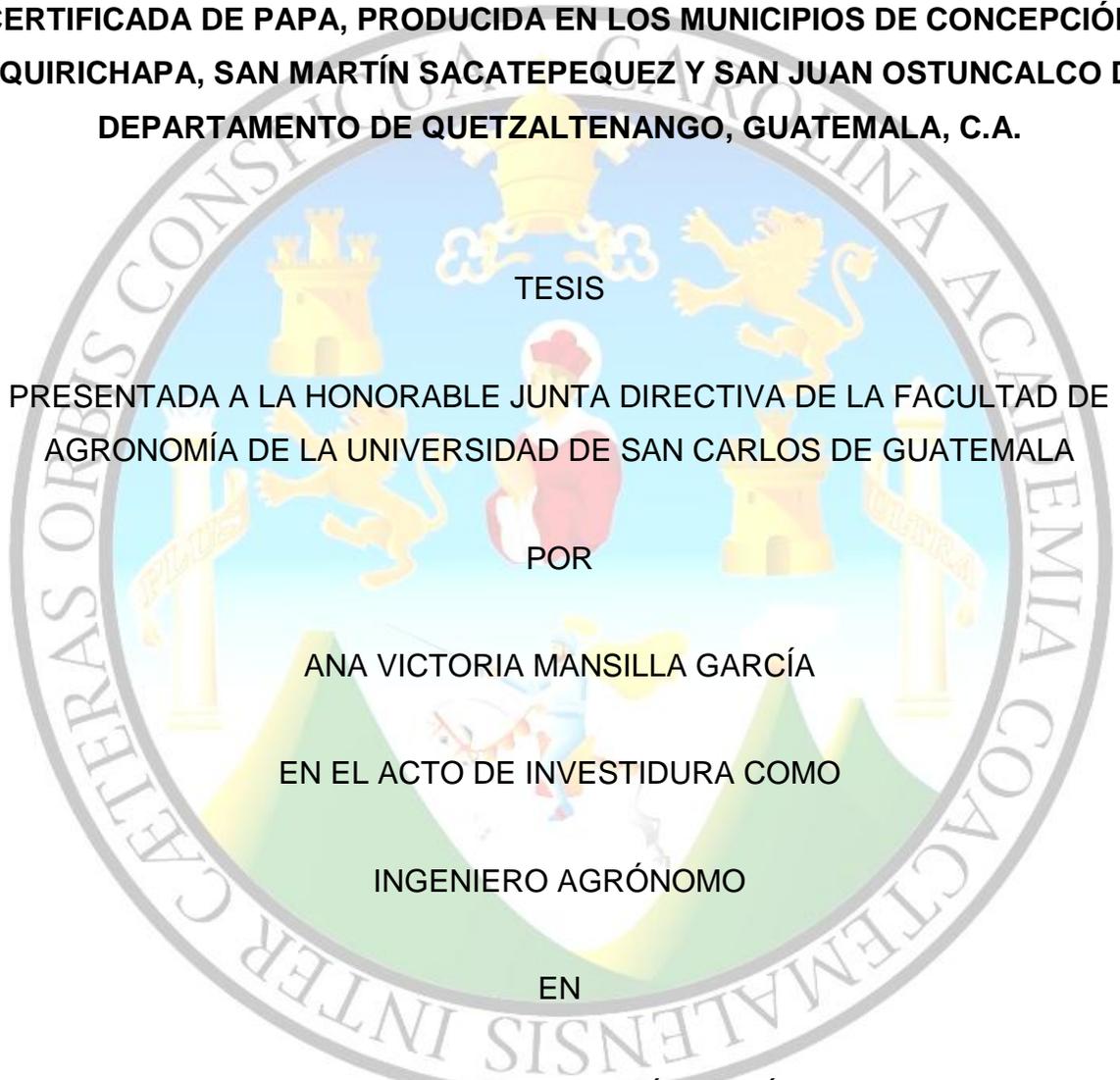
SECRETARIO

Ing. Agr. Carlos Roberto Echeverría Escobedo

Guatemala, febrero de 2012

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS

**PRESENCIA DE LA BACTERIA *Ralstonia solanacearum* EN SEMILLA NO
CERTIFICADA DE PAPA, PRODUCIDA EN LOS MUNICIPIOS DE CONCEPCIÓN
CHIQUIRICHAPA, SAN MARTÍN SACATEPEQUEZ Y SAN JUAN OSTUNCALCO DEL
DEPARTAMENTO DE QUETZALTENANGO, GUATEMALA, C.A.**



TESIS

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

POR

ANA VICTORIA MANSILLA GARCÍA

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO

INGENIERO AGRÓNOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

EN EL GRADO ACADÉMICO DE

LICENCIADA

Guatemala, febrero de 2012

Guatemala, febrero de 2012

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 Graduación “Presencia de la bacteria *Ralstonia solanacearum* en semilla no certificada de papa, producida en los municipios de Concepción Chiquirichapa, San Martín Sacatepéquez y San Juan Ostuncalco del departamento de Quetzaltenango, Guatemala, C.A.”, 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”

Ana Victoria Mansilla García

ACTO QUE DEDICO A:

- Dios** Por mostrarme su amor en todas las bendiciones que me da día a día.
- Mis padres** Cándida Anabela García García y Cosme Leonardo Mansilla Sarazúa, por haberme dado la vida. Por ser mí más hermoso ejemplo de amor. Ejemplo de humildad y sencillez. Porque ustedes me enseñan todos los días que en la vida no hay sueño que no pueda cumplir con esfuerzo y dedicación. Realmente no encuentro las palabras para expresarles mi infinito amor. Les dedico este triunfo, misión cumplida.
- Mis hermanos** Mario José gracias por tu apoyo y ejemplo. Y Candy María porque desde que llegaste a la casa has iluminado a todos con tu luz, espero que este triunfo sirva de ejemplo para tu superación. Qué bendición más grande compartir mi vida con ustedes.
- Mis abuelitos** José Ovidio García y Yolanda García, gracias por sus enseñanzas de vida, por brindarme su apoyo, consejos y amor incondicional. Que este triunfo sea sólo una pequeña muestra que atribuya todo el cariño y amor que me han dado. Elodia Sarazúa (QEPD), por haber criado a mi papá con tanto esfuerzo y dedicación. Dios la tenga en su gloria.
- Mis tíos** Rina, Ovidio, Carmen, Gabriel, Juan, Yoly, Alejandro y Carol. Gracias por siempre ser ejemplo de apoyo y amor en familia, esta meta es para ustedes también. Los amo con todo mi corazón.
- Mis primos** Ángel, Estrella, Karen, Liseth, Kimberly, Gabriela, Ashley, Gabriel, David, Alex, Julián, Kevin, Selvin, Adrianita. Qué alegría tenerlos en mi vida.
- Mis amigos** Para los que han estado en mi vida desde pequeños, para los que llegaron un poco después. Mil gracias por brindarme su amistad sincera, por los buenos y malos momentos. Y por compartir mis metas más deseadas, los llevo siempre en mi corazón. Dios los bendiga.

AGRADECIMIENTOS A:

Facultad de Agronomía U.S.A.C. Por abrirme sus puertas y brindarme las herramientas necesarias para mi formación académica.

Mis catedráticos Por brindarme su excelencia profesional que me permitirá ser una mejor ciudadana y contribuir al desarrollo de mi linda Guatemala.

Mis asesores Ing. Agr. Amílcar Sánchez y Dr. David Monterroso por brindarme su apoyo y colaboración en la elaboración de este documento, y por compartir sus valiosos conocimientos que me permitieron culminar la etapa final de mi formación académica.

Mi familia y amigos en general Por su apoyo incondicional en todo momento.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE CUADROS	IV
ÍNDICE DE GRÁFICA	IV
RESUMEN.....	V
1 INTRODUCCIÓN	1
2 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	3
3 MARCO TEÓRICO.....	5
3.1 Marco conceptual.....	5
3.1.1 El cultivo de la papa (<i>Solanum tuberosum</i>).....	5
3.1.1.1 Descripción morfológica de la especie.....	6
3.1.1.2 Cultivo de la papa (<i>Solanum tuberosum</i>) en Guatemala.....	7
3.1.1.3 Propagación de la papa (<i>Solanum tuberosum</i>).....	8
3.1.1.4 Componentes básicos de un programa formal de producción de semillas	13
3.1.1.5 Normas para la certificación de semilla de papa (<i>Solanum tuberosum</i>) en Guatemala.....	14
3.1.1.6 Enfermedades de la papa (<i>Solanum tuberosum</i>).....	21
3.1.2 Marchitez bacteriana " <i>Ralstonia solanacearum</i> " en papa	21
3.1.2.1 Reseña Histórica.....	21
3.1.2.1 Importancia económica	22
3.1.2.2 Clasificación actual y distribución geográfica	23
3.1.2.3 Descripción de la bacteria.....	24
3.1.2.4 Sintomatología de la bacteria.....	25
3.1.2.5 Ciclo de la enfermedad	29
3.1.2.6 Medio de infección de la bacteria.....	30
3.1.2.7 Métodos de diagnóstico y detección de <i>Ralstonia solanacearum</i>	31
3.1.3 Reacción en cadena de la polimerasa, PCR.....	34
3.1.3.1 Componentes de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	35
3.1.3.2 Electroforesis en gel de agarosa para visualización de bandas de ADN	37
3.2 Marco referencial	40
3.2.1 Áreas de colecta de muestras de tubérculos-semilla	40

3.2.1.1	Ubicación geográfica	40
3.2.1.2	Características principales de producción	41
3.2.2	Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, USAC	42
4	OBJETIVOS.....	43
4.1	General	43
4.2	Específicos.....	43
5	HIPÓTESIS.....	44
6	METODOLOGÍA	45
6.1	Selección del área a muestrear.....	45
6.1.1	Obtención de muestras.....	45
6.2	Aislamiento y purificación de la bacteria	46
6.3	Protocolo de PCR.....	47
6.4	Protocolo de electroforesis.....	48
6.5	Análisis de resultados	49
6.5.1	Análisis de medios nutritivos	49
6.5.2	Análisis de la información de PCR.....	50
6.5.3	Análisis de la presencia de <i>R. solanacearum</i> en tubérculos-semilla de papa	50
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
7.1	Obtención de muestras	52
7.2	Aislamiento y purificación de <i>Ralstonia solanacerum</i>	53
7.3	Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa y electroforesis para colonias de <i>R. solanacearum</i> identificadas en medios nutritivos.	57
8	CONCLUSIONES	63
9	RECOMENDACIONES.....	64
10	BIBLIOGRAFÍA.....	65
11	GLOSARIO	71

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1. Esquema del desarrollo inicial de un tubérculo en estolón.....	7
Figura 2. Distribución geográfica de producción de papa en Guatemala	7
Figura 3. Síntoma de marchitez bacteriana de la papa causado por <i>R. solanacearum</i>	26
Figura 4. Tubérculo de papa infectado por <i>R. solanacearum</i> exudando bacteria.....	27
Figura 5. Síntomas de marchitez bacteriana en tomate causada por <i>R. solanacearum</i> mostrando marchitamiento de las hojas en los extremos de la rama de la planta.....	28
Figura 6. Marchitez avanzada y amarillamiento anormal causado por <i>R solanacearum</i>	29
Figura 7. Flujo bacteriano de un tallo infectado por <i>R. solanacearum</i> inmerso en agua	32
Figura 8. Etiqueta de identificación de muestras	45
Figura 9. Tubérculos-semillas de papa comercializados en los municipios de Concepción Chiquirichapa, San Martín Sacatepéquez y San Juan Ostuncalco, utilizados para determinar presencia de <i>R. solanacearum</i>	53
Figura 10. Crecimiento de colonias mutantes y contaminantes en SMSA.	54
Figura 11. Crecimiento de colonias bacterianas de <i>R. solanacearum</i> en medio CPG-TZC.	54
Figura 12. Purificación de colonias de <i>Ralstonia solanacearum</i>	55
Figura 13. Fotografías de gel de agarosa mostrando el producto amplificado mediante PCR..	59

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
Cuadro 1. Descripción taxonómica de la papa (<i>Solanum tuberosum</i>)	5
Cuadro 2. Categorías de la semilla por productividad	15
Cuadro 3. Tolerancias máximas según categoría	16
Cuadro 4. Tolerancia de laboratorio en los factores que se indican para las semillas	17
Cuadro 5. Características de las razas y su relación con biovares de <i>R. solanacearum</i>	24
Cuadro 6. Concentraciones de agarosa utilizadas para la separación electroforética de fragmentos lineales de ADN de diferentes tamaños	38
Cuadro 7: Tubérculos-semilla que presentaron incidencia de <i>Ralstonia solanacearum</i> por productor.....	57
Cuadro 8: Identificación de tubérculos-semilla utilizados para prueba de PCR.....	58

ÍNDICE DE GRÁFICA

GRÁFICA	PÁGINA
Gráfica 1. Porcentaje de productores cuyos tubérculos comercializados como semillas poseen infecciones latentes de <i>R. solanacearum</i>	61

**PRESENCIA DE LA BACTERIA *Ralstonia solanacearum* EN SEMILLA NO
CERTIFICADA DE PAPA, PRODUCIDA EN LOS MUNICIPIOS DE CONCEPCIÓN
CHIQURICHAPA, SAN MARTÍN SACATEPÉQUEZ Y SAN JUAN OSTUNCALCO DEL
DEPARTAMENTO DE QUETZALTENANGO, GUATEMALA.**

RESUMEN

La papa (*Solanum tuberosum*) constituye uno de los principales productos de la canasta básica nacional por lo que representa una gran importancia en el mercado, por los beneficios que genera su consumo así como la generación de fuentes de empleo para muchos guatemaltecos.

Entre el conjunto de plagas y enfermedades que causan pérdidas económicas en el cultivo de papa se encuentra la marchitez bacteriana la cual es causada por *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith. Dicho patógeno causa la enfermedad en muchos cultivos de interés en Guatemala y el mundo, limita la producción de cultivos económicamente importantes incluyendo papa, tomate, banano y tabaco. La bacteria posee la capacidad de infectar e inducir síntomas en distintas especies de malezas solanáceas y no solanáceas que pueden ser fuentes de inóculo y hospederos alternos a las especies de importancia económica (Champoiseau 2009).

Los sistemas de Manejo Integrado son la única forma de contrarrestar la marchitez bacteriana y el uso de tubérculos-semilla de papa de completa sanidad fitopatológica es un componente base para reducir la incidencia de la enfermedad (Prior *et al.* s.f.). Actualmente,

el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA) se encarga de producir minitubérculos que constituyen el tubérculo-semilla básica, los cuales son producidos por medio de cultivo *in vitro*-invernadero, producto que es adquirido por alrededor de 9 grupos de productores conformados por asociaciones, cooperativas, ONG's y OG's que abastecen el mercado de semilla certificada en el país (Ramírez *et al.* 2011).

En el campo la observación de síntomas es el primer paso para detectar *Ralstonia solanacearum*, pero en la mayoría de los casos no es posible detectar su presencia en forma visual, por lo que las técnicas moleculares juegan un papel muy importante para detectar infecciones aunque los síntomas no se manifiesten. En la presente investigación se puso en práctica el aislamiento de la bacteria por medio de medios nutritivos y la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR, para detectar *Ralstonia solanacearum* en tubérculos comerciales utilizados como semilla de papa no certificada.

Las pruebas realizadas demostraron distintos resultados. Para determinar la incidencia se realizó un sondeo (Ruano 1989) lográndose obtener 150 tubérculos-semilla de 17 productores comerciales en las tres zonas en estudio. Se obtuvo que la presencia de *Ralstonia solanacearum* por medio de aislamiento en medios de cultivo es del 8%, porcentaje que se representa a nivel de reconocimiento o exploratorio; y la prueba de PCR denotó la presencia de la bacteria en un 2.66% lo cual se muestra a un nivel de detalle.

