

Universidad Autónoma de Baja California

Instituto de Ciencias Agrícolas



***Ralstonia solanacearum*: UNA ENFERMEDAD BACTERIANA
DE IMPORTANCIA CUARENTENARIA Y SU SITUACIÓN
ACTUAL EN EL CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.)
EN LAS ZONAS AGROPRODUCTORAS DE SONORA,
MÉXICO**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA:

ANA GABRIELA ALVARADO MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. EDGAR OMAR RUEDA PUENTE

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

DICIEMBRE, 2012

La presente tesis titulada, “***Ralstonia solanacearum*: Una Enfermedad Bacteriana de Importancia Cuarentenaria y su Situación Actual en el Cultivo de Papa (*Solanum tuberosum* L.) en las Zonas Agroproductoras de Sonora, México**” realizada por el **M.C. Ana Gabriela Alvarado Martínez**; fue dirigida y asesorada por el **Dr. Edgar Omar Rueda Puente**, siendo aceptada, revisada y aprobada por el Consejo Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Consejo Particular

Dr. EDGAR OMAR RUEDA PUENTE
DIRECTOR DE TESIS

Dr. JUAN FCO. PONCE MEDINA
CO-DIRECTOR DE TESIS

Ph. D. LEONEL AVENDAÑO REYES
SINODAL

Ph. D. JESÚS SANTILLANO CÁZARES
SINODAL

Dr. JESÚS BORBOA FLORES
SINODAL

DEDICATORIA

A Dios:

Por haberme dado la vida, y por darme la gran oportunidad de seguir adelante, con una nueva etapa en la vida; que son mis estudios de Doctorado, que es uno de mis más grandes sueños y que hoy puedo hacer realidad.

A mis padres:

Francisca Martínez Rosas y José Antonio Alvarado Babuca.

Porque creyeron en mí y me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega. Por el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.

A mis hermanos:

Abigail Alvarado Martínez y Daniel Antonio Alvarado Martínez.

Por darme su más sincero apoyo, y les deseo de todo corazón, el éxito en su vida.

A mis abuelos:

Guadalupe Babuca Gámez (+) y Jesús Manuel Alvarado Dórame (+).

María del Socorro Rosas Casillas (+) y Teófilo Martínez Tapia (+).

Donde quiera que se encuentren, son mi guía. Gracias por su cariño y por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida.

A todos mis familiares:

Mil gracias a todos, espero no defraudarlos y contar siempre con su valioso apoyo, sincero e incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis Dr. Edgar Omar Rueda Puente y asesores Dr. Juan Fco. Ponce Medina, Ph. D. Leonel Avendaño Reyes, Ph. D. Jesús Santillano Cázares, Dr. Jesús Borboa Flores; gracias por haberme brindado la oportunidad de ser su asesora dentro de mi formación doctoral.

A todos mis profesores y amigos que me brindaron su apoyo en la Universidad Autónoma de Baja California.

Así como a la Universidad Autónoma de Baja California y SAGARPA (Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación) y CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) quienes a través del proyecto clave 12067, me fue otorgada una beca (236483), para la realización de mis estudios de doctorado.

A Dra. María Susana Yépiz Gómez: mil gracias por todo su apoyo y sus conocimientos; porque fueron de vital importancia para la realización de mi investigación en el laboratorio de Microbiología en DIPA (Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos) en Universidad de Sonora en Hermosillo.

ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO 1. INTEGRACIÓN GENERAL.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
HIPÓTESIS.....	5
OBJETIVOS.....	5
Objetivo general.....	5
Objetivos específicos.....	5
CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
1 El cultivo de la papa.....	6
Taxonomía de <i>Solanum tuberosum</i>	6
La papa.....	6
Descripción botánica de la papa.....	7
Sistema radicular, tallo y hoja.....	7
Sistema radicular.....	7
Los tallos.....	9
Las hojas.....	10
Descripción de flor y fruto.....	10
Las flores.....	10

El fruto.....	12
Importancia del cultivo de papa.....	13
2 Producción.....	14
Producción de papa en el mundo.....	14
Producción de papa en México.....	14
Producción de papa en el estado de Sonora.....	14
3 Protección de la papa en México.....	15
Regulación fitosanitaria.....	15
Cuarentena.....	15
Enfermedad cuarentenaria.....	15
NOM (Normas Oficiales Mexicanas).....	15
NOM-012-FITO- 1996.....	15
4 Enfermedades Bacterianas.....	16
Enfermedades que disminuyen su producción.....	16
Morfología y estructura de bacterias fitopatógenas.....	19
5 Clasificación de <i>Ralstonia solanacearum</i>	22
Marchitez bacteriana de la papa.....	22
Sintomatología de <i>Ralstonia solanacearum</i> en papa.....	24
Ciclo de la enfermedad y epidemiología.....	27
Manejo de la enfermedad.....	28
Importancia económica de <i>Ralstonia solanacearum</i>	29
6 Descripción de <i>Ralstonia solanacearum</i>	31
<i>Ralstonia solanacearum</i>	31

Características bioquímicas de <i>Ralstonia solanacearum</i>	32
Detección de <i>Ralstonia solanacearum</i> mediante pruebas Serológicas.....	33
Diagnóstico molecular de <i>Ralstonia solanacearum</i>	33
7 Métodos de control de <i>Ralstonia solanacearum</i>	34
Control químico de <i>Ralstonia solanacearum</i>	34
Control biológico.....	35
Aceites esenciales.....	36
Tomillo.....	37
Orégano.....	37
Mecanismos de acción de aceites esenciales contra <i>Ralstonia solanacearum</i>	38
LITERATURA CITADA.....	41
CAPÍTULO 3. DETECCIÓN DE LA PUDRICIÓN PARDA (<i>Ralstonia solanacearum</i>) DE LA PAPA (<i>Solanum tuberosum</i> L) EN EL ESTADO DE SONORA, MÉXICO	52
RESUMEN.....	52
ABSTRACT.....	53
INTRODUCCIÓN.....	54
MATERIAL Y MÉTODOS.....	55
Primera etapa.....	56
Incremento de <i>Ralstonia solanacearum</i> (Rs).....	56
Pruebas de patogenicidad.....	56
Identificación de Rs en material vegetativo de las PP.....	56
Segunda etapa.....	58

Obtención de semilla de importación, tubérculo de consumo que utilizada como semilla, muestreo de plántulas, hoja desarrollada y fruto (tubérculo-semilla) de papa en Sonora, y su análisis fitopatológico para la detección de Rs.....	58
Detección de Rs en semilla de importación y tubérculo de consumo que es utilizado como semilla mediante técnica Randhawa (1996).....	59
Detección de Rs en semilla, tubérculo de consumo que es utilizado como semilla, plántula, hoja desarrollada y fruto por la técnica ELISA.....	60
Detección de Rs en semilla, plántula, hoja desarrollada y fruto por la técnica PCR.....	60
Pruebas de patogenicidad a bacterias positivas con los diferentes métodos de detección.....	60
Diseño experimental.....	60
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
Primera etapa.....	61
Segunda etapa.....	62
CONCLUSIONES.....	66
Primera y segunda etapa.....	66
LITERATURA CITADA.....	67
CAPÍTULO 4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA <i>IN VITRO</i> DE ACEITES ESENCIALES DE ORÉGANO Y TOMILLO CONTRA <i>Ralstonia solanacearum</i>	70
RESUMEN.....	70
ABSTRACT.....	71
INTRODUCCIÓN.....	71
MATERIALES Y MÉTODOS.....	74
Tercera etapa.....	74

Obtención de aceites.....	75
Cultivos bacterianos.....	75
Determinación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales.....	75
Preparación del inóculo.....	75
Método de difusión en disco.....	76
Actividad antimicrobiana.....	76
Análisis estadístico.....	76
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	76
Tercera etapa.....	76
Orégano.....	76
Tomillo.....	77
CONCLUSION.....	80
Tercera etapa.....	80
LITERATURA CITADA.....	81
ANEXO.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		Pág.
1	(A). Plántula de papa originada de semilla botánica. (B). plántula de papa originada de tubérculo-semilla. mt. Tubérculo originario. r. raíces adventicias. rh. Rizomas. s. hoja escamosa.....	8
2	Sistema radicular, tallo y hoja de papa.....	8
3	Tubérculo de papa. (A) estados de desarrollo de un tubérculo en el extremo del rizoma. (B). vista externa del tubérculo maduro. (C). tubérculo que muestra la disposición en espiral de las yemas laterales. (D). sección transversal del tubérculo.....	10
4	Flor y fruto de papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	11
5	Flor, fruto y semilla de papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	12
6	Marchitez Bacteriana (<i>Ralstonia solanacearum</i>).....	17
7	Necrosis bacteriana <i>Clavibacter michiganensis</i> subespecie <i>sepedonicum</i>	17
8	Pudrición parda (<i>Erwinia carotovora</i>).....	18
9	Sarna común (<i>Streptomyces scabies</i>).....	18
10	Mosaico rugoso (<i>Potato Virus Y</i>).....	19
11	Estructura de una bacteria fitopatógena.....	19

12	Síntomas de <i>R. solanacearum</i> en planta de papa.....	25
13	Síntomas de <i>R. solanacearum</i> en Tubérculos de papa.....	25
14	Daño causado por <i>R. solanacearum</i> , la exudación permite adhesión de tierra.....	26
15	Tallo de papa infectado de <i>Ralstonia solanacearum</i>	26
16	Micrografía de <i>R. Solanacearum</i>	31
17	Destilación por arrastre de vapor de agua.....	37
18	Planta de orégano (<i>Lippia graveolens</i>) y tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>) para Aceites esenciales.....	39
19	Muestreo de papa (<i>Solanum tuberosum</i> L) en los municipios del estado de Sonora.....	59
20	Comparación de valores medios de inhibición de crecimiento de <i>Ralstonia solanacearum</i> por efecto de aceite esencial de Orégano en diluciones 1:1, 1:5, 1:10 a diferentes cantidades aplicadas 7.5, 10 y 15 μ l a las 24 horas del ensayo.....	77
21	Comparación de los valores medios de halo de inhibición de crecimiento de <i>Ralstonia solanacearum</i> por efecto de aceite esencial de Tomillo en diluciones 1:1, 1:5, 1:10 a diferentes cantidades aplicadas 7.5, 10 y 15 μ l. In vitro.....	78
22	Halo de inhibición de crecimiento de <i>Ralstonia solanacearum</i> con aceite esencial de Orégano (<i>Lippia graveolens</i>) dilución 1:1, 15 μ l.....	79
23	Halo de inhibición de crecimiento de <i>Ralstonia solanacearum</i> con aceite esencial de tomillo <i>Thymus Vulgaris</i> L dilución 1:1,15 μ l.....	79

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		Pág.
1	Valores nutricional de la papa.....	13
2	Superficie cosechada, rendimiento, producción y producción de papa en el estado de Sonora.....	15
3	Clasificación de bacterias fitopatógenas de acuerdo al tipo de ataque.....	22
4	Denominaciones de <i>Ralstonia solanacearum</i> (Rs).....	23
5	Superficie sembrada del cultivo de papa en los diferentes municipios del estado de Sonora; superficie muestreada en la detección de <i>Ralstonia solanacearum</i>	63
6	Detección de <i>Ralstonia solanacearum</i> en semilla de papa procedente de Canadá y Estados Unidos de América (EUA) y aquella que es de consumo humano.....	64
7	Detección de <i>Ralstonia solanacearum</i> en plántula, hoja y fruto (tubérculo) muestreado en áreas agrícolas que se dirigen al cultivo de papa en Sonora, México.....	65
8	Valores medios de halo de inhibición de crecimiento de <i>Ralstonia solanacearum</i> por efecto de aceites (trifactorial AxBxC).....	80

RESUMEN

A nivel mundial, el cultivo de la papa es uno de los cuatro cultivos más importantes para la alimentación humana. En años recientes se ha detectado en algunas regiones de Estados Unidos y Canadá, la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Rs) la cual provoca la enfermedad denominada Marchitez bacteriana (Mb) o pudrición parda. Esta bacteria tiene la particularidad de diseminarse por semilla. Dada la cercanía con esos países, y siendo México un país importador de semilla, las probabilidades de una eventual introducción de esta enfermedad son significativas, especialmente en áreas con amplias extensiones de papa. El estado de Sonora es una de las regiones más importantes en relación a la producción de papa. Por lo anterior, se realizó la presente investigación, teniendo como objetivos detectar la presencia de *Ralstonia solanacearum* en semilla y material vegetativo de *Solanum tuberosum* L, y evaluar el efecto bactericida de aceites esenciales.

La investigación se realizó en tres etapas. La primera etapa consistió en la familiarización con síntomas de *Ralstonia solanacearum* en condiciones de laboratorio, para ello se procedió al incremento de *Ralstonia solanacearum*, pruebas de patogenicidad en semilla, plántula con fines de familiarización de los signos de Rs; la segunda etapa incluye la obtención de semilla, muestreo de plantas en estado de plántula, floración y madurez fisiológica de papa en las zonas agrícolas del estado de Sonora; El muestreo se realizó en el 10% del total de la superficie cultivable de los municipios productores de papa en estado de Sonora. En el 10% de la superficie de cada municipio. Se realizó lo siguiente: cada lote de 5 hectáreas fue considerado una superficie de muestreo. Cada hectárea de esa superficie fue un punto de muestreo. En cada punto se trazo una línea diagonal imaginaria de esquina a esquina, y en esa recta trazada se colectaron 10 muestras. Cada una de las muestras colectadas, previamente identificada, se envolvió con papel húmedo y se colocaron en una hielera para ser trasladada al laboratorio para su análisis. Además se llevaron a cabo análisis fitopatológicos mediante Técnica de Randhawa y ELISA. También se llevaron a cabo, pruebas de patogenicidad en aquellas muestras que resultaron positivas a la presencia de Rs. La presencia de la bacteria *Ralstonia solanacearum* resultó ser negativa en semilla procedente del extranjero. No obstante ello, se detectó la presencia del agente causal de la marchitez bacteriana en papa de consumo nacional que algunos productores podrían utilizar como semilla.

La tercera etapa se realizó con el propósito de encontrar una alternativa natural para controlar la bacteria Rs. Se evaluó el poder bactericida de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*) y orégano (*Lippia graveolens*). La técnica utilizada para el análisis de la actividad antibacteriana fue la difusión en agar, utilizando discos de papel filtro estériles, se utilizaron diluyentes 1:1, 1:5 y 1:10 y se colocaron 7.5, 10, 15 μ l de cada una de las concentraciones de los aceites. Se utilizó alcohol al 70% en uno de los discos de papel filtro como control negativo. Además, se utilizó un disco de estreptomicina (10 μ g/disco) y otro de ampicilina (10 μ g/disco). Se utilizó medio de cultivo agar dextrosa y papa previamente inoculado con la cepa en estudio. Después de la incubación, se midieron los halos de inhibición del crecimiento bacteriano en milímetros. Los análisis fueron por triplicado. Los aceites esenciales de orégano y tomillo mostraron efectos inhibitorios sobre el crecimiento de *Ralstonia solanacearum* en la dilución 1:1, que ($P<0.05$) resultó ser más efectiva que el resto de las diluciones evaluadas, donde la cantidad aplicada más efectiva fue de 15 μ l de aceite esencial de orégano y tomillo. Los aceites esenciales de orégano y tomillo ($P<0.05$) mostraron mejor efecto inhibitorio que los antibióticos. Los aceites esenciales se consideran como una alternativa para el control de Rs.

ABSTRACT

Worldwide, potato is considered the fourth most important crop for human consumption. In recent years it has been detected in some Regions of USA and Canada, the bacterium *Ralstonia solanacearum* (Rs), which causes the diseases called bacterial wilt (Mb) or brown rot. This bacterium has the distinction of spreading by seed. Given the proximity to these countries, and begin Mexico a seed importer, the odds of an eventual introduction of this diseases are significant, especially in areas with large tracts of potato. The state of Sonora is one of the most important in relation to potato production. Therefore, this research was performed, to detect the presence of *Ralstonia solanacearum* in seed and vegetative material of *Solanum tuberosum* L, and evaluated the bactericidal effect of essential oils. The research was conducted in three stages. The first stage involved familiarization with symptoms of *Ralstonia solanacearum* in laboratory conditions, for it proceeded to the increase of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity tests on seed, seedling familiarization purposes of the sings of Rs, the second stage includes obtaining seed, plant sampling at seedling stage, flowering and maturity of potato in agricultural areas of the state of Sonora; sampling was performed in 10 % of the total arable land of the potato producing municipalities in the state of Sonora. In 10 % of the surface of each municipality. Was performed as follows: each lot 5 hectares was considered a surface sampling. Each hectare of this area was a point sampling. At each point stroke an imaginary diagonal line from corner to corner, and in that line drawn 10 samples were collected. Each of the collected samples, previously identified, wrapped with wet paper and placed in a cooler to be moved to the laboratory for analysis. Furthermore phytopathological analysis were carried by out ELISA technique and Randhawa. Also, pathogenicity tests were carried out on those samples that tested positive for the presence of Rs. The presence of the bacterium *Ralstonia solanacearum* was negative in seed from abroad. Nevertheless, we detected the presence of the casual agent of bacterial wilt in potatoes for domestic consumption that producers could use as seed. The third stage was performed in order to find a natural alternative to control the bacterium was assessed Rs bactericidal power of essential oils of oregano (*Lippia graveolens*) and thyme (*Thymus vulgaris*). The technique used for analysis of antibacterial activity was spread on agar, using sterile filter paper discs were used diluents 1:1, 1:5 and 1:10 and placed 7.5, 10, 15 μ l of each of concentrations of the oils. Was used 70 %

alcohol in one of the filter paper discs as negative control. Furthermore, we used disc streptomycin (10 μ g/disc) and another of ampicilin (10 μ g/disc). We used culture medium and potato dextrose agar previously inoculated with the strain under study. After incubation, we measured the inhibition of bacterial growth in millimeters. Analyses were in triplicate. The essential oils of oregano and thyme showed inhibitory effects on the growth of *Ralstonia solanacearum* in 1:1 dilution in which (P<0.05) was more effective than the rest of the dilutions tested, and the most effective amount applied was 15 μ l of essential oil of oregano and thyme which (P<0.05) showed better inhibitory effect on antibiotics. Essential oils are considered as an alternative for the control of Rs.

CAPÍTULO 1

Integración general.

La presente investigación consta de cuatro capítulos. El primer capítulo consiste en introducción; hipótesis, objetivos. Segundo capítulo, revisión de literatura sobre la cual se describen los aspectos generales del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L) y de la bacteria *Ralstonia solanacearum*. También se describen los aceites esenciales de orégano y tomillo. Literatura citada. En el tercer capítulo se hace referencia del artículo: Detección de la pudrición parda (*Ralstonia solanacearum*) de la papa (*Solanum tuberosum* L) en el estado de Sonora, México. Integrado por resumen, abstract, introducción. La metodología utilizada en el muestreo de plantas de papa en estado de plántula, hoja desarrollada y fruto (tubérculo-semilla) en los municipios del estado de Sonora (Agua Prieta, Caborca, Cajeme, Hermosillo, Moctezuma, Navojoa, Sahuaripa, Santa Ana y Ures). También se llevaron a cabo análisis fitopatológicos mediante Técnica de Randhawa y ELISA. Asimismo se llevaron a cabo, pruebas de patogenicidad en aquellas muestras que resultaron positivas a la presencia de *Rs* en papa para consumo. Los resultados indican la presencia de *Rs* en semilla nacional. Por lo tanto, es necesario considerar medidas de verificaciones de origen del tubérculo. Además incluye conclusiones, literatura citada. El cuarto capítulo se hace referencia del artículo: Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales de orégano y tomillo contra *Ralstonia solanacearum*. Integrado por resumen, abstract, introducción. La metodología consistió en evaluar el poder bactericida de los aceites esenciales de orégano (*Lippia graveolens*) y tomillo (*Thymus vulgaris*). La cepa bacteriana utilizada en el estudio fue *Ralstonia solanacearum*, que fue aislada y caracterizada de las pruebas de patogenicidad de papa procedente de casas comerciales del estado de Sonora que posiblemente puede ser dirigida como semilla. La técnica utilizada para el análisis de la actividad antibacteriana fue la difusión en agar, utilizando discos de papel filtro estériles, se utilizaron diluyentes 1:1, 1:5 y 1:10 y se colocaron 7.5, 10, 15 μ l de cada una de las concentraciones de los aceites. Se utilizó alcohol al 70% en uno de los discos de papel filtro como control negativo. Además, se utilizó un disco de estreptomycin (10 μ g/disco) y otro de ampicilina (10 μ g/disco). Se utilizó medio de cultivo agar dextrosa y papa previamente inoculado con la cepa en estudio. Los aceites esenciales de orégano y tomillo mostraron efectos inhibitorios sobre el

crecimiento de la bacteria *Ralstonia solanacearum*. También incluye conclusiones, literatura citada.

INTRODUCCIÓN

La agricultura mundial se ha visto afectada en los últimos años por problemas fitosanitarios causados principalmente por hongos, bacterias, nemátodos, malezas e insectos. Al presentarse un cambio radical dentro del comercio internacional, con el movimiento de material vegetativo y siembras de estos productos vegetales, las plagas están dispersándose por todo el mundo, volviéndose un problema un tanto más complejo, lo anterior debido a la rapidez con que en la actualidad se transportan, las grandes cantidades de material vegetal que se movilizan y que en algunos casos pueden ser portadores de agentes nocivos. Aún cuando se hagan esfuerzos, en primera instancia para medir la introducción de enfermedades de otros países y en segunda para impedir su dispersión a partir de fuentes de inóculo primario, los aspectos negativos antes citados, han originado en cierto grado pérdidas y grandes trastornos en algunas regiones a la agricultura nacional, por lo que es conveniente contar con las medidas necesarias para evitar el ingreso primeramente y en segunda el control y dispersión de estos agentes biológicos nocivos a las plantas (Rueda, 1998). En la República Mexicana, específicamente en el noroeste de México, la superficie dirigida al cultivo de hortalizas principalmente (tomate, papa, chile y sandía) ha aumentado en forma considerable en los últimos años (SIAP, 2012). Debido a que México no produce su propia semilla, obliga a los productores a adquirir semilla de origen extranjero, principalmente de Estados Unidos, ya que las variedades adquiridas producen frutos que reúnen las características preferidas por el consumidor, originando además que los volúmenes de semilla que ingresan al país sea una puerta de entrada para microorganismos de importancia cuarentenaria como son: *Pseudomonas solanacearum* = (actualmente) *Ralstonia solanacearum* para la papa; *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* para chile y tomate; *Clavibacter michiganensis* subespecie *sepedonicum* para papa, la subespecie *michiganensis* para tomate y *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* para sandía, entre otros (Rueda, 1998). Asimismo, actualmente se está generando controversia entre los productores acerca de su presencia en campos agrícolas del estado de Sonora, México.

Por lo anterior, resulta de gran importancia conocer la situación actual de *Ralstonia solanacearum* en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.), en material

vegetativo de importación y durante las diferentes etapas fenológicas del cultivo en la zona agrícola del estado de Sonora.

Esta investigación pretende ampliar el conocimiento de la situación que acontece en materia de detección de bacterias de importancia cuarentenaria, además de actualizar y reafirmar su nula presencia en las áreas agrícolas del estado, y posteriormente extenderse al interior del país. Además este estudio de detección es con la finalidad de involucrar a los productores con un nuevo esquema de producción bajo condiciones de fitosanidad con la finalidad de salvaguardar nuestra agricultura nacional.

Por otra parte, en los últimos años ha habido un creciente interés en el uso de compuestos biológicamente activos, extraídos de especies de plantas que presentan la capacidad de eliminar a microorganismos patógenos por sí mismas, esto debido principalmente, a la resistencia que los microorganismos han desarrollado a los antibióticos (Daferera *et al.*, 2003). Además, la agricultura del nuevo milenio debe establecer nuevas alternativas de control que produzcan un menor impacto ambiental, ya que día con día va en aumento el porcentaje de consumidores que demandan alimentos sanos y libres de productos químicos (Ponce *et al.*, 2004). Por lo anterior surge la importancia de conocer nuevas estrategias de control, sobre todo aquellas que conlleve un aspecto sustentable. Con base a lo anterior, se presenta la necesidad de evaluar productos bactericidas para realizar pruebas de actividad antimicrobiana contra *Ralstonia solanacearum*.

HIPÓTESIS

- 1.-La semilla de importación y aquella que es de consumo humano y que se dirige como semilla resultará positiva a *Ralstonia solanacearum*.
- 2.-*Ralstonia solanacearum* estará presente en lotes paperos del sur del estado de Sonora.
- 3.-De los aceites esenciales orégano (*Lippia graveolens*) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.) evaluados para la actividad antimicrobiana de *Ralstonia solanacearum*, el orégano ofrecerá mayor actividad.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Detectar la presencia de *Ralstonia solanacearum* en semilla y material vegetativo de *Solanum tuberosum* L, y evaluar el efecto bactericida de aceites esenciales.