Esta diferencia en porcentajes se debe a distintas razones, entre éstas se encuentra la sensibilidad del PCR a la sensibilidad y especificidad de los cebadores utilizados y de la eficiencia de la reacción. La Taq polimerasa también es sensible a la inhibición por factores presentes en las muestras biológicas. Teóricamente la técnica de PCR es capaz de detectar

tan pocas como una sola hebra de ADN (Pastrik 2000), más en la práctica se pudo dar un falso negativo por otras circunstancias como el hecho de que las colonias utilizadas para realizar la prueba de PCR no estuviesen completamente purificadas por lo que otros organismos pudieron haber inhibido la acción de la reacción.

Se le dio importancia a los elevados porcentajes de la bacteria en los campos de cultivo y las altas infecciones que no se exteriorizan en el material vegetal, poniendo de manifiesto la falta de responsabilidad de autoridades gubernamentales como el MAGA y el ICTA, y no gubernamentales como asociaciones, cooperativas y el gremio de productores de papa, en la regulación de la producción de tubérculos-semilla de calidad.

Todavía hace falta mucha sensibilización a los productores sobre la importancia de utilizar semilla de calidad puesto que no se está realizando ningún tipo de control preventivo evitando la infestación de nuevas zonas. Con esto se sugiere al ICTA como institución estatal, para que realice labores de sensibilización, capacitación, control y supervisión a productores de tubérculos-semilla de papa no certificados en los siguientes lineamientos:

1. Sensibilizar sobre la importancia de manejar culturalmente la papa contaminada.
2. Capacitar en cómo producir semilla certificada.
3. Controlar los procesos de producción identificando zonas infestadas y manejarlas debidamente.

1 INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum*) constituye uno de los productos de la canasta básica nacional por lo que tiene importancia en el país, ya sea por los beneficios que genera su consumo así como la generación de fuentes de empleo para muchos guatemaltecos. Para el año 2009 la producción nacional total fue de 469,906.63 toneladas métricas de tubérculos de papa (SIM 2010). En algunos casos se ha observado que la papa es la única fuente de alimentación por familia y de acuerdo al Instituto Nacional de Estadística de Guatemala (INE), se indica que durante los años 1,988 y 1,990 se considera que el mayor porcentaje (alrededor del 80%) del consumo per cápita del grupo de alimentos que aportan carbohidratos (tubérculos, plátano y banano) se refiere a la papa (Franco 2002).

Entre el conjunto de plagas y enfermedades que causan pérdidas económicas en el cultivo de papa se encuentra la marchitez bacteriana la cual es causada por *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith, inicialmente descrita como *Bacillus solanacearum* (Smith 1896) y posteriormente como *Pseudomonas solanacearum* (Smith 1914). La bacteria ataca a más de 200 especies de plantas y la misma se encuentra predominantemente presente en las zonas altas y frías de los trópicos, hasta los 3,400 m.s.n.m. (Prior, Barea, Aley s.f.). *Ralstonia solanacearum* ataca el sistema vascular de las plantas provocando amarillamiento, marchitez, y en casos extremos la muerte prematura de las mismas (Sánchez *et al.* 2008).

En el cultivo de la papa, *Ralstonia solanacearum* ha sido dispersada por medio de semilla de baja calidad por lo que una alternativa al manejo integrado de la enfermedad es la utilización de semilla libre de la bacteria. Actualmente, el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas

(ICTA) se encarga de producir minitubérculos que constituyen el tubérculo-semilla básica, los cuales son producidos por medio de cultivo *in vitro*-invernadero, y asociaciones de productores de semilla comercial como Joya Hermosa, en el departamento de Huehuetenango son de los pocos productores que abastecen el mercado de semilla certificada en Guatemala. A pesar de esto, aproximadamente un 90% de agricultores siembran semilla producida en forma artesanal, comercializada por los mismos productores de papa; semilla que no posee control fitosanitario regulado.

Para poder identificar a la bacteria estudiada en material potencialmente infectado como lo son tubérculos comercializados como semillas, existen distintos métodos de detección, ya sea en el campo como en el laboratorio, desde la observación de síntomas hasta la utilización de técnicas serológicas y moleculares. En el campo, la observación de síntomas es el primer paso para detectar *Ralstonia solanacearum*, pero en la mayoría de los casos no es posible detectar su presencia en de forma visual, por lo que las técnicas moleculares juegan un papel muy importante para detectar infecciones aunque los síntomas no se manifiesten. En la presente investigación se puso en práctica el aislamiento de la bacteria por medio de medios nutritivos y la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR, para detectar *Ralstonia solanacearum* en tubérculos comerciales utilizados como semilla de papa no certificada.

2 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La bacteria *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith causa la enfermedad de la marchitez bacteriana en muchos cultivos de interés en Guatemala y el mundo. Ésta limita la producción de cultivos económicamente importantes incluyendo papa, tomate, banano y tabaco. La bacteria posee la capacidad de infectar e inducir síntomas en distintas especies de malezas solanáceas y no solanáceas que pueden ser fuentes de inóculo y hospederos alternos a las especies de importancia económica (Champoiseau 2009).

Las plantas con marchitez bacteriana se reconocen por la expresión que sufren las mismas por amarillamiento, retraso en el crecimiento, marchitez y finalmente la muerte. Sin embargo, pueden existir infecciones latentes en donde estén presentes altas poblaciones de la bacteria y ésta no muestre síntomas. Poblaciones de la misma pueden ser diseminadas por herramientas agrícolas, insectos polinizadores, agua de irrigación, suelos infestados, etc. (Sánchez *et al.* 2008). Sin embargo, la diseminación de *Ralstonia solanacearum* ha sido mayormente asociada a tubérculos-semillas de papa en donde poblaciones latentes del patógeno colonizan el tejido vascular sin mostrar síntomas de la enfermedad.

Ralstonia solanacearum ha mostrado mucha variabilidad genética por lo que se conoce como una especie compleja. Pero es de especial importancia la raza 3 biovar 2 de la cual no se tiene evidencia de encontrarse en Estados Unidos y Canadá (Champoiseau 2009), esto la coloca en la lista de especies cuarentenadas debido al riesgo de reintroducción por medio de importación de material infectado. Actualmente la misma cepa se encuentra en el listado de patógenos selectos de plantas bajo la Ley Agrícola de Bioterrorismo del 2002 (Floyd 2008).

El patógeno no puede controlarse toda vez se encuentra latente en el suelo y material vegetativo por lo que frenar su dispersión en el campo supone una lucha constante. Los sistemas de Manejo Integrado son la única forma de contrarrestar la marchitez bacteriana y el uso de tubérculos-semilla de papa de completa sanidad fitopatológica es un componente base para reducir la incidencia de la enfermedad (Prior *et al.* s.f.). Actualmente, el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA) se encarga de producir minitubérculos que constituyen el tubérculo-semilla básica, los cuales son producidos por medio de cultivo *in vitro*-invernadero, producto que es adquirido por alrededor de 9 grupos de productores conformados por asociaciones, cooperativas, ONG's y OG's que abastecen el mercado de semilla certificada en el país (Ramírez *et al.* 2011).

Actualmente existen más de 27,000 productores de papa de los cuales menos del 5% utiliza semilla certificada encontrándose pérdidas en el campo entre 40 a 50% por falta de utilización de semilla de calidad, el otro 95% utiliza tubérculos comerciales como semilla (Ramírez *et al.* 2011). Por lo tanto se puede determinar que no se posee control sobre la producción y utilización de semilla de papa en Guatemala, y por consiguiente la desinformación sobre la diseminación de la bacteria también es una incógnita. La comercialización de los tubérculos utilizados como semillas se está realizando de forma no regulada infestando nuevas áreas de cultivo. Es por esto que la determinación de la presencia de *Ralstonia solanacearum* en tubérculos comerciales vendidos como semilla no certificada permitirá conocer el estado actual del patógeno en los sistemas de producción del cultivo en el país.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 Marco conceptual

3.1.1 El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*)

La papa cultivada es originaria de Sudamérica, probablemente, de los Andes de Bolivia y Perú. Fue introducido en América Central después de la conquista española (Standley y Steyermark 1973). Guatemala es considerado como centro secundario de origen. Los exploradores españoles llevaron la planta a Europa a fines del siglo XVI como una curiosidad botánica. Para el siglo XIX se había extendido por todo el continente, proporcionando alimentación abundante y de bajo costo a los trabajadores de la Revolución Industrial (Franco 2002).

En Guatemala, el cultivo de papa es propio de regiones frías o templadas a altitudes de 1,500 a 3,600 m.s.n.m. Las regiones productoras se establecen en los departamentos de Huehuetenango, San Marcos, Quetzaltenango, Sololá, El Quiché, Chimaltenango, Guatemala, Jalapa, Alta y Baja Verapaz (Franco 2002).

Cuadro 1. Descripción taxonómica de la papa (*Solanum tuberosum*) (Standley y Steyermark 1973, Cronquist 1988)

División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliópsida
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Solanum</i>
Especie	<i>S. tuberosum</i>

3.1.1.1 Descripción morfológica de la especie

Hierbas perennes (aunque estas son cultivadas como anuales) de 0.40 a 1.4 m de alto, robustas, produciendo tubérculos. Tallos de 30.0-60.0 cm de largo, gruesos, erectos, alados, verdes a púrpura. Hojas compuestas, imparipinnadas, alternas; 1.0 cm de largo (SIOVM s.f.). Inflorescencias terminales opuestas a las hojas. Anteras cortas, oblongas, dehiscentes por poros terminales grandes y rápidamente abriéndose longitudinalmente. Rizomas a menudo produciendo tubérculos (Nee 1993).

Las plantas de papa pueden desarrollarse a partir de una semilla o de un tubérculo. Cuando crecen a partir de semilla, forman una delicada raíz axonomorfa con ramificaciones laterales. Cuando crecen de tubérculos, forman raíces adventicias primero en la base de cada corte y luego encima de los nudos en la parte subterránea de cada tallo (Franco 2002).

El sistema de tallos de la papa consta de tallos, estolones y tubérculos. Los estolones pueden formar tubérculos mediante un agrandamiento de su extremo terminal. Sin embargo, no todos los estolones llegan a formar tubérculos (Franco 2002). A este proceso se le llama tuberización. Los estolones son tallos subterráneos que crecen en posición más o menos horizontal formando pequeñas hojuelas, botones laterales y un botón terminal compuesto de cierto número de hojuelas. En un momento dado su extremo comienza a hincharse inmediatamente después de una curvatura del estolón para formar el tubérculo. Factores ambientales favorecen la tuberización como lo son fotoperíodos cortos, bajas temperaturas y bajos niveles de fertilización nitrogenada (Pozo 1999).

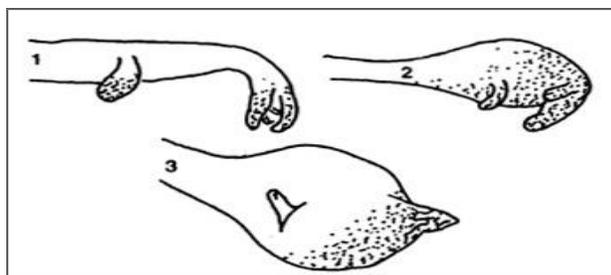


Figura 1. Esquema del desarrollo inicial de un tubérculo en estolón (Pozo 1999)

3.1.1.2 Cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*) en Guatemala

En el 2009 Guatemala los principales municipios productores de papa son Huehuetenango con una producción de 727,418 qq, Quetzaltenango con 522,005 qq, San Marcos con 481,151 qq, Guatemala con 120,869 qq y Sololá con 84,499 qq (Figura 2) (Jansen y Torero s.f.). Para el año 2009 la producción nacional total fue de 469,906.63 toneladas métricas (SIM 2010).

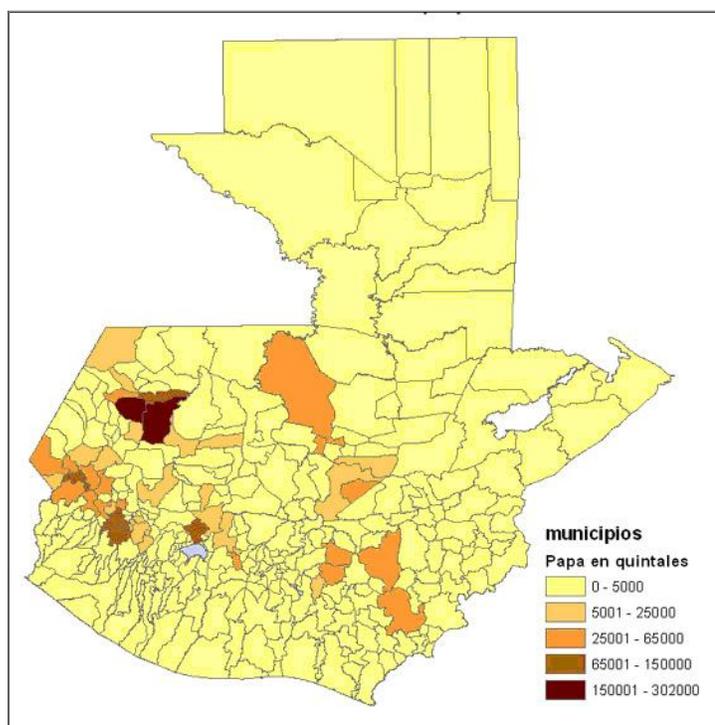


Figura 2. Distribución geográfica de producción de papa en Guatemala (Jansen y Torero s.f.).

Las variedades más producidas son Atlantic, Loman, Atzimba, Tollocan, cosechadas desde 2,390 hasta los 3,500 m.s.n.m. (Pavel *et al.* 2009).

3.1.1.3 Propagación de la papa (*Solanum tuberosum*)

Hacia los años 90's se empezaron a desarrollar importantes tecnologías en la propagación de la papa. La micropropagación, las técnicas de multiplicación rápida usando esquejes o partes diferentes de plantas, y semilla sexual de papa. Esos métodos tienen una amplia gama de aplicaciones porque la eficiencia de propagación es mucho mayor a partir de material sano (Malagamba 1996).

Las semillas comerciales de papa de calidad, ya sea tubérculos-semillas o semillas botánicas, deben poseer características como pertenecer íntegramente a la variedad que se anuncia, estar libres de patógenos, poseer buenas condiciones fisiológicas para producir nuevas plantas, poseer un tamaño apropiado (tamaño semilla), estar disponible a precio razonable, estar disponible para la siembra en el momento de su mayor demanda (Hidalgo 1999A).

A. Propagación sexual: semilla botánica

Según Hidalgo (1999A), la semilla se define como un óvulo maduro que consta de una planta embriónica, una fuente de alimento almacenado y una testa o cubierta protectora, la cual, de acuerdo con su viabilidad, podrá dar origen a una nueva planta. Ésta es el producto de la unión sexual de los gametos de dos plantas compatibles, por lo que cada semilla contiene un genotipo diferente. También se le conoce como "semilla botánica de papa" o simplemente "semilla", "semilla sexual de papa" (SSP) o "TPS" en inglés de "true potato seed".