Objetivos específicos.

- 1.-Detectar la presencia de *Ralstonia solanacearum* en material vegetativo de importación y aquella que es de consumo y utilizada como semilla (de *Solanum tuberosum* L.).
- 2.-Conocer la situación actual de *Ralstonia solanacearum* en el cultivo de papa el estado de Sonora, México.
- 3.-Evaluar el efecto bactericida de orégano (*Lippia graveolens*) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.), realizando pruebas de actividad antimicrobiana contra *Ralstonia solanacearum*.

CAPITULO 2

REVISIÓN DE LITERATURA

1 El cultivo de la papa.

Taxonomía de *Solanum tuberosum*.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Solanum*

Especie: *tuberosum* (Kawagoe y Kikuta, 1991).

La papa.

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es originaria de las áreas montañosas de los Andes en América del Sur (en los alrededores del lago Titicaca para las subespecies *andigenum*) fue introducida en Europa en el siglo XVI y de allí llevada al resto del mundo. (Sktruiik *et al.*, 1999). Existen muchas especies silvestres en México, Guatemala, Ecuador y Chile; en este último la Isla Chiloe se considera el centro secundario de la Subespecie *tuberosum* (Cortez y Hurtado, 2002).

Es una planta dicotiledónea herbácea anual, que pertenece a la familia de las solanáceas. Además, el órgano consumido es el tubérculo. Este es un órgano subterráneo. Los tubérculos sobreviven en dormancia durante el invierno y en la primavera, cuando las condiciones de temperatura son favorables para el crecimiento, brotan originando una nueva planta (Sktruiik *et al.*, 1999).

Es sensible a heladas y crece bien en climas templados, con temperaturas entre 15° y 27°C. Requiere una estación de crecimiento con un largo mínimo de 3 a 4 meses, en la cual las temperaturas no sean demasiado altas (>30°C) ni demasiado bajas (<5°C). (Kooman *et al.*, 1996).

La papa puede crecer en casi todo los tipos de suelos excluyendo suelos muy húmedos, porque la semilla se pudre. El suelo debe proveer de agua, nutrientes y oxígeno a las raíces. Además la estructura del suelo debe facilitar las labores de la preparación de la tierra, manejo de cultivo y cosecha. Su pH debe ser entre 5.5 y 7, la profundidad del suelo de 35 cm y la cantidad de sales debe ser baja. Los suelos

francos son los más adecuados; porque no se secan tan rápido y mantienen una adecuada estructura durante el cultivo. Los suelos arenosos se secan más rápido, lo que permite sembrar temprano en la época y las temperaturas de estos suelos se elevan rápido, lo que provoca un fuerte crecimiento de la planta joven. Sin embargo, tiene una capacidad limitada de retención de agua, lo que puede afectar al desarrollo de la planta en tiempos secos (Parsons, 1982).

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos hortícolas más valiosos para la humanidad. En la mayoría de los países se siembra en superficies extensas, y por el volumen de producción, ocupa el cuarto lugar a nivel mundial (Grageda *et al.*, 2001). A nivel mundial la papa junto con el arroz, el maíz y el trigo, constituyen los cuatro cultivos más importantes para la alimentación humana (Anónimo, 1998). La papa es una especie de multiplicación vegetativa. Su propagación está por lo tanto asegurada por el tubérculo, órgano de reserva rico en agua y en sustancias nutritivas. Desde el punto de vista anatómico, el tubérculo es un tallo modificado con entrenudos cortos y densos, cuyas yemas darán origen a los gérmenes (Rouselle y Crosnier, 1999).

La cosecha de papa se realiza cuando la planta está naturalmente madura, cuando la mayor parte de las hojas muestran color amarillento, cuando ha perdido la totalidad de hojas o cuando no muestra follaje verde (Egúsquiza, 2000).

Descripción botánica de la papa.

La papa pertenece a las familias de las solanáceas. Las especies cultivadas son las tetraploides ($2n=48$) que pertenecen a las especies *Solanum tuberosum* y *Solanum andigenum*. La *Solanum tuberosum*, fue llevada a Europa por los españoles y domesticada en esos países, generalmente es de días y ciclos cortos; (90 a 100 días) de forma alargada, piel lisa, ojos superficiales, el color de la pulpa es crema a amarilla y la piel rosada, roja o beige, y tiene estolones cortos. La *Solanum andigenum* es de días largos, ciclo tardío (de forma redonda, y ojos profundos, color de piel variable (morada, roja, blanca, negra y combinada); la pulpa es blanca o amarilla, y es cultivada por los países de Sur América (Cortez y Hurtado, 2002).

Sistema radicular, tallo y hoja.

Sistema radicular: en las plantas provenientes de semilla sexual, la raíz principal es filiforme, a partir de la cual aparecen ramificaciones laterales que forman un sistema fibroso. La raíz formada a partir de semilla tubérculo es fibrosa, no existe

una raíz principal y posee muchas raíces adventicias. Su mayor crecimiento lo desarrolla en los primeros 0.20 m de profundidad (Figuras 1,2), extendiéndose lateralmente de 0.30 hasta 0.60 m. las raíces laterales fibrosas pueden llegar hasta 1.20 de profundidad, en suelos francos y profundos (Agrios, 1995).

Las plantas provenientes de semilla botánica poseen una raíz principal delgada, la cual se transforma en fibrosa (Figura 1), mientras que las plantas provenientes de tubérculos usados como semilla vegetativa tiene un sistema fibroso de raíces laterales y se originan en las regiones del periciclo de las raíces y en los meristemos de los tallos subterráneos (Pérez *et al.*, 1998).

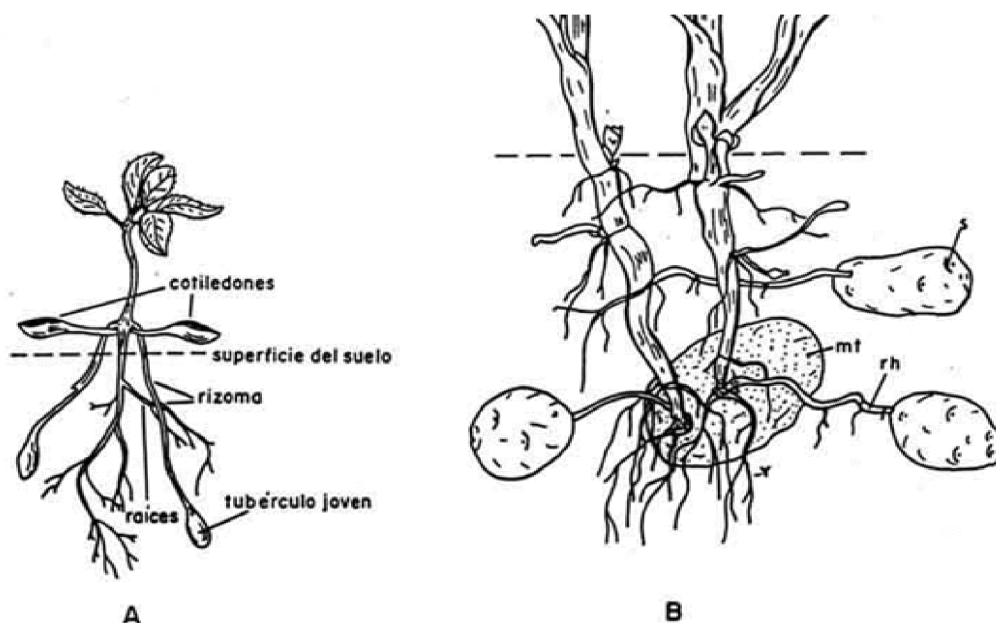


Figura 1. (A). Plántula de papa originada de semilla botánica. (B). plántula de papa originada de tubérculo-semilla. mt. Tubérculo originario. r. raíces adventicias. rh. Rizomas. s. hoja escamosa.



Figura 2. Sistema radicular, tallo y hoja de papa

Los tallos: son gruesos, fuertes y angulosos, alcanzando una altura en el momento de máximo desarrollo de entre 0,5 y 1 m, originándose en las yemas del tubérculo madre. Los tallos aéreos, normalmente son de color verde ramificado. La parte más baja del tallo es redonda y sólida. Se considera que un tallo es el tallo principal si crece directamente del tubérculo semilla madre. Las ramas laterales que salen del tallo principal se llaman tallos secundarios y pueden salir muy cerca del tubérculo semilla, en cuyo caso su formación o la producción de estolones (son tallos laterales, normalmente subterráneos) y tubérculos será parecida a la del tallo principal (Arce, 2002).

En la planta de papa consta de tallos, estolones y tubérculos. Las plantas provenientes de semillas verdaderas tienen un solo tallo principal mientras que las provenientes de tubérculos-semilla pueden producir varios tallos. Los tallos laterales son ramas de los tallos principales (Huamán, 1986).

El tubérculo se puede considerar como una parte del tallo que se ha adaptado para almacenar reservas para la producción. El tubérculo se forma en el extremo del estolón como consecuencia de la acumulación de reservas que se produce por el rápido desarrollo y división celular. La unión del estolón con el tubérculo generalmente muere cuando la planta alcanza la madurez. Además los estomas están dispersos en la epidermis y debajo de ellos se forman lenticelas que permiten el intercambio gaseoso y son vías de penetración para diversos patógenos (Figura 3). La epidermis protege al tubérculo contra daños mecánicos, regula la velocidad de intercambio de agua y gases y permite o excluye la posibilidad de penetración de patógenos; por lo tanto la capacidad de regenerarse la epidermis por medio de la cicatrización (Alonso, 1996).

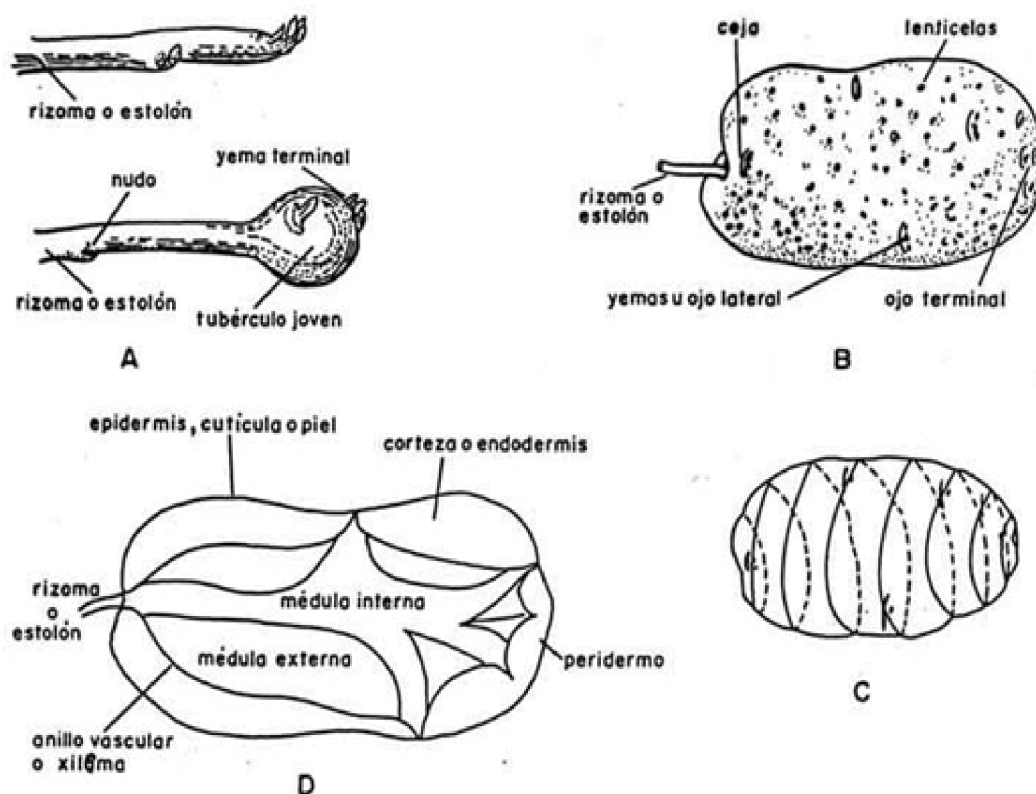


Figura 3. Tubérculo de papa. (A) estados de desarrollo de un tubérculo en el extremo del rizoma. (B). vista externa del tubérculo maduro. (C). tubérculo que muestra la disposición en espiral de las yemas laterales. (D). sección transversal del tubérculo.

Las hojas: son compuestas y pinnadas. Las hojas primarias de plántulas pueden ser simples, pero una planta madura contiene hojas compuestas en par y alternadas. Las hojas se ordenan en forma alterna a lo largo del tallo, dando un aspecto frondoso al follaje, especialmente en las variedades mejoradas (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Las hojas están distribuidas en espiral sobre el tallo. Además están provistas de pelos de diversos tipos, los cuales también se encuentran presentes en las demás partes aéreas de la planta. Hay más estomas en la superficie inferior de las hojas que en la superior. La forma de la hoja puede verse modificada de manera muy sustancial por la temperatura y el número de horas luz (Agronegocios, 2001).

Descripción de flor y fruto.

Las flores: nacen en racimos y por lo regular son terminales (figura 4, 5). Cada flor contiene órganos masculino (androceo) y femenino (gineceo). Son pentámeras (poseen cinco pétalos) y sépalos que pueden ser de variados colores,

pero comúnmente blanco, amarillo, rojo y púrpura. Muchas variedades dejan caer las flores después de la fecundación. La autopolinización se realiza en forma natural. (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Las flores de la papa son bisexuales, y poseen las cuatro partes esenciales de una flor: cáliz, corola, estambres y pistilo. Los estambres son el órgano masculino llamado: androceo, y el pistilo es el órgano femenino llamado gineceo (Huamán, 1986).

La flor es muy característica de la familia de las Solanáceas, actinomorfa y pentámera. Es sostenida por un pedicelo y presenta:

- 5 sépalos, soldados en la base en un calis gamusépalo.
- 5 pétalos, igualmente soldados en una corola gamupétala, coloreada diversamente.
- 5 estambres, en un solo ciclo alternando con los pétalos y fijados sobre el tubo de la corola. Las anteras, están unidas entre sí, formando un manguito en cuyo centro se destaca un estilo único.
- 2 carpelos, soldados en un ovario, con 2 cavidades, con placentación axilar, conteniendo numerosos óvulos y coronado por el estilo y el estigma. Los carpelos están orientados oblicuamente en relación con el plano medio de la flor (Debener *et al.*, 1990).

Las flores autógamas no producen néctar y son raramente visitadas por los insectos, lo que hace que la fecundación cruzada sea casi inexistente en la naturaleza. Frecuentemente estériles. La androesterilidad es frecuentemente (70% de los cultivares), a causa del aborto parcial o total de los estambres o la esterilidad del polen que depende parcialmente de las condiciones ambientales, como lo son las temperaturas elevadas (Hosaka y Hanneman, 1988).



Figura 4. Flor y fruto de papa (*Solanum tuberosum* L.)

El fruto: es una baya de forma redonda u oval, variando el color desde verde a amarillo, o incluso a violeta; su tamaño suele variar entre uno y tres centímetros de diámetro y consta de dos cavidades o lóculos en los que se alojan las semillas (Figura 5); el número de semillas da cada fruto es muy variable y puede ir desde ninguna hasta más de trescientas. Raramente se ha cultivado la papa a partir de semilla verdadera, excepto con fines genéticos de obtención de nuevas variedades (Arce, 2002).

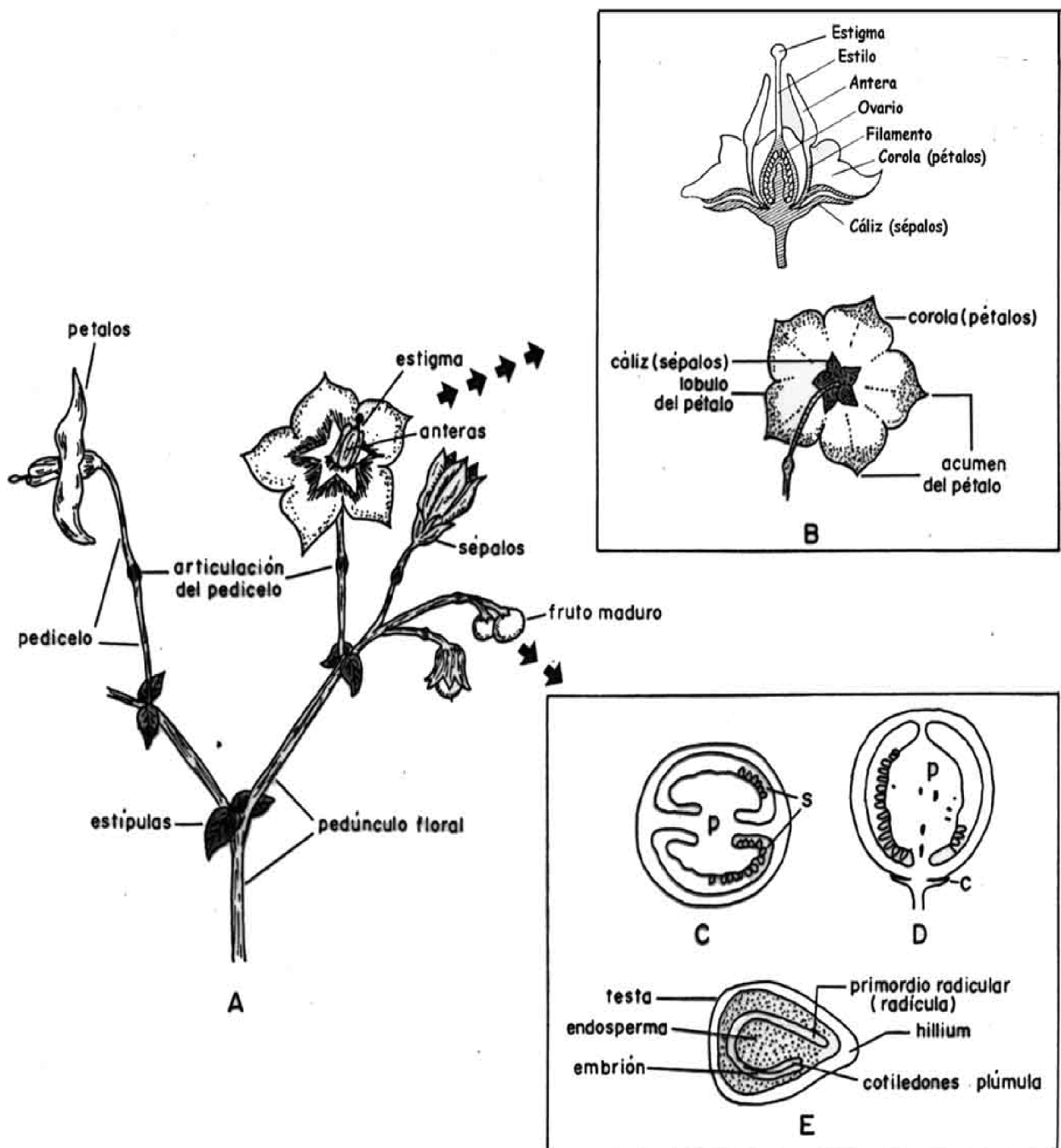


Figura 5. Flor, fruto y semilla de papa (*Solanum tuberosum* L.).

El fruto es de color verde o pardo que amarillea en la madurez. Contiene generalmente varias decenas de semillas pequeñas, aplastadas, reniformes, bañadas en una pulpa mucilaginosas que proviene de la transformación del endocarpio del fruto (Figura 5). Las semillas son albuminadas, con embrión claramente enrollado característico de la subfamilia de las solanoideae (Martínez y Oliver, 1985).

Importancia del cultivo de la papa.

El cultivo de la papa en México resulta de gran importancia, por dos aspectos fundamentales: 1) como alimento con un elevado valor nutricional; 2) porque demanda gran cantidad de jornales de trabajo durante la siembra, cosecha, comercialización y demás actividades relacionadas con su producción y porque en nuestro país existen diversas variedades de papa, entre las que destacan Alpha, White Rose, Criolla (ASERCA, 1998).

A continuación se indican en el Cuadro 1, el valor nutricional de la papa, además, tiene un alto contenido de carbohidratos lo que la posiciona como un alimento de alto valor energético acorde a Borba (2008).

Cuadro 1. Valor Nutricional de la Papa.

Valores nutricionales para 100 gr. de papa	
Agua	77,00 g
Fibra	1,80 g
Valor Calórico	87 Kcal
Proteína	1,87 g
Carbohidratos	20,13 g
Lípidos	0,10 g
Vitamina C	13 mg
Hierro	0,31mg
Calcio	5 mg
Fósforo	44 mg

(Borba, 2008).

La papa es una de las principales hortalizas que se producen en México; su cultivo es uno de los más importantes en el renglón alimenticio y, al igual que en

todos los países, sólo es superado por el maíz, frijol, trigo y arroz (Santiago y García, 2001).

La papa es ampliamente utilizada en la industria textil, farmacéutica, de la madera, y del papel, como adhesivo, aglutinante, texturizador y relleno, y por las compañías que perforan pozos petroleros, para lavar los pozos. El almidón de la papa es un sustituto 100% biodegradable del poliestireno y se utiliza, para hacer platos y cubiertos desechables. Además de la cascara de la papa tiene un gran contenido de almidón que se puede licuar para obtener etanol apto para la producción de combustible (Claridades Agropecuarias, 2008).

2 Producción.

Producción de papa en el mundo.

Del año 2003 al 2005, China e India fueron los principales productores de papa con el 30% de la producción mundial. Seguidas por Estados Unidos de América con 6%, la Federación Rusa 11%, Unión Europea 20%, Ucrania, Belarús, Canadá, República Islámica de Irán, Turquía, Bangladesh, Perú y Brasil 33%. (Claridades Agropecuarias, 2008).

Producción de papa en México.

En los últimos 10 años, los principales estados productores fueron: Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Nuevo León, Estado de México, Guanajuato, Michoacán y Veracruz (SIAP, 2012).

La papa se cultiva en 25 estados de la República Mexicana durante todo el año, tanto en el ciclo de primavera-verano como en el de otoño-invierno. En 2008 se sembraron 61,069 ha de papa en el país. En Sinaloa se sembraron 14,014 ha de papa; mientras que en Sonora se sembraron 11,648 ha. La producción nacional de papa es 1, 670,148 toneladas. Sonora, en 2008, fue el principal productor con un rendimiento de 33.2 ton/ha, siendo el mayor productor de esta hortaliza en el país con 386,850 toneladas en ese año (SAGARPA, 2009).

Producción de papa en el estado de Sonora.

En el Cuadro 2 se indica la superficie cosechada, rendimiento, producción y valor de la producción de la papa, acorde a SIAP (2012).

Cuadro 2. Superficie cosechada, rendimiento y producción de papa en el estado de Sonora.

Papa (Riego+ temporal)	2008	2009	2010	2011	2012 a
Superficie sembrada (en hectáreas).	11,648	10,809	8,903	13,765	13,337
Superficie cosechada (en hectáreas).	11,648	10,694	8,903	8,143	13,225
Producción (ton)	386,850	342,616	278,663	254,824	411,186
Rendimiento (ton / ha)	33.2	32.0	31.30	31.29	31.0

a Cifras preliminares SIAP.
(SIAP, 2012).

3 Protección de la papa en México.

Regulación fitosanitaria.

Son las disposiciones oficiales para prevenir la introducción y/o diseminación de plagas o enfermedades, mediante la vigilancia de la producción, movilización y certificación fitosanitaria (SENASICA, 2002).

Cuarentena.

Conjunto de procedimientos que tienen como objetivo evitar la introducción y/o diseminación al país o a una región determinada de plagas y enfermedades cuarentenarias (Funbapa, 2011).

Enfermedad cuarentenaria.

Es una enfermedad de importancia económica potencial para el área puesta en peligro, donde aún no está presente o si lo está no se encuentra ampliamente distribuida y es oficialmente controlada (Funbapa, 2011).

NOM (Normas Oficiales Mexicanas).

Son regulaciones y especificaciones de carácter obligatorio que deben reunir, los productos y procesos cuando éstos puedan constituir un riesgo para la seguridad de las personas o dañar la salud humana, animal o vegetal (SENASICA, 2002).

NOM-012-FITO- 1996.

Es una Norma Oficial Mexicana Fitosanitaria que regula el comercio internacional de la papa; la cual establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas de la papa (SENASICA, 2003).

Tiene por objeto prevenir la introducción al territorio mexicano de plagas cuarentenarias de la papa mediante el establecimiento de regulaciones y medidas fitosanitarias para su importación, siendo aplicable a las plantas, sus partes y órganos de papa, así como sus envases y empaques (Aduana México, 2012).

Existen en el mundo diversas plagas cuarentenarias que dañan al cultivo de la papa, las que en su mayoría no están presentes en México o están limitadas a pequeñas regiones del país y en cualquier parte de la planta de papa, principalmente los tubérculos que son capaces de diseminar problemas fitosanitarios. La mayoría de las plagas asociadas a la papa son capaces de afectar a otros cultivos de la familia Solanaceae, tales como tomate, chile, berenjena, tabaco y otras familias botánicas. Además debido a que la mayoría de los problemas fitosanitarios de la papa son difíciles de detectar en la semilla-tubérculo durante las inspecciones en el punto de Inspección Fitosanitaria Internacional, es necesario establecer medidas fitosanitarias que regulen su importación, así como los de sus productos y subproductos, para prevenir la introducción, diseminación y establecimiento de plagas cuarentenarias que la afectan (SAGARPA, 2012).

Se prohíbe la introducción o transito de papa para siembra (semilla-tubérculo) excepto para Canadá por ser socio comercial de México. Se prohíbe la importación de papa para consumo, con excepción de la que provenga de Estados Unidos de América y Canadá, únicamente con destino a la Franja Fronteriza Norte. Según los cupos establecidos por la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial y en acuerdo Con la Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (Aduana México, 2012).

4 Enfermedades bacterianas.

Enfermedades que disminuyen su producción.

La Marchitez bacteriana o pudrición parda de la papa es causada por (*Ralstonia solanacearum*). Esta es una de las enfermedades más destructivas en el cultivo de la papa. El síntoma en el campo se observa como marchitez, enanismo y a veces amarillamiento del follaje. Inicialmente sólo una rama del tallo presenta los síntomas de marchitez. Con el tiempo todas las ramas de la planta se marchitan, en días calurosos este fenómeno se acelera (Figura 6). En tallos jóvenes se observan rayas oscuras y angostas que corresponden a los haces vasculares infectados (Kim y Olson, 2003).



Figura 6. Marchitez Bacteriana (*Ralstonia solanacearum*).

La Podredumbre anular de la papa o necrosis bacteriana (*Clavibacter michiganensis* subespecie *sepedonicum*). Es un microorganismo que afecta al cultivo de la papa causando los mayores daños en los tubérculos ya que éstos resultan comercialmente inservibles (Cosave, 1991). Además, la necrosis bacteriana de la papa, es causada por *Clavibacter michiganensis* subespecie *sepedonicum* (Cms), una bacteria de importancia cuarentenaria, debido a esto, las exportaciones de papa de siembra procedentes de países en el que la enfermedad es endémica, en su mayor parte es restringida (Figura 7). El uso de altos niveles de higiene y de tolerancia cero de la presencia de la bacteria en papas de siembra no ha sido un completo éxito en la erradicación de la enfermedad, ya que la propagación de la enfermedad es a través de tubérculos de papa infectados y equipos contaminados que se utilizan en la producción del cultivo (Laurila *et al.*, 2003).



Figura 7. Necrosis bacteriana (*Clavibacter michiganensis* subespecie *sepedonicum*).

Pudrición blanda es causado por (*Erwinia carotovora*), y en el tubérculo es una enfermedad de muy fácil diseminación, especialmente en zonas muy húmedas y climas con temperaturas mayores a 20° C. La bacteria penetra por heridas o por el extremo del estolón, que comunica la papa con la planta madre. Al comienzo las lesiones son en forma de heridas circulares húmedas, ligeramente hundidas de color

canela a castaño. Se presenta una clara demarcación entre el tejido sano y el enfermo (Figura 8). Al comienzo de la infección el tejido enfermo es inodoro, pero a medida que la ésta avanza adquiere olor desagradable y se torna pegajoso (Moctezuma, 2006).



Figura 8. Pudrición parda (*Erwinia carotovora*).

Sarna común, es causado por (*Streptomyces scabies*). Las lesiones en los tubérculos son de diferentes tipos, que pueden ser superficiales o reticulares, profundas o cóncavas, o protuberantes, que varían en tamaño y forma y se pueden juntar, hasta que la superficie entera resulta afectada (Figura 9). En nuestro medio es muy común después de la segunda siembra con la misma semilla, a medida que se repite el número de siembras aumenta la incidencia en los tubérculos (Biadene, 1998).

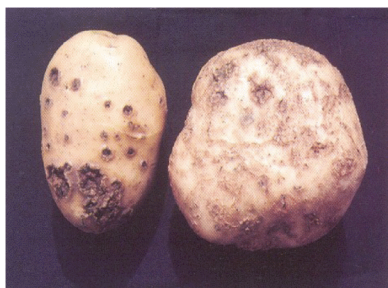


Figura 9. Sarna común (*Streptomyces scabies*).

El mosaico rugoso es causado por (*Potato Virus Y*); se considera como uno de los virus más importantes de la papa debido a que se disemina fácilmente y puede disminuir el rendimiento del cultivo hasta en 80% (Figura 10). Los síntomas primarios se manifiestan en forma de necrosis o de amarillamiento de las hojas y a veces muerte temprana. Las plantas con infección secundaria son enanas, de hojas encarrujas y moteadas, a veces se produce necrosis en las nervaduras de hojas y en los tallos (Bertschinger *et al.*, 1995).



Figura 10. Mosaico rugoso (*Potato Virus Y*).

Morfología y estructura de bacterias fitopatógenas.

Las bacterias. Son microorganismos unicelulares, tienen típicamente algunos micrómetros de largo (entre 0.5 y 5 μm) y se presentan en diversas formas incluyendo esferas, barras, y espirales. Generalmente, poseen una pared celular, pero compuesta por peptidoglicanos. Las bacterias disponen de cilios o flagelos, son móviles y son procariotas (Figura 11). Las células bacterianas no tienen núcleo ni membranas que delimiten sus orgánulos internos. Aunque el término bacteria incluye tradicionalmente a todos los procariotes, actualmente la taxonomía y la nomenclatura científica los divide en dos grupos. Estos dominios evolutivos se denominan Bacteria y Archaea. La división se justifica en las grandes diferencias que presentan ambos grupos a nivel bioquímico (Woese *et al.*, 1990).

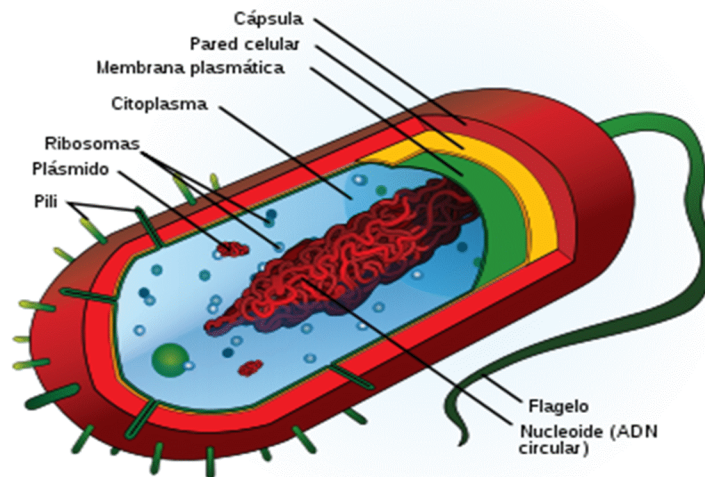


Figura 11. Estructura de una bacteria fitopatógena.

Un importante grupo de bacterias fitopatógenas, representando principalmente por especies de los géneros *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*, colonizan y se multiplican superficialmente en hojas, frutos, flores o ramillas de diferentes plantas cultivadas y de numerosas malezas, sin que

necesariamente infecten la planta hospedera. Estos microorganismos se denominan epifitos. Las poblaciones epifitas de organismos fitopatógenos constituyen importantes fuentes de inóculo y a menudo permiten la sobrevivencia y la diseminación de bacterias fitopatógenas (Fahy y Persley, 1983).

La célula bacteriana está rodeada por una membrana lipídica denominada membrana celular. Esta membrana actúa como barrera de contención para los nutrientes, proteínas y demás componentes esenciales del citoplasma celular. Puesto que las bacterias son procariotas, no tienen membranas que limiten los orgánulos citoplasmáticos y por ello presentan pocas estructuras intracelulares. Carecen de núcleo celular, mitocondrias, cloroplastos y de los otros orgánulos presentes en las células eucariotas, tales como el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático (Bullock, 1960).

Las bacterias disponen de una pared celular que rodea a su membrana celular. Las paredes celulares bacterianas están hechas de peptidoglicano (llamado antiguamente mureína). Esta sustancia está compuesta por cadenas de polisacárido enlazadas por péptidos inusuales que contienen aminoácidos D. Estos aminoácidos no se encuentran en las proteínas, por lo que protegen a la pared de la mayoría de las peptidasas. Las paredes celulares bacterianas son distintas de las que tienen plantas y hongos, que están hechas de celulosa y quitina, respectivamente. Son también distintas a las paredes celulares de Archaea, que no contienen peptidoglicano. El antibiótico penicilina puede matar a muchas bacterias inhibiendo un paso de la síntesis del peptidoglicano (Van, 2001).

Existen dos diferentes tipos de pared celular bacteriana denominadas Gram-positiva y Gram-negativa. Estos nombres provienen de la reacción de la pared celular a la tinción de Gram, un método tradicionalmente empleado para la clasificación de las especies bacterianas. Las bacterias Gram-positivas tienen una pared celular gruesa que contiene numerosas capas de peptidoglicano y ácido teicoico. En cambio, las bacterias Gram-negativas tienen una pared relativamente fina consistente en unas pocas capas de peptidoglicano rodeadas por una segunda membrana lipídica que contiene lipopolisacáridos y lipoproteínas (Engelhardt y Peters, 1998).

Las bacterias pueden moverse mediante flagelos, deslizamientos, contracciones (twitching) o por cambios en la flotabilidad. En el movimiento de tipo twitching, la bacteria usa su pili como gancho de ataque, primero extendiéndolo,

anclándolo y después contrayéndolo con una fuerza notable. Según el número y disposición de los flagelos en la superficie de la bacteria, se distinguen los siguientes tipos: un solo flagelo (monótrico), un flagelo en cada extremo (anfítrico), grupos de flagelos en cada extremo (lofótrico) y flagelos distribuidos sobre toda la superficie de la célula (perítricos). Los flagelos bacterianos son la estructura de movilidad mejor comprendida de cualquier organismo. Los flagelos están compuestos por cerca de 20 proteínas, con aproximadamente otras 30 proteínas para la regulación y coordinación. Las bacterias móviles son atraídas o alejadas por ciertos estímulos del comportamiento denominados *taxis*: éstos incluyen quimiotaxis, fototaxis y magnetotaxis (Lux y Shi, 2004).

Las bacterias penetran al hospedero por aberturas o heridas naturales (estomas, lenticelas, estigmas, cicatrices foliares) o a través de daños producidos por granizos, labores de cultivo o insectos. Además las bacterias fitopatógenas se diseminan en el agua de riego y en el drenaje superficial producido por el riego o por la lluvia; junto al salpicado producido por el impacto de las lluvias o del riego por aspersión sobre tejidos; por el arrastre superficial ocasionado por el agua de lluvias o por los riegos por aspersión sobre una planta enferma; junto a semilla infectada; tubérculos, estacas, o en hijuelos infectados; por insectos vectores o al comercializar plantas con infecciones incipientes (Latorre, 1999).

Las bacterias en las plantas, comúnmente son muy difíciles de controlar; con frecuencia, se requiere de una combinación de varios métodos de control para combatir a una determinada enfermedad bacteriana. Debe evitarse la infestación de los campos o de las cosechas, debido a las bacterias patógenas, introduciendo y sembrando solamente semilla o plantas sanas, es muy importante las medidas sanitarias que permiten disminuir la cantidad de inóculo en un aérea del cultivo a trasladar o ramas infectadas y limitar la propagación de las bacterias de planta en planta mediante la desinfección de las herramientas y manos después de haber manipulado plantas enfermas (Agrios, 1989).

A continuación se indican en el Cuadro 3, la clasificación de bacterias fitopatógenas de acuerdo al tipo de ataque acorde a Rueda y Sánchez (1997).

Cuadro 3. Clasificación de bacterias fitopatógenas de acuerdo al tipo de ataque.

	Parenquimatosas (mesófitas)	Vasculares o sistémicas	Meristemáticos o hiperplásticos
Tejido	Parenquima (esponjoso o empalizado)	Xilema y Floema	Meristemáticos (apical, cofia, procambium, cambium, embrión, proxilema-floema)
Órgano	Hoja, flor, fruto.	Tallos, Pecíolos, Nervaduras de hoja.	Raíz, Tallos, Flor, Fruto (semilla)
Síntoma	Cambio de color, necrosis (muerte celular)	Raíz (marchitez)	Yemas (superdesarrollo, subdesarrollo, cambio de coloración, necrosis)
Géneros	<i>Erwinia</i> <i>Xanthomonas</i> <i>Pseudomonas</i>	<i>Clavibacter</i> <i>Xanthomonas</i> <i>Pseudomonas</i>	<i>Agrobacterium</i> <i>Pseudomonas</i>

(Rueda y Sánchez, 1997).

5 Clasificación de *Ralstonia solanacearum*.

Marchitez bacteriana de la papa.

El organismo causal de esta enfermedad llamada marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) (ex *Pseudomonas solanacearum*) o podredumbre parda, es un bacilo Gram negativo con un flagelo polar. Esta bacteria vive en el suelo (Smith *et al.*, 1995).

La marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), es una enfermedad que devasta numerosos cultivos de importancia económica entre los que se cuentan el tomate, la papa, el plátano y algunas plantas de interés ornamental. Adquiere gran importancia en las zonas tropicales y subtropicales (Pradhanang *et al.*, 2003).

La Marchitez Bacteriana o pudrición parda de la papa (*Ralstonia solanacearum*) es la segunda enfermedad que limita la producción de papa; además afecta a un gran número de familias de plantas tanto cultivadas como silvestres, entre las cuales se encuentran la papa (*Solanum tuberosum*), el tomate (*Lycopersicon esculentum*), el pimiento (*Capsicum annuum*), el plátano (*Musa sp.*), como los cultivos más afectados (Priou *et al.*, 2006).

Clasificación taxonómica de *Ralstonia solanacearum*:

Phylum: Gracillicutes

Clase: Bacteria

Orden: Bacteriales

Familia: Bacteriaceae

Genero: *Ralstonia*

Especie: *solanacearum* (Yabuuchi *et al.*, 1995).

Se conocen tres razas de *Ralstonia solanacearum*: la raza 1 que afecta solanáceas y otras plantas, la raza 2 afecta a bananos, y la raza 3 que afecta papa (García *et al.*, 1999). El principal efecto fisiológico que causa (*Ralstonia solanacearum*) en sus hospederos se denomina marchitez, que se da cuando las hojas pierden turgencia y decaen junto con toda la planta, debido a una obstrucción de los tejidos conductores que transportan el agua y nutrientes a través del tallo (Gabor y Wiebe, 1997).

Esta bacteria se ha descrito como un microorganismo muy infeccioso, sin embargo, en cultivo muta con mucha facilidad perdiendo su patogenicidad. Sus propiedades han llevado a investigadores de todo el mundo a analizarlo, siendo uno de los microorganismos más estudiados en la historia; incluso algunos lo señalan como el fitopatógeno más importante del mundo (APHIS, 2004). En el Cuadro 4 se muestran las diferentes denominaciones más importantes de *Ralstonia solanacearum*.

Cuadro 4. Denominaciones de *Ralstonia solanacearum* (Rs).

País/ Idioma	Denominaciones
Perú	Bacteriosis, Podredumbre parda, Seca, Borrachera, Mata todo
Ingles	Brown rot, bacterial wilt
Francés	Bacteriose vasculaire, Pourriture brune.
Alemán	Braunfaule
Español	Marchitez bacteriana, Podredumbre parda
Portugués	Murcha bacteriana

(Aley *et al.*, 1994).

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

En 1896, Edwin F. Smith hace referencia a la primera descripción del patógeno *Pseudomonas solanacearum*, como el causante de la marchitez Bacteriana, cuya nomenclatura dada, sufriría modificaciones de acuerdo a estudios consecuentes del mismo Smith (Orozco, 2004).

En América Latina, fue localizada en 1965, en áreas amazónicas de Sur América, sobre grandes altitudes en Perú y Costa Rica, Guatemala (Loarca, 1987).

Ralstonia solanacearum es afectada por la temperatura, la humedad del suelo y otros factores físicos y químicos del suelo, siendo más favorables las temperaturas altas de 28 °C a 35°C (Hayward, 1991).

En climas fríos (menos de 18°C), y en altitudes superiores a 2,500 msnm, la bacteria crece muy lentamente y convive en el cultivo, como infección latente, sin ocasionar daños aparentes ni presentar síntomas visibles. El material vegetativo de propagación, se convierte en portador asintomático de la bacteria que al ser sembrado, en lugares más calurosos, se desarrolla la enfermedad en el cultivo (Delgado *et al.*, 1999).

Sintomatología de *Ralstonia solanacearum* en papa.

En la papa, los síntomas inducidos por *R. solanacearum* aparecen generalmente en el follaje de las plantas. Estos síntomas consisten en marchitamiento de las hojas más jóvenes en las partes terminales de las ramas, además. Los síntomas iniciales de amarillamiento leve se observan primero en un solo lado de la hoja o en una rama y no en la siguiente (Figura 12) (Gregory y Andrade, 1996).

Los síntomas en el follaje son marchitez, enanismo y amarillamiento del follaje y pueden aparecer en cualquier estado de desarrollo de la planta. Las hojas marchitas palidecen, toman una coloración verde claro y finalmente se tornan de color castaño, sin que se produzca enrollamiento de los bordes a medida que se van secando los folíolos (Yu *et al.*, 2003).



Figura 12. Síntomas de *R. solanacearum* en planta de papa.

Los síntomas pueden encontrarse en los tubérculos de papa. El tubérculo infectado de papa puede revelar una decoloración gris-marrón. Mientras la infección progresa, la decoloración puede extenderse a la corteza del tubérculo con un exudado de lechoso (exudado mucilaginoso), que indica la presencia de células bacterianas, también puede ser observada en secciones recién cortadas de tubérculos infectados. Exudado bacteriano también puede ser visible en los ojos o en el punto donde el estolón se conecta al tubérculo (Figura 13). Estos signos o síntomas no pueden ser visibles temprano en el desarrollo de la enfermedad. (Smith y Saddler, 2001).



Figura 13. Síntomas de *R. solanacearum* en Tubérculos de papa.

Cuando el tubérculo está infectado de forma clara, si se corta transversalmente y se aplica una ligera presión, salen del anillo vascular gotas blanquecinas de exudado bacteriano. Este exudado se mezcla con la tierra y la mezcla de exudado bacteriano y suelo se seca y se adhiere a la superficie del tubérculo. Los tubérculos dejados en la tierra siguen su proceso de podredumbre; las bacterias continúan destruyendo los tejidos que rodea al anillo vascular y finalmente se rompe la piel apareciendo grietas. En este momento otros organismos penetran en el tubérculo y aceleran la podredumbre; lo que queda es una masa viscosa de olor desagradable (Figura 14) (Pastrik y Maiss, 2000).



Figura 14. Daño causado por *R. solanacearum*, la exudación permite adhesión de tierra.

En tallos jóvenes, los líos vasculares infectados por *Ralstonia solanacearum* (*Rs*), pueden llegar a ser visibles como rayos largos y estrechos de color marrón oscuro. En plantas jóvenes y jugosas de variedades sumamente susceptibles, el desplome del tallo también puede ser observado. En infecciones bien avanzadas, las secciones transversales del tallo o del estolón pueden revelar una decoloración marrón de los tejidos infectados (Figura 15) (Swanson *et al.*, 2005).

La zona vascular del tallo se vuelve marrón cuando es invadida por las bacterias. El taponamiento de los vasos del anillo vascular del tallo es lo que produce el marchitamiento y muerte de la planta, al cortar el suministro de agua a la zona superior de la misma. Un signo que puede servir para hacer el diagnóstico es la presencia de gotitas brillantes de color castaño grisáceo que exudan del xilema cuando se hace un corte transversal en el tallo. Si se ponen en contacto dos superficies de corte del tallo infectado y luego se alejan lentamente, se pueden ver hilos delgados de mucosidad (Caruso *et al.*, 2002).



Figura 15. Tallo de papa infectado de *Ralstonia solanacearum*.

Ralstonia solanacearum se manifiesta sin amarillamiento previo de las hojas que se enrollan y comienzan a musitarse solamente en las horas más cálidas del día, mientras que los peciolo se encorvan hacia abajo como si la marchitez fuera debida a la falta de agua. Cuando la enfermedad evoluciona más lentamente, la marchitez de la parte aérea es en un principio unilateral; al cortar el tallo se observa una coloración parda de los tejidos vasculares. Es importante señalar que esta marchitez puede ser confundida con los síntomas provocados por la bacteria Gram positiva *Clavibacter michiganensis subsp. Sepedonicum* (Podredumbre anular). Sin embargo se puede diferenciar ya que *R. solanacearum* produce la marchitez del follaje verde, mientras que *C. michiganensis*, induce la marchitez de un follaje clorótico amarillento (Bowman *et al.*, 1982).

Ciclo de la enfermedad y epidemiología.

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

La bacteria se dispersa principalmente a través del suelo, sobreviviendo en este medio por largos periodos de tiempo. Además es posible su transmisión por medio del agua, equipo o por materiales infectados. Por ejemplo, se puede diseminar por medio del trasplante y la propagación de plantas infectadas, cuando se realizan cortes sin desinfectar el equipo que previamente ha tenido contacto con una planta infectada y una importante forma de diseminación se da por medio del riego (APHIS, 2004).

Cuando la bacteria afecta los cultivos de un país, región o zona, las posibilidades de diseminación son múltiples, como suelo infectado, aguas, labores culturales, etc., ya que es un patógeno del suelo y tiene la capacidad de persistir en él, aún sin el hospedante específico. Dicha capacidad va a depender de la raza presente, lo que dificulta la aplicación de medidas de control eficientes (Hernández *et al.*, 2005).

Los tubérculos infectados, son los principales medios de difusión de *Ralstonia solanacearum* (Rs). El desarrollo de la enfermedad depende de (temperatura y de humedad), la temperatura de 25° C favorecen la multiplicación bacteriana. Los tubérculos infectados, pero sin síntoma de Rs, puede abrigar la bacteria y después transmitir el patógeno a los tubérculos de la progenie como

infección latente. El patógeno puede sobrevivir en suelo. Además, las herramientas de trabajo que se utilizan para plantar y cosechar puede también llevar la enfermedad a los campos sanos, porque están en contacto con el suelo infestado. El suelo también infestado adherido a los zapatos de los granjeros o animales también contribuye a la difusión de la enfermedad. La entrada de la bacteria en raíces de papa (*Solanum tuberosum* L.), es facilitada por las heridas hechas por las herramientas durante la cultivación. *Rs*, puede estar presente adentro de los sacos; donde ponemos los tubérculos infectados. Cuando ponemos los tubérculos sanos de la semilla en esos sacos, se infectan (Boudazin *et al.*, 1999).

El estado latente de la bacteria *Ralstonia solanacearum* plantea las mayores dificultades. Las bacterias son invisibles, salvo en pruebas especializadas. Los tubérculos parecen estar sanos, pero diseminarán la enfermedad en donde se siembren. Pueden comerse, ya que los mamíferos son inmunes al organismo y en su forma latente no alteran el sabor ni el valor nutritivo de los tubérculos. Esto último puede parecer una bendición, pero las bacterias pueden sobrevivir el recorrido por el sistema digestivo. Ni las plantas de tratamiento de aguas servidas les hacen daño, y cuando llegan al agua, las plantas acuáticas les sirven como punto de escala para su posterior proliferación conforme se dispersan por medio de sistemas de irrigación y regresan nuevamente a la tierra (CIP, 2004).

La marchitez bacteriana persiste en el suelo durante todo el año. También se propaga de manera eficiente en suelos infectados, así como en el agua de riego. En general, la raza 3, esta bacteria sobrevive mejor bajo condiciones de alta humedad en suelo y temperatura baja. La raza 3 por lo general disminuye la virulencia, cuando las temperaturas exceden los 35° C. La enfermedad es más severa en 24-35 ° C y rara vez se encuentra en climas templados donde la temperatura media de invierno para cualquier mes cae por debajo de 10° C (Stansbury *et al.*, 2001).

Manejo de la enfermedad.

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

incidencia de la *Rs*, e incluso erradicarla. Esta estrategia es específica para cada lugar. De los factores de control existentes y disponibles, se deben seleccionar los que son factibles, apropiados y latentes para descartar la presencia de *R. solanacearum*. En áreas endémicas donde hay escasez de tubérculos-semilla sanos, una alternativa es el uso de semilla sexual de papa (TPS) o esquejes provenientes de micropropagación bajo condiciones controladas (French *et al.*, 1995).