Las técnicas de multiplicación rápida y micropropagación se usan principalmente en esquemas básicos de producción de semillas, donde son eficaces para prevenir la propagación de enfermedades. La utilización de semilla sexual de papa produce ciertos beneficios ante la utilización de tubérculo-semilla (Malagamba 1996), entre los cuales podemos describir los siguientes:

- a. El precio de semilla representa hasta 1/10 del precio que los agricultores pagan por tubérculo-semilla de calidad.
- b. Disminución de los problemas relacionados con las enfermedades transmitidas por tubérculos.
- c. Las semillas sexuales pueden ser almacenadas por varios años y a un bajo costo en áreas cálidas y/o húmedas, reduciendo el costo por infraestructura específica para los tubérculos-semillas.
- d. Un problema común es la obtención de tubérculos-semillas los cuales se ubican lejos de las zonas de cultivo, y debido a que estos son perecederos y difíciles de almacenar, esto representa mayores costos por transporte. Las semillas sexuales de papa usualmente no se ven afectadas por el transporte y son más fáciles de almacenar.
- e. Los agricultores pueden depender menos de los esquemas convencionales de certificación de tubérculo-semilla de papa. Éstos poseen mayores beneficios al poder acceder a otras fuentes de material de siembra sano con diferentes requerimientos de tecnología y costos.

B. Propagación vegetativa: tubérculo – semilla

Este tipo de propagación corresponde al tubérculo que se utiliza para la siembra. La producción de tubérculos-semillas de papa debe iniciarse con material de la más alta calidad sanitaria (Hidalgo *et al.* 1999).

En el proceso de propagación de los tubérculos-semillas se toma en cuenta la edad fisiológica del tubérculo. La edad fisiológica del tubérculo se refiere a todo el proceso en el que se forma y desarrolla el mismo hasta el brotamiento la cual depende de su edad cronológica así como de las condiciones ambientales a los que los tubérculos están expuestos (Malagamba 1999). La etapa de formación del tubérculo-semilla pasa por los procesos enumerados a continuación (Montesdeoca 2005):

- a. **Reposo:** lapso en el cual la semilla es cosechada, seleccionada y almacenada hasta que se da el inicio del brote apical.
- b. **Brotación apical:** la semilla posee un solo brote. No es aconsejable sembrarla en esta etapa pues la misma desarrollará pocos tallos principales y su producción se vería afectada. Se aconseja eliminar el brote apical para eliminar la dominancia apical y permitir la brotación de las yemas.
- c. **Brotación múltiple:** estado en el cual todos los ojos poseen su brote, estado ideal para sembrar el tubérculo.
- d. **Envejecimiento:** estado en el que la semilla ha pasado su madurez fisiológica y ha perdido agua y nutrientes. Esta semilla produce plantas de poco vigor y poco resistentes a ataques de patógenos y factores ambientales.

C. Producción del tubérculo-semilla

Los países que emplean los más altos volúmenes de tubérculos-semillas son Brasil, Bolivia, Perú y Colombia, aunque son los países con mayor superficie cosechada de papa. En términos porcentuales, Bolivia emplea en semilla el 28% de su disponibilidad interna de papa, seguido por Guatemala (17%) y Brasil (15%) (Fano 1999).

Existen dos sistemas de oferta de semilla en el mercado en América Latina y el Caribe: el sistema tradicional o informal y el sistema formal. El sistema tradicional los agricultores utilizan sus propios tubérculos o utilizan los de otros agricultores, estas prácticas las realizan suponiendo que otros cosechan semillas de mejor calidad pero basándose en criterios subjetivos. Por lo contrario, el sistema formal se basa en programas de certificación de tubérculos-semillas (Fano 1999).

La mayor parte de productores de papa en países en vías de desarrollo utilizan el sistema tradicional, dicho sistema no responde a los estándares de calidad de semilla y no existen garantías de que el insumo que se utiliza sea comercial. También forman parte de este sistema los agricultores que guardan su propia semilla para la campaña siguiente, suelen escoger los tubérculos más pequeños y los de menor calidad comercial para utilizarlos como semilla la siguiente cosecha. En los países en desarrollo el mayor porcentaje (más del 90%) de los tubérculos-semillas que se usan en la producción de papa provienen del sistema tradicional (Hidalgo 1999B).

En el sistema formal los tubérculos-semillas provienen de campos especialmente destinados para producir las categorías aceptadas por la ley en el proceso de certificación. En un sistema

formal hay normas y reglamentos que rigen y determinan la aptitud como semillas del material producido (Hidalgo 1999B).

En Guatemala el ICTA produce tubérculos-semillas de papa de categoría básica bajo el sistema *in vitro*-invernadero-campo, desde el año 1996; actualmente sólo produce bajo el sistema *in vitro*-invernadero. Esta oferta, cubre solamente el 1.13% de la demanda de la región occidental de Guatemala. El sistema de producción de tubérculos-semillas de papa, desarrollado en los últimos años por el ICTA, comprende procesos de termoterapia a plantas completas, cultivo de meristemos, diagnóstico de virus por medio de técnicas serológicas como ELISA, cultivo de micro-esquejes, aclimatación de plantas en peat-moss, cultivo de vitropiantas en invernadero, y cultivo de mini tubérculos en invernadero. Este sistema es pionero en Guatemala y tiene como finalidad producir tubérculos-semillas a nivel comercial de completa sanidad fitosanitaria (Pavel *et al.* 2009).

D. Manejo de los tubérculos para producción se semillas

El almacenamiento de los tubérculos para semilla se realiza en condiciones de campo sobre almacenes rústicos creados con madera y paja, u otros materiales de bajo costo. Para la producción se inicia con la selección y clasificación de los tubérculos. La temperatura y la ventilación proporcionan un balance en el desarrollo del tubérculo a semilla evitando la deshidratación de la misma, a su vez la luz difusa permite el rompimiento de la dominancia apical permitiendo el crecimiento de brotes pequeños (Franco 2002).

3.1.1.4 Componentes básicos de un programa formal de producción de semillas

El programa de certificación es la parte fundamental para completar el proceso de producción y garantizar la calidad del tubérculo-semilla dentro de un programa formal de producción de semilla (Hidalgo 1999b). Los programas formales de producción de tubérculos-semillas promueven la distribución y la utilización de semillas de alta calidad en sus componentes genético, físico, fisiológico y sanitario destinados a la siembra (Del Valle *et al.* 2001). Por lo tanto, los componentes básicos para un programa de producción de semilla se describen a continuación:

- A. Operaciones de producción:** el productor debe estar inscrito para producir una categoría determinada de semilla, el lugar de cultivo y todos los datos pertinentes a la producción. El organismo certificador se encarga de la verificación del registro del productor y los inspectores evalúan e inspecciona la situación en el campo en relación a las normas establecidas en la ley de semillas (Hidalgo 1999B).
- B. Atributos del inspector:** persona encargada de realizar las inspecciones en el campo, para interpretar y aplicar las normas. Tiene la obligación de aplicar su criterio propio para aplicar las normas, tomando en cuenta que el programa formal de producción también significa un proceso de capacitación y aprendizaje por parte de los productores (Hidalgo 1999B).
- C. Factores a inspeccionar en el campo:** el inspector debe verificar todos los factores que afectan la calidad de la semilla especificados en las normas y regulaciones de la producción de tubérculos-semillas. Entre estos las plantas enfermas, los plaguicidas utilizados, anomalías en el cultivo, etc (Hidalgo 1999B).

D. Toma de muestras: este componente generalmente está indicado en las normas de cada país. En Guatemala, según Del Valle *et al.* (2001), el objeto de este proceso es obtener semilla de tamaño adecuado con relación a la especie y el tamaño de la misma, se espera que esta muestra contenga los mismos constituyentes que posee el lote de semillas. El supervisor será el encargado de llevar los registros de los muestreos: muestreo efectuado en el campo productor de semillas, propietarios, fechas, la conservación de las muestras al laboratorio, etc.

3.1.1.5 Normas para la certificación de semilla de papa (*Solanum tuberosum*) en Guatemala

La siguiente información ha sido citada del manual de Normas para la certificación de semilla de papa del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (Cobaquil 2010).

- A. Aplicaciones de las bases generales para la producción de semilla certificada: las bases generales para la producción de semillas certificadas son esenciales y juntamente con los siguientes requisitos específicos constituyen las normas para la certificación de semilla de papa.

- B. Clases de semilla que se reconocen: Genética, Básica o Fundación, Registrada y Certificada.

La semilla de fundación y registrada debe ser producida y cosechada bajo la supervisión directa de un agrónomo aprobado por el departamento, centros de experimentación estatales o empresas fitotécnicas privadas.

- C. Origen de la semilla sembrada: los semilleristas deben mostrar al inspector del departamento una copia de la factura de compra o cualquier otra evidencia aceptable que muestre el origen, calidad y cantidad de la semilla comprada. El semillerista también debe acompañar, como muestra una etiqueta de certificación de la semilla adquirida.
- D. Variedad por finca: se podrá producir más de una variedad por finca, siempre y cuando sea avalada por el departamento de Control y Certificación de semillas de la dirección técnica de semillas.
- E. Requisitos de terreno: los campos de papa ofrecidos para la certificación, no pueden haber producido para un año anterior, al menos que:
- a. La papa sembrada previamente en el terreno fuera de la misma variedad que la ofrecida para la certificación, y
 - b. La papa sembrada previamente en el terreno haya sido inspeccionada en el campo y aprobada la certificación de pureza varietal libre de virosis y bacteriosis.
- F. Aislamiento:

Cuadro 2. Categorías de la semilla por productividad

CATEGORÍA DE LA SEMILLA POR PRODUCTIVIDAD	DISTANCIA EN METROS
Básica	50
Registrada	25
Certificada	05 (si es la misma variedad) 10 (si es otra variedad)

- G. Desmalezado de los campos: cuando las plantas tengan de veinte a treinta centímetros y antes que los campos sean inspeccionados deben ser desmalezados, remover todas las malezas nocivas y plantas fuera de tipo.
- H. Equipo: carretones, tráileres, camiones, bodegas, etc. Todo el equipo usado debe de estar completamente limpio antes de poder usarse para la certificación de semilla, evitándose mezclas entre variedades.
- I. Cosecha: la semilla de papa certificada debe ser cosechada bajo selección de tubérculos, exentos de virosis y otras enfermedades transmitidas por semilla (bacteriosis).
- J. Requisitos en el campo: tolerancias máximas expresadas en porcentajes de los factores que se indican en las diferentes categorías.

Cuadro 3. Tolerancias máximas según categoría

FACTORES	FUNDACIÓN		CERTIFICADA		REGISTRADA	
	1ra.	2da.	1ra.	2da.	1ra.	2da.
Inspecciones						
Mezcla de variedades	0.1	0.0	1.5	0.5	0.25	0.0
Mosaico común	0.2	0.0	8.0	6.0	0.3	0.2
Mosaico rugoso	0.2	0.0	8.0	6.0	0.3	0.2
Enrollamiento	0.5	0.0	1.5	1.0	1.0	0.5
Punta morada	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Bacteriosis	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Infecciones por nematodo dorado	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

- K. Requisitos de laboratorio: en casos dudosos en las inspecciones oculares de campo, se tomarán muestras representativas del follaje y de los tubérculos para análisis de laboratorio e invernadero con el propósito de identificar las enfermedades que puedan afectar la calidad y sanidad de la semilla.

Las semillas de todas las categorías deben estar libres de plagas, enfermedades, daños mecánicos, grietas y tubérculos deformes, sin embargo se permite cierta tolerancia en las inspecciones de los tubérculos de acuerdo con factores que a continuación se indican:

Cuadro 4. Tolerancia de laboratorio en los factores que se indican para las semillas

TOLERANCIAS MÁXIMAS			
FACTOR	BASICA	REGISTRADA	CERTIFICADA
Pierna negra	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Pudrición anular	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Nemátodos	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Tizón tardío	Ninguna	1 en 350	1 en 200
Tubérculo alargado	Ninguna	1 en 350	1 en 200

En Guatemala el ICTA se encarga directamente de iniciar la cadena de producción de semilla de calidad prebásica y básica con el proceso *in vitro*–invernadero, las cuales son destinadas como material para producción de semilla certificada. En Huehuetenango la Cooperativa “Joya Hermosa” y asociaciones adjuntas de agricultores han ofrecido semilla certificada de papa desde el 1998 y la oferta se ha incrementado año tras año. Según los datos obtenidos para el año 2003 la producción de semilla certificada fue equivalente al 5% de la demanda total de semilla para ese mismo año (Mejía s.f.).

Actualmente se pueden identificar organizaciones a nivel nacional que han adquirido minitubérculos producidos por el ICTA desde el 2005 (Ramírez 2011). Entre estas se pueden citar a:

- Cooperativa Joya hermosa
- Cooperativa Integral Paquixqueña
- Asociación Integral de Hortalizas y Frutas
- Programa de Crédito y Comercialización Agrícola
- FAO San Marcos
- Asociación Hierba Buena (Prorural)

Con base a lo anterior se tiene, entonces, que el sistema formal de oferta de semilla, basado en programas de producción de semilla certificada, se sustenta solamente en las instituciones mencionadas, y que aún cuando está en proceso de crecimiento, todavía es mínima su cobertura (Mejía s.f.).

En cuanto a la producción de semilla de ninguna calidad certificada se poseen datos del año 2003 en donde se produjo una cantidad de 6,734 tm de semilla, satisfaciendo más del 90% de la demanda regional (Huehuetenango, San Marcos y Quetzaltenango). La mayor parte de este insumo que se utiliza en la región, por lo tanto, proviene de sistemas tradicionales o informales de oferta de semilla, en los cuales los agricultores obtienen la semilla de su finca o de otros agricultores vecinos, por lo que generalmente no se consideran factores técnicos de calidad (Mejía s.f.).

Dentro de los problemas básicos que se encuentran en las plazas de venta es que no siempre se encuentra semilla clasificada y la mezcla de variedades es frecuente. También se observa tubérculos afectados por plagas y enfermedades. Los principales centros de distribución en el departamento de Quetzaltenango se ubican específicamente en la cabecera municipal de Concepción Chiquirichapa y en la aldea La Cumbre del municipio de San Juan Ostuncalco. En Concepción Chiquirichapa existen al menos doce oferentes con establecimiento propio para la venta de papa comercial y semilla. En la aldea La Cumbre se registra la cantidad de ocho expendedores, que al igual que en Concepción Chiquirichapa, se dedican tanto a la venta de papa comercial como de semilla (Mejía s.f.).

La papa comercial o de consumo, en el caso de estos centros, es básicamente de tamaño "super", es decir la de mayor tamaño, cuyo peso aproximado es de 115 gramos y cuyo mercado de destino es el centroamericano, especialmente El Salvador; mientras que la papa de menor tamaño como "mediana", "segunda" y "tercera", con pesos aproximados de 58, 32 y 28 gramos, respectivamente, es comercializada como semilla y destinada principalmente al mercado nacional. Dentro de los lugares de destino nacional se encuentran Nahualá, Patzicía, Sololá, Chimaltenango y Cobán. En Concepción Chiquirichapa se hallan dos oferentes que exportan semilla a la república de Honduras. En "La Cumbre", San Juan Ostuncalco, Quetzaltenango se exporta a Centroamérica principalmente por encargo (Mejía s.f.).

En estos dos centros de distribución se ofrece semilla durante todo el año. La cantidad comercializada en el año 2003 alcanzó la cantidad de 2,800 TM, aproximadamente. El centro de Concepción Chiquirichapa fue el más importante, el cual vendió entre el 60 y 70% del total (Mejía s.f.).

A. Debilidades en los sistemas de producción de tubérculos-semillas

Según Ezeta (2001), existen factores que limitan el desarrollo de la industria del tubérculo-semilla en el país como lo es el incumplimiento de leyes y reglamentos de semilla, obsolescencia o inaplicabilidad de las normas legales, indefinición de responsabilidades institucionales para la supervisión y el control de calidad, inestabilidad del personal capacitado para producción de semilla prebásica en las instituciones públicas, debilidad de las asociaciones de productores, poca coordinación entre oferta y demanda para definir qué se multiplica, dónde y cuánta semilla pre-básica o básica se necesita, competencia entre el sector público y el sector privado en la producción de semilla, baja eficiencia productiva en laboratorios, invernaderos y campo, elevado costo de producción, inestabilidad de precios, fuga de semilla del sistema formal hacia el mercado de consumo, deshonestidad de intermediarios en el mercado de semilla.