Si un cultivo ha sido infectado con *Rs*, se debe evitar la siembra de papa u otros cultivos hospedantes por lo menos durante dos años. Se puede efectuar una rotación con cereales o pastos para eliminar el inóculo del suelo. La duración de la rotación necesaria para eliminar el inóculo varía, ya que la supervivencia de *R. solanacearum* en el suelo depende de las condiciones ambientales (temperatura, humedad) y de las características del suelo (factores bióticos y abióticos). Después de la cosecha de un cultivo infectado con *Rs*, se deben eliminar del campo los rastrojos de papa y quemarlos. La maquinaria, los vehículos, los cascos de los animales usados para la tracción y los zapatos del personal que provienen de un campo infestado deben ser lavados por lo menos con agua antes de ingresar a otro campo. Se debe evitar el flujo del agua de un campo infestado hacia los campos vecinos. En las áreas infestadas, es preferible usar el agua de pozo en vez de las aguas provenientes de los ríos o canales de irrigación. Además, se debe evitar el transporte de tubérculos-semilla o papa de consumo provenientes de áreas infectadas para evitar la diseminación de la enfermedad. Aunque muchas veces es difícil controlar la comercialización de papa, ésta es una de las mejores medidas disponibles de prevención (French, 1994).

Una vez que se haya detectado la enfermedad en un área, debe ser declarada en cuarentena para evitar la diseminación de la *Rs* hacia zonas no infectadas. Las medidas cuarentenarias restringen la producción de semilla de papa y prohíben la comercialización de papa de consumo hacia los países o regiones que no han sido afectadas con *Rs*. Esta situación afecta la economía de las regiones en cuarentena (French, 1994).

Importancia económica de *Ralstonia solanacearum*.

Esta bacteria es responsable de pérdidas considerables que se producen en muchos cultivos hortícolas y en algunas solanáceas como es el cultivo de la papa

donde deja inutilizadas grandes extensiones de tierras contaminadas con el agente (Iglesia *et al.*, 2008).

Ralstonia solanacearum, está distribuida por todo el mundo y tiene un amplio rango de hospedantes con variaciones fenotípicas y genotípicas, representando una grave amenaza para las producciones (Wicker *et al.*, 2002).

Cuando esta bacteria se instala en un país o región, las posibilidades de diseminación son múltiples (suelo infectado, aguas, labores culturales, etc.), ya que es un patógeno de suelo y persiste en él por muchos años aún sin el hospedante específico. Es importante considerar el origen de las semillas portadoras de las primeras infecciones para aplicar las medidas fitosanitarias. Entre los aspectos más importante en relación con esta enfermedad se encuentra el diagnóstico y detección del agente causal, para ello se usan técnicas serológicas (ELISA). En Cuba la enfermedad es cuarentenada, pero se presentan las condiciones propicias de humedad y temperatura para el desarrollo y sobrevivencia de esta bacteria. Actualmente la padecen todas las islas del Caribe y países del continente Americano, provocando grandes daños anualmente en la cosecha o dejando tierras sin poder ser utilizadas por estar contaminadas (Álvarez *et al.*, 2008).

En la actualidad, toda Europa occidental mantiene un estricto sistema de cuarentena, pruebas y certificación. Recientemente, la llegada a los Estados Unidos de cepas parecidas a las de la papa en *geranium* planteó una amenaza inmediata y seria a la enorme industria estadounidense de la papa. Contener los brotes de marchitez bacteriana en Europa y los Estados Unidos costó millones, mantener una cuarentena para esta enfermedad implica un gasto enorme y recurrente, pero hay demasiado en juego. Una industria gigantesca, el suministro de un alimento básico y muchos sustentos dependen de la viabilidad sostenida de la producción de papa. Y en los países en desarrollo éste suele ser un asunto de vida o muerte (Prior *et al.*, 2005).

La marchitez bacteriana de la Papa (*Ralstonia solanacearum*), es un grave problema económico en Egipto, los campos infestados son sometidos a medidas de cuarentena. Para investigar la supervivencia del patógeno y determinar el tiempo necesario para mantener los campos infestados en cuarentena (Messiha *et al.*, 2009).

La mancha bacteriana de la papa ha sido reportada en 10 países en África, Burundi, Egipto, sur África, Tanzania y Uganda ocasionando serios problemas económicos (Elphinstone, 1996).

Las plantas de papa presentaron síntomas de podredumbre parda, en algunos campos de Portugal, y se confirmó su existencia. Se implementó un programa nacional para vigilar a *Ralstonia solanacearum* (Cruz *et al.*, 2008).

Ralstonia solanacearum biovar 2, el agente causante de la podredumbre parda de la papa, ha sido responsable de grandes pérdidas de cultivos en el noroeste de Europa durante la última década. Los conocimientos sobre el comportamiento ecológico de *R. solanacearum* y sus antagonistas se requiere para desarrollar los procedimientos adecuados para su control y erradicación en los campos infestados (van *et al.*, 2002).

Los brotes de la enfermedad de la podredumbre parda causada por *Ralstonia solanacearum* raza 3 se han traducido en pérdidas de 291 toneladas de papa, un valor aproximado de USD 171 000 desde el año 2005 más de tres temporadas de cultivo. La propagación gradual de la enfermedad de cuarentena en Mauricio ha merecido un estudio de la población del patógeno (Khoodoo *et al.*, 2009).

Ralstonia solanacearum causa la marchitez bacteriana de la papa, principalmente en cultivos de papa en Irán. Se encontró que *R. solanacearum*, raza 3, biovar 2, tiene 100 % de similitud a la cepa de biovar 2 de la papa en el Perú. Este es el primer informe de la presencia de *R. solanacearum* biovar 2 en Irán y el primer informe de la existencia de este grupo de *R. solanacearum* fuera de América del Sur (Nouri *et al.*, 2009).

6 Descripción de *Ralstonia solanacearum*.

***Ralstonia solanacearum*.**

R. solanacearum es un bacilo Gram negativo, de 0.5 a 0.7 μm de ancho por 1.5 a 2.0 μm de largo. Presenta motilidad gracias a la presencia de uno a cuatro incluso más flagelos polares (Figura 16) (Jones *et al.*, 1991).



Figura 16. Micrografía de *R. Solanacearum*.

La especie ha sido subdividida en 5 biovars. La raza 1, afecta a las solanáceas y plataneras. La raza 2, provoca la enfermedad del moko en plátano. La raza 3, en papa y tomate. También la papa es afectada por la raza 1 en las zonas tropicales de baja altitud y por la raza 3 en zonas de montaña (Seal *et al.*, 1992).

Ralstonia solanacearum es el agente causal de la mancha bacteriana que infecta más de 200 plantas de diferentes especies, que abarcan 50 familias botánicas. La raza 3, es responsables de importantes pérdidas económicas a la industria de la papa y amenazan la producción de cultivos ornamentales en todo el mundo (Guidot *et al.*, 2009).

Características bioquímicas de *Ralstonia solanacearum*.

Los medios selectivos de crecimiento de la bacteria son: Agar TZC (Medio Tetrazolio de Kelman) y SMSA. Éstos son los más recomendados para el aislamiento de *R. solanacearum*, porque son muy específicos e incluso con algunas modificaciones, que podrían incluir la adición de antibióticos, permiten el crecimiento únicamente de esta bacteria. Además los medios se podrían usar para la caracterización de la raza y el biovar con que se cuenta (Directiva del consejo UE, 1998).

Medio SMSA: Los ingredientes por litro son: casamino ácido (casiena hidrolizada) 1 gr; peptona 10 gr; glicerol; 5 ml; agar 17gr; se ajustó a un pH 6.5 y esterilizó a 121°C/ 20 minutos; se enfrió el medio y adhirieron 5 ml de solución stock de 2,3 5-Cloruro de Trifenil Tetrazolio ó Cloruro de tetrazolio. La solución stock fue esterilizada por 5 minutos a 121 °C y almacenada a 4 °C (cristal violeta 5 mg; Polimixina B 100 mg; Bacitracina 25 mg; cloroanfenicol 5 mg; Penicilina 0.5 mg; Cicloheximida 100 mg (se disolvieron los ingredientes de la solución stock 30 minutos antes de utilizarla en 5 ml de 70% de etanol). Medio TZC: ingredientes por litro: Casamino ácido (casiena hidrolizada) 1 gr; peptona 10 gr; glucosa 5 gr; agar 17gr; se ajustó a pH 6.5 y esterilizó a 121°C/ 20 minutos. Los medios se incubaron durante siete días a 34 °C (Schaad *et al.*, 2001).

En el medio de TZC, las colonias típicas de aislados virulentos de *R. solanacearum* son de color crema, planas, irregulares, con anillos de color rojo sangre en el centro. Las colonias avirulentas de *R. solanacearum* son butirosas y de color rojo fuerte (Anon, 1997).

En el medio SMSA, las colonias típicas de los aislados virulentos de *R.*

solanacearum son de color blanco lechoso, planas, irregulares y fluidas, y presentan centros de un marcado color rojo sangre. Las formas avirulentas de *R. solanacearum* desarrollan colonias menos fluidas, cuyo color oscila entre completamente rosa y rojo en el medio SMSA (Engelbrecht, 1994).

Detección de *Ralstonia solanacearum* mediante pruebas serológicas.

Para conocer las propiedades antigénicas de *Ralstonia solanacearum* se utiliza (Enzyme Linked Inmunosorbent Assay). Es una prueba confiable y rápida para la detección de bacterias fitopatógenas, ya que permite detectar, en órganos de plantas, cantidades muy pequeñas de estos agentes y además permite estimar su concentración en el tejido enfermo. La sensibilidad de ELISA (ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas) es superior a otras pruebas de diagnóstico, por lo que ha sido extensamente utilizada para la detección de patógenos en humanos, animales y plantas (Flores, 1997).

La técnica ELISA es una prueba confiable y rápida para la detección de organismos fitopatógenos como bacterias, virus, hongos, ya que permite detectar, en órganos de plantas, cantidades muy pequeñas de estos agentes y además permite estimar su concentración en el tejido enfermo. El ensayo denominado sándwich de doble anticuerpo (DAS) es la variante más comúnmente utilizada de ELISA y constituye en la adsorción de anticuerpos específicos a una placa de poliestireno, los antígenos o fitopatógenos reaccionan con los anticuerpos adheridos a la placa (Cruz, 1997).

Diagnóstico molecular de *Ralstonia solanacearum*.

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta de partir de una única copia de ese fragmento original, o molde (Patrik and Rainey, 1999).

PCR en tiempo real mejora la sensibilidad de la detección y la especificidad y proporciona una herramienta importante para la detección rutinaria de *R. solanacearum* en muestras de suelo y para estudios epidemiológicos y ecológicos (Huang *et al.*, 2009).

PCR facilita la detección de patógenos en pequeñas. El método es de gran importancia en la gestión de la enfermedad de la podredumbre parda o mancha

bacteriana de la papa. Es suficiente para ser incluida en los programas control integrado de la enfermedad de marchitamiento (Grover *et al.*, 2009).

PCR mejora la sensibilidad de la detección de *Ralstonia solanacearum* y proporciona una herramienta importante para su detección rutinaria de muestras de agua del medio ambiente y para estudios epidemiológicos (Caruso *et al.*, 2003).

7 Métodos de control de *Ralstonia solanacearum*.

Control químico de *Ralstonia solanacearum*.

El método de control de patógenos más generalizado en la agricultura, especialmente en la lucha contra enfermedades fungosas y bacterianas, es el químico. El primer fungicida, descubierto en 1882, se conoció como la pasta bordelesa (Alexopoulos *et al.*, 1996), y marcó el comienzo del control químico de las enfermedades en plantas.

El control químico de la enfermedad en tomate provocadas por Rs se basa en el uso de tratamientos con productos cúpricos de oxiclورو de cobre, sulfato cúprico, óxido cuproso, o Kasugamicina. Así como rociar plantas con estreptomycin antes del trasplante y aplicar mezclas de mancozeb y cobre tras el trasplante y antes de la incidencia de la enfermedad (Blancard, 2000). Tales métodos de control previenen la multiplicación bacteriana pero no son siempre controles adecuados del inóculo llevado en la semilla. Desafortunadamente, el uso frecuente de pesticidas y los antibióticos contra la planta y bacterias patógenas ha llevado a la selección de poblaciones bacterianas resistentes contra los antibióticos. Aunado a lo anterior existen restricciones gubernamentales en el uso de los compuestos de cobre, que son ampliamente utilizados para el control de las enfermedades bacterias en la planta, estos compuestos han sido limitados en los países de la unión europea por la regla 473/2002 debido a su impacto en el ambiente, y por su toxicidad para el hombre, provocan irritación en la piel, en el tracto respiratorio y los ojos. Además son de un alto costo no se consigue fácilmente y se dispone de un limitado número de productos y en su mayoría afectan a organismos benéficos (Blancard, 2000).

El control químico contra *Ralstonia solanacearum* es antieconómico, por lo general no se recomienda (Hereida *et al.*, 1995).

Control biológico.

El control biológico es una de las tantas herramientas disponibles para utilizar en el programa de manejo integrado de enfermedades de las plantas. En años recientes, se han incrementado los casos exitosos de control biológico el cual se basa en emplear un agente de control con propiedades similares al patógeno y aprovechar una serie de interacciones ecológicas: competencia, antagonismo o antibiosis (Ducrot, 2005).

El desarrollo de agentes de control biológico es más complicado que el control químico, ya que introduce un tercer ser vivo en la interacción. Los mecanismos de control biológico para bacterias son básicamente los mismos que para el control biológico de hongos. Uno de los más frecuentes es la producción de metabolitos, capaces de actuar específicamente sobre las bacterias o de amplio espectro o de bacteriocinas activas frente a microorganismos de un cierto género o especie (Fravel, 1989).

El control biológico de la gobernadora (*L. tridentata*) ha probado tener efectos bactericidas al evaluar in vitro diversas dosis del extracto etanólico contra las bacterias fitopatógenas *Pseudomonas solanacearum*, *Erwinia amylovora*. Los extractos de *L. tridentata* mostraron una excelente acción bactericida contra *Pseudomonas solanacearum* aún a las dosis mínimas (Velásquez, 1983).

Los extractos vegetales, su actividad antimicrobiana ha sido relacionada con la actividad biológica de los mismos. Si consideramos que los compuestos obtenidos de las plantas en su mayoría son biodegradables e inocuos y que en México se encuentran aproximadamente el 10% de las especies de plantas superiores del mundo y más del 50% de ellas son exclusivamente de nuestro país (CONABIO, 2006).

En Japón se analizaron 14 plantas silvestres por su actividad microbiana contra *Ralstonia solanacearum*. El extracto de *G. carolinianum* mostro actividad antimicrobiana contra los patógenos que causan la sarna común de la papa y la podredumbre del suelo de la papa. Porque podría utilizarse como un agente biológico para el control de la marchitez bacteriana de la papa (Ooshiro *et al.*, 2004).

En los últimos años ha habido un creciente interés en el uso de compuestos biológicamente activos, extraídos de especies de plantas que presentan la capacidad de eliminar a microorganismos patógenos por sí mismas, esto debido

principalmente, a la resistencia que los microorganismos han desarrollado a los antibióticos (Daferera *et al.*, 2003).

La agricultura del nuevo milenio debe establecer nuevas alternativas de control que produzcan un menor impacto ambiental, ya que día con día va en aumento el porcentaje de consumidores que demandan alimentos sanos y libres de productos químicos (Ponce *et al.*, 2004).

Aceites esenciales.

Los aceites esenciales obtenidos de plantas son una alternativa para el control de bacterias. Los aceites esenciales son mezclas de sustancias obtenidas de plantas, que presentan como características principales su compleja composición química y su carácter fuertemente aromático (Sánchez, 2006).

Los aceites esenciales son biodegradables, amigables con el ambiente y poseen bajos o inexistentes niveles de toxicidad, lo que permite que sean utilizados en cualquier ambiente (Cheng *et al.*, 2009).

Las plantas tienen una capacidad casi ilimitada para sintetizar sustancias aromáticas, siendo la mayoría fenoles o sus derivados oxígeno-sustituidos. En general son metabolitos secundarios (es decir, que no tienen un papel esencial en el metabolismo de la plantas) de acuerdo a Walton y Brown (1999).

Los aceites esenciales pueden ser extraídos por diferentes métodos, el más utilizado; el de destilación por arrastre de vapor de agua (Figura 17), donde la muestra vegetal se coloca en un recipiente (tipo clavenger cerrado) y es sometida a una corriente de vapor de agua, así la esencia es arrastrada y posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. El fundamento de esta técnica, consiste en una vaporización a temperaturas inferiores a la ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua, el cual ejerce la doble función de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y adicionar tensión de vapor a la de los componentes volátiles del aceite esencial; los vapores que salen del matraz extractor se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, de los dos productos agua y aceite finalmente se separan en un dispositivo o vaso (Ortega, 2011).



Figura 17. Destilación por arrastre de vapor de agua.

Estos productos nombrados comúnmente esencias son sustancias olorosas volátiles contenidas normalmente en los vegetales. Su volatilidad los diferencia de los aceites fijos que producen los lípidos, los cuales son particularmente abundantes en las Retaceas, Umbelíferas, Mirtáceas y Labiadas (Torres, 2004).

Tomillo.

Las plantas aromáticas son importantes para la obtención de aceites esenciales como es el caso del tomillo (*Thymus vulgaris* L) pertenece a la familia de labiadas. El nombre genérico proviene del verbo griego Thym, perfumar, en alusión al intenso y agradable aroma de la planta (Muñoz, 1996).

El tomillo es una planta medicinal muy importante para el sector hortícola. Es un arbusto perenne con tallos de madera y alcanza una altura de 30 a 50 cm. es una planta típica de la región mediterránea. El tomillo posee propiedades antisépticas, desinfectantes, antiespasmódico, desodorante, sedante y sus principales componentes son timol y carvacol (Muñoz, 1993).

El tomillo es de hoja perenne o semiperenne es una planta herbácea. Es nativa de Europa. Las plantas son ampliamente utilizadas, frescas y secas, como una hierba culinaria. Su aceite esencial se utiliza como ingrediente en una amplia variedad de alimentos, así como en perfumería, jabones y lociones. Además tiene propiedades antimicrobianas (El-Hela, 2007).

Orégano.

El orégano *Lippia graveolens* pertenece al género *Lippia*, familia *verbenaceae*, es una planta fuertemente aromática nativa del sur de Norteamérica, México, Guatemala, Nicaragua, Honduras, Panamá, Guatemala y Colombia (Castro, 2004).

El Orégano mexicano (*Lippia graveolens*) se caracteriza por ser una planta perenne, que crece en climas semiáridos y se utiliza tradicionalmente como antiséptico intestinal, antiespasmódico, analgésico y antiinflamatorio y tiene propiedades antibacterianas (Castillo *et al.*, 2007).

La distribución del orégano en la República Mexicana es en los estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Zacatecas, Puebla, Querétaro, Tamaulipas, Oaxaca y Sinaloa (Huerta, 1997). La producción nacional de orégano en México, es alrededor de 4,000 toneladas, obtenidas de las poblaciones de los estados de Chihuahua, Coahuila, Guanajuato y Querétaro; cubriendo las demandas de las industrias, cosméticas, alimenticias y farmacéuticas de Estados Unidos de Norteamérica y de Japón, a donde se exportan más del 90% de la producción Mexicana (Osorno *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que los géneros *Origanum* (orégano) y *Thymus vulgaris* (tomillo) entre otros, tienen propiedades antioxidantes, relacionadas con los compuestos fenólicos, carvacrol y el timol que pueden ser utilizados bajo ciertas condiciones como fungicidas y bactericidas (Aballa y Rosen, 2001).

Mecanismos de acción de aceites esenciales contra *Ralstonia solanacearum*.

Los aceites esenciales han demostrado poseer características insecticidas, antioxidantes, anti-bacteriano, antifúngicos, antiviral (Burt, 2004; Kordali *et al.*, 2005). Se ha demostrado que los géneros *Origanum* (orégano) y *Thymus* (Tomillo) tienen propiedades antioxidantes, relacionadas con los compuestos fenólicos, carvacrol y el timol que pueden ser utilizados bajo ciertas condiciones como fungicidas y bactericidas, para inducir la lisis rápida de la célula bacteriana (Figura 18) (Basim *et al.*, 2004).

Los mecanismos de acción de los diversos compuestos orgánicos de las plantas son variables; por ejemplo, la toxicidad de los fenoles se atribuye a la oxidación de compuestos en la célula del carvacol; se ha reportado que se encuentra presente en aceite esencial de orégano en un 60 a 70% y en tomillo 45%, la inhibición de crecimiento de muchos patógenos por carvacrol ha sido reportada en varios artículos sin embargo no se ha definido el mecanismo de acción de este (Cowan, 1999).



Figura 18. Planta de orégano (*Lippia graveolens*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) para aceites esenciales.

Los triterpenos pueden actuar siguiendo diversos mecanismos en dependencia de su naturaleza química. Los triterpenos de naturaleza alcohólica pueden alterar la naturaleza coloidal del protoplasma celular provocando su muerte (Pelczar y Reid, 1992).

De los alcaloides se ha postulado que se intercala con el ADN, el de las lectinas y polipéptidos se conoce que pueden formar canales iónicos en la membrana microbiana o causar la inhibición competitiva por adhesión de proteínas microbianas a los polisacáridos receptores del hospedero (Cowan, 1999). Otro estudio reporta que los componentes del aceite esencial interfieren con las funciones de permeabilidad de membrana celular (Lambert *et al.*, 2004).

En la búsqueda de sustancias naturales que permitan desarrollar nuevas estrategias para controlar y eliminar de plagas se han realizado numerosas investigaciones con aceites esenciales, y se ha observado que actúan como bio-controladores debido a la presencia de metabolitos secundarios los cuales están implicados en el control biológico contra organismos fitopatógenos, y en ciertos casos, activando procesos de defensa en la planta, brindando una protección preventiva (Castillo, 2004; Kagale *et al.*, 2004; Ducrot, 2005), los cuales son las fracciones líquidas volátiles que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas, son mezclas complejas de hasta 100 componentes, entre ellos: terpenoides, fenoles aromáticos, éteres, ésteres, aldehídos y cetonas que determinan el aroma característico de la planta donante (Batish *et al.*, 2008; Shiva, 2007). Los aceites esenciales son biodegradables, amigables con el ambiente y poseen bajos o inexistentes niveles de toxicidad, lo que permite que sean utilizados en cualquier ambiente (Cheng *et al.*, 2009). Lo anterior se ha reflejado en el interés

que han mostrado los investigadores para obtener nuevos conocimientos sobre el potencial de las plantas aromáticas, sobre las bacterias fitopatógenas, como se describe en la siguiente investigación donde se evaluó la actividades antibacterianas de los aceites esenciales de las plantas medicinales contra el crecimiento del *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* utilizando los aceites esenciales obtenidos de las plantas de orégano (*Origanum syriacum*), tomillo (*Thymbra spicata*), menta (*Mentha spicata*) y lavanda (*Lavandula stoechas* ssp. *stoechas*). El resultado indicó que el aceite esencial del tomillo fue el más eficaz de inhibir el crecimiento de *Cmm*, seguido por los aceites de orégano, menta y lavanda (Soylu *et al.*, 2003).

Los aceites esenciales derivados de plantas como el timol y la palmarosa son biofumigantes efectivos contra *R. solanacearum* en invernaderos, pero se necesitan evaluaciones en campo antes de su uso práctico para el manejo de la enfermedad (Pradhanang *et al.*, 2005).

LITERATURA CITADA

- Aballa, A. and J. P. Rosen. 2001. The effects of stabilized extracts of sage and oregano on the oxidation of salad dressings, *European Food Research and Technol.* 212:551-560.
- Aduana México. 2012. Norma Oficial Mexicana NOM-012-FITO-1996 <http://www.aduanas-mexico.com.mx/claa/ctar/normas/nm012afi.htm>. 01/09/12.
- Agrios, N. G. 1989. *Fitopatología*. Ed. Limusa S. A de C. V. 3^{ra} edición. México. pp. 488-489.
- Agrios, N. G. 1995. *Fitopatología*. Ed. Uteha. 2^{da} edición. México. p 838.
- Agronegocios. 2001. Cultivo de la papa, centro de estudios agropecuarios. Ed. Iberoamericana, S. A. de C. V. México. pp. 19-20.
- Alexopoulos, C., C. Mims and M. Blackwell. 1996. *Introductory Mycology*. Ed. Wiley. 4th edition. Nueva York, EEUU. p. 869.
- Aley, P., E. R. French and U. Nydegger. 1994. Methods of greenhouse inoculation with *Pseudomonas solanacearum* to select resistant potato clones. *Phytopath.* 29:20.
- Alonso, F. 1996. Cultivo de la patata. Ed. Mundi-prensa. México. pp. 26-27.
- Álvarez, E., A. Iglesia., A. García y E. Blanco. 2008. Optimización de métodos serológicos para la detección de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi. *Rev. Protección vegetal.* 23:10.
- Anon, M. 1997. Intermin testing scheme for the diagnosis, detection and identification of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in potatoes. Publication 97/64/EC, Official. J. Eu. Com. 273:1-25.
- Anónimo. 1998. La papa en México, un cultivo con potencialidad. *Rev. Claridades Agropecuarias*. Ed. Abriendo surcos. N° 59. México. pp. 3-15.
- APHIS. 2004. New Pest Response Guidelines *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2; Southern wilt of Geranium. Ed. Floyd. Riverdale, USA. USDA. p.19.
- Arce, F. A. 2002. El cultivo de la patata. Ed. Mundi-Prensa. 2^{da} edición. México. pp. 42-43.
- ASERCA (Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria). 1998. Un alimento básico en la dieta de los mexicanos. *Rev. Claridades Agropecuarias*. N° 57. México. pp. 1-15.

- Basim, E., H. Basic., E. R. Dikcstein y J. B. Jones. 2004. Bacterial Canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* on greenhouse-grow tomato in the Western Mediterranean region of Turkey. Plant Disease. 88:1048.
- Batish, D., H. Singh., R. Kohli y S. Kaur. 2008. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. Forest Ecol. Manage. In Press. p. 1016.
- Biadene, G. 1998. Las enfermedades de la patata. Ed. Mundi-Prensa. 1^{ra} edición. España. pp. 1-80.
- Bertschinger, L., U. C. Scheidegger., J. Muñoz y A. Hidalgo. 1995. Efecto de diferentes virus sobre el rendimiento potencial de la papa y su interacción con el estado de brotamiento de tubérculos-semilla en la costa del Perú. Rev. Latinoamericana de la Papa. 7/8:36-54.
- Blancard, D. 2000. Enfermedades de tomate, observar, identificar, luchar. Ed. mundi-prensa. Madrid, España. p. 212.
- Borba, N. 2008. La papa un alimento básico. Uruguay. pp. 1-11.
- Boudazin, G., A. C. LeRoux., K. Josi., P. Labarre and B. Jouan. 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. Eu. J. of Plant Pathol. 105:373-380.
- Bowman, J. E. and L. Sequeira. 1982. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato:infectivity titrations In relation to multiplication and spread of the pathogen. Am. Potato. J. 59:155-164.
- Bulloch, W. 1960. The History of Bacteriology. Ed. University Press. Nueva York, Oxford. pp. 20-30.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. Int. J. of Food Microbiol. 94:223-253.
- Caruso, P., M. T. Gorris., M. Cambra., J. L. Palomo., J. Collar and M. M. López. 2002. Enrichment double-antibody sandwich indirect enzyme-linked immunosorbent assay that uses a specific monoclonal antibody for sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in asymptomatic potato tubers. Appl. Environ. Microbiol. 68:3634-3638.
- Caruso, P., E. Bertolini., M. Cambra and M. M. López. 2003. A new and sensitive co-operational polymerase chain reaction for rapid detection of *Ralstonia solanacearum* in water. J. of Microbiol. Methods. 55:257-272.
- Castillo, J. 2004. Determinación de Metabolitos Secundarios en Plantas Silvestres del Parque Nacional Terepaima, Municipio Palavecino, estado Lara. Tesis. Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado, Venezuela. p. 103.

- Castillo, H. A. G., F. A. J. García and E. M. Estarrón. 2007. Extraction Method that enriches phenolic content in oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) essential oil. J. of food proce. Eng. 30:661-669.
- Castro, H. 2004. Evaluación agronómica de frecuencias de corte y densidades de siembra de orégano (*Lippia graveolens*), en el centro de Agricultura Tropical Bulbuxya, San Miguel Panan. Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos Guatemala, Facultad de Agronomía Instituto de investigaciones agronómicas. Guatemala. p. 43.
- Cheng, S., J. Liu., C. Huang., y. Hsui., W. Chen and S. Chang. 2009. Bioresource Technol. 100:457-464.
- CIP. 2004. Informe anual 2004: Centro internacional de la papa. http://www.cipotato.org/publications/annual_reports/2004spa/ar2004_06.asp. 18/03/2010.
- Claridades Agropecuarias. 2008. La papa: tesoro enterrado ¿Por qué la papa?. Rev. Claridades Agropecuarias. N° 174. México. pp. 41-50.
- CONABIO. 2006. Capital natural y bienestar social. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad. México. p. 17.
- Cortez, M. R. Y G. Hurtado. 2002. Guía técnica de cultivo de papa. El Salvador. pp. 7-33.
- Cosave, M. A. 1991. *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum*, método cuarentenario N° 1. En: Procedimientos y métodos analíticos para materiales de propagación. Montevideo, Uruguay. pp 82-95.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiol. Rev. 10:564.
- Cruz, F. M. 1997. Ensayo de Inmunoadsorción con Enzimas Ligadas (ELISA) para la detección de virus fitopatógenos. En: manual de métodos de detección e identificación de fitopatógenos. Departamento de fitopatología. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.
- Cruz, L., M. Eloy., F. Quirino and H. Carrinho. 2008. *Ralstonia solanacearum* biovar 1 associated with a new outbreak of potato brown rot in Portugal. Phytopatho. Mediterran. 47:87-91.
- Daferera, D. J., B. N. Ziogas and M. G. Polissiou. 2003. The effectiveness of plant essential oils in the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Crop Protection. 22:39-44.
- Debener, T., F. Salamini and C. Gehhart. 1990. Phylogeny of wild and cultivated *Solanum* species based on nuclear restriction fragment length polymorphisms. Ther. Appl. Genet. 79:360-368.

- Delgado, L., A. García and R. García. 1999. Marchitez bacteriana del tomate causado por el biovar 2 de *Ralstonia solanacearum* en algunas localidades del estado Mérida, Venezuela. Forest. 43:183-189.
- Directiva del consejo UE. 1998. Método de diagnóstico e identificación de *Ralstonia solanacearum*. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. España. Julio. 20:1-30.
- Ducrot, P. H. 2005. Organic chemistry's contribution to the understanding of biopesticida activity of natural products from higher plants. pp. 47-58.
- Egúsqiza, B. R. 2000. La papa, producción, transformación y comercialización. Convenio ADEX-AID/MSP. Ed.CIMAGRAF S. R. L. Lima Perú. p. 168.
- El-Hela, A. A. A. 2007. Chemical composition and biological studies of the essential oil of *Thymus decussatus* Benth growing in Egypt. Egypt. J. Biom. Sci. 23:146-153.
- Elphinstone, J. G. 1996. Survival and possibilities for extinction of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in cool climates. Potato Res. 39:403-410.
- Emilie, F. F., A. Bart and P. H. J. Thomma. 2006. Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. Molecular Plant Pathol. 2:71-86.
- Engelbrech, M. 1994. Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. Bacterial Wilt Newsletter. 10:3-5.
- Engelhardt, H. and J. Peters. 1998. Structural research on srface layers: a focus stability, surface layer homology domains, and surface layer-cell wall interactions. Struct Biol. 3:276-300.
- Fahy, P. C. and G. J. Persley. 1983. Plant bacterial Diseases. Ed. Academic Press. Nueva York. p. 393.
- Flores, M. C. 1997. Ensayo de Inmunoadsorción de Enzimas Ligadas (ELISA). México. p. 1.
- Fravel, D. R. 1989. Rolo of antibiosis in the biocontrol of plant disease. Ann. Rev. of Phytopath. 26:75-91.
- French, E. R. 1994. Strategies for integrated control of bacterial wilt of potatoes. In Bacterial wilt: the disease and its causative agent *Pseudomonas solanacearum*. Eds. Hayward, A. C. and Hartman, G. L. p. 199-207.
- French, E. R., L. Gutarra., P. Aley and J. Elphinstone. 1995. Culture media for *Pseudomonas solanacearum* isolation, identification and maintenance. Phytopath. 30:126-130.

- Funbapa (Fundación barrera zoofitosanitaria patagónica). 2011. Sistema cuarentenario. <http://www.funbapa.org.ar/barrera/definicion.htm>. Consultada: 13/10/2012.
- Gabor, B. y W. Wiebe. 1997. Enfermedades del tomate. California, USA. Seminis Vegetable Seed Inc. p. 92.
- García, R., A. García and L. Delgado. 1999. Distribución, incidencia y variabilidad de *Ralstonia Solanacearum*, agente causal de la marchitez bacteriana de la papa en el estado de Mérida. Bioagro. 11:12-23.
- Grageda, G. J., M. T. Cervantes., M. P. F. Ortega., P. R. Sabori., C. M. Chávez., C. A. A. Fu y N. L. A. Maldonado. 2001. Manual para la producción de cultivos agrícolas y forrajeros de la sierra de Sonora. Hermosillo. pp. 90-100.
- Gregory, P. y H. Andrade. 1996. Principales enfermedades, nematodos e insectos de la papa. Ed. Stella. Lima-Perú. pp.7 y 8.
- Grover, A., W. Azmi., S. M. P. Khurana and S. K. Chakrabarti. 2009. Multiple displacement amplification as a pre-polymerase chain reaction (pre-PCR) to detect ultra low population of *Ralstonia solanacearum*. Letters in App. Microbiol. 49:539-543.
- Guidot, A., M. Elbaz., S. Carrere., M. L. Siri., M. J. Pianzzola., P. Prior and C. Boucher. 2009. Specific Genes from the potato brown rot Strains of *Ralstonia solanacearum* and Their Potential Use for Strain Detection. Phytopath. 99:1105-1112.
- Hayward, A. C. 1991. Bology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Ann. Rev. of Phytopath. 29:64-87.
- Hereida, H. C. A., F. H. L. Guzmán y M. D. J. Mendoza. 1995. Manejo integrado del cultivo de la papa. Corporación colombiana de investigación Agropecuaria (Corpoica). Colombia. p. 131.
- Hernández, Y., N. Mariño., G. Trujillo and C. U. de Navarro. 2005. Invasión de *Ralstonia solanacearum* en tejidos de tallos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Rev. Fac. Agron. 22:185-194.
- Hosaka, K. y R. E. Hanneman. 1988. The origin of the cultivated tetraploid potato based on chloroplast DNA of cultivated potatoes. Theor. Appl. Genet. 72:606-618.
- Huamán, Z. 1986. Botánica sistemática y morfológica de la papa. 2^{da} edición. Lima, Perú. pp 2-10.
- Huang, J., J. Wu., C. Li., C. Xiao and G. Wang. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil with quantitative, real-time PCR assays. J. of App. Microbiol. 107:1729-1739.

- Huerta, C. 1997. Orégano Mexicano: Oro vegetal. Biodiversistas. Bol. CONABIO 3:8-13.
- Iglesia, A., E. Álvarez., Y. Martínez y A. García. 2008. Diagnóstico molecular de la marchitez bacteriana. Rev. Protección vegetal. 23:75-79.
- Jones, J., R. Stall y T. Zitter. 1991. Compendium of tomato disease. Minnesota, USA. The Amer. Phytopath. Society. p. 120.
- Kagale, S., T. Marimuthu., B. Thayumanavan., R. Nandakuman and R. Samiyappan. 2004. Physiol. and Molec. Plan Pathology. 65:91-100.
- Kawagoe, Y. and Y. Kikuta. 1991. Chloroplast DNA evolution in potato (*Solanum tuberosum* L.). Theor. Appl. Genet. 81:13-20.
- Khoodoo, M. H. R., E. S. Ganoo and A. S. Saumtally. 2009. Molecular Characterization and Epidemiology of *Ralstonia solanacearum* Race 3 biovar 2 Causing Brown Rot of Potato in Mauritius. J. Phytopath. 10:1-10.
- Kim, S. and T. Olson. 2003. *Ralstonia* wild of geranio. Plant pathology circular. Pensilvania Dept of Agricult. 85:1-15.
- Kordali, S., A. Fakir., A. Mavi and A. Yildirim. 2005. Screening of Chemical Composition and Antifungal and Antioxidant Activites of the Essential Oils from three Turkish Artemisa Species. J. Agric. Food. Chem. 53:1408-1416.
- Kooman, P. L., M. Fahem., P. Tegera and A. J. Haverkort. 1996. Effect of climate on different potato genotypes:1. Radiation interception, total and tuber dry matter production. Eu. J. of Agr. 5:193-205.
- Latorre, G. B. 1999. Enfermedades de las plantas cultivadas. Ed. AlfaOmega. 5^{ta} edición. México. p. 23.
- Lambert, R. J., G. W. Hanlon and S. P. Denyer. 2004. The synergistic effect of EDTA/antimicrobial combinations on *Pseudomonas aeruginosa*. J. App. Microbiol. 96:244-253.
- Laurila, J., M. C. Metzler., C. A. Ishimaru and V. M. Rokkaa. 2003. Infection of plant material derived from *Solanum acaule* With *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum*: temperature as a determining factor in immunity of *S. Acaule* to bacterial ring rot. Plant Pathol. 52:496-504.
- Loarca, M. J. L. 1987. Estudio del patosistema *Solanum-Pseudomonas* y alternativas de control químico aplicado a semilla, en dos municipios del departamento de Quetzaltenango. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. p.64.
- López, T. J. G. 2004. Evaluación del solarizado para el control de *Ralstonia Solanacearum*, en el cultivo de tomate *Lycopersicum esculentum* en la aldea el tempisque, Agua Blanca, Jutiapa. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. p. 43.

- Lux, R. and W. Shi. 2004. Chemotaxis guided movements in bacteria. *Rev. Biology.* 15:207-210.
- Martínez, Z. J. M. and J. L. Oliver. 1985. Isozyme gene duplication in diploid and tetraploid potatoes. *theor. Appl. Genet.* 70:172-173.
- Moctezuma, G. R. 2006. Relevancia de la papa en México. *Rev. productores de Hortalizas.* Ed. Meister. México. p.16.
- Messih, N. A., A. H. C. Van Bruggen., E. Franz., J. D. Janse., M. E. Schoeman., A. J. Termorshuizen and A. D. Van Diepeningen. 2009. Effects of soil type, management type and soil amendments on the survival of the potato brown rot bacterium *Ralstonia solanacearum*. *App. Soil Ecology.* 43:206-215.
- Muñoz, F. 1993 plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado. Ed. Mundi-prensa. Madrid. p. 365.
- Nouri, S., M. Bahar and M. Fegan. 2009. Diversity of *Ralstonia solanacearum* causing potato bacterial wilt in Iran and the first record of phylotype II/biovar 2T strains outside South America. *Plant Pathol.* 58:243–249.
- Orozco, M. E. F. 2004. Colonización de raíces de malezas por *Ralstonia solanacearum*, biovars 1, 2 y 3. In métodos moleculares para diagnóstico de patógenos y mejoramiento para resistencia en vegetales. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. pp. 4-19.
- Ortega, N. M. M., E. D. McCaughey., M. R. Bargueño y F. Serna. 2005. Estimación de materia vegetal del Orégano (*Lippia palmeri* Watson) y su contenido de aceite esencial por planta en dos sitios nativos del estado de Sonora. *Memorias del 5to Simposio Internacional de la Flora Silvestre de Zonas Áridas.* pp. 234-249.
- Ortega, N. M. M. 2011. Caracterización del aceite esencial del orégano *Lippia palmeri* wats y su actividad biológica. Tesis doctoral. Universidad de Baja California. Instituto de Ciencias Agrícolas. Baja California, México. pp. 11-12.
- Ooshiro, A., K. Takaesu., M. Natsume., S. Taba., K. Nasu., M. Uehara and Y. Muramoto. 2004. Identification and use of a wild plant with antimicrobial activity against *Ralstonia solanacearum*, the cause of bacterial wilt of potato. *Weed Biol. and Manag.* 4:187-194.
- Osorno, H. T., J. D. Flores., S. L. Hernández Y R. Cisneros. 2009. Management and extraction of *Lippia graveolens* in the arid lands of Queretaro, Mexico. *Economic Botany* 63:314-318.
- Parsons, D. B. 1982. Papas. Ed. Trillas Sep. México. p. 18.
- Pastrik, K. H. and E. Maiss. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* in Potato Tubers by Polymerase Chain Reaction. *J. of Phytopath.* 148:619-626.

- Pastrik, K. H. and F. A. Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavivacter michiganensis subspecies michiganensis* by Polymerase Chain Reaction-based techniques. J. of Phytopath. 147:687-693.
- Pelczar, M. J. y R. D. Reid. 1992. Microbiología. Ed. Pueblo y Educación. La Habana Cuba. p. 664.
- Pérez, G. M., S. F. Márquez y L. A. Peña. 1998. Mejoramiento genético de hortalizas. Ed. Universidad Autónoma de Chapingo. 2^{da} edición. México. pp. 67-73.
- Ponce, A. G., C. del Valle and S. I. Roura. 2004. Evaluation of plant essential oil as natural posharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Int. Soci. for Hort. Sci. 628:737-745.
- Pradhanang, P. M., P. Ji., M. T. Momol., S. M. Olson., J. L Mayfield and J. B. Jones. 2005. Application of acibenzolar-S-methyl enhances host resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum*. Plant Dis. 89:989-993.
- Pradhanang, P. M., M. T. Momol., S. M. Olson and J. B. Jones. 2003. Effects of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. Plant Dis. 87:423-427.
- Prior, P. H., C. Allen and A. C. Hayward. 2005. Bacterial Wilt disease and the *Ralstonia solanacearum*:species complex. The Amer. Phytopath. Soci. p. 510.
- Priou, S., L. Gutarra and P. Aley. 2006. An improved enrichment broth for the sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* (biovars 1 and 2A) in soil using DAS-ELISA. Plant Pathol. 55:36-45.
- Pumisacho, M. and S. Sherwood. 2002. El cultivo de la papa en Ecuador. 1^{era} edición. Ecuador. pp. 33-37.
- Rouselle, P. y R. J. Crosnier. 1999. La patata. Ed. Mundi - Prensa. España. pp. 76 y 77.
- Rueda, P. E. O. y A. A. Sánchez. 1997. Manual de reconocimiento de bacterias fotopatógenas. Universidad Autónoma Agraria. Saltillo, Coahuila. México. p. 17.
- Rueda, P. E. O. 1998. Producción de antisuero contra *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* y su detección en la Comarca Lagunera. Tesis maestro en ciencias. Universidad Autónoma Agraria. Saltillo, Coahuila. México. pp.1-4
- SAGARPA. 2012. Norma Oficial Mexicana en materia de sanidad vegetal. <http://www.encuentra.gob.mx/resultsAPF.html?q=norma%20fitosanitaria%20de%20la%20papa%201996&client=sagarpa>. 30/09/12.
- Sánchez, M. F. 2006. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Ed. Aiyana. 1^{era} edición. España. pp. 7-14.

- Santiago, C. M. y J. S. García. 2001. Economía de la Agroindustrialización de la Papa en México. Rev. Latinoamericana de la papa. Vol-especial: 21-43.
- Schaad, N. W., J. B. Jones and W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd edition. Ed. APS PRESS (The American Phytopathological Society). Minnesota, U. S. A. pp. 152-155.
- Seal, S. E., L. A. Jackson and M. J. Daniels. 1992. Use of tRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction amplification. Appl. Environ Microbiol. 58:3579-3761.
- SENASICA. (Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2002. Curso de Capacitación y Actualización en Certificación Fitosanitaria para Personal Oficial de SAGARPA. Regulación fitosanitaria de la papa. Hermosillo, Sonora. pp. 1-4.
- SENASICA. (Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2003. Modificación de la Norma Oficial Mexicana NOM-012-FITO 1995. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=609>. 29/09/12.
- Shiva, R. C. 2007. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis Doctoral. Departamento de Sanidad y Anatomía de Animales. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. p. 173.
- SAGARPA. 2009. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. www.siap.gob.mx. 22/03/2010.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2012. Superficie sembrada. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351. 21/09/12.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2012. Papa. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351. 20/09/12.
- Sktruijk, P. C., D. Vreugdenhil., J. Herman., E. van., W. Christian., y. Bachem., G. Richard and F. Visser. 1999. Potato Research. 42:313-331.
- Smith, R. A., P. Jones., J. G. Elphinstone and S. M. D. Forde. 1995. Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. Food and Agric. Immunol. 7:67-79.
- Smith, J. J. and G. S. Saddler. 2001. The use of avirulent mutants of *Ralstonia solanacearum* to control bacterial wilt disease. pp.159-176.
- Soylu, S., E. M. Soylu., I. A. Bozkurt and A. D. Kaya. 2003. Antibacterial activities of essential oils from oregano, thyme, rosemary and lavender plants against

- Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, the causal agent of halo blight of bean. Ovidius Univ. Ann. Med. Sci. Pharm. 1:40-44.
- Stansbury, C., S. McKirdy., A. Mackie and G. Power. 2001. Bacterial wilt *Ralstonia solanacearum*-race 3 . Exotic threat to Western Australia. Agriculture Western Australia. N° 7. ISSN:1443-7783.
- Swanson, J. K., J. Yao., J. Tans-Kersten and C. Allen. 2005. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent infection of geranium. Phytopath. 95:136-143.
- Torres, C. M. 2004. Investigación en la transformación secundaria de fruto, tubérculos, flores y hoja o tallo de especies pertenecientes al ecosistema andino. Informe técnico Jardín botánico. Subdirección de ciencias botánicas. Bogotá D. C. pp. 2-14.
- Van, H. J. 2001. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. Glycobiol.11:25-36.
- Van, O. L. S., M. Cassidy., J. Kozdroj., J. T. Trevors and E. D. J. Van. 2002. polyphasic approach for studying the interaction between *Ralstonia solanacearum* and potential control agents in the tomato phytosphere. J. of Microbiol. Meth. 48:69-86.
- Velásquez, M. J. L. 1983. Evaluación del poder bactericida o bacteriostático de la fracción etanólica de la resina de Gobernadora contra las bacterias fitopatógenas *Erwinia amylovora*, *E.atroséptica* y *Pseudomonas solanacearum*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. p.57.
- Yabuuchi, E., Y. Kosako., I. Yano., H. Hotta and Y. Nishiuchi. 1995. Transfer of two Burkholderia and an Alcaligenes species to *Ralstonia* gen. nov: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Douderoff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. & *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. Microbiol. and Immunol. 39:897-904.
- Yesil, C. O., K. E. E. Hames., E. Bedir., S. F. Vardar., T. Ozek and K. H. C. Baser. 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and Essentials oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chem. 100:553-559.
- Yu, Q., A. M. Álvarez., P. H Moore., F. Zee., M. S. Kim and A. de Silva. 2003. Molecular diversity of *Ralstonia solanacearum* isolate from ginger in Hawaii. Phytopath. 93:1124-1130.
- Walton, N. J. and D. E. Brown. 1999. Chemical from plants. perspectives on plants secondary products. Imperial College Press.

- Ward, E., S. J. Foster, B. A. Fraaije and H. A. McCartney. 2004. Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches *Ann. appl. Biol.* 145:1-16.
- Watanebe, J. 2006. Informe final de apoyo al laboratorio de biotecnología de la FAUSAC. Guatemala, Facultad de Agronomía. p. 50.
- Wicker, E., L. Grassart., D. Mian., R. Coranson., D. Dufeal and C. Guilbaud. 2002. *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita moschata*, and *Anthurium* spp., new hosts of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies). *Bact.Wilt Newsl.* 17:20-21.
- Woese, C., O. Kandler and M. Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 87:457-459.

CAPÍTULO 3

ARTÍCULO

DETECCIÓN DE LA PUDRICIÓN PARDA (*Ralstonia solanacearum*) DE LA PAPA (*Solanum tuberosum* L) EN EL ESTADO DE SONORA, MÉXICO

DETECTION OF BROWN ROT (*Ralstonia solanacearum*) OF POTATOE CROP (*Solanum tuberosum* L.) OF THE STATE OF SONORA, MÉXICO

A G Alvarado-Martínez, E O Rueda-Puente*, J F Ponce-Medina, L Avendaño-Reyes, J Santillano-Cazares, B Murillo-Amador, J Borboa-Flores y A M García-López.

(AGAM) Estudiante de doctorado. Instituto de Ciencias Agrícolas-Universidad Autónoma de Baja California. Ejido Nuevo León, Mexicali Baja California, México., CP 21705. anagabrielaalvarado@yahoo.com.mx.

(EORP) (JBF) Universidad de Sonora, Campus Santa Ana, Carretera Internacional y 16 de Septiembre s/n, Santa Ana, Sonora, México C P 84600. erueda04@santana.uson.mx, jborboa@guayacan.uson.mx.

(JFPM) (LAR) (JSC) (AMGL) Departamento de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Baja California. Ejido Nuevo León, Mexicali Baja California, México. C P 21705. jfponce8@hotmail.com, lar62@hotmail.com, santillano64@hotmail.com, amgarcial@hotmail.com.