Como consecuencia el riesgo más evidente e inmediato a la falta de aplicabilidad de la ley de semillas consiste en la diseminación de enfermedades, por medio del movimiento descontrolado de semillas dentro del país. También la introducción de plagas y enfermedades exóticas desde países vecinos o aún desde otro continente (Ezeta 2001).

B. Impacto de los programas de tubérculo-semilla

Se pueden mencionar tres tipos de impacto: 1) sobre la calidad, 2) sobre la productividad, y 3) sobre los ingresos netos de los productores. El primero se observa en la mejora de la calidad del alimento, es percibido por los agricultores y consumidores y, en el futuro, debería expresarse en una mejora de los precios y del consumo. El segundo está directamente

relacionado con los rendimientos promedio que un agricultor puede obtener y que, adicionalmente, tiene un impacto en los ingresos de los agricultores. Pero éste último impacto también es el resultado de la valoración de los costos promedio de producción (Fano 1999).

3.1.1.6 Enfermedades de la papa (*Solanum tuberosum*)

Las principales enfermedades de la papa en Guatemala son: tizón tardío (*Phytophthora infestans*), la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) y enfermedades viróticas tales como el mosaico de la hoja (virus X), el mosaico rugoso (virus Y) y el enrollamiento de la hoja (virus PLRV). También atacan el hongo *Rhizoctonia solani* causando la costra negra, *Rosellinia* sp. causando la mortaja blanca, *Verticillium albo-atrum* causando la marchitez temprana, entre otras (Franco 2002, Taller Nacional de... 2004).

3.1.2 Marchitez bacteriana “*Ralstonia solanacearum*” en papa

3.1.2.1 Reseña Histórica

El origen de de la marchitez bacteriana en tabaco, tomate, papa y otras especies no se sabe con certeza; no se sabe en qué continente surgió o si evolucionó separadamente en varios lugares relacionado a ancestros de plantas actuales (Hayward 1991). Se considera a América Central y el norte de Sudamérica como el centro de origen del moco causado por *R. solanacearum*. El patógeno probablemente evolucionó en asociación con heliconias nativas en selvas vírgenes (Sánchez *et al.* 2008).

En Guatemala *Ralstonia solanacearum*, es mencionado por Buddenhagen (1961), como uno de los afectados para dicho cultivo, así como también el área de América Central y Tapachula. De acuerdo a información proporcionada por agricultores del área oriental de Guatemala, en cultivos como tomate y chile, el problema inicia aproximadamente en 1,995 (Izaguirre 2008).

3.1.2.1 Importancia económica

Ralstonia solanacearum ha sido descrita como una de las bacterias fitopatógenas más destructivas del mundo, está ampliamente distribuida en más de 30 países, pero la raza 3 biovar 2 es de particular importancia por desconocerse su presencia en Estados Unidos y Canadá por lo que se encuentra cuarentenada en dichos países (Floyd 2008).

Esta se encuentra en la lista de agentes selectos en el Acta de Protección de Bioterrorismo Vegetal del 2002. Ha causado impacto en países como Estados Unidos infectando aproximadamente 3.7 millones de hectáreas de papa y se estima que en el mundo se pierde un aproximado de \$950 millones anuales (Floyd 2008).

En Estados Unidos se tiene referencia de la introducción de esquejes de geranio importados de Guatemala infectados de la R3b2 por lo que la industria de la floricultura ha venido decayendo. Esta sepa infecta de igual manera a la papa y al tomate por lo que al infestar un terreno se corre el riesgo de infectar cultivos de distintas especies (Floyd 2008).

3.1.2.2 Clasificación actual y distribución geográfica

Históricamente se ha subclasificado a *R. solanacearum* en cinco razas patógenas y cinco biovares. Las razas se han determinado en base al rango de hospederos que infecta y los biovares en relación a la habilidad que tienen de acidificar carbohidratos (Sánchez et al. 2008).

La raza 1 ocurre en áreas tropicales alrededor del mundo su temperatura óptima de desarrollo es de 35 °C como las razas 2, 4 y 5. La raza 2 ataca mayormente en áreas tropicales de Sudamérica en cultivos de banano y heliconias, causando la enfermedad del Moco; también en las Filipinas causa la enfermedad de Bugtok. La raza 3 se produce en mayores altitudes en los trópicos, y en zonas subtropicales y templadas ataca a cultivos de papa, tomate, ocasionalmente pelargonio, berenjenas y chile pimiento, y algunas malezas de la familias *Solanaceae*. La raza 4 se especializa en jengibre y la raza 5 (biovar 5) en *Morus* (Janse 2006).

De acuerdo al análisis de secuencia de ARN ribosomal de las regiones intergénicas se ha determinado una importante subdivisión fijogenética en el complejo de especies de *R. solanacearum* en cuatro filotipos agrupados por su origen geográfico ancestral. El filotipo I proviene de Asia, el filotipo II de América, el filotipo III de África y el filotipo IV proviene de Indonesia (Sánchez et al. 2008).

Los filotipos también pueden ser agrupados dentro de secuevares (grupos de aislamientos con secuencia de ADN altamente conservada de endoglucanasas o del gen *mutS* divergentes por menos del 1%) y clones (grupo de cepas que exhiben la misma huella genómica) (González et al. 2009).

Cuadro 5. Características de las razas y su relación con biovares de *Ralstonia solanacearum* (Champoiseau 2009).

Raza	Huésped principal	Distribución geográfica	Biovar
1	Tabaco, tomate, malezas solanaceas y no solanaceas, bananos, cacahuete, papa, pimienta, berenjena, jengibre, fresa, geranio, eucalipto, entre otras plantas.	Asia, Australia, Américas	3, 4, 1
2	Banano	Caribe, Brasil, Filipinas	1
3	Papas y tomate	Mundial excepto en los Estados Unidos y Canadá	2
4	Jengibre	Australia, China, Hawaii, India, Japón Asia del Sur India	4, 3
5	Árbol de moras	China	5

3.1.2.3 Descripción de la bacteria

Pastrik y Maiss (2000) describen que: “El moco de la papa es causado por la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (1995) (syn. *Burkholderia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (1992); syn. *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith)”.

Es gram negativa, con forma de bacilos o bastones rectos o curvos, con dimensiones de 0.5 a 1 x 1.5 a 4 um (micrómetros). Se desplazan por medio de uno o más flagelos polares. Muchas especies son habitantes comunes del suelo o ambiente marino y de agua dulce. La mayoría de las especies patógenas de éste género infectan a las plantas y sólo algunas de ellas a los animales y al hombre. Dicha bacteria no produce pigmentos fluorescentes por lo que se le denomina no fluorescente (Agrios 2008).

La bacteria entra en las raíces de la planta hospedera en el suelo y coloniza los vasos xilemáticos en el sistema vascular. Las plantas infectadas sufren amarillamiento, retraso en el crecimiento, marchitamiento y a menudo muerte prematura (Sánchez *et al.* 2008).

3.1.2.4 Sintomatología de la bacteria

A. Papa (*Solanum tuberosum*)

Los síntomas en el cultivo de papa se manifiestan de distinta manera. En el follaje incluyen rápida marchitez de las hojas y tallos. Eventualmente la planta no se recupera, presenta síntomas de amarillamiento, necrosidad y por último muere. Conforme la enfermedad avanza, se puede observar una coloración marrón en los tallos por encima del nivel del suelo y las hojas se tornan color bronce. Una masa viscosa exuda de los haces vasculares al cortarse algún tejido (EPPO 2004). Otro síntoma común que se asocia a la marchitez por *R. solanacearum* en el campo es el enanismo de las plantas. Estos síntomas pueden aparecer en cualquier etapa del crecimiento de la planta (Champoiseau 2009).

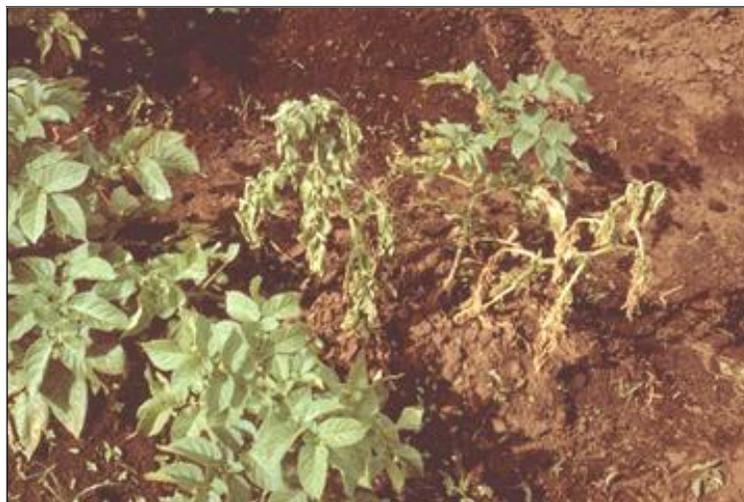


Figura 3. Síntoma de marchitez bacteriana de la papa causado por *R. solanacearum* (Champoiseau 2009).

En tubérculos es distinto, los síntomas externos pueden no ser visibles dependiendo del estado de la enfermedad. *R. solanacearum* se puede distinguir por un exudado bacteriano que a menudo emerge de los ojos en el punto donde el estolón se conecta al tubérculo, también puede aparecer suelo adherido a estos (EPPO 2004). Un tubérculo cortado transversalmente presenta en el anillo vascular una coloración parda, el cual tras una ligera presión hace salir el mucílago típico con aspecto de pus; en pudriciones avanzadas todo el tubérculo emana este exudado lechoso hasta desintegrarse (García *et al.* 1999).

La expresión del síntoma es favorecida por temperaturas altas, rangos entre 29 a 35°C, y los síntomas de la enfermedad pueden desarrollarse rápidamente después de la infección. No obstante, bajo condiciones favorables, plantas asintomáticas pueden quedarse latentemente infectadas por tiempo indefinido. Después de la infección el patógeno puede sobrevivir en la planta infectada y ser esparcido por la misma (Champoiseau 2009).



Figura 4. Tubérculo de papa infectado por *R. solanacearum* exudando bacteria (Champoiseau 2009).

B. Tomate (*Solanum lycopersicum*)

En cultivo de tomate las hojas jóvenes son las que muestran los síntomas. Se muestran flácidas y se marchitan rápidamente si las condiciones ambientales son favorables para el patógeno. Los tejidos vasculares del tallo muestran una coloración parda y si se cortan transversalmente puede ser visible el exudado bacteriano de coloración blanco o amarillento (EPPO 2004).



Figura 5. Síntomas de marchitez bacteriana en tomate causada por *R. solanacearum* mostrando marchitamiento de las hojas en los extremos de la rama de la planta (Champoiseau 2009).

C. Pelargonio (*Pelargonium sp.*)

En pelargonio los síntomas generales son marchitez y subsecuente clorosis. Los tallos pueden tornarse negros y eventualmente sufrir necrosis. A menudo puede observarse hojas de un lado de la planta con síntomas de marchitez. En casos severos las hojas se marchitan sin cambiar de color y se mantienen adheridas al tallo (EPPO 2004). El anormal enroscamiento hacia arriba en los márgenes de las hojas es típico de la enfermedad. Los márgenes de las hojas también se pueden volver cloróticos y más tarde necróticos, y la planta entera puede desecarse y morir. En las etapas tardes de la enfermedad, el desplome del tallo también puede ser observado (Champoiseau 2009).



Figura 6. Marchitez avanzada y amarillamiento anormal causado por *R solanacearum* (Floyd 2008).

3.1.2.5 Ciclo de la enfermedad

La bacteria puede sobrevivir por días a años en el agua, tierras húmedas o en las capas de tierras profundas (>75cm), dependiendo de las condiciones de temperatura. En hábitats acuáticos, los factores como el pH, niveles salados, organismos antagónicos o parasitarios pueden afectar la supervivencia bacteriana (Champoiseau 2009).

En climas fríos (menos de 18 °C), como en altitudes mayores a los 2,500 m.s.n.m., la bacteria crece muy lentamente y convive con el cultivo, como infección latente sin ocasionar daños aparentes ni presentar síntomas visibles (Rodríguez 2007). Hayward (1991) citado por Orozco (1977), describe que la temperatura es el factor más importante que afecta la interacción entre este patógeno y su hospedero y que el aumento de la temperatura del ambiente hasta 30-35°C° durante el día, aumenta también la incidencia y la severidad de la marchitez bacteriana, pero no para todas las estirpes del patógeno.

Otras condiciones que favorecen el desarrollo de la enfermedad es el mal drenaje del suelo, altos aportes de superfosfato a los suelos, soluciones nutritivas pobres en K sobre todo en verano, bajas concentraciones de nitrógeno en el suelo (López 2004).

3.1.2.6 Medio de infección de la bacteria

R. solanacearum infecta principalmente las plantas hospederas por las raíces. Penetra las heridas en los puntos de salida de raíces laterales o por daño de raíces que pueden ser causadas por microorganismos del suelo, como nemátodos (Champoiseau 2009).

A causa de propagación vegetativa, tubérculos infectados de semilla de papa y cortes infectados de geranio pueden jugar un papel mayor en la diseminación de la bacteria, especialmente durante infecciones latentes. El patógeno puede ser esparcido de campos infestados a campos sanos por transferencia de tierra en la maquinaria y pérdidas de superficie de riego después de irrigación o lluvia (Champoiseau 2009).

A pesar de que sea poco común encontrar frutos de tomate infectados con la bacteria, reportes han indicado que el patógeno es capaz de moverse del sistema vascular de la planta a los frutos bajo ciertas circunstancias (Sánchez *et al.* 2008).

Las medidas sanitarias permiten disminuir la cantidad de inóculo en un área de cultivo al trasladar y quemar las plantas o ramas infectadas y al limitar la propagación de las bacterias de planta en planta mediante la desinfección de las herramientas y manos después de haber manipulado plantas con síntomas de infección (Agrios 2008).

3.1.2.7 Métodos de diagnóstico y detección de *Ralstonia solanacearum*

Entre los aspectos más importantes en relación a la enfermedad, se encuentran el diagnóstico y la detección del agente causal por lo que se utilizan técnicas variadas. Desde diagnósticos en el campo, técnicas serológicas, moleculares, entre otras. Entre los métodos recomendados para la detección de *R. solanacearum* incluyen la prueba ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, por sus siglas en inglés) y cultivo en medios selectivos con procedimientos complementarios, ensayos inmunoenzimáticos indirectos, y ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Patrik y Maiss 2000).

Los aislamientos usando medios diferenciales y semiselectivos no son del todo satisfactorios para aislar la bacteria debido a que no permite el crecimiento de todas las cepas de *R. solanacearum* y o no impide el crecimiento de otras bacterias gram negativas relacionadas. Las técnicas serológicas en la actualidad no han sido del todo desarrolladas para identificación, más bien para detección (Schaad *et al.* 2001).

La reacción en cadena de la polimerasa ofrece alternativas para alta sensibilidad y especificidad de detección de la bacteria. La efectividad de los ensayos de PCR está limitada a la sensibilidad y especificidad de los cebadores usados, y la eficiencia de la reacción (Patrik y Maiss 2000).

A. Diagnóstico a nivel de campo

Para diagnosticar la bacteria en el campo se debe observar la presencia del exudado mucoso de los haces vasculares. Este se puede presentar en los ojos de tubérculos o en la superficie

cortada de un tubérculo donde las gotas del exudado se forman sobre los haces vasculares cortados (French *et al.* 1999). También se puede observar la presencia de la bacteria en el tejido vascular de tallos enfermos, se extrae una sección de este y se coloca en un vaso de agua. Una prueba positiva se da tras observarse a través de la pared del vaso el flujo bacteriano que emerge del xilema en forma de hilos de color lechoso que se proyectan hasta el fondo (Izaguirre 2008).