(BMA) Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo Santa Rita, La Paz, Baja California Sur C P 23090. Grupo de Microbiología ambiental. bmurillo04@cibnor.mx.

*Corresponding: Edgar Omar Rueda-Puente. Department of Agro Administration. Universidad de Sonora-Campus Santa Ana, Carretera Internacional y Avenida 16 de septiembre s/n, Col. La Loma, Santa Ana, Sonora, México. C. P. 84600. Tel-Fax. 01-641-324-1242: erueda04@santana.uson.mx.

RESUMEN

A nivel mundial el cultivo de la papa, constituye ser de los cuatro cultivos más importantes para la alimentación humana. En años recientes se ha detectado en algunas regiones de Estados Unidos y Canadá, la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Rs) la cual provoca la enfermedad denominada Marchitez bacteriana (Mb) o pudrición parda. Esta bacteria tiene la particularidad de diseminarse por semilla. Dada la cercanía con esos países, y siendo México un país importador de semilla, las probabilidades de una eventual introducción de esta enfermedad son

significativas, especialmente en áreas con amplias extensiones de papa. El estado de Sonora es una de las regiones más importantes en relación a la producción de papa. Por lo anterior, se realizó la presente investigación, teniendo como objetivo detectar la presencia de *Ralstonia solanacearum* en semilla y material vegetativo de *Solanum tuberosum* L. La investigación consistió en el incremento de *Ralstonia solanacearum*, pruebas de patogenicidad en semilla, plántula y fruto con fines de familiarización de los signos de Rs; además incluyó la obtención de semilla, muestreo de plantas en estado de plántula, floración y madurez fisiológica de papa en las zonas agrícolas del estado de Sonora, y su correspondiente análisis fitopatológico mediante Técnica de Randhawa y ELISA. Asimismo se llevaron a cabo, pruebas de patogenicidad en aquellas muestras que resultaron positivas a la presencia de Rs. Los resultados indican la presencia de Rs en semilla nacional.

Palabras clave: Diagnóstico fitopatológico, marchitez bacterial de la papa.

ABSTRACT

In the World, the potato is the four most important crops for human consumption. In recent years it has been detected in some USA Regions and Canada, the bacterium *Ralstonia solanacearum* (Rs), which causes the disease called bacterial wilt (Mb) or brown rot. This bacterium has the distinction of spread by seed. Given the proximity of these countries, and Mexico being an importer of seed, the odds of an eventual introduction of this disease are significant, especially in areas with large tracts of potato. The state of Sonora is one of the most important regions in relation to potato production. Therefore, this research was conducted, aiming to detect the presence of *Ralstonia solanacearum* in seed and planting of *Solanum tuberosum* L. The research consisted of increasing *Ralstonia solanacearum* pathogenicity tests on seed, seedling and fruit familiarization purposes of the signs of Rs, plus included obtaining seed, plant sampling at seedling stage, flowering and physiological maturity potato in agricultural areas of the state of Sonora, and their analysis phytopathological by Randhawa and ELISA technique. Also took place, pathogenicity tests on those samples that were positive for the presence of Rs. The results indicate the presence of Rs in national seed.

Key words: Phytopatologic diagnostic, Bacterial Wilt of potato.

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) ocupa el cuarto lugar a nivel mundial (Grageda *et al.*, 2001). La papa es una especie de multiplicación vegetativa. Su propagación está por lo tanto asegurada por el tubérculo, órgano de reserva rico en agua y en sustancias nutritivas. Desde el punto de vista anatómico, el tubérculo es un tallo modificado con entrenudos cortos (Rouselle y Crosnier, 1999).

Existen tres métodos posibles para multiplicar la papa en campo por siembra de semilla, por esquejes de tallos y por plantación de tubérculos, aunque solamente se utiliza el último en la práctica corriente de producción de papa de siembra (Moctezuma, 2006). El cultivo de la papa se desarrolla bien en un rango amplio de tipos de suelo; sin embargo, los más adecuados son los de textura ligera o franca, ya que facilitan el crecimiento de los tubérculos (Grageda *et al.*, 2001). En los últimos 10 años, los principales estados productores han sido: Sinaloa, estado de México, Nuevo León, Chihuahua, Sonora y Guanajuato (SIAP, 2012). En el estado de Sonora, se prefieren tubérculos de color crema o blancos por lo cual se recomienda utilizar la variedad white rose, gigant, Alpha y atlantic (Macias *et al.*, 2006).

La papa es susceptible a enfermedades causadas por bacterias, hongos, nematodos, virus. Una enfermedad es la Marchitez Bacteriana o pudrición parda de la papa, que es causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum*, constituyéndose la segunda enfermedad que limita la producción de papa; además afecta a un gran número de familias de plantas, entre las cuales se encuentran la papa (*Solanum tuberosum*), el tomate (*Lycopersicon esculentum*), el pimiento (*Capsicum annuum*), el plátano (*Musa sp.*), como los cultivos más afectados (Priou *et al.*, 2006). Es una de las enfermedades más graves de la papa, pues reduce siempre la productividad hasta en un 89% en un lapso de 4 a 12 días bajo condiciones favorables de altas temperaturas (30 °C) y humedad relativa (70 %). Los síntomas iniciales de Rs, es la observación de un amarillamiento leve en un solo lado de la hoja o en una rama y no en la siguiente. Los síntomas avanzados son la marchitez severa y la sequedad, que preceden a la muerte de la planta; los haces vasculares se oscurecen y, si se hace un corte transversal al tallo, se nota la exudación de un mucílago gris-castaño, excepto en los casos leves. Esto se puede verificar mediante la observación de un fluido filamentososo de color blanco lechoso que emana de los haces vasculares al

cortar y sumergir un pedazo del tallo en agua limpia. La infección latente del tubérculo ocurre cuando se siembran semillas infectadas en lugares fríos, o cuando los tubérculos son infectados al final de la temporada. La marchitez bacteriana evoluciona rápidamente a temperatura altas (Priou *et al.*, 2006).

En la República Mexicana, específicamente en el noroeste de México la superficie dirigida al cultivo de hortalizas principalmente (tomate, Papa, chile y sandía), ha aumentado considerablemente en los últimos años (SIAP, 2012). Debido a que México no produce su propia semilla obliga a que los productores a adquirir semilla de origen extranjero, principalmente de Estados Unidos, ya que las variedades y/o híbridos adquiridos, producen frutos que rinden las características preferidas por el consumidor, originando además, que la semilla que ingresa al país sea una puerta de entrada para microorganismos. La sintomatología de esos problemas indica que es semejante a la de *Ralstonia solanacearum*. Asimismo, actualmente se está generando controversia entre los productores, en los campos agrícolas del estado de Sonora, México.

El objetivo de la investigación, fue conocer la situación actual de *Ralstonia solanacearum* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.), en material vegetativo de importación, en aquella de consumo humano y que se utiliza como semilla; durante las diferentes etapas fenológicas del cultivo en la zona agrícola del estado de Sonora.

MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación se realizó en dos etapas:

La primera consistió en el incremento de *Ralstonia solanacearum* (Rs) con medios de cultivo específicos, pruebas de patogenicidad en semilla, plántula y fruto con fines de familiarización en los signos de Rs y su identificación mediante técnica ELISA.

La segunda etapa incluyó la obtención de tubérculo-semilla de importación, papa de consumo que es utilizada como semilla por productores, un muestreo de plántulas, hojas desarrolladas y frutos (tubérculo semilla) de papa en las zonas agrícolas del estado de Sonora, y su correspondiente análisis fitopatológico para la detección mediante uso de medios de cultivo específicos y ELISA. Asimismo se llevaron a cabo, pruebas de patogenicidad en aquellas muestras (órganos vegetativos muestreados) que resultaron positivos a la presencia de Rs. La detección se llevo cabo en el Campus Santa Ana de la Universidad de Sonora.

Primera etapa.

Incremento de *Ralstonia solanacearum* (Rs). Se inició con el incremento de Rs y fue desarrollada según el protocolo establecido por Randhawa (1996), utilizándose medios de cultivos específicos. De acuerdo con la técnica descrita por Kiraly (1974), se obtuvieron 10 tubos de ensaye en solución salina al 0.85% de NaCl con una concentración de 10^8 unidades formadoras de colonias UFC./ml., verificada con ayuda de un hematocímetro (Kiraly, 1974). Las suspensiones bacterianas en tubos fueron almacenadas en refrigeración a 4°C para estabilizar la bacteria y evitar un shock en la inmunización.

Pruebas de patogenicidad. Las pruebas de patogenicidad (PP) se desarrollaron con la finalidad de familiarizarse con la sintomatología de Rs las cuales fueron realizadas en tubérculo-semilla y plántula de papa. En el caso de tubérculo-semilla, 20 semillas fueron partidas a la mitad y fueron inoculadas en el haz por 200 ml con una suspensión bacteriana de 10^8 UFC/ml; se ubicaron en cámaras húmedas en condiciones favorables de la enfermedad; asimismo, otras 20 semillas, se consideraron como control negativo al pasar por el mismo proceso, pero haciendo uso de agua destilada estéril en la incisión. Respecto a las PP en plántulas, 40 semillas previamente desinfectadas, fueron germinadas en placas de germinación con sustrato estéril; las condiciones en que se produjeron las plántulas fue a 25° C haciendo uso de agua corriente de llave estéril para el riego; al cabo de 30 días después de la emergencia, 20 plántulas fueron inoculadas con la solución bacteriana de Rs a una concentración de 10^8 UFC./ml con la ayuda de un cotonete de algodón sobre los cotiledones de las plántulas; las restantes 20 plántulas fueron consideradas como control negativo al pasar por el mismo proceso con cotonete más agua destilada estéril. Las semillas, plántulas utilizados para en las PP, posterior a la inoculación, fueron cubiertas con bolsas de polietileno y ubicadas en una cámara de incubación con una humedad relativa entre 80-90% y una temperatura de 35-41°C en un período de cuatro a siete días; condiciones que acorde a Randhawa (1996) son las apropiadas para inducir los signos de la enfermedad.

Identificación de Rs en material vegetativo de las PP. Para el proceso de identificación de Rs se desarrollo la técnica serológica ELISA, siguiendo el protocolo general de identificación de bacterias AGDIA. El kit de Rs fue donado por el proyecto al que pertenece esta investigación. La técnica consistió en hacer uso de pipetas

estériles y depositando a cada pozo de la placa, 100 μ l de anticuerpo del kit con una solución amortiguadora de cubierta a 1X. La placa fue incubada en una cámara húmeda durante la noche en el refrigerador a 4 °C. Posteriormente se lavó la placa vaciando el contenido de los pozos en un recipiente para residuos. Se llenaron los pozos hasta desbordar de una solución amortiguadora a 1X denominada PBST, después se vació la placa rápidamente una y otra vez. Se repitió la acción de 4 a 8 veces. Las placas se colocaron boca abajo y se golpearon ligera y firmemente en una toalla de papel doblada para secar los pozos. Posteriormente, segmentos de 5 cm² de material vegetativo (considerando parte sana y enferma) de las pruebas de patogenicidad, se maceraron con la ayuda de un mortero y un mazo hasta obtener suficiente extracto, utilizando bolsas de polietileno para macerar tejido en el interior de ellas. Se obtuvo el líquido total de cada muestra macerada; se diluyó el extracto en tubos Eppendorf con un almacenador intermediario de extracción de la muestra en un cociente de 1:10 (volumen de extracto: volumen de almacenador intermediario). De cada muestra, se extrajo 100 μ l de la muestra y se depositó en cada pozo de la placa. En esta fase y acorde al diagrama realizado, se depositaron en tres celdas 100 μ l del control positivo de *Rs* y del control negativo –solución amortiguadora de extracción (SAE)–. Tres celdas con SAE serán consideradas como controles o testigos negativos (Control 1 =C1=, Control 2 =C2= y Control 3 =C3=). Se incubó la placa dentro de una cámara húmeda durante la noche en el refrigerador a 4 °C. Se lavó la placa realizando movimientos de un tirón rápido para descargar el contenido de los pozos en un recipiente para residuos, sin mezclar el contenido. Se llenaron todos los pozos de una solución amortiguadora de lavado, y se vació al instante. Utilizando nuevas pipetas estériles para cada muestra y prevenir la contaminación, se depositarán 100 μ l en los pozos de la enzima conjugada y se mezcló el contenido de cada celda. Se incubó la placa en una cámara húmeda por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la placa al revés y se golpearon ligera y firmemente en una toalla de papel doblada, los pozos fueron secados. Esta acción se repite de 4 a 8 veces. En condiciones de oscuridad se añadió a cada pozo 100 μ l de solución reveladora denominada PNP. Se incubó la placa por 30 a 60 minutos en una cámara húmeda y para la reacción agregando 50 μ l a 3M de hidróxido de sodio en cada pozo. Los resultados fueron interpretados hasta 60 minutos después de la incubación y mientras los pozos con control negativos permanecieran claros. Las placas fueron evaluadas en un lector ELISA a 405 nm.

Segunda etapa.

Obtención de semilla de importación, tubérculo de consumo que utilizada como semilla, muestreo de plántulas, hoja desarrollada y fruto (tubérculo-semilla) de papa en Sonora, y su análisis fitopatológico para la detección de *Rs*

Para la obtención de los diversos órganos vegetativos, se obtuvo la colaboración de la Confederación Nacional de Productores Hortícolas (CNPH); para el caso de obtención de semilla cada uno de los productores, facilitaron una cantidad de 20-50 semillas para el análisis. En el muestreo en plántulas, se obtuvo aquellas que no presenten la primera hoja verdadera durante los primeros quince días después de su emergencia. Para el caso de hojas desarrolladas, se consideraron aquellas entre las cinco y quince hojas a partir del tronco de la base del tallo de la planta en fase de floración. Para la obtención de fruto, se consideraron los más próximos a corte y de posterior venta. Cabe indicar que aquellas plántulas, hojas o frutos de plantas que muestren una sintomatología similar a la de *Rs* también fueron colectados. El muestreo de lotes se reprodujo al considerar en el muestreo nacional de papa por la SARH (1994). El muestreo se realizó en el 10% del total de la superficie cultivable de los municipios de (Agua Prieta, Caborca, Cajeme, Hermosillo, Moctezuma, Navojoa, Sahuaripa, Santa Ana y Ures) productores de papa del estado de Sonora (Figura 19). Ubicados en las coordenadas geográficas: Agua Prieta 31°17' de latitud norte y a los 109°33' de longitud al oeste; Caborca 30°42' de latitud norte y 112°09' longitud al oeste; Cajeme 27° 29' de latitud norte y a los 109° 56' de longitud al oeste; Hermosillo 29° 05' de latitud norte y 110° 57' de longitud al oeste; Moctezuma 29° 47' de latitud norte y a los 109° 40' de longitud al oeste; Navojoa 27° 03' de latitud norte y a los 109° 25' de longitud al oeste; Sahuaripa 29° 03' de latitud norte y a los 109° 14' de longitud al oeste; Santa Ana 30°33'de latitud norte y a los 111°07' de longitud al oeste; Ures 29° 25' de latitud norte y a los 110° 23' de longitud al oeste (Enciclopedia de México, 2005).

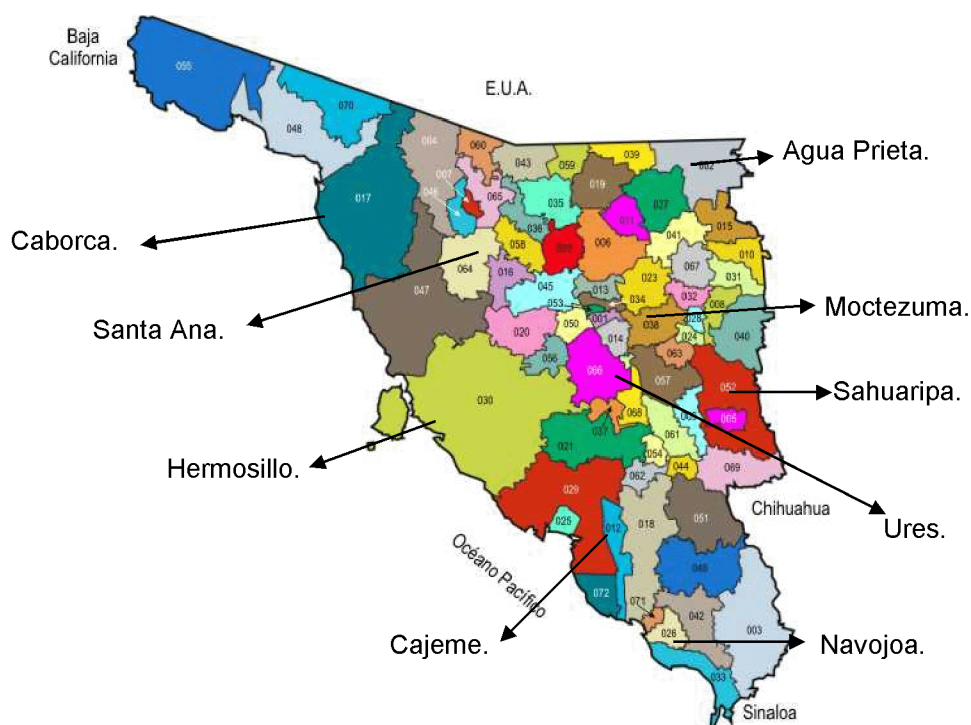


Figura 19. Muestreo de papa (*Solanum tuberosum* L) en los municipios del estado de Sonora.

En el 10% de la superficie de cada municipio. Se realizó lo siguiente: cada lote de 5 hectáreas fue considerado una superficie de muestreo. Cada hectárea de esa superficie fue un punto de muestreo. En cada punto se trazó una línea diagonal imaginaria de esquina a esquina, y en esa recta trazada se colectaron 10 muestras. Se obtuvieron donaciones de productores. Cada una de las muestras colectadas, previamente identificada, se envolvió con papel húmedo y se colocaron en una hielera para ser trasladada al laboratorio para su análisis.

Detección de *Rs* en semilla de importación y tubérculo de consumo que es utilizado como semilla mediante técnica Randhawa (1996). De acuerdo con Randhawa (1996), cada muestra de semilla; consistente en 10 semillas provenientes de cada uno de los lotes de los productores cooperantes, se pesaron por separado, se lavó en agua corriente durante 30 min y se colocaron en charolas de plástico con capacidad de 2 L. Cada charola, con su respectiva muestra de semilla se deja con una cantidad de 100 ml. de agua destilada, y a cada una de estas charolas se le añadió 2 ml. de solución amortiguadora fosfatasa con un pH = 7. A la mezcla de agua con fosfatasa conteniendo cada muestra de semillas se le llama “suspensión madre”. Las charolas se incubaron durante 12 horas en refrigeración a 4°C con la finalidad de que se liberara la bacteria a la suspensión madre. Después de la

incubación, se tomó 10 ml. de suspensión madre de cada una de las charolas, se le realizaron cuatro diluciones a tal suspensión (10:1, 10:2, 10:3, 10:4), y de la última dilución se tomó 0.1 ml. que se sembró en medio de cultivo específico en cajas de petri por el método de dispersión por varilla (Roger *et al.*, 1981). Los medios se incubaron durante siete días a 34° C. Posteriormente se incubaron los medios inoculados a una temperatura de 35° C durante 7 días.

Detección de *Rs* en semilla, tubérculo de consumo que es utilizado como semilla, plántula, hoja desarrollada y fruto por la técnica ELISA. Para la detección de *Rs*, con respecto a la técnica serológica ELISA, se considero el protocolo descrito en la detección del microorganismo en las PP.

Detección de *Rs* en semilla, plántula, hoja desarrollada y fruto por la técnica PCR. Se obtuvieron primers comerciales de la región intergénica 16Sr y se corrieron pruebas de detección para reafirmar la nula o positiva presencia.

Pruebas de patogenicidad a bacterias positivas con los diferentes métodos de detección. Para la reafirmación de las bacterias *Rs* que resultaron ser positivas en los anteriores métodos de detección, fueron llevando a cabo pruebas de patogenicidad acorde a Randhawa, (1996). Las PP fueron aplicadas en plántulas de 25-30 días después de la emergencia, como se describió anteriormente en las PP de la primera etapa. Se reaisló la bacteria de tejidos enfermos mediante la técnica de Randhawa y confirmándose el patógeno por ELISA.

Diseño experimental.

El diagnóstico de enfermedades como ciencia práctica, incluye varias técnicas para identificación del agente causal de determinada enfermedad (Dhingra *et al.*, 1985).

Históricamente, las técnicas de diagnóstico han sido acotadas en base a síntomas, medios selectivos, caracterización morfológica y biológica, pruebas bioquímicas (ELISA), microscopia y plantas diferenciales entre otras (Lievens *et al.*, 2003).

Actualmente con los avances en investigación se han establecido métodos nuevos de biología molecular para establecer la identidad de un patógeno. Técnicas tales como PCR, hibridación molecular y marcadores moleculares han sido de gran ayuda en los métodos de diagnóstico, aunque cabe mencionar que siempre es recomendable establecer al menos dos métodos independientes en la realización de un buen diagnostico (Ronai y Yakubovskaya, 2005).

Normalmente, en los estudios relacionados con el diagnóstico en fitosanitario, no se usa un diseño experimental determinado (Jain *et al.*, 1998; Mesquita *et al.*, 1998; Kamel *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2004; Schena *et al.*, 2006; Emilie *et al.*, 2006), dado que el principal interés de este tipo de estudios está en la aportación científica que tengan que ver con la ampliación del conocimiento-aportación, validación, y complementación de las técnicas (Holguín-Peña, 2008). El diseño experimental *per se*, siempre será un complemento importante siempre y cuando sea de particular interés la comparación de tratamientos (Lelliott *et al.*, 2004; Dardon *et al.*, 2006; Rodríguez, 2008; Holguín-Peña, 2008). En este caso lo que es recomendable cuando se implementan experimentos en campo, son métodos de muestreo adecuados según sea el caso (Lelliott *et al.*, 2004). Por lo anterior y debido a que el presente estudio de investigación es de caracterización-diagnóstico y no de cohorte, no se utilizó un diseño experimental.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primera etapa.

Al realizar las pruebas de patogenicidad para la familiarización de síntomas *Ralstonia solanacearum* (Rs) en semilla-tubérculo y plántulas de papa, los resultados indican que de las semillas embebidas en la suspensión bacteriana de 10^8 UFC/mL., entre los 7 y 15 días bajo condiciones favorables de la enfermedad, el haz vascular de la semilla se oscureció y, al hacer un corte transversal un mucílago bacteriano grisáceo fue exudado por los ojos y por el extremo del estolón en los tubérculos. Existieron rebrotes de color blanco-grisáceo exudados del anillo vascular oscurecido de los tubérculos cortados. Por su parte en las plántulas inoculadas al hacer un corte transversal a nivel de tallo, se notó la exudación de un mucílago gris-castaño. Esto se pudo verificar al hacer un corte transversal en la base del tallo de la plántula y observándose un fluido filamentoso de color blanco lechoso que emanó de los haces vasculares y sumergir un pedazo del tallo en agua limpia y estéril. De igual forma, las primeras hojas verdaderas para el caso de plántula, se observaron manchas irregulares de aspecto blanquesino con relación al área sana, y finalmente se presentó la muerte de la plántula. Para esto, primeramente se presentaron manchas irregulares en un principio claras y posteriormente oscuras, y al cabo de siete a catorce días la muerte. Un resultado opuesto fue para aquellas PP que se dirigieron como control negativo mediante el uso de agua destilada estéril, en semilla-tubérculo y plántula, observándose que los órganos utilizados se mostraron

sanos, excepto en semilla donde el área pinchada, mostraba una oxidación de color café claro (2 mm) que al presionarlo, mostraba la misma consistencia sólida que el área sana.

Respecto a la siembra de “suspensiones bacterianas” obtenidas de las pruebas de patogenicidad sobre medios de cultivos SMSA y TZC, los resultados indican que sobre el medio TZC, las colonias desarrolladas mostraron un color blanco rosado, mientras que sobre el medio SMSA, las colonias de bacterias desarrolladas mostraron una forma irregular, de color blanco y con centros de color rosado al cabo de 72 hrs de incubación a 30 °C. Un similar resultado fue obtenido para aquellas PP que fueron inoculadas con el control positivo (Rs), mientras que para aquellas muestras generadas de las PP que sirvieron como control negativo (agua destilada estéril), el resultado sobre ambos medios utilizados fueron colonias secas no mucoides.

Mediante la confirmación por la técnica ELISA, se obtuvo un resultado positivo para la cepa control (Rs), así como también para las suspensiones bacterianas aisladas de las pruebas de patogenicidad antes mencionadas y de aquellas crecidas sobre los medios de cultivo SMSA y TZC. Lo contrario ocurrió con el testigo control utilizado como control negativo.