Figura 7. Flujo bacteriano de un tallo infectado por *R. solanacearum* inmerso en agua (Floyd 2008).

Las técnicas serológicas son utilizadas para detección rápida de *R. solanacearum* proveniente de cultivo de colonias bacterianas o directamente de material infectado. Estas pruebas están basadas en la capacidad de anticuerpos específicos para reconocer un antígeno, en este caso a *R. solanacearum*. Estas pruebas pueden ser utilizadas tanto en el campo como en el laboratorio para la identificación temprana del patógeno, pero a la vez poseen restricciones al no ser específicos en la identificación de las distintas cepas existentes de la bacteria (Champoiseau 2009).

B. Diagnóstico a nivel de laboratorio

- **Aislamiento de la bacteria**

Luego del diagnóstico en el campo se debe proceder a realizar pruebas en el laboratorio para identificar con certeza la presencia de la bacteria, por medio del siguiente procedimiento:

- a) Se selecciona material representativo. Se desinfecta (alcohol 70%) el material utilizado (Rodríguez 2007).
- b) Con la muestra de flujo bacteriano se procede a realizar estriados en medios de cultivo para bacterias en caja petri. Para la siembra de la bacteria mediante estriados se diluye la concentración de la misma en el medio en direcciones contrarias y con giros de 180°, todo realizado dentro de una campana de flujo laminar (Rodríguez 2007).
- c) Colocar en la incubadora las cajas petri por 48-72 horas, a temperatura de $\pm 28^\circ$ brindado las condiciones óptimas para el desarrollo de las colonias (Rodríguez 2007).
- d) Se inicia el proceso de purificación de la bacteria, seleccionando colonias que correspondan con las características que correspondan a las características de la bacteria, para luego cultivarlas en medios nutritivos (Rodríguez 2007).

- **Cultivo de bacterias**

El cultivo de bacterias corresponde a un medio nutritivo específico para el crecimiento de bacterias fitopatógenas (Rodríguez 2007). Existen diferentes medios para la detección de *R. solanacearum*, por ejemplo el medio YDC (Yeast extract-dextrose-CaCO₃) en donde las colonias se muestran mucoides y de coloración beige a café claro. Medio CPG y TTC

(Triphenyl tetrazolium chloride) (Schaad *et al.* 2001) al cual se le puede aplicar el tetrazolium, útil para distinguir colonias virulentas dando una coloración fucsia en forma de estrías dentro de la formación de la colonia resultando positivo mediante la reacción del tetrazolium con el citocromo de la bacteria que produce los pigmentos ya referidos (Rodríguez 2007).

Plántulas de papa que se desarrollan de tubérculos portadores de la bacteria pueden ser adecuados para la detección de *R. solanacearum* en suelo, también plántulas de tomate pueden ser utilizadas para desarrollar poblaciones del patógeno en extractos de tubérculos de papa (Schaad *et al.* 2001).

3.1.3 Reacción en cadena de la polimerasa, PCR

Antiguamente en la práctica era difícil obtener moléculas de ácido desoxiribonucleico, ADN, bien definidas de cualquier organismo. En 1983, Kary Mullis creó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa la cual permite amplificar y crear un número ilimitado de copias de una región específica de ADN (Mullis 1990).

En el inicio del PCR se utilizaba polimerasa, cuyas funciones naturales son reparación y replicación del ADN, que se destruía fácilmente a altas temperaturas, por lo que era necesario agregar más durante cada ciclo de la reacción (Mullis 1990). En 1988, Saiki y sus colegas descubrieron que al utilizar una ADN polimerasa termoestable de *Thermus aquaticus* no era necesario agregar más durante cada ciclo de la reacción (Nakhla 2004). En la actualidad, la utilización de esta permite ser añadida al inicio de la reacción y mantenerse activa durante todo el proceso. El ambiente natural de la bacteria son aguas termales junto a geisers a 75°C, la

cual tiene una ADN polimerasa que funciona bien a altas temperaturas (72°C) e incluso es estable a 94°C (Rodríguez y Barrera 2004).

3.1.3.1 Componentes de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Los componentes básicos para realizar la PCR son los siguientes:

- **Solución amortiguadora:** este componente establece las condiciones de pH correctas para el funcionamiento de la ADN polimerasa. Generalmente, el amortiguador mantiene un rango de pH de 8.3 a 8.8 a temperatura ambiente y baja a aproximadamente 7.2 al ser incubado a 72°C (Fulladolsa 2009).
- **Fuente de nucleótidos (dNTPs):** estos son utilizados por la ADN polimerasa para sintetizar las nuevas cadenas de ADN en la reacción (Nakhla 2004).
- **ADN polimerasa:** cataliza la adición covalente de nucleótidos a la cadena simple de ADN. La enzima es activa únicamente en presencia de iones de Mg²⁺ y de ADN preexistente, el cual debe servir como iniciador o cebador y como molde (Fulladolsa 2009).
- **Cebadores de ADN (delantero y reversa):** son pequeños segmentos específicos que se deben acoplar únicamente a la secuencia que se está amplificando. Su temperatura de fusión debe ser mayor a la temperatura de acoplamiento para que estos se puedan acoplar al ADN objetivo antes del paso de la extensión. Usualmente constan de 18 a 24 nucleótidos de longitud (Nakhla 2004).
- **ADN molde:** puede ser monocatenario (una hebra) o bicatenario (dos hebras); aislado cualquier organismo. Normalmente, existen varios miles de copias de ADN en la mezcla de reacción del PCR (Nakhla 2004).

- **Cationes divalentes:** la ADN polimerasa necesita cationes divalentes para su actividad. Normalmente se utiliza Mg^{2+} , la concentración molar de estos debe exceder la concentración de los dNTPs y de los cebadores, ya que éstos también capturan los iones y debe quedar disponibilidad del catión para la polimerasa (Nakhla 2004).

El procedimiento para la reacción en cadena de la polimerasa requiere de tres pasos para realizar un ciclo de copiado. Cada paso permite que la temperatura de la mezcla cambie para optimizar la reacción. Los ciclos se pueden repetir cuantas veces sea necesario para obtener las copias de ADN que se requieran. Los pasos para un ciclo de copiado se describen a continuación (Iowa State University 2005):

1. **Desnaturalización:** la doble hebra de ADN que va a ser copiada se calienta a $\pm 95^{\circ}C$ por lo que los puentes de hidrógeno entre las bases complementarias se rompen. El producto de este paso son dos hebras de ADN sueltas y extendidas (Iowa State University 2005).
2. **Alineamiento o Hibridación:** la temperatura baja hasta $\pm 58^{\circ}C$ lo que permite que los cebadores se adhieran a su secuencia complementaria en las hebras molde de ADN, formando enlaces hidrógeno entre las bases. (Iowa State University 2005).
3. **Síntesis de ADN o extensión:** la temperatura se eleva hasta $\pm 72^{\circ}C$ lo que permite que la ADN polimerasa incorpore los nucleótidos libres en las nuevas hebras de ADN. La nueva hebra de ADN es formada por medio del apareamiento de las bases nitrogenadas que son complementarias hasta que se llegue al final de la región a ser copiada (Iowa State University 2005).

3.1.3.2 Electroforesis en gel de agarosa para visualización de bandas de ADN

El método de electroforesis de ácidos nucleicos hace referencia a la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico con el objetivo de separar, identificar y purificar moléculas o fragmentos de DNA y RNA (Padilla *et al.* 2006; Alvadalejo 2006). Fue empleado por primera vez por Tiselius en el año 1937 (García 2000).

La agarosa es un polisacárido natural extraído de las paredes celulares de ciertas algas rojas llamadas agarofitas. La estructura macrorreticular de los geles de agarosa se forma por uniones de puentes de hidrógeno que hacen que el gel sea termo-reversible, y por lo tanto que se funda cuando es sometido a calentamiento. La ausencia de grupos iónicos hace que el gel sea una estructura neutra e inerte, por lo que se evita la interacción de las moléculas con la estructura del gel (Hispanagar.com s.f.).

Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma, de manera que moléculas de ADN de diferente tamaño van a moverse de forma distinta en una electroforesis en gel (Padilla *et al.* 2006).

Los geles de agarosa se utilizan para fragmentos grandes de ADN, dependiendo la concentración de agarosa se pueden separar fragmentos de hasta 50kb aplicando un campo eléctrico constante (Alvadalejo 2006).

Cuadro 6. Concentraciones de agarosa utilizadas para la separación electroforética de fragmentos lineales de ADN de diferentes tamaños (Alvadalejo 2006).

Agarosa (%)	Intervalo de tamaños separables (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10.0
0.9	0.5-7.0
1.2	0.4-6.0
1.5	0.2-3.0
2.0	0.1-2.0

El gel de agarosa se coloca en un aparato horizontal, denominado cámara de electroforesis, el cual constituye un sistema eléctrico termodinámico. Consiste en una caja dividida en dos compartimentos por medio de una plataforma en el centro. El gel se coloca sobre la plataforma y se agrega tampón de electroforesis. La cámara posee electrodos en cada compartimento. El aparato recibe energía de una fuente de poder y libera energía en forma de calor. Las moléculas de ADN son sometidas a electroforesis y se desplazan al polo positivo, ya que a pH superiores a 5 poseen carga negativa (Fulladolsa 2009).

La movilidad electroforética del ADN se ve afectada por la composición y la fuerza iónica del tampón de electroforesis. En ausencia de iones, la conductividad eléctrica es mínima y el ADN migra lentamente. En un tampón de elevada fuerza iónica la conductividad eléctrica es elevada y se genera una mayor cantidad de calor. Los tampones para la electroforesis de ADN contienen EDTA, y tris-acetato (TAE), tris-borato (TBE) o tris-fosfato (TPE) con pH entre 7.5-7.8 (Osma y Querci 2007).

El peso molecular de los ácidos nucleicos puede determinarse en electroforesis al comparar las movilidades electroforéticas de varios marcadores de peso molecular conocido. Existen patrones de varios rangos de peso molecular, se debe aplicar el que abarque el peso molecular esperado (García 2000).

Los geles de agarosa se tiñen con bromuro de etidio el cual es una sustancia que se intercala entre las bases del DNA y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Luego de la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y se observan las bandas correspondientes a las muestras de DNA aplicado y los marcadores de peso molecular (Padilla *et al.* 2006).

3.2 Marco referencial

3.2.1 Áreas de colecta de muestras de tubérculos-semilla

La colecta de tubérculos-semillas se realizó en el occidente del país, zona que se caracteriza por su producción de papa *Solanum tuberosum* específicamente en el departamento de Quetzaltenango el cual es el segundo productor de papa en Guatemala. Los principales municipios productores de Quetzaltenango son Palestina de los Altos (21%), San Martín Sacatepéquez (20%), Concepción Chiquirichapa (18%) y Ostuncalco (18%) (MAGA 2008). En base a esta información se seleccionaron los tres últimos municipios para la recolección del material vegetal.

3.2.1.1 Ubicación geográfica

El departamento de Quetzaltenango se ubica en la región Suroccidental del país. El departamento cuenta con 24 municipios, los cuales cuentan con una extensión total de 1,951 kilómetros cuadrados (UVG 2003). Entre éstos se determinó el área de muestreo detallada a continuación:

El municipio de Concepción Chiquirichapa cuenta con una extensión territorial de 48 kilómetros cuadrados. Se encuentra a una altura de 2,565 m.s.n.m. latitud de 14° 51' 20'', longitud 91° 37' 26''. El territorio se encuentra limitado por 5 municipios. Al norte limita con San Juan Ostuncalco y San Mateo, al sur limita con San Martín Sacatepéquez, al este con San Mateo y Quetzaltenango y al oeste con San Juan Ostuncalco y San Martín Sacatepéquez, todos municipios del departamento de Quetzaltenango (SIM s.f.).

San Martín Sacatapéquez posee una extensión territorial de 48 kilómetros cuadrados. Se encuentra a una altura de 2,490 m.s.n.m. latitud $14^{\circ} 49' 22''$, longitud $91^{\circ} 38' 33''$. El municipio colinda al norte con el municipio de Concepción Chiquirichapa y Palestina de los Altos, al este con Concepción Chiquirichapa y Quetzaltenango, al sur con El Palmar y Colomba y al oeste con Colomba y San Cristobal Cucho, y San Antonio Sacatepéquez (San Marcos) (Funcede 1994).

Por último, San Juan Ostuncalco posee una extensión territorial de 44 kilómetros cuadrados. Se encuentra a una altura de 2,500 m.s.n.m. latitud $14^{\circ} 52' 6''$, longitud $91^{\circ} 37' 15''$. Colinda al norte con Cojolá y Palestina de los Altos, al este con San Mateo, al sur con Concepción Chiquirichapa y al este con Palestina de los Altos, todos municipios del departamento de Quetzaltenango (Estrada 1982).

3.2.1.2 Características principales de producción

La producción de papa en Guatemala data, según otras fuentes, desde el año 1771. Actualmente, es una de las hortalizas tradicionales dentro de la agricultura guatemalteca cuyas cosechas han sido destinadas principalmente al abastecimiento del mercado nacional y centroamericano. Esta actividad agroproductiva ha sido favorecida por la existencia de diversos microclimas, cuyas condiciones naturales permiten su cultivo durante todo el año (MAGA 2008). Debido a esta producción histórica de la papa, se ha llegado a constituir como el cultivo básico en la economía de los habitantes de los tres municipios seleccionados para la recolección, y también dado a la gran importancia que tiene el cultivo en los municipios, San Martín Sacatepéquez, Concepción Chiquirichapa y San Juan Ostuncalco se constituyen como

zonas eminentemente semilleristas, siendo los principales distribuidores de semilla al resto del país (Loarca 1987).

Según Loarca Marroquín (1987), en una investigación realizada hace más de 20 años, encontró que la presencia de la bacteria en el municipio de Concepción Chiquirichapa y San Martín Sacatepéquez ya era significativa en el cultivo de papa. Él obtuvo un porcentaje de incidencia de la bacteria en el cultivo entre 1.319% hasta 8.38%. Evidentemente, los altos porcentajes de incidencia de *R. solanacearum* que obtuvo Loarca durante el desarrollo del cultivo no corresponden solamente a la contaminación proveniente de tubérculos-semillas, sino también a otros factores que favorecen el apareamiento de la enfermedad. Por lo tanto factores como tierra infectada que se moviliza de un lugar a otro, agua de riego o escorrentía en época de lluvia, por medio de animales, por nemátodos y algunas malezas, también son fuente de inóculo de la bacteria, afectando directamente la producción de la papa.

3.2.2 Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, USAC

El aislamiento y purificación de la bacteria *Ralstonia solanacearum* en tubérculos-semillas de papa, las pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR, y electroforesis fueron realizadas en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, edificio T-8, Laboratorio B-12, en el campus central de la Universidad de San Carlos, zona 12 ciudad de Guatemala, Guatemala.

4 OBJETIVOS

4.1 General

- Determinar la presencia de *Ralstonia solanacearum* en semilla no certificada de papa, producida en los municipios de Concepción Chiquirichapa, San Martín Sacatepéquez y San Juan Ostuncalco del departamento de Quetzaltenango, Guatemala.

4.2 Específicos

- Identificar la bacteria *Ralstonia solanacearum* en tubérculos de papa no certificada, producidos en los municipios de Concepción Chiquirichapa, San Martín Sacatepéquez y San Juan Ostuncalco.
- Determinar la proporción de tubérculos de papa infectados por la bacteria *Ralstonia solanacearum*.

5 HIPÓTESIS

Los tubérculos de papa comercializados por productores de Quetzaltenango, son utilizados como semilla y se encuentran infectados por *Ralstonia solanacearum* en una razón de riesgo epidemiológico.

6 METODOLOGÍA

6.1 Selección del área a muestrear

Se seleccionaron los municipios de Concepción Chiquirichapa, San Martín Sacatepéquez y San Juan Ostuncalco, todos del departamento de Quetzaltenango. Dichos municipios son importantes productores de papa comercial la cual utilizan como semilla y es distribuida a productores de todo el país.

6.1.1 Obtención de muestras

Se colectaron muestras de tubérculos-semilla no certificados de productores comerciales del área seleccionada. Se compraron de 4 a 5 libras por muestra las cuales se identificaron debidamente:

Nombre del productor: _____
Departamento: _____
Municipio: _____
Fecha de colecta: _____
Número de muestra: _____
Cantidad colectada: _____
Tipo de semilla: _____
Variedad: _____
Observaciones: _____

Figura 8. Etiqueta de identificación de muestras

Las muestras se colectaron en bolsas de polietileno libres de contaminantes, las cuales fueron debidamente selladas luego de introducir la papa obtenida y se conservaron sin exposición directa al sol. Se almacenaron en el laboratorio de Biotecnología luego de ser colectadas, en un periodo no mayor a dos días después de ingresarlas.

Las muestras se obtuvieron por medio de un sondeo o análisis exploratorio (Ruano 1989) en las principales zonas de producción y comercialización de tubérculos utilizados como semilla. Los tubérculos colectados no se seleccionaron bajo ningún criterio más que el de ser utilizado para venta de semilla, no se tomaron en cuenta la presencia de síntomas por enfermedades o plagas.

6.2 Aislamiento y purificación de la bacteria

Se utilizaron dos medios nutritivos para aislar *Ralstonia solanacearum*. El primer medio, CPG-TZC (1 Litro) (Schaad *et al.* 2001): Caseína hidrolizada 1 g, Peptona 10 g, Glucosa 5 g, Agar 17 g, Extracto de levadura 1 g, Triphenyl tetrazolium chloride (TZC) 5 ml (se agrega luego del proceso de esterilización en autoclave).

El segundo, Medio Semiselectivo Sudáfrica modificado, SMSA (1 litro): Caseína hidrolizada 1 g, Peptona 10 g, Glicerol 1 ml, Agar 17 g, Triphenyl tetrazolium chloride (TZC) 5 ml (se agrega luego del proceso de esterilización en autoclave). Luego se disolvió en 5 ml de etanol al 70% por 30 minutos cada uno de los componentes siguientes por aparte: Cristal violeta 5 mg, Polymyxin β sulfato 100 mg, Bacitracina 25 mg, Cloromicetina 5 mg, Penicilina 0.5 mg, Cicloheximida 100 mg. Estos se disolvieron antes de ser agregados al medio autoclaveado (Sánchez *et al.* 2008).

Luego de la preparación de los medios nutritivos se procedió a realizar el aislamiento del patógeno de los tubérculos-semillas de la manera siguiente:

- A. Se lavaron los tubérculos-semilla con agua eliminando residuos de cualquier procedencia.

- B. Se obtuvo una porción de tejido vascular el cual se maceró en un mortero con agua estéril (2-3 minutos).
- C. La mezcla macerada se utilizó para cultivar en el medio nutritivo. Con ayuda de un asa de inoculación debidamente esterilizada se procedió a hacer un estriado en los medios.
- D. Se colocaron los cultivos de bacterias a temperatura ambiente (28°C) durante 48-72 horas para el desarrollo de las colonias.
- E. Por último se realizó la purificación de las colonias. Se seleccionaron las colonias con características propias de *Ralstonia solanacearum*, consistencia mucoide y color cremoso para su posterior replicación.

6.3 Protocolo de PCR

Se realizó el proceso de reacción en cadena de la polimerasa por medio de los ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión para comprobar la presencia de *Ralstonia solanacearum* en los tubérculos comercializados como semillas utilizados para la investigación. Las copias se obtuvieron de las colonias en el medio CPG-TZC y SMSA que presentaron las características propias del patógeno.

La solución se realizó en tubos Eppendorf de 250- μL . Para la reacción se utilizaron los siguientes componentes: ADN molde 40 ng, Amortiguador 10X 2.5 μL , 25 nM MgCl_2 2.5 μL , 0.25 nM dNTPs 2.5 μL , Taq polimerasa 5 U/ml 0.1 μL , Cebador delantero 10 pmol 2.5 μL , Cebador reversa 10 pmol 2.5 μL (Sánchez *et al.* 2008).

Los cebadores específicos para detección de *Ralstonia solanacearum* que se utilizaron poseen la siguiente secuencia (Opina 1997):

759 (5'-GTCGCCGTCAACTCACTTTCC-3')

760 (5'-GTCGCCGTACGAATGCGGAATCG-3')

La amplificación de las reacciones de PCR se realizaron en un termo ciclador por medio de los siguientes ciclos: 3 minutos a 96°C, seguido de 30 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C. La reacción se completara con 5 minutos a 72°C (Sánchez *et al.* 2008).

6.4 Protocolo de electroforesis

Para efectuar la electroforesis se utilizó un gel de agarosa al 1.5% para el corrido de las cadenas de ADN luego del PCR. El procedimiento fue el siguiente (Rodríguez 2007):

- a. Pesar y preparar la solución de agarosa la cual se fundió en horno microondas.
- b. Se colocó la solución en un molde de gel nivelado horizontalmente y ya también el molde para pozos con el número de celdas a utilizarse.
- c. Se dejó reposar hasta que se solidificó la solución.
- d. Se colocó el gel sólido sobre la cámara de electroforesis y se agregó buffer (TBE a 0.5X).
- e. Se aplicó 2 µL de buffer de carga por muestra de ADN.
- f. Se agregó el marcador de peso.
- g. Se llenaron los pozos con las muestras obtenidas por PCR, evitando la contaminación y mezcla entre las mismas.
- h. Se proveyó la fuente de poder a la cámara para iniciar la electroforesis.

- i. Terminó la electroforesis cuando el color del cargador avanzó aproximadamente 2/3 partes del gel.
- j. Seguidamente se colocó el gel en la solución de Bromuro de Etidio y buffer para su tinción. Se sumergió el gel con agitación durante 10-15 minutos, tomando las precauciones necesarias para su manejo dado a las características cancerígenas del Bromuro de Etidio.
- k. Finalmente se colocó el gel en un trasiluminador y se observó con luz ultravioleta.
- l. Se observaron los resultados de la corrida de ADN y se archivaron fotos para su posterior análisis.

6.5 Análisis de resultados

6.5.1 Análisis de medios nutritivos

El análisis se llevó a cabo con los medios nutritivos en los cuales se desarrollaron colonias bacterianas con las características morfológicas típicas de *Ralstonia solanacearum*. Las colonias seleccionadas presentaron aspecto mucoso y coloración beige a café claro. Se distinguieron las que formaron estrías de coloración fucsia las cuales corresponden a colonias virulentas positivas las cuales reaccionaron con el tetrazolium. Las colonias de las cuales se obtuvieron crecimiento característico se tomó muestras para su amplificación por medio de PCR.

6.5.2 Análisis de la información de PCR

Las muestras de colonias bacterianas purificadas que se obtuvieron de los medios nutritivos se utilizaron para su amplificación en el termo ciclador por medio de la técnica de PCR. Cada muestra amplificada se corrió en un gel de agarosa al 1.5%. Tras la tinción del gel con bromuro de etidio y su visualización con luz UV se obtuvo bandas de 281 pares de bases (Schaad *et al.* 2001) lo cual confirmó la presencia de *Ralstonia solanacearum* en los tubérculos.

6.5.3 Análisis de la presencia de *Ralstonia solanacearum* en tubérculos-semillas de papa

La información obtenida se utilizó para conocer la presencia de la *Ralstonia solanacearum* en tubérculos comercializados como semillas no certificados y obtener una proporción de la infección de la misma en la producción comercializada a productores de papa.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith está causando grandes pérdidas a los agricultores en el campo, se identifica por la expresión que sufren las plantas por amarillamiento, retraso en el crecimiento, marchitez y finalmente la muerte. Sin embargo, pueden existir infecciones latentes en donde estén presentes altas poblaciones de la bacteria y ésta no muestre síntomas. Poblaciones de la misma pueden ser diseminadas por herramientas agrícolas, insectos polinizadores, agua de irrigación, suelos infestados, infecciones latentes en material vegetativo (como tubérculo-semillas de papa, esquejes de *Pelargonium* y cormos de banano) y por medio de raíces dañadas por nemátodos (Sánchez et al. 2008).

En el caso de Guatemala, la fuente más importante de diseminación de esta bacteria es la producción de tubérculo comercial de papa y su venta como semilla, lo que demuestra que en su mayoría no hay una cultura de producción y siembra de semilla certificada. También se ha evidenciado que la poca producción que existe de semilla bajo altos estándares de calidad supera los precios de la semilla no certificada, encontrándose desde Q.0.25 los tubérculos no certificados hasta precios de semilla de calidad prebásica y básica de Q.4.00 la unidad; estos precios también influyen en la comercialización de semilla libre de patógenos y por lo tanto incide en la infestación de nuevas áreas de producción.

La falta de regulación en el mercado de la semilla no certificada de papa tiene consecuencias directas en las pocas opciones que tienen los productores para acceder a producto de calidad y a precios viables. Actualmente no se posee un control sobre la producción de la misma en el

país, por lo tanto la desinformación sobre la diseminación de la bacteria también es una incógnita. La comercialización se realiza de forma no regulada y consecuentemente el mercado se maneja al gusto de los comerciantes y no de las necesidades de los compradores.

7.1 Obtención de muestras

Para determinar la incidencia del patógeno en tubérculos-semilla de papa se realizó un sondeo (Ruano 1989) lográndose obtener 150 tubérculos-semilla de 17 productores comerciales en estas zonas. Inicialmente se consideró tomar 10 productores en cada localidad y solamente se logró coleccionar este número en Concepción Chiquirichapa; en el caso de San Juan Ostuncalco y San Martín Sacatepéquez, solamente se coleccionaron tubérculos de cuatro y tres productores respectivamente, dado a que en su mayoría son revendedores de los productores de Concepción Chiquirichapa.

Durante el proceso de recolección de muestras se detectó que el productor no trabaja con estándares o normas de calidad de ningún tipo. Sin embargo, las preferencias de los consumidores y las exigencias de los intermediarios determinan las características de la papa que se selecciona para enviar al mercado. De esta forma, la calidad de la papa se evalúa fundamentalmente por su tamaño.

En base a estas observaciones, la figura 9 muestra los distintos tipos de tubérculos-semillas que son comercializados a productores de papa y que varían en su aspecto, como se mencionó anteriormente.



Figura 9. Tubérculos-semillas de papa comercializados en los municipios de Concepción Chiquirichapa, San Martín Sacatepéquez y San Juan Ostuncalco, utilizados para determinar presencia de *R. solanacearum*.

7.2 Aislamiento y purificación de *Ralstonia solanacearum*

Como se mencionó anteriormente, los productores seleccionan la semilla a partir de sus características físicas sin embargo no es posible identificar si dicho material posee infecciones latentes de *R. solanacearum*. Dado a esta imposibilidad de identificar la presencia de la bacteria de forma visual, se trasladaron las muestras al laboratorio en los cuales se pudo determinar el crecimiento distintas colonias de microorganismos que confirmaron la presencia de infecciones latentes de la bacteria en los tubérculos comercializados como semilla, encontrándose diferencias entre los medios utilizados.

Los aislamientos iniciales presentaron contaminación pero luego se logró purificar las colonias de la bacteria en estudio. De los medios utilizados el SMSA es más específico, debido a sus componentes antibióticos los cuales inhiben el crecimiento de microorganismos fungos y favorecen el crecimiento de la bacteria. Por otro lado, el medio CPG no es tan específico pues los antibióticos no son utilizados para evitar el crecimiento de otros organismos. En los

aislamientos utilizados se puede observar en la figura 10 pequeñas colonias mutantes o no virulentas las cuales tienen una apariencia seca, redonda y nada fluidas. Por el contrario se observa en la figura 11 colonias virulentas o normales de *R. solanacearum* cuyas características físicas muestran una consistencia lechosa, mucoide y blanquecina con coloración levemente roja en el centro, de crecimiento irregular que permite distinguirla de las demás colonias.

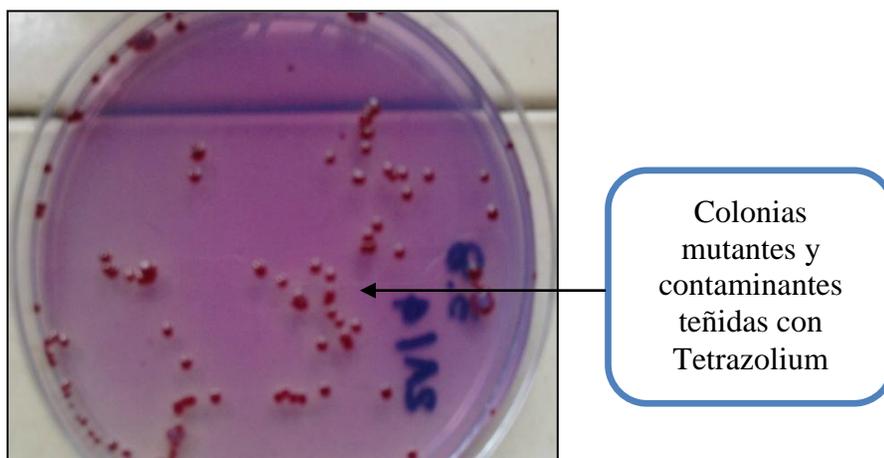


Figura 10. Crecimiento de colonias mutantes y contaminantes en SMSA.

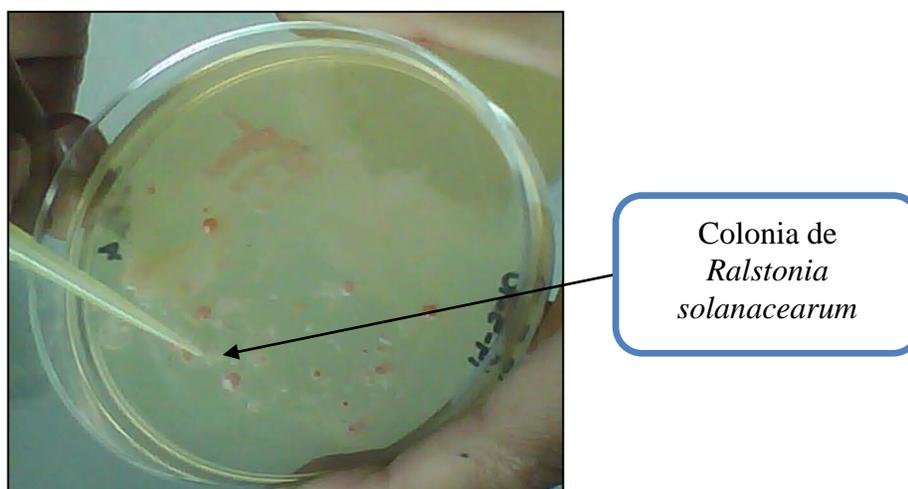


Figura 11. Crecimiento de colonias bacterianas de *Ralstonia solanacearum* en medio CPG-TZC.

Las colonias aisladas se purificaron dando como resultado colonias puras, siguiendo la metodología descrita anteriormente. En la figura 12 se identificaron dentro del óvalo las colonias purificadas cuyo aspecto corresponde a las características morfológicas esperadas de la bacteria. También se observan colonias que corresponden a otros organismos no identificados.