Segunda etapa.

El muestreo de papa se realizó en los municipios de Agua Prieta, Caborca, Cajeme, Hermosillo, Moctezuma, Navojoa, Sahuaripa, Santa Ana, Ures. Conforme al método de muestreo (SARH 1994) y detección de Rs, en el (Cuadro 5). Se indica la superficie que se dirige a la producción de papa en el estado de Sonora. Se puede identificar la superficie muestreada (889.8), sobresaliendo el municipio de Navojoa y Cajeme con 394 y 240.6 ha, respectivamente.

Cuadro 5. Superficie sembrada del cultivo de papa en los diferentes municipios del estado de Sonora; superficie muestreada en la detección de *Ralstonia solanacearum*.

Distrito	Superficie sembrada (ha)				
	Total	Riego	Temporal	Superficie muestreada de tipo riego 10%	Superficie muestreada tipo temporal
Navojoa	3940	3940	0	394	0
Cajeme	2406	2406	0	240.6	0
Hermosillo	371	371	0	37.1	0
Ures	115	115	0	11.5	0
Caborca	2000	2000	0	200	0
AguaPrieta	35	35	0	3.5	0
Sahuaripa	5	0	5	0	0.5
Santa Ana	30	30	0	3	0
Moctezuma	1	1	0	0.1	0
Total	8903	8898	5	889.8	0.5

(SAGARPA, 2009).

Los resultados del diagnóstico fitopatológico muestran positiva la presencia de Rs para los municipios de Navojoa, Hermosillo, Aguaprieta en tubérculo de consumo que puede ser utilizado como semilla (Cuadro 6). Al desarrollar las pruebas sobre los medios SMSA, TZC y PPO, los resultados fueron positivos ya que las colonias visibles sobre medio SMSA fueron después de 36 a 48 horas de crecimiento en 30 °C y, blancas con centros rosados a coloreadas de nata e irregularmente redondas; sobre el medio TZC, las colonias aparecieron blancas con centros rosados. Cabe indicar que de aquellas colonias bacterianas crecidas sobre medio SMSA y TZC obtenidas de muestras de papa para consumo, indicaron que las células bacterianas resultaron Gram negativa, forma de barra, estrictamente aeróbica, medida de 0.5-0.7 x 1.5-2.0 μm ; Estas colonias al hacer analizadas por las técnicas ELISA y PCR resultaron ser positivas.

En semilla de importación, los resultados arrojados fueron negativos. En las pruebas de SMSA, PPO y ELISA, No obstante ello, es importante notar que en aquella procedente del extranjero, existió variabilidad de respuesta para los municipios de Agua Prieta, Sahuaripa, Moctezuma, Hermosillo y Ures al resultar positivas con el medio específico TZC, pero negativas a la prueba PPO y ELISA.

Cuadro 6. Detección de *Ralstonia solanacearum* en semilla de papa procedente de Canadá y Estados Unidos de América (EUA) y aquella que es de consumo humano.

Técnicas de Diagnóstico				
	Prueba SMSA	Prueba TZC	Prueba PPO	Técnica Serológica
Papa procedente de Canadá y EUA				
Navojoa	-	-	-	-
Cajeme	-	-	-	-
Hermosillo	-	+	-	-
Ures	-	+	-	-
Caborca	-	-	-	-
Agua Prieta	-	+	-	-
Sahuaripa	-	+	-	-
Santa Ana	-	-	-	-
Moctezuma	-	+	-	-
Papa muestreada en casas comerciales que es dirigida a consumo humano y que puede ser dirigida como semilla				
Navojoa	+	+	+	+
Cajeme	-	-	-	-
Hermosillo	+	+	+	+
Ures	-	-	-	-
Caborca	-	-	-	-
Agua Prieta	+	+	+	+
Sahuaripa	-	-	-	-
Santa Ana	-	-	-	-
Moctezuma	-	-	-	-
Control positivo Rs	+	+	+	+
Control negativo (agua destilada estéril)	-	-	-	-

+ :Prueba positiva; -:prueba negativa; Medios de cultivos específicos: SMSA y TZC.

Rs: *Ralstonia solanacearum*; PPO: prueba de oxidasa.

Respecto a los análisis realizados en plántula, hoja desarrollada obtenida en etapa de floración y tubérculo-fruto muestreado en madurez fisiológica, los resultados indican que para aquellas muestras obtenidas de los municipios de Agua Prieta, Navojoa y Hermosillo y Caborca, resultaron negativas al hacer uso de medios específicos (SMSA y TZC) y las pruebas serológicas, excepto en la prueba PPO que resultó positivas para hoja y fruto (Cuadro 7).

Cuadro 7. Detección de *Ralstonia solanacearum* en plántula, hoja y fruto (tubérculo) muestreado en áreas agrícolas que se dirigen al cultivo de papa en Sonora, México.

Municipios muestreados	Técnicas de Diagnóstico			
	Prueba SMSA	Prueba TZC	Prueba PPO	Técnica Serológica
Navojoa				
Plántula	-	-	-	-
Hoja	-	-	+	-
Fruto	-	-	+	-
Cajeme				
Plántula	-	+	+	-
Hoja	-	+	+	-
Fruto	-	+	+	-
Hermosillo				
Plántula	-	-	-	-
Hoja	-	-	+	-
Fruto	-	-	+	-
Ures				
Plántula	-	+	+	-
Hoja	-	+	+	-
Fruto	-	+	+	-
Caborca				
Plántula	-	-	-	-
Hoja	-	-	+	-
Fruto	-	-	+	-
Agua Prieta				
Plántula	-	-	-	-
Hoja	-	-	+	-
Fruto	-	-	+	-
Sahuaripa				
Plántula	-	+	+	-
Hoja	-	+	+	-
Fruto	-	+	+	-
Santa Ana				
Plántula	-	-	-	-
Hoja	-	-	-	-
Fruto	-	-	-	-
Moctezuma				
Plántula	-	-	-	-
Hoja	-	-	-	-
Fruto	-	-	-	-
Control positivo Rs	+	+	+	+
Control negativo	-	-	-	-

+ Prueba positiva; - prueba negativa; Medios de cultivos específicos: SMSA y TZC.

PPO: prueba de oxidasa. Control negativo con agua destilada estéril.

Por otra parte al analizar las muestras vegetativas procedentes de Sahuaripa, Cajeme y Ures, los análisis arrojaron resultados negativos en medio específico SMSA y pruebas serológicas, lo contrario ocurrió en medio de cultivo TZC y prueba PPO. Se desarrolló una prueba adicional a las colonias aisladas de los diferentes puntos de muestreo, resultando ser Gram negativa, forma de barra, estrictamente aeróbica, medida de 0.3-0.5 x 1.0-1.5 μm . Para el municipio de Moctezuma, los resultados indican negativa la presencia de Rs. Un resultado favorable fue obtenido para el control positivo en las pruebas SMSA, TZC, PPO y ELISA.

Respecto a las PP de las muestras positivas de tubérculo de consumo, las semillas embebidas en la suspensión bacteriana de 10^8 UFC/mL, entre los cinco y 15 días bajo condiciones favorables de la enfermedad, presentaron una acuosidad en el haz vascular de la semilla. Asimismo se detectó que en tubérculos inoculados con Rs, aparecieron unos exudados blanquecinos de consistencia pastosa. Al evolucionar la infección se produjo un oscurecimiento de todo el anillo vascular, los tejidos adyacentes comenzaron a descomponerse, presentando una coloración amarillenta, crema o marrón, finalmente terminó pudriéndose. Al corroborar estos síntomas por la técnica ELISA; el resultado fue positivo para Rs. Para el caso de plántulas, las pruebas de patogenicidad mostraron en las primeras hojas verdaderas, manchas irregulares de aspecto blanquecino con relación al área sana, y finalmente se presentó la muerte de la plántula; para esto, primeramente se presentaron manchas irregulares, en un principio claras y posteriormente oscuras, amarillamiento leve que presenta la enfermedad de la marchitez bacteriana de la planta, la cual es observada primero en un solo lado de la hoja o en una rama, y al cabo de siete a catorce días, ocurrió la muerte; un resultado positivo para Rs fue obtenido por ELISA, al analizar los órganos de las PP en etapa de plántula. Lo contrario ocurrió para aquellos órganos de la PP inoculadas con agua destilada estéril.

CONCLUSIONES

Primera y segunda etapa.

La presencia de la bacteria Rs resultó ser negativa en semilla procedente del extranjero. No obstante ello, se detectó la presencia del agente causal de la marchitez bacteriana en papa de consumo nacional que algunos productores podrían utilizar como semilla. La presencia de *Ralstonia solanacearum*, se comprobó mediante el uso de medios de cultivo específicos denominado SMSA y

TZC en condiciones controladas, prueba PPO, pruebas de patogenicidad. Se concluye que las pruebas de detección por separado no deben ser utilizadas como un método único de detección. *Ralstonia solanacearum* resultó ser positivo en tubérculo de consumo, en las diferentes etapas vegetativas (plántula, hoja desarrollada y fruto-tubérculo) en que se tomaron muestras para detección de la enfermedad bacteriana, éstas resultaron ser negativas en todos los casos, siendo ello corroborado bajo las mismas técnicas de detección implementadas. Sin embargo, al ser positiva la presencia de Rs en tubérculo de consumo, representa un riesgo de una eventual manifestación de la enfermedad, es necesario que las áreas productoras realicen actividades para evitar que la enfermedad se desarrolle, tales como verificación de semilla certificada, limpieza y desinfección de maquinarias, entre otras, y más aún, realizar pruebas en papas provenientes de importación, para evitar la entrada de semilla conteniendo la bacteria.

LITERATURA CITADA

- Dardón, D. E. A., G. Álvarez., T. R. Guerra., B. García., N. J. García., A. M. Solares y M. M. Ayau. 2006. Diagnóstico de enfermedades para documentar pictóricamente las principales enfermedades que afectan a los cultivos de Guatemala. Rev. Venezolana de Fitopatología 2:13-16.
- Dhingra, O. D., Sinclair and B. James. 1985. Basic plant pathology methods. Ed. CRC. p. 355.
- Emilie, F. F., A. Bart and P. H. J. Thomma. 2006. Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. Molec. Plant Pathol. 2:71-86.
- Enciclopedia de México. 2005. Instituto nacional para el federalismo y el desarrollo municipal, gobierno del estado de Sonora. Disponible en <http://www.elocal.gob.mx/work/templates/enciclo/sonora/municipios/26052a.htm>. Consultada el 17/9/2012.
- Grageda, G. J., M. T. Cervantes., M. P. F. Ortega., P. R. Sabori., C. M. Chávez., C. A. A. Fu y N. L. A. Maldonado. 2001. Manual para la producción de cultivos agrícolas y forrajeros de la sierra de Sonora. Hermosillo. pp. 90-100.
- Holguín-Peña, J. H. 2008. El diagnóstico fitosanitario. Tercero Especialista Fitosanitario del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria-Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SENASICA-SAGARPA). En proceso de edición. Editorial Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste-Agriconsulting Europe. S. A. p.119.

- Jain, R. K., S. S. Pappu., H. R. Pappu., A. K. Culbreath and J. W. Todd. 1998. Molecular diagnosis of tomato spotted wilt tospovirus infection of peanut and other field and greenhouse crops. *Plant Dis.* 82:900-904.
- Kamel, A., A. Elsalam., N. A. Ibrahim., A. Mohamed., A. Satar., S. K. Mohamed and J. A. Verreet. 2003. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *African J. of Biotechnol.* 2:82-85.
- Kiraly, G. Z. 1974. *Methods in Plant Pathology.* Elsevier Scientific Publishing Company. New York, USA. p. 509.
- Lelliott, R. A. and D. E. Stead. 2004. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. *Methods in Plant Pathology.* Oxford, Reino Unido, Blackwell Scientific. 2:216.
- Lievens, B. A., B. M. A. Brouwer., C. R. C. Alfons., B. Vanachter., C. A. C. Levesque., B. P. A. Cammue., A. Bart and P. H. J. Thomma. 2003. Design and development of a DNA array for rapid detection and identification of multiple tomato vascular wilt pathogens *FEMS Microbiology Letters.* 223:113-122.
- Macias, V., M. Reyes y E. Robles. 2006. Guía para cultivar papa en Aguascalientes. Folleto técnico N° 13. INIFAP. Campo Experimental Pabellón. Aguascalientes. México. p.16.
- Mesquita, A. G. G., T. J. Paula., M. A. Moreira and E. G. de Barros. 1998. Identification of races of *Colletotrichum lindemuthianum* with the aid of PCR-based molecular markers. *Plant Dis.* 82:1084-1087.
- Moctezuma, G. R. 2006. Relevancia de la papa en México. *Rev. Productores de Hortalizas.* Ed. Meister. México. p.16.
- Priou, S., L. Gutarra and P. Aley. 2006. An improved enrichment broth for the sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* (biovars 1 and 2A) in soil using DAS-ELISA. *Plant Pathol.* 55:36-45.
- Randhawa, P. 1996. Fruit Blotch Testing Protocol. California Seed and Plant Lab. Roseville, California, USA. p. 5.
- Rodríguez, G. G. 2008. Diseño del estudio clínico: la práctica en la investigación clínica. Conferencia 7, Congreso Internacional de Investigación Clínica. Madrid España.
- Roger, Y., A. Stainer., M. Doudoroff y E. Adelberg. 1981. *Microbiología.* Ed. Prentice_Hall Inc. 2^{da} edición. Madrid, España. p.932.
- Ronai, Z. and M. Yakubovskaya. 2005. Clinical diagnosis. *J. of Clinic. Labor. Analy.* 20:269-283.

Rouselle, P. y R. J. Crosnier. 1999. La patata. Ed. Mundi-Prensa. España. pp 76 - 77.

SAGARPA Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2009. Avances de siembra y cosecha de riego + temporal. Situación al 30 de noviembre de 2009. <http://w2.siap.sagarpa.gob.mx:8080/Brio/inhtml/Request?Com>.

SARH (Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos) 1994. Manual de muestreo y procesamiento para la identificación de los principales patógenos de la papa. Dirección General de Sanidad Vegetal. México, D.F. p.16.

Schena, L., J. D. H. Kelvin and D. E. L. Cooke. 2006. Detection and quantification of *Phytophthora ramorum*, *P. kernoviae*, *P. citricola* And *P. quercina* in symptomatic leaves by multiplex real-time PCR. *Molec. Plant Pathol.* 5:365-3793.

Ward, E., S. J. Foster., B. A. Fraaije and H. A. McCartney. 2004. Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches *Ann. appl. Biol.* 145:1-16.

CAPÍTULO 4

ARTÍCULO

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE ACEITES ESENCIALES DE ORÉGANO Y TOMILLO CONTRA *Ralstonia solanacearum*

EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL *IN VITRO* ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS OF OREGANO AND THYME AGAINST *Ralstonia solanacearum*

Ana Gabriela Alvarado-Martínez^{1*}, María Susana Yépiz- Gómez², Maricela Duarte -Medina¹, Jesús Borboa-Flores², Edgar Omar Rueda-Puente^{3*}, Juan Fco. Ponce-Medina¹, Manuel Cruz-Villegas¹.

¹Instituto de Ciencias Agrícolas Carretera a Delta s/n 21705 Ejido Nuevo León, Baja California, México. anagabrielaalvarado@yahoo.com.mx, duartem23@hotmail.com, jfponce8@hotmail.com; mcruz1410@hotmail.com

²Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos Universidad de Sonora. Blvd. Luís Encinas y Rosales s/n, Col. Centro CP 83000, Hermosillo, Sonora, México. msyepiz@gmail.com, jborboa@guayacan.uson.mx, ³Universidad de Sonora, Campus Santa Ana, Carretera Internacional y 16 de Septiembre s/n, Santa Ana, Sonora, México C P 84600 erueda04@santana.uson.mx; Email: anagabrielaalvarado@yahoo.com.mx. Celular (632) 327-69-72. *Corresponding autor: erueda818@gmail.com; erueda04@santana.uson.mx.

RESUMEN

Ralstonia solanacearum (Rs), es una bacteria fitopatógena de gran importancia a nivel mundial conocida como marchitez bacteriana. Es una enfermedad que devasta numerosos cultivos entre ellos se encuentra la papa. Con el propósito de encontrar una alternativa natural para controlar la bacteria Rs se evaluó el poder bactericida de los aceites esenciales de orégano (*Lippia graveolens*) y tomillo (*Thymus vulgaris*). La técnica utilizada para el análisis de la actividad antibacteriana fue la difusión en agar, utilizando discos de papel filtro estériles, se utilizaron diluyentes 1:1, 1:5 y 1:10 y se colocaron 7.5, 10, 15 μ l de cada una de las concentraciones de los aceites. Se utilizó alcohol al 70% en uno de los discos de papel filtro como control negativo. Además, se utilizó un disco de estreptomicina (10 μ g/disco) y otro de ampicilina (10 μ g/disco). Se utilizó medio de cultivo agar dextrosa y papa previamente inoculado con la cepa en estudio. Después de la incubación, se midieron los halos de inhibición del crecimiento bacteriano en milímetros. Los análisis fueron por triplicado. Los aceites esenciales de orégano y tomillo mostraron

efectos inhibitorios sobre el crecimiento de *Ralstonia solanacearum* en la dilución 1:1 que resultó ser más efectiva que el resto de las diluciones evaluadas, y la cantidad aplicada más efectiva fue de 15 μ l de aceite esencial de orégano y tomillo. Los aceites esenciales de orégano y tomillo mostraron mejor efecto inhibitorio que los antibióticos utilizados. Los aceites esenciales se consideran como una alternativa para el control de *Rs*.

Palabras clave: Marchitez bacteriana; inhibición; Biobactericida; Biocontrol.

ABSTRACT

Ralstonia solanacearum (*Rs*) is a phytopathogenic bacterium of great importance worldwide known as bacterial wilt. It is a disease that devastates many crops including potato. In order to find a natural alternative to control bacterium *Rs*, it was evaluated the bactericidal power of essential oils of oregano (*Lippia graveolens*) and thyme (*Thymus vulgaris*). The technique used for analysis of the antibacterial activity was spread on agar, using sterile filter paper discs were used diluents 1:1, 1:5 and 1:10 and placed 7.5, 10, 15 μ l of each of concentrations of the oils. Was used 70% alcohol in one of the filter paper discs as negative control. Furthermore, we used a disc streptomycin (10 μ g / disc) and another of ampicillin (10 μ g / disk). We used culture medium potato dextrose agar previously inoculated with the strain under study. After incubation, we measured the inhibition of bacterial growth in millimeters. Analyses were in triplicate. The essential oils of oregano and thyme showed inhibitory effects on the growth of *Ralstonia solanacearum* in 1:1 dilution that proved to be more effective with the rest of the dilutions tested, and the most effective amount applied was 15 μ l of essential oil of oregano and thyme. The essential oils of oregano and thyme showed better inhibitory effect of antibiotics used the essential oils are consider as an alternative for the control of *Rs*.

Keywords: bacterial wilt; inhibition; biobactericide; biocontrol.

INTRODUCCIÓN

Ralstonia solanacearum, es una bacteria fitopatógena de gran importancia a nivel mundial conocida como marchitez bacteriana (Jones *et al.*, 1991). El organismo causal de esta enfermedad previamente estaba denominada *Pseudomonas solanacearum*. La mancha bacteriana también es conocida como podredumbre parda. Esta bacteria vive en el suelo (Smith *et al.*, 1995). La bacteria se dispersa principalmente a través del suelo, sobreviviendo en este medio por largos periodos de tiempo. Además es posible su transmisión por medio del agua, equipo o por

materiales infectados. Se puede diseminar por medio del trasplante y la propagación de plantas infectadas, cuando se realizan cortes sin desinfectar el equipo que previamente ha tenido contacto con una planta infectada y una importante forma de diseminación se da por medio del riego (APHIS, 2004). *Ralstonia solanacearum*, es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia de las Pseudomonadáceas. Se trata de un bastoncillo móvil por medio de un flagelo (Seal *et al.*, 1992). Es una enfermedad que devasta numerosos cultivos de importancia económica entre ellos se encuentra la papa (Pradhanang *et al.*, 2003). En papa (*Solanum tuberosum* L.), los síntomas inducidos por *R. solanacearum* aparecen generalmente en el follaje de las plantas. Estos síntomas consisten en marchitamiento de las hojas más jóvenes en las partes terminales de las ramas. Además, los síntomas iniciales de amarillamiento leve en un solo lado de la hoja o en una rama y no en la siguiente (Gregory y Andrade, 1996). En tallos jóvenes, infectados por *Ralstonia solanacearum* (Rs), pueden llegar a ser visibles como rayos largos y estrechos de color marrón oscuro. En infecciones bien avanzadas, las secciones transversales del tallo o del estolón pueden revelar una decoloración marrón de los tejidos infectados (Swanson *et al.*, 2005). Los síntomas pueden encontrarse en los tubérculos de papa. El tubérculo infectado de papa puede revelar una decoloración gris-marrón. Mientras la infección progresa, la decoloración puede extenderse a la corteza del tubérculo con un exudado de lechoso (mucilaginoso), que indica la presencia de células bacterianas, también puede ser observada en secciones recién cortadas de tubérculos infectados exudado bacteriano también puede ser visible en los ojos o en el punto donde el estolón se conecta al tubérculo. Estos signos o síntomas no pueden ser visibles temprano en el desarrollo de la enfermedad (Smith y Saddler, 2001). Cuando el tubérculo está infectado de forma clara, si se corta transversalmente y se aplica una ligera presión, salen del anillo vascular gotas blanquecinas de exudado bacteriano. Este exudado se mezcla con la tierra y la mezcla de exudado bacteriano y suelo se seca y se adhiere a la superficie del tubérculo. Los tubérculos dejados en la tierra siguen su proceso de podredumbre; las bacterias continúan destruyendo los tejidos que rodea al anillo vascular y finalmente se rompe la piel apareciendo grietas. Por tanto queda una masa viscosa de olor desagradable (Pastrik y Maiss, 2000). El control químico es antieconómico, por lo general no se recomienda (Hereida *et al.*, 1995). En los últimos años ha habido un creciente interés en el uso de compuestos biológicamente activos,

extraídos de especies de plantas que presentan la capacidad de eliminar a microorganismos patógenos por sí mismas, esto debido principalmente, a la resistencia que los microorganismos han desarrollado a los antibióticos (Daferera *et al.*, 2003). La agricultura del nuevo milenio debe establecer nuevas alternativas de control que produzcan un menor impacto ambiental, ya que día con día va en aumento el porcentaje de consumidores que demandan alimentos sanos y libres de productos químicos (Ponce *et al.*, 2004). Los aceites esenciales obtenidos de plantas son una alternativa para el control de bacterias. Los aceites esenciales son mezclas de sustancias obtenidas de plantas, que presentan como características principales su compleja composición química y su carácter fuertemente aromático (Sánchez, 2006). Son biodegradables, amigables con el ambiente y poseen bajos o inexistentes niveles de toxicidad, lo que permite que sean utilizados en cualquier ambiente (Cheng *et al.*, 2009). Los aceites esenciales han demostrado poseer características insecticidas, antioxidantes, antibacteriano, antifúngico y antiviral (Burt, 2004; Kordali *et al.*, 2005). Los aceites esenciales pueden ser extraídos por diferentes métodos, el más utilizado; el de destilación por arrastre de vapor de agua, donde la muestra vegetal se coloca en un recipiente (tipo clavenger cerrado) y es sometida a una corriente de vapor de agua, así la esencia es arrastrada y posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. El fundamento de esta técnica, consiste en una vaporización a temperaturas inferiores a la ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua, el cual ejerce la doble función de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y adicionar tensión de vapor a la de los componentes volátiles del aceite esencial; los vapores que salen del matraz extractor se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, de los dos productos agua y aceite finalmente se separan en un dispositivo decantador o vaso (Ortega, 2011). Las plantas aromáticas son importantes para la obtención de aceites esenciales como es el caso del tomillo su nombre científico es *Thymus vulgaris* L. pertenece a la Familia de labiadas. El nombre genérico proviene del verbo griego Thym, perfumar, en alusión al intenso y agradable aroma de la planta. Es una planta aromática (Muñoz, 1996). El Tomillo es una planta medicinal muy importante para el sector hortícola. Es un arbusto perenne con tallos de madera y alcanza una altura de 30 a 50 cm. es una planta típica de la región mediterránea. El tomillo posee propiedades antisépticas, desinfectantes, antiespasmódico, desodorante, sedante y sus principales

componentes son timol y carvacol (Muñoz, 1993). El tomillo es de hoja perenne o semiperenne es una planta herbácea. Es nativa de Europa. Las plantas son ampliamente utilizadas, frescas y secas, como una hierba culinaria. Su aceite esencial se utiliza como ingrediente en una amplia variedad de alimentos, así como en perfumería, jabones y lociones. Además tiene propiedades antimicrobianas (El-Hela, 2007). El Orégano mexicano (*Lippia graveolens*) se caracteriza por ser una planta perenne, que crece en climas semiáridos y se utiliza tradicionalmente como antiséptico intestinal, antiespasmódico, analgésico y antiinflamatorio y tiene propiedades antibacterianas (Castillo *et al.*, 2007). El orégano *Lippia graveolens* pertenece al género *Lippia*, Familia *verbenaceae*, es una planta fuertemente aromática nativa del sur de Norteamérica, México, Guatemala, Nicaragua, Honduras, Panamá, Guatemala y Colombia (Castro, 2004). La distribución del orégano en la República Mexicana es en los estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Zacatecas, Puebla, Querétaro, Tamaulipas, Oaxaca y Sinaloa (Huerta, 1997). La producción nacional de orégano en México, es alrededor de 4,000 toneladas, obtenidas de las poblaciones de los estados de Chihuahua, Coahuila, Guanajuato y Querétaro; cubriendo las demandas de las industrias, cosméticas, alimenticias y farmacéuticas de Estados Unidos de Norteamérica y de Japón, a donde se exportan más del 90% de la producción Mexicana (Osorno *et al.*, 2009). Se ha demostrado que los géneros *Origanum* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomillo) entre otros, tienen propiedades antioxidantes, relacionadas con los compuestos fenólicos, carvacrol y el timol que pueden ser utilizados bajo ciertas condiciones como fungicidas y bactericidas (Aballa y Rosen, 2001). Hoy en día, los aceites esenciales representan una nueva alternativa para el control de bacterias fitopatógenas y para el manejo del cultivo de papa; ya que no causa daños al ambiente, ni a la salud. En base a lo anterior surgió la presente investigación, donde se evaluó el poder bactericida de los aceites esenciales de orégano (*Lippia graveolens*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) contra la bacteria *Ralstonia solanacearum* que provoca la enfermedad de la Marchitez Bacteriana en el cultivo de papa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tercera etapa.

Consistió en la evaluación de la actividad antibacteriana de dos aceites esenciales se realizó en el laboratorio de microbiología y Micotoxinas del

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora, en la ciudad de Hermosillo, Sonora, México. Mediante pruebas *in vitro* bajo condiciones controladas de temperatura a 30 °C y humedad de 90 %.

Obtención de aceites

Los dos aceites esenciales utilizados fueron: Orégano (*Lippia graveolens*) y Tomillo (*Thymus vulgaris* L.).

El Orégano (*Lippia graveolens*) fue recolectado de plantas procedentes de Naica, Chihuahua, localizado en las coordenadas geográficas a 27° 51' 17" N y 105° 29' 33" Oeste. Además se utilizó una muestra comercial de Tomillo (*Thymus vulgaris* L.) la cual se adquirió del comercio local ubicado en Hermosillo, Sonora, el aceite esencial de tomillo es de la marca Soria Natural. Distribuido por la casa Herbofarm Madrid, España, los cuales son obtenidos por arrastre de vapor de agua en gran escala con un grado de pureza de 99%.

El aceite esencial se obtuvo por arrastre de vapor, siguiendo el Método Oficial de la Asociación de Análisis Químicos A.O.A.C. 6.006 (1975), dividiendo los compuestos volátiles del aceite esencial y empleando un destilador tipo Clavender de capacidad de 2 litros. La calidad de los aceites esenciales seleccionados para este estudio oscilaron entre 98 y 99% de pureza acorde a (Ortega *et al.*, 2005; Yesil *et al.*, 2007).

Cultivos bacterianos

La cepa bacteriana utilizada en el estudio fue *Ralstonia solanacearum*, fue aislada y caracterizada de las pruebas de patogenicidad de papa procedente de casas comerciales del estado de Sonora.

Determinación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales.

Preparación del inóculo.

La cepa bacteriana se desarrolló en un cultivo de 24 h a 30° C, en caldo Nutritivo (Difco, Sparks, MD) (extracto de res 3,0 g y peptona 5,0 g) y se ajustó a una concentración de 10^8 UFC/ml con PBS (Phosphate Buffered Saline). El inóculo bacteriano se sembró de forma masiva en placas de agar dextrosa y papa, utilizando un hisopo de algodón estéril, para conseguir un crecimiento microbiano uniforme (Borboa *et al.*, 2010).

Método de difusión en disco.

Una vez inoculadas las placas con la bacteria, fueron colocados en el centro de la misma, discos de papel filtro de aproximadamente 10 mm de diámetro, en los cuales, se aplicaron diferentes cantidades de los aceites esenciales en estudio.

Actividad antimicrobiana.

Los aceites esenciales fueron preparados a diferentes concentraciones usando alcohol etílico al 70% como diluyente. Las concentraciones usadas fueron 1:1, 1:5 y 1:10. De forma aséptica se colocaron 7.5, 10, 15 μ l de cada una de las concentraciones de los aceites esenciales sobre los discos de papel filtro.

Se utilizó alcohol al 70% en uno de los discos de papel filtro como control negativo y para descartar la actividad antimicrobiana del mismo. Además, se utilizó un disco de estreptomicina (10 μ g/disco) y otro de ampicilina (10 μ g/disco), como control de referencia. Después de impregnar los discos con el respectivo tratamiento, las placas fueron incubadas a 30° C por 24 horas. Posterior al período de incubación, se midieron los halos de inhibición del crecimiento bacteriano en milímetros utilizando una regla. Los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

Análisis estadístico

El diseño experimental fue Trifactorial AxBxC. Donde el factor A fueron los 2 aceites (orégano y tomillo). El factor B: las tres diluciones (1:1, 1:5, 1:10), el factor C: las 3 cantidades aplicadas 7.5, 10 y 15 μ l. Los datos se analizaron en programa Statistix 8.0 (2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tercera etapa.

Tanto los aceites esenciales de orégano como de tomillo presentaron halos de inhibición, como prueba de actividad antimicrobiana contra *Ralstonia solanacearum*, en todas las concentraciones y cantidades aplicadas.

Orégano.

La actividad antibacteriana promedio obtenida de todas las concentraciones y diferentes cantidades de extracto de orégano aplicadas fue de 25.8 mm. Los valores promedio de inhibición encontrados fueron 38.3, 20.5, y 20.2 mm de diámetro, para las concentraciones 1:1, 1:5 y 1:10, respectivamente. En un estudio similar en el que se evaluó la actividad antibacteriana de los aceites de cuatro diferentes variedades

de orégano sobre la bacteria *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (*Cmm*) se encontraron valores promedio de 47.5, 35.6 y 30.8 mm de diámetro para las mismas concentraciones y en las que se uso la cantidad aplicada de 15 μ l (Borboa *et al.*, 2010). Estos resultados de inhibición son mayores a los encontrados en el presente experimento; esto puede deberse no solo a la diferente sensibilidad de las bacterias en estudio, sino también a la diferente composición de los aceites de orégano utilizados. La concentración de aceite esencial de orégano que mostró una mayor actividad antibacteriana contra la bacteria *Ralstonia solanacearum* fue la de 1:1 en las diferentes cantidades aplicadas de 7,5 μ l con 35.16 mm, 10 μ l con 39 mm y 15 μ l con 40.83 mm de diámetro, como se muestra en la figura 20. Por otro lado los resultados de inhibición de *Ralstonia solanacearum* fueron muy similares cuando fueron aplicadas 7.5 y 10 μ l del extracto en las concentraciones 1:5 (valor promedio: 19 mm) y 1:5 (valor promedio: 19.5 mm). Sin embargo, la cantidad aplicada tuvo mayor efecto cuando se aplicaron 15 μ l del extracto, sobretodo en la concentración 1:5 (23.8 mm).

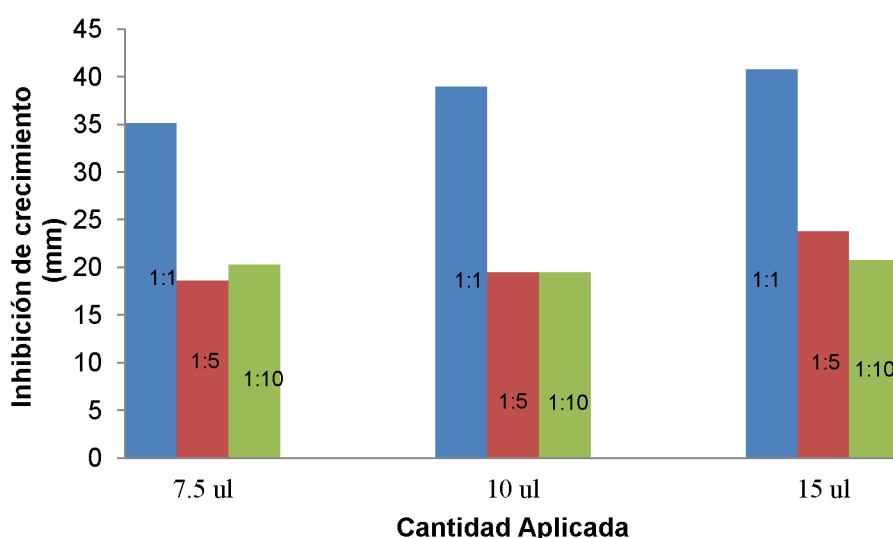


Figura 20. Comparación de valores medios de inhibición de crecimiento de *Ralstonia solanacearum* por efecto de aceite esencial de Orégano en diluciones 1:1, 1:5, 1:10 a diferentes cantidades aplicadas 7.5, 10 y 15 μ l a las 24 horas del ensayo.

Tomillo

La actividad antibacteriana promedio obtenida de todas las concentraciones y diferentes cantidades de extracto de tomillo evaluadas fue de 26.2 mm. Los valores promedio de inhibición encontrados fueron 36.3, 28.0, y 14.1 mm de diámetro, para las concentraciones 1:1, 1:5 y 1:10, respectivamente. Estos resultados fueron

menores que los obtenidos por (Borboa *et al.*, 2010) quienes obtuvieron 50.3, 33.0, y 21.0 mm para las mismas concentraciones (Borboa *et al.*, 2010).

La concentración de aceite de tomillo que mostró mayor halo de inhibición de crecimiento de la bacteria *Ralstonia solanacearum* fue la concentración 1:1 en las diferentes cantidades aplicadas, con 33.5 mm, 35.2, y 40.5mm, cuando se aplicaron 7.5, 10 y 15 μ l, respectivamente, como se muestra en la figura 21.

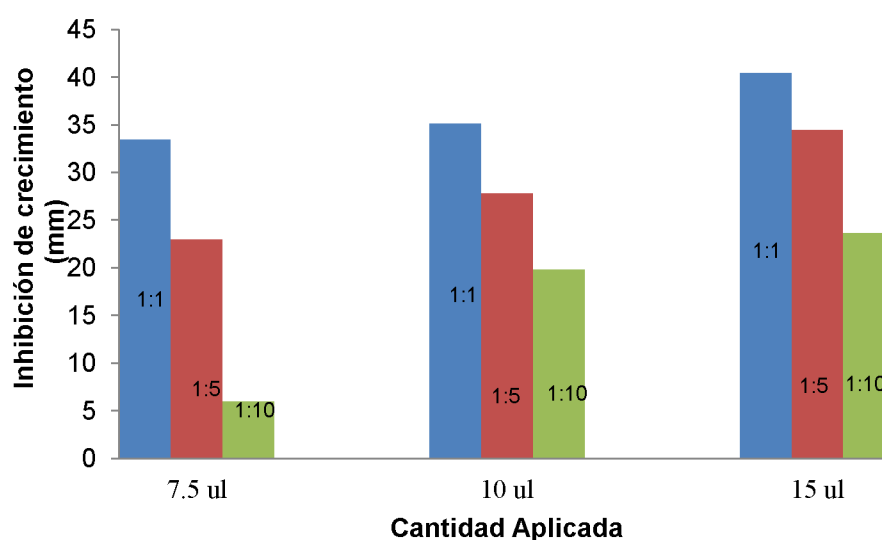


Figura 21. Comparación de los valores medios de halo de inhibición de crecimiento de *Ralstonia solanacearum* por efecto de aceite esencial de Tomillo en diluciones 1:1, 1:5, 1:10 a diferentes cantidades aplicadas 7.5, 10 y 15 μ l. In vitro.

Al realizar la comparación entre los aceites esenciales de orégano *Lippia graveolens* y tomillo *Thymus vulgaris* L de los valores medios de halo de inhibición en el crecimiento de *Ralstonia solanacearum* ($P > 0.05$) no existe diferencia significativa en Orégano: 25.907 a, y Tomillo: 27.204 a. Los dos aceites se consideran con efecto inhibitorio del crecimiento de *Ralstonia solanacearum* efecto que en otras investigaciones se comprobó sus capacidades inhibitorias del crecimiento en bacterias patógenas de plantas tales como: *Agrobacterium tumefaciens*, *C. michiganensis* subespecie *michiganensis*, *Erwinia amylovora*, *E. caratovora* E. *Xanthomonas vesicatoria* (Sivropoulou *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1997; Soyulu *et al.*, 2003).

Respecto a la comparación de los valores medios de las diluciones (1:1,1:5,1:10) de los aceites esenciales de Orégano y tomillo en halo de inhibición de crecimiento de *Ralstonia solanacearum*. Figuras 22 y 23. En la cual existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la dilución 1:1, a diferencia de las siguientes

diluciones 1:5: 24.5 b y 1:10: 17.750 c. Además un resultado similar con la dilución 1:1 fue obtenido en el estudio de inhibición de crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* con aceites de orégano y tomillo (Borboa *et al.*, 2010).

En la Comparación de los valores medios de cantidades aplicadas (7.5, 10, 15 μ l.) de aceites esenciales de Orégano y tomillo en halo de inhibición de crecimiento de *Ralstonia solanacearum*, ($P < 0.05$) hubo diferencia significativa en cantidad aplicada de 15 μ l: 30 a, 7.5 μ l: 22.7 b, 10 μ l: 26.05 b. Figura 22 y 23.

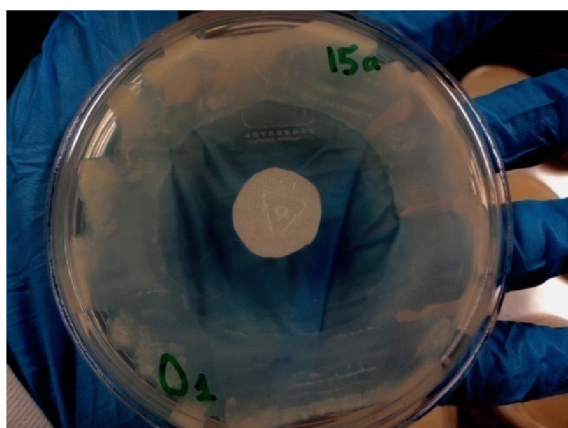


Figura 22. Halo de inhibición de crecimiento de *Ralstonia solanacearum* con aceite esencial de Orégano (*Lippia graveolens*) dilución 1:1, 15 μ l.

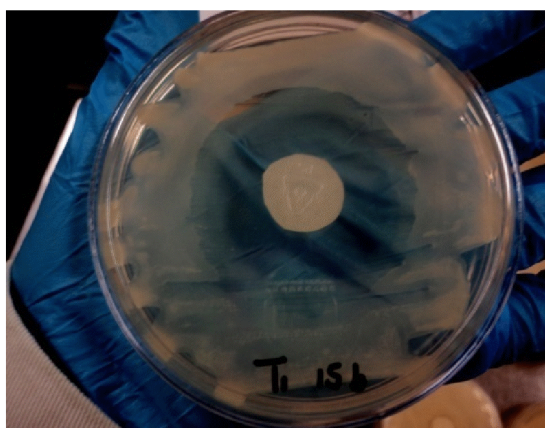


Figura 23. Halo de inhibición de crecimiento de *Ralstonia solanacearum* con aceite esencial de tomillo *Thymus Vulgaris* L dilución 1:1, 15 μ l

Respecto a los valores de halo de inhibición de crecimiento de la bacteria *Ralstonia solanacearum* por efecto de los aceites de orégano y tomillo se muestran en la Cuadro 8. En la cual se indica que ($P > 0.05$) no existe diferencia significativa entre medias de orégano 40.833 a y tomillo 40.500 a.

Cuadro 8. Valores medios de halo de inhibición de crecimiento de *Ralstonia solanacearum* por efecto de aceites (trifactorial AxBxC).

Aceite	Diluciones	Cantidad aplicada	Medias
Orégano	1:1	15 μ l	40.833 a
Tomillo	1:1	15 μ l	40.500 a
Orégano	1:1	10 μ l	39.000 ab
Tomillo	1:1	10 μ l	35.167 abc
Orégano	1:1	7.5 μ l	35.167 abc
Tomillo	1:5	15 μ l	34.500 abcd
Tomillo	1:1	7.5 μ l	33.500 abcde
Tomillo	1:5	10 μ l	27.833 abcdef
Tomillo	1:10	15 μ l	24.500 bcdef
Orégano	1:5	15 μ l	23.833 cdef
Tomillo	1:5	7.5 μ l	23.000 cdef
Orégano	1:10	15 μ l	20.833 def
Orégano	1:10	7.5 μ l	20.333 ef
Tomillo	1:10	10 μ l	19.833 efg
Orégano	1:5	10 μ l	19.500 efg
Orégano	1:5	7.5 μ l	18.667 fg
Orégano	1:10	10 μ l	15.000 fg
Tomillo	1:10	7.5 μ l	6.000 g

(P>0.05). Valores con la misma letra no existe diferencia significativa.

CONCLUSIÓN

Tercera etapa.

Los aceites esenciales de orégano y tomillo mostraron efectos inhibitorios sobre el crecimiento de la bacteria *Ralstonia solanacearum* en la dilución 1:1 resulto (P<0.05) ser más efectiva, que el resto de las diluciones evaluadas, y la cantidad aplicada más efectiva fue de 15 μ l de aceite esencial de orégano y tomillo.

Los aceites esenciales de orégano y tomillo mostraron (P<0.05) mejor efecto inhibitorio que los antibióticos utilizados Estreptomicina (10 μ g) y Ampicilina. Por lo anterior los aceites esenciales son una excelente alternativa para evitar el uso de antibióticos en el control de la bacteria *Ralstonia solanacearum*.

Es de gran importancia realizar otras investigaciones para evaluar la actividad fito-tóxica de los aceites esenciales de Orégano y tomillo sobre la germinación de la semilla de papa y durante ciclo vegetativo.

LITERATURA CITADA

- Aballa, A. and J. P. Rosen. 2001. The effects of stabilized extracts of sage and oregano on the oxidation of salad dressings, *European Food Research and Technol.* 212:551-560.
- APHIS. 2004. New Pest Response Guidelines *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2; Southern wilt of Geranium. Ed. Floyd. Riverdale, USA. USDA. p.19.
- A.O.A.C. (Association of official Analytical Chemists). 1975. William, H., Alam, S, Z and Reynoldsd, H. *Res. Vet. Sci.* 6.006. Edit. 25. p. 77.
- Borboa, F. J., P. E. Rueda., E. F. Acedo., F. J. Ponce., V. M. Cruz., L. J. H. García y N. M. M. Ortega. 2010. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales contra *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems.* 12:539-547.
- Burt, S. A. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. of Food Microbiol.* 94:223-253.
- Castillo, H. A. G., F. A. J. García and E. M. Estarrón. 2007. Extraction Method that enriches phenolic content in oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) essential oil. *J. of food proce. Eng.* 30:661-669.
- Castro, H. 2004. Evaluación agronómica de frecuencias de corte y densidades de siembra de orégano (*Lippia graveolens*), en el centro de Agricultura Tropical Bulbuxya, San Miguel Panan. Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos Guatemala, Facultad de Agronomía Instituto de investigaciones agronómicas. Guatemala. p. 43.
- Cheng, S., J. Liu., C. Huang., y. Hsui., W. Chen and S. Chang. 2009. Bioresource Technol. 100:457-464
- Daferera, D. J., B. N. Ziogas and M. G. Polissiou. 2003. The effectiveness of plant essential oils in the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection.* 22:39-44.
- El-Hela, A. A. A. 2007. Chemical composition and biological studies of the essential oil of *Thymus decussatus* Benth growing in Egypt. *Egypt. J. Biom. Sci.* 23:146–153.
- Hereida, H. C. A., F. H. L. Guzmán Y M. D. J. Mendoza. 1995. Manejo integrado del cultivo de la papa. Corporación colombiana de investigación Agropecuaria (Corpoica). Colombia. p. 131.
- Huerta, C. 1997. Orégano Mexicano: Oro vegetal. *Biodiversistas. Bol. CONABIO* 3:8-13.
- Gregory, P. y H. Andrade. 1996. Principales enfermedades, nematodos e insectos de la papa. Ed. Stella. Lima–Perú. pp.7 y 8.

- Jones, J., R. Stall and T. Zitter. 1991. Compendium of tomato disease. Minnesota, USA. The Amer. Phytopath. Society. p. 120.
- Kordali, S., R. Kotan., A. Mavi., A. Fakir., A. Ala and A. Yildirim. 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish. *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. J. of Agric. Food Chem. 53:9452-9458.
- Muñoz, F. 1993. Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado. Ed. Mundi-prensa. Madrid. p. 365.
- Muñoz, F. 1996. Plantas medicinales y aromáticas. Ed. Mundi-prensa. 2^{da} reimpresión. México. pp. 281-283.
- Ortega, N. M. M., E. D. McCaughey., M. R. Bargueño y F. Serna. 2005. Estimación de materia vegetal del Orégano (*Lippia palmeri* Watson) y su contenido de aceite esencial por planta en dos sitios nativos del estado de Sonora. Memorias del 5to Simposio Internacional de la Flora Silvestre de Zonas áridas. pp. 234-249.
- Ortega, N. M. M. 2011. Caracterización del aceite esencial del orégano *Lippia palmeri wats* y su actividad biológica. Tesis Universidad de Baja california. Instituto de ciencias agrícolas. Baja California, México. pp. 11-12.
- Osorno, H. T., J. D. Flores., S. L. Hernández Y R. Cisneros. 2009. Management and extraction of *Lippia graveolens* in the arid lands of Queretaro, Mexico. Economic Botany 63:314-318.
- Pastrik, K. H. and E. Maiss. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* in Potato Tubers by Polymerase Chain Reaction. J. of Phytopath. 148:619-626.
- Ponce, A. G., C. del Valle and S. I. Roura. 2004. Evaluation of plant essential oil as natural posharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Int. Soci. for Hort. Sci. 628:737-745.
- Pradhanang, P. M., M. T. Momol., S. M. Olson and J. B. Jones. 2003. Effects of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. Plant Dis. 87:423-427.
- Sánchez, M. F. 2006. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Ed. Aiyana. 1^{era} edición. España. pp. 7-14.
- Seal, S. E., L. A. Jackson and M. J. Daniels. 1992. Use of tRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction amplification. Appl. Environ. Microbiol. 58:3579-3761.

- Sivropoulou, A., E. Papanikolaou., C. Nikolaou., S. Kokkini., T. Lanaras and M. Arsenakis. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. J. of Agric. and Food Chem. 44:1202-1205.
- Smith, R. A., P. Jones., J. G. Elphinstone and S. M. D. Forde. 1995. Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. Food and Agric. Immunol. 7:67-79.
- Smith, M. D. and P. L. Navilliat. 1997. A new protocol for antimicrobial testing of oils. J. of Microbiol. Meth. 28:21-24.
- Smith, J. J. and G. S. Saddler. 2001. The use of avirulent mutants of *Ralstonia solanacearum* to control bacterial wilt disease. pp.159-176.
- Soylu, S., E. M. Soylu., Ö. Baysal and W. Zeller. 2006. Antibacterial activities of the essential oils from medicinal plants against the growth of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Biocontrol of Bacterial Plant Diseases, 1st Symposium, 23-26 October, 2005, Darmstadt, Germany. Vol. 408. pp. 82-85.
- Statistix 8. 0. 2003. User's Manual. Analytical Software, U.S.A. p. 396.
- Swanson, J. K., J. Yao., J. Tans-Kersten and C. Allen. 2005. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent infection of geranium. Phytopath. 95:136-143.
- Yesil, C. O., K. E. E. Hames., E. Bedir., S. F. Vardar., T. Ozek and K. H. C. Baser. 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and Essentials oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chem. 100:553-559.

ANEXO

1.- Detección de la pudrición parda (*Ralstonia solanacearum*) de la papa (*Solanum tuberosum* L) en el estado de Sonora, México.

Revista universidad y ciencia (enviado).

2.-*Ralstonia solanacearum*: una enfermedad bacteriana.

Revista de Riego (publicado).

3.- Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales de orégano y tomillo contra *Ralstonia solanacearum*.

Revista Tropical and Subtropical Agroecosystems (enviado).