Figura 12. Purificación de colonias de *Ralstonia solanacearum*

Finalmente se logró purificar 12 colonias, confirmándose luego la presencia de *R. solanacearum* con el diagnóstico de PCR.

A continuación se presenta un cuadro resumen en donde se identifican las zonas muestreadas, enumerando los productores por municipio y cuántos tubérculos-semilla se utilizaron por cada uno. Se muestra también cuáles tubérculos-semilla presentaron incidencia de *R. solanacearum* al aislarla en medios nutritivos y de éstos aislamientos cuáles fueron positivos en la prueba de PCR.

En el departamento de Concepción Chiquirichapa se colectaron tubérculos de diez productores de los cuales dos presentaron incidencia de la bacteria en su producto. A nivel de reconocimiento se logró aislar la bacteria de nueve tubérculos-semilla, mas en la prueba de PCR sólo un aislamiento dio resultado positivo.

Luego se observó que en el municipio de San Martín Sacatepéquez, se logró colectar tubérculos-semilla de cuatro productores de los cuales sólo uno mostró producto contaminado. En este caso se nota que los dos tubérculos-semilla de los cuales se encontró presencia de *R. solanacearum* también dieron respuesta positiva en prueba de PCR.

Por último en la localidad de San Juan Ostuncalco, sólo se logró contactar a tres productores que venden tubérculos comerciales como semilla, al igual que los anteriores descritos. De los tres, sólo uno presentó material contaminado y este mismo aislamiento presentó pruebas positivas en PCR, confirmando la presencia de la bacteria.

A continuación en el cuadro 7 se detalla la información anteriormente descrita.

Cuadro 7: Tubérculos-semilla que presentaron incidencia de *Ralstonia solanacearum* por productor.

Procedencia	Productor	Tubérculos-semilla									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concepción Chiquirichapa	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
	6	+	+	+	-	+	⊕	-	-	■	
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	■					
San Martín Sacatepéquez	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	■	
	13	-	-	⊕	⊕	-	-	■			
	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
San Juan Ostuncalco	15	-	-	-	-	■					
	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	-	-	-	-	⊕	-	-	-	-	-

- : Prueba negativa en medio nutritivo
 + : Prueba positiva en medio nutritivo
 ■ : Sin unidad
 ⊕ : Prueba positiva con PCR

7.3 Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa y electroforesis para colonias de *R. solanacearum* identificadas en medios nutritivos.

Como se mencionó anteriormente, en la localidad de Concepción Chiquirichapa sólo el productor cinco y seis mostraron incidencia de la bacteria en sus tubérculos, los cuales fueron posteriormente sometidos a la prueba de PCR. En el municipio de San Martín Sacatepéquez y

San Juan Ostuncalco solamente se identificaron dos productores que comercializan su producto con infecciones latentes del patógeno.

El cuadro 8 detalla a los tubérculos-semilla que presentaron incidencia de *R. solanacearum* en medios nutritivos y se les asignó una numeración para identificarlos en la prueba de PCR.

Cuadro 8: Identificación de tubérculos-semillas utilizados para prueba de PCR.

Localidad	Productor	Tubérculo-semilla
Concepción Chiquirichapa	5	5.1
		5.2
		5.3
		5.7
	6	6.1
		6.2
		6.3
		6.5
San Martín Sacatepéquez	13	6.6
		13.3
San Juan Ostuncalco	17	13.4
		17.5

Las colonias evaluadas con PCR confirmaron la presencia de la bacteria en 4 de las 8 muestras corridas. Solamente las unidades 6.6, 13.3, 13.4 y 17.5 corrieron en el gel de agarosa. En la figura 13 se observan las muestras corridas. Los controles positivos (CP) muestran que las unidades positivas son del mismo peso molecular por lo que se contemplan bandas del mismo tamaño, contrario al control negativo (CN) que, como era de esperarse, no presentó banda alguna.

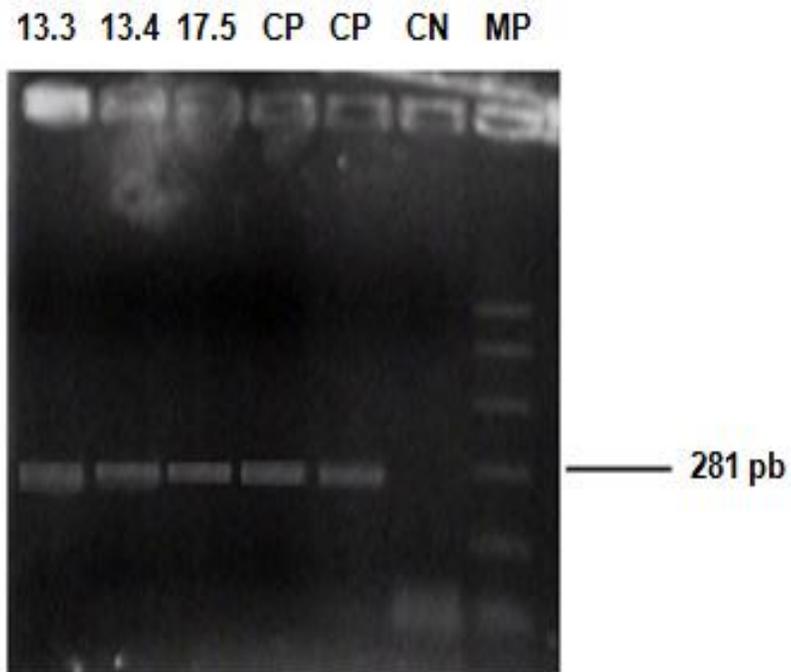
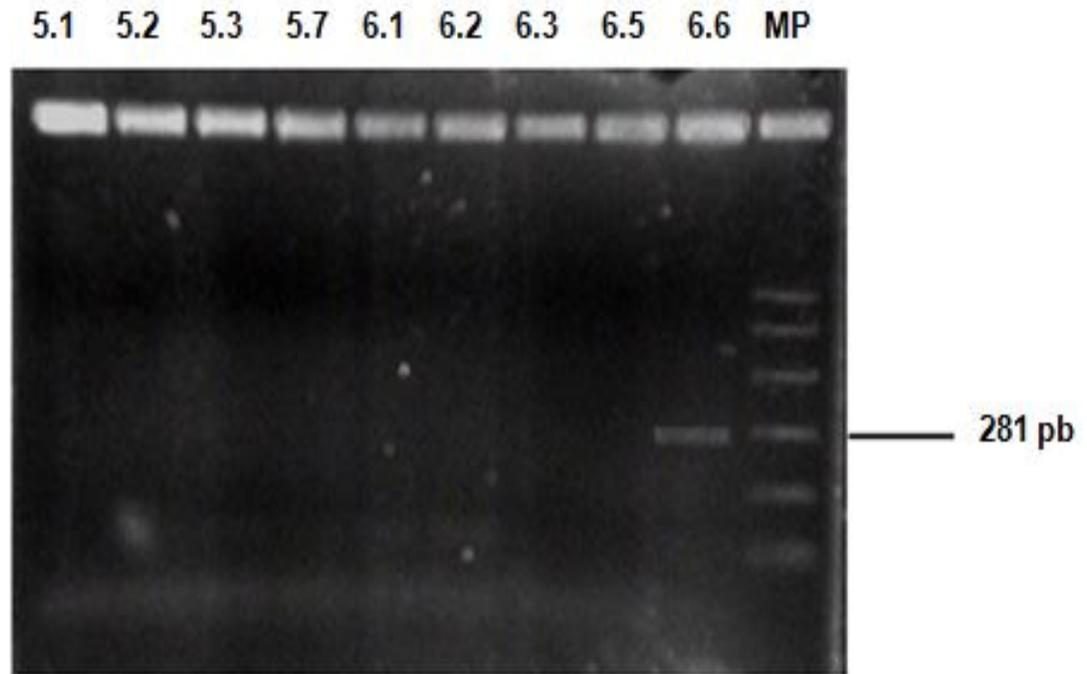


Figura 13. Fotografías de gel de agarosa mostrando el producto amplificado mediante PCR con el par de cebadores 759 y 760 y con bandas de 281 pares de bases. MP: Marcador de peso molecular, CP: Control positivo, CN: Control Negativo.

Como se mencionó al inicio, el presente estudio corresponde a un análisis exploratorio sobre la diseminación de la bacteria por medio de tubérculos comercializados como semilla. Dado a esto se obtuvo que la presencia de *Ralstonia solanacearum* por medio de aislamiento en medios de cultivo es del 8%, porcentaje que se representa a nivel de reconocimiento o exploratorio; y la prueba de PCR denotó la presencia de la bacteria en un 2.66% lo cual se muestra a un nivel de detalle.

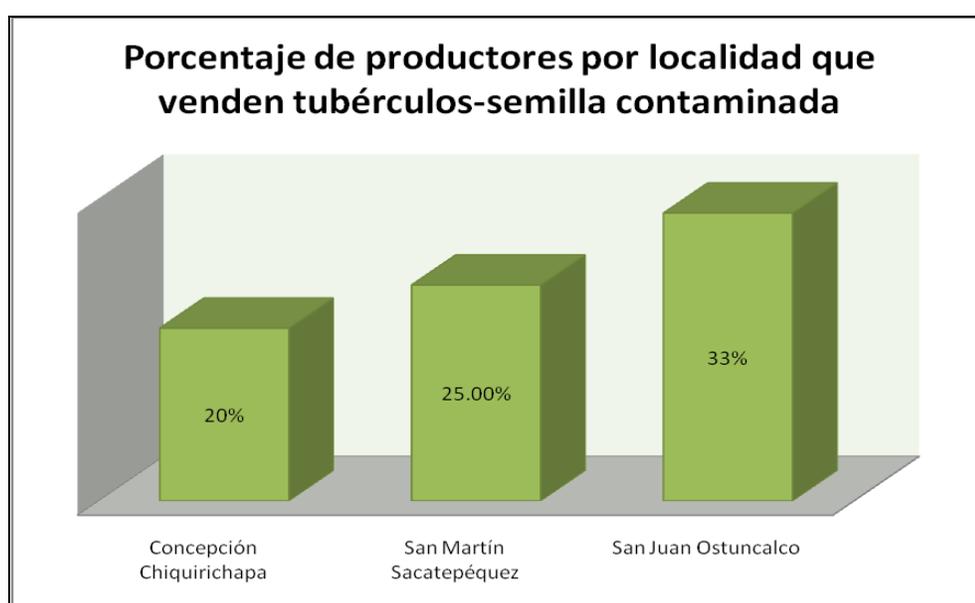
Esta diferencia en porcentajes se debe a distintas razones, entre éstas se encuentra la sensibilidad del PCR a la sensibilidad y especificidad de los cebadores utilizados y de la eficiencia de la reacción. La Taq polimerasa también es sensible a la inhibición por factores presentes en las muestras biológicas. Teóricamente la técnica de PCR es capaz de detectar tan pocas como una sola hebra de ADN (Patrik 2000), más en la práctica se pudo dar un falso negativo por otras circunstancias como el hecho de que las colonias utilizadas para realizar la prueba de PCR no estuviesen completamente purificadas por lo que otros organismos pudieron haber inhibido la acción de la reacción.

Por otro lado se pudieron hacer otras inferencias con respecto a los resultados obtenidos a nivel de reconocimiento. Los productores evaluados revelaron que la incidencia de la bacteria en los tubérculos que están comercializando como semilla es alta, en el caso del productor 5 del municipio de Concepción Chiquirichapa posee actualmente un porcentaje de infección de la bacteria del 40% del total de sus tubérculos, luego el productor 6 presenta un 50% de incidencia lo cual muestra que ambos comercializan un gran porcentaje de su producto con infecciones latentes de la peligrosa bacteria. En el municipio de San Martín Sacatepéquez sólo el productor 13 presentó un 33.33% de incidencia la cual también es bastante alta, y por último el productor 17 de San Juan Ostuncalco con un 10% de incidencia.

También se pudo determinar que 2 de cada 10 productores en el municipio de Concepción Chiquirichapa comercializan su producto contaminado, pudiéndose determinar un 20% de los mismos con campos contaminados. En el caso del municipio de San Martín Sacatepéquez 1 de cada 4 productores también lo hace, determinándose un 25% de productores comercializando material contaminado. Por último el municipio de San Juan Ostuncalco muestra que 1 de cada 3 productores vende tubérculos comerciales como semillas contaminados con *R. solanacearum*, ajustando un 33.33% de contaminación.

Finalmente del total de productores se puede aseverar que 4 de cada 17 comercializa su producto con infecciones latentes de la peligrosa bacteria. Se puede observar en la siguiente gráfica una representación de las tres localidades donde se produce y comercializa tubérculos como semilla de papa y el porcentaje de productores que venden su producto contaminado según el análisis realizado.

Gráfica 1. Porcentaje de productores cuyos tubérculos comercializados como semillas poseen infecciones latentes de *R. solanacearum*.



Los elevados porcentajes de infestación en campos y las altas infecciones latentes en el material estudiado ponen de manifiesto la falta de responsabilidad de autoridades gubernamentales como el MAGA y el ICTA, y no gubernamentales como asociaciones, cooperativas y el gremio de productores de papa, en la regulación de la producción de tubérculos-semilla de calidad.

Todavía hace falta mucha sensibilización a los productores de papa sobre la importancia de utilizar semilla de calidad puesto que no se está realizando ningún tipo de control preventivo evitando la infestación de nuevas zonas. Con esto se sugiere al ICTA como institución estatal, para que realice labores de sensibilización, capacitación, control y supervisión a productores de tubérculos-semilla de papa no certificados en los siguientes lineamientos:

1. Sensibilizar sobre la importancia de manejar culturalmente la papa contaminada
2. Capacitar en como producir semilla certificada
3. Controlar los procesos de producción identificando zonas infestadas y manejarlas debidamente.

8 CONCLUSIONES

- Se determinó que en las tres localidades estudiadas se encuentra presente la bacteria *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith en tubérculos de papa.
- A través de prueba de determinación específica de PCR se confirmó la presencia de *Ralstonia solanacearum*.
- Por medio de medios de cultivo a nivel exploratorio, la presencia de la bacteria se comprobó en el 8% de las muestras, mientras que en la prueba confirmatoria de PCR el porcentaje bajó a un 2.66%.
- Se determinó que el 26% (4 de 17 productores) comercializan tubérculos-semilla de papa contaminados con la bacteria.

9 RECOMENDACIONES

- En el ámbito productivo, utilizar semilla de calidad certificada para asegurar la sanidad del material y por consiguiente asegurar la reducción del apareamiento del moco de la papa causado por *Ralstonia solanacearum*. En esta vía, profundizar estudios de los factores que influyen en la diseminación del inóculo de la misma.
- Es necesario que instituciones como el ICTA enfoquen apoyos directamente a productores, en conjunto con la producción de semilla de calidad certificada, para que se pueda disminuir la presencia de *R. solanacearum* en los campos agrícolas.
- Realizar estudios sobre métodos de identificación de la bacteria que sean más viables para los productores.
- Enfocar estudios de incidencia y severidad de *R. solanacearum* en la región.
- Agudizar el cuidado en las metodologías utilizadas para diagnosticar la presencia de *R. solanacearum* y poder evaluar al patógeno más a detalle.
- Dada a la finalidad de la investigación, se hace necesario poder realizar bioensayos para comprobar la identidad de *R. solanacearum* y tener mayor certeza de su presencia.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, GN. 2008. Fitopatología. Trad. Guzmán Ortiz, M. 2 ed. México, LIMUSA. 856 p.
2. Alvadalejo, J. 2006. Soluciones electroforesis: protocolo y técnicas (en línea). Consultado 29 mar 2010. Disponible en: <http://www.cultek.com/link/link.asp?link=/inf/otros/soluciones/Soluciones-Electroforesis-protocolos.pdf>
3. BASC (Bussines Alliance for Secure Commerce, CR) s.f. ¿Qué es bioterrorismo? (en línea). Costa Rica. 9 p. Consultado 24 ene 2012. Disponible en <http://www.basc-costarica.com/documentos/Bioterrorismo.pdf>
4. Cobaquil, R. 2010. Normas para la certificación de semilla de papa (correspondencia personal). Guatemala, MAGA (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación), Unidad de Normas y Regulaciones, Área Fitosanitaria.
5. Cronquist, A. 1988. The evolution and clasification of flowering plants. Bronx, New York, US, The New York Botanical Garden. 555 p.
6. Champoiseau, PG. 2009. *Ralstonia solanacearum* raza 3 biovar 2. US, USDA-NRI Project (2007- 2010). 15 p.
7. Del Valle, M; Cobaquil, R; Aguilera, R; De León, G. 2001. Manual de procedimientos para la certificación de semillas: fase de muestreo de semillas. Guatemala, MAGA, Unidad de Normas y Regulaciones, Área Fitozoogenética. 8 p. Disponible en <http://uvg.edu.gt/instituto/centros/cea/Perfil%20Socio%20Ambiental%20Sur%20Occident e.pdf>
8. EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization, UE). 2004. Diagnostic protocols for regulated pests: *Ralstonia solanacearum*. EPPO Bulletin 34:173–178.
9. Estrada N, EA. 1982. Informe de práctica final supervisada, realizada en el Centro de Producción Labor Ovalle, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, ICTA, región I, Quetzaltenango. Tesis Tec. Prod. Granos Básicos. Mazatenango, Suchitepéquez, Guatemala, USAC, CUNSUROC. 67 p.
10. Ezeta, FN. 2001. Producción de semilla de papa en Latinoamérica. Revista Latinoamericana de la Papa 2001(12):1-14.
11. Fano R, H. 1999. Aspectos socio-económicos de la producción y distribución de los tubérculos-semillas de papa en América Latina y el Caribe (en línea). In Producción de tubérculos-semillas de papa. 2 ed. Lima, Perú, CIP. Consultado 20 mar 2010. Disponible en: <http://www.cipotato.org/csd/materials/Tuberculos-Semilla/semilla5-1.pdf>
12. Floyd, J. 2008. New pest response guidelines: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 (en línea). Riverdale, Maryland, US, USDA / APHIS / PPQ / Emergency and Domestic

Programs. Consultado 21 mar 2010. Disponible en:
http://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/manuals/index.shtml

13. Franco R, J. 2002. El cultivo de la papa en Guatemala. Guatemala, ICTA. 54 p.
14. French, E; Gutarra, L; Aley, P. 1999. Enfermedades bacterianas en la producción de tubérculos-semillas (en línea). In Producción de tubérculos-semillas de papa. 2 ed. Lima, Perú, CIP. Consultado 21 mar 2010. Disponible en:
<http://www.cipotato.org/csd/materials/Tuberculos-Semilla/semilla3-4.pdf>
15. Fulladolsa Palma, AC. 2009. Trabajo de graduación: desarrollo de un marcador molecular, basado en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, para la detección del gen i-3 de resistencia a la marchitez vascular en el tomate (*Solanum lycopersicum* L.), causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3 y servicios realizados en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 115 p.
16. FUNCEDE (Fundación Centroamericana de Desarrollo, GT). 1994. Diagnóstico del municipio de San Martín Sacatepéquez, departamento de Quetzaltenango. Guatemala, FUNCEDE / SCODEVI PADEL-CANADA / SEGEPLAN / KAS. 52 p.
17. García Pérez, HM. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico* 1(2):31-41.
18. García, R; García, A; Delgado, L. 1999. Distribución, incidencia y variabilidad de *Ralstonia solanacearum*, agente causal de la marchitez bacteriana de la papa en el estado de Mérida. *Bioagro* 11(1):12-23.
19. González, I; Arias, Y; Peteira, B. 2009. Interacción planta-bacterias fitopatógenas: caso de estudio *Ralstonia solanacearum*-plantas hospedantes (en línea). *Rev. Protection Vegetal* 24(2). Consultado 23 abr 2010. Disponible en:
http://scielo.slb.cu/cielo.php?pid=S1010-25522009000200001&script=sci_arttext
20. Hayward, AC. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Ann. Rev. Phytopathology* 29:65-87.
21. Hidalgo, OA. 1999A. Conceptos básicos sobre la producción de semillas de papa y de sus instituciones (en línea). In Producción de tubérculos-semillas de papa. 2 ed. Lima, Perú, CIP. Consultado 20 mar 2010. Disponible en:
<http://www.cipotato.org/csd/materials/Tuberculos-Semilla/semilla5-1.pdf>
22. _____. 1999B. Fundamentos sobre certificación de tubérculos-semillas de papa (en línea). In Producción de tubérculos-semillas de papa. 2 ed. Lima, Perú, CIP. Consultado 20 mar 2010. Disponible en:
<http://www.cipotato.org/csd/materials/Tuberculos-Semilla/semilla5-3.pdf>
23. Hidalgo, OA; Marca, JL; Palomino, L. 1999. Producción de semilla pre básica y básica usando métodos de multiplicación acelerada (en línea). In Producción de tubérculos-

- semillas de papa. 2 ed. Lima, Perú, CIP. Consultado 20 mar 2010. Disponible en: <http://www.cipotato.org/csd/materials/Tuberculos-Semilla/semilla4-3.pdf>
24. Hispanagar.com. s.f. Productos: agarosa (en línea). Burgos, España. Consultado 25 mar 2010. Disponible en: <http://www.hispanagar.net>
 25. IMCYC (Instituto Mexicano del Cemento y del Concreto, MX). s.f. ¿Qué es la certificación? México. Consultado 24 ene 2012. Disponible en http://www.imcyc.com/ct2009/may09/publicidad/publicidad_onncce.pdf
 26. Iowa State University, US. 2005. From Mendel to markers: impact of molecular technologies on animal, plant and human genetics, lesson module II - marker assisted selection. Iowa, US, Iowa State University, Biotechnology Institute. p. 57-62.
 27. Izaguirre De León, LF. 2008. Epidemiología de la marchitez bacteriana *Ralstonia solanacearum* en el cultivo de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. en el oriente de Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 82 p.
 28. Janse, JD. 2006. *Phytopathology: principles and practice*. UK, CABI Publishing. p. 277.
 29. Jansen, HGP; Torero, M. s.f. Los pequeños productores ante el CAFTA: Análisis de cuellos de botella y competitividad en cadenas productivas seleccionadas. (en línea). IFPRI, Internacional Food Policy Research Institute. Consultado 21 marzo 2010. Disponible en: <http://www.ruta.org/admin/calendario/documentos/299.ppt>
 30. Loarca Marroquín, JL. 1987. Estudio del patosistema *Solanum-Pseudomonas* y alternativas de control químico aplicado a la semilla en dos municipios del departamento de Quetzaltenango. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 64 p.
 31. López Tzoc, JG. 2004. Evaluación del solarizado para el control de *Ralstonia solanacearum* en el cultivo de tomate *Lycopersicon esculentum*, en la aldea el Tempisque, Agua Blanca, Jutiapa. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 56 p.
 32. MAGA (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Programa de Apoyo a los Agronegocios, GT). 2008. Papa (*Solanum tuberosum*) (en línea). Guatemala. 34 p. Consultado 15 ago 2011. Disponible en http://portal.maga.gob.gt/portal/page/portal/uc_upie/documentos/papa_agronegocios.pdf
 33. Malangamba, P. 1996A. La semilla sexual de papa (en línea). In Manual de producción de papa con semilla sexual. Lima, Perú, CIP. Fascículo 1.1. Consultado 3 mar 2010. Disponible en: <http://www.cipotato.org/csd/Materials/Manual%20Produccion/1-1a.pdf>
 34. _____. 1999B. Fisiología y manejo de tubérculos-semillas de papa (en línea). In Producción de tubérculos-semillas de papa. 2 ed. Lima, Perú, CIP. Consultado 26 mar 2010. Disponible en: <http://www.cipotato.org/csd/materials/Tuberculos-Semilla/Semilla2-2.pdf>

35. Mejía. S.f. Análisis de mercado de la semilla de papa, calidad y productividad de la semilla. Guatemala. ICTA Quiché. 72 p.
36. Montesdeoca M, F. 2005. Guía para la producción, comercialización y uso de semilla de papa de calidad (en línea). Quito, Ecuador, PNTR / INIAP / Proyecto Fortipapa. Consultado 25 mar 2010. Disponible en: <http://www.papandina.org/fileadmin/documentpool/Institucional/05-Ec-Produccion-Semilla-Papa.pdf>
37. Mullis, KB. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262(4):56-61, 64-65.
38. Nakhla, MK. 2004. Seminario: métodos de laboratorio para la detección de patógenos – PCR. In *Métodos moleculares para el diagnóstico de patógenos y mejoramiento para resistencia en vegetales*. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 6 p.
39. Nee, M. 1993. Flora de Veracruz: solanaceae II. Xalapa, Veracruz, México, Instituto de Ecología. Fascículo 72, 137-138 p.
40. 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-specifics DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*) Asia Pacific *J. Mol. Biol. Biotch* 5:19-30.
41. Orozco, ME. 1997. Colonización de raíces de plantas naninhas por *Ralstonia solanacearum* "in vitro" e em casa-de-vegetação. Tese Mestrado. Brasília, Brasil, Universidad de Brasília de Ciencias Biológicas. p. 46-49.
42. Osma, M; Querci, M. 2007. Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos: electroforesis en gel de agarosa, sesión no. 5 (en línea). EU, OMS, Oficina Regional para Europa. Consultado 10 mar 2010. Disponible en: <http://mbg.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/Sesion5.pdf>
43. Padilla P, CA; Diez D, J; Martínez G, E; Bárcena R, JA; García A, C. 2006. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa: aislamiento y caracterización electroforética de ADN plasmídico (en línea). Córdoba, España, Universidad de Córdoba, Depto. de Bioquímica y Biología Molecular. Consultado 26 mar 2010. Disponible en: <http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimicabiolmol/pdfs/17%20ELECTROFORESIS%20ACS%20NUCLEICOS%20GELES%20AGAROSA.pdf>
44. Pstrik, KH; Maiss, E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *J. Phytopathology* 2000(148):619-626.
45. Pavel, F; Chinchilla, R; Hernández, Y; Hernández, H. 2009. El mercado de la papa. *Revista AgroNegocios* 2009(2):1-20.

46. Pozo C, M. 1999. Tuberización, tamaño de la semilla y corte de tubérculos. In Producción de tubérculos-semillas de papa (en línea). 2 ed. Lima, Perú, CIP. Consultado 13 mar 2010. Disponible en: <http://www.cipotato.org/csd/materials/Tuberculos-Semilla/Semilla2-3.pdf>
47. Prior, S; Barea, O; Aley, P. s.f. Manejo integrado de la marchitez bacteriana de la papa (en línea). Lima, Perú, CIP. Consultado 6 abr 2010. Disponible en: http://www.cipotato.org/potato/pests_diseases/bacterial_wilt/sintomas.asp
48. Ramírez, E; Chávez, G; Cifuentes, O. 2011. La producción de semilla certificada de papa en Guatemala. Guatemala. ICTA. 39 p.
49. Rodríguez Martínez, D. 2007. 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 nahum* L. en el oriente de Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 72 p.
50. Rodríguez Sánchez, IP; Barrera Saldaña, HA. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa. Monterrey, México, Universidad Autónoma de Nuevo León. Ciencia UANL 7(3):323-335.
51. Ruano, S. 1989. El sondeo: actualización de su metodología para caracterizar sistemas agropecuarios de producción. San José, Costa Rica, IICA. 103 p.
52. Sánchez P, A; Mejía, L; Fegan, M; Allen, C. 2008. Diversity and distribution of *Ralstonia solanacearum* strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection. Plant Pathology 57:320-331.
53. Schaad, NW; Jones, JB; Chun, W. 2001. Plant pathogenic bacteria. 3 ed. US, APS Press. p. 151-163.
54. SIM (Inforpress Centroamericana, Servicio de Información Municipal, GT). s.f. Concepción Chiquirichapa: Quetzaltenango (en línea). Guatemala. Consultado 15 abr 2010. Disponible en: <http://www.inforpressca.com/concepcionchiquirichapa/demografia.php#>
55. SIM (MAGA, UPIE, Sistema de Información de Mercados, GT). 2010. Aspectos productivos– Aspectos económicos (en línea). Guatemala. Consultado 15 abr 2010. Disponible en
56. SIOVM (Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados, MX); Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad, MX; CONABIO, MX. s.f. Solanum tuberosum (en línea). México. Consultado 5 abr 2010. Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20914_sg7.pdf
57. Standley, P; Steyermark, J. 1973. Flora of Guatemala. Chicago, US, Natural History Museum, Fieldiana Botany, v. 24, pts. 10, p. 142.

58. Taller nacional de patógenos del suelo, virus e insectos plaga diferentes a *Tecia solanivora* (1, 2004, Bogotá, Colombia). Memorias. Bogotá, Colombia, Rasgo & Color. 62 p.
59. Universidad del Valle de Guatemala, Centro de Estudios Ambientales, GT. 2003. Perfil socioambiental de la región sur occidente: San Marcos, Suchitepéquez, Quetzaltenango, Sololá, Totonicapán, Retalhuleu. Guatemala. 87 p.

11 GLOSARIO

Ácido desoxirribonucleico (ADN): material que contiene información genética codificada en forma lineal por sus cuatro bases orgánicas (A=adenina, C=citosina, G=guanina y T=timina) (Agrios 2008).

Anticuerpo: proteína producida en un animal de sangre caliente como respuesta a la inoculación con un antígeno extraño, capaz de reaccionar específicamente con él (Agrios 2008).

Antígeno: proteínas extrañas o en ocasiones carbohidratos y lípidos complejos que, al inocularse en un animal de sangre caliente inducen la formación de anticuerpos (Agrios 2008).

Bioterrorismo: es el término utilizado para definir el empleo criminal de virus bacterias, hongos, parásitos, toxinas o sustancias dañinas contra una población animal, vegetal o humana, con el propósito de generar enfermedad, muerte, pánico y terror en los mismos. Es también introducir en un país, material biológico con agentes fitopatógenos, enfermedades cuarentenarios, insumos químicos o cualquier otro tipo de material que atente contra la vida y la salud de las personas (BASC s.f.).

Certificación: procedimiento por el cual se asegura que un producto, proceso, sistema o servicio se ajusta a las normas, lineamientos o recomendaciones de organismos dedicados a la Normalización Nacional o Internacional. Es una actividad a cargo de los Organismos

Nacionales de Certificación, que son personas morales acreditadas que cumplen con dicho objeto social (IMCYC s.f.).

Flagelo: estructura en forma de látigo que se proyecta desde una bacteria o zoospora y que funciona como órgano de locomoción; llamado también cilio (Agrios 2008).

Gen: es un segmento de una molécula de ADN. Porción lineal del cromosoma que determina o condiciona uno o más caracteres hereditarios. La unidad funcional más pequeña del material genético (Agrios 2008).

ICTA: Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, Guatemala.

MAGA: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Guatemala.

Serología: método en el que se utiliza la especificidad de una reacción antígeno-anticuerpo para detectar e identificar las sustancias antígenas y los organismos que las portan (Agrios 2008).

Sondeo: es una forma de realizar investigación con fines de diagnóstico. Se utiliza para caracterizar los sistemas de producción y delimitar su área de influencia. El producto final de esta actividad es orientar el trabajo en la selección de materiales, establecimiento de ensayos en fincas, ayudar a localizar colaboradores para los ensayos en fincas y para validación de tecnología, para planificar acciones de extensión, para diagnósticos dinámicos, etc (Ruano 1989).