

**Evaluación del efecto del tipo de suelo y de la
tetraciclina sobre el tamaño de las
poblaciones de *Ralstonia solanacearum* para
la estandarización de un microcosmos**

Raquel Penagos Becquet

Universidad EAFIT
Escuela de Ingeniería
Ingeniería de Procesos
Medellín, Colombia

2014

Evaluación del efecto del tipo de suelo y de la tetraciclina sobre el tamaño de las poblaciones de *Ralstonia solanacearum* para la estandarización de un microcosmos

Raquel Penagos Becquet

Proyecto de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de:
Ingeniero de Procesos

Asesora:

M.Sc., Educrecia María Ramírez Correa

Coasesora:

M.Sc., Ruth Natalia Moncada Ossa

Línea de investigación:

Bioprocesos

Grupo de investigación:

Grupo de investigación en ciencias biológicas y bioprocesos CIBIOP

Universidad EAFIT

Escuela de Ingeniería

Ingeniería de Procesos

Medellín, Colombia

2014

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad EAFIT por brindarme los espacios para el desarrollo de este proyecto de pregrado y por el apoyo académico y económico.

Quiero agradecer a mis asesoras María Ramírez y Natalia Moncada por haberme acompañado a lo largo de todo el proceso, por confiar en mí y brindarme todo su conocimiento científico y personal. Les agradezco por ayudarme en mi formación como investigadora. También le agradezco a Valeska Villegas por sus asesorías y aportes a la investigación.

A Sigifredo Cárdenas y demás personal de los laboratorios de la Universidad EAFIT por facilitar todas las pruebas y su soporte.

No puede escaparse mi familia y amigos cercanos, por su motivación y apoyo incondicional, sin el cual no hubiera sido posible este proyecto.

RESUMEN

Ralstonia solanacearum es una bacteria fitopatógena causante de la marchitez bacteriana. En cultivos de banano se conoce como la enfermedad del Moko y se caracteriza por marchitez general de la planta y maduración prematura del fruto. El único método de control consiste en la erradicación de plantas afectadas e implementa una cuarentena de mínimo seis meses. Dada la capacidad adaptativa del patógeno en diferentes ambientes es difícil encontrar métodos que garanticen su completa erradicación con este método de control, por lo cual se vienen estudiando nuevas alternativas que buscan atacar directamente a la bacteria. Buscando dar solución a este problema, en el presente trabajo se logró estandarizar un modelo de microcosmos de suelo para la evaluación de compuestos con actividad contra *R. solanacearum* AW1, el cual consta de un sistema cerrado en envases de vidrio de 250 mL, trabajado con 50 g de suelo estéril a una temperatura de 30°C, humedad entre el 60-70% y ciclos de luz de 12 horas. Se evaluaron tres tipos de sustratos para determinar el tamaño de población de *R. solanacearum* en el tiempo. Los resultados evidenciaron que la bacteria se mantuvo en una población promedio de 1.9×10^8 UFC/g suelo, y este valor no variaba significativamente entre cada tratamiento durante dos meses evaluados. Además para darle validez al modelo estandarizado, se evaluó el efecto de tres concentraciones del antibiótico tetraciclina (1000 ppm, 2500 ppm y 5000 ppm) sobre el tamaño de población de *R. solanacearum*, obteniendo que hasta el séptimo y décimo día posterior a la infección para las concentraciones de 2500 ppm y 5000 ppm respectivamente, no hubo crecimiento del patógeno. Sin embargo al transcurrir más días de evaluación se obtuvo una alta concentración de la bacteria en todos los tratamientos, posiblemente debido a la generación de resistencia al antibiótico por parte de *R. solanacearum* AW1.

Palabras claves: *Ralstonia solanacearum*, microcosmos, suelo, tetraciclina

CONTENIDO

RESUMEN	6
CONTENIDO.....	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABLAS	11
LISTA DE ANEXOS	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
INTRODUCCIÓN.....	14
1. OBJETIVOS.....	16
1.1. GENERAL	16
1.2. ESPECÍFICOS	16
2. MARCO TEÓRICO	18
2.1. GENERALIDADES DE <i>Ralstonia solanacearum</i>	18
2.2. CICLO BIOLÓGICO DE <i>R. solanacearum</i>	19
2.3. CONTROL DE <i>R. solanacearum</i>	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. LOCALIZACIÓN.....	24
3.2. MICROORGANISMOS	24
3.3. MEDIOS DE CULTIVO.....	25
3.4. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE <i>R. solanacearum</i>	26
3.5. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD	27
3.6. EVALUACIÓN DEL TIPO DE SUSTRATO SOBRE EL TAMAÑO DE POBLACIÓN DE <i>R. solanacearum</i>	28
3.7. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TETRACICLINA SOBRE EL TAMAÑO DE POBLACIÓN DE <i>R. solanacearum</i>	30
3.7.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de la tetraciclina contra <i>R. solanacearum</i>	30
3.7.2. Efecto de la tetraciclina sobre la población de <i>R. solanacearum</i> en microcosmos de suelo.....	31
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
4. RESULTADOS	34
4.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE <i>R. solanacearum</i>	34

4.2.	PRUEBAS DE PATOGENICIDAD	36
4.3.	TAMAÑO DE LA POBLACIÓN DE <i>R. solanacearum</i> EN DIFERENTES SUSTRATOS	39
4.4.	EFEECTO DE LA TETRACICLINA SOBRE <i>R. solanacearum</i>	41
4.4.1.	Concentración mínima inhibitoria de <i>R. solanacearum</i> en medio líquido BG....	41
4.4.2.	Evaluación de tetraciclina en microcosmos de suelo	42
5.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	44
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	50
6.1.	CONCLUSIONES.....	50
6.2.	RECOMENDACIONES.....	51
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	52
	ANEXOS	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del modelo de microcosmos empleado para las evaluaciones.....	30
Figura 2. Comportamiento en el tiempo de los síntomas de marchitamiento y clorosis en banano para todos los aislados de <i>R. solanacearum</i>	37
Figura 3. Plantas de banano infectadas con la cepa <i>R. solanacearum</i> EAP019.....	38
Figura 4. Variación de la concentración de <i>R. solanacearum</i> AW1 en los sustratos evaluados.	40
Figura 5. Porcentaje de inhibición de la cepa <i>R. solanacearum</i> AW1 a partir del antibiótico tetraciclina en medio de cultivo líquido BG a nivel <i>in vitro</i>	41
Figura 6. Efecto de las tres concentraciones de tetraciclina evaluadas sobre el tamaño de población de <i>R. solanacearum</i> AW1..	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Procedencia y morfología de los aislados en diferentes medios de cultivo.	35
Tabla 2. Prueba de rangos múltiples para el ABC de los síntomas de clorosis y marchitamiento de las cepas de <i>R. solanacearum</i> en el tiempo.	38
Tabla 3. Grupos homogéneos obtenidos para el ABC de la concentración en el tiempo de las cepas de <i>R. solanacearum</i> en los sustratos evaluados.....	40
Tabla 4. Grupos homogéneos obtenidos para el ABC del tamaño de población de <i>R. solanacearum</i> en el tiempo bajo el efecto de diferentes concentraciones de tetraciclina. ..	43

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Determinación de la máxima capacidad de retención de humedad (MCRH)	58
Anexo 2. Re-aislamiento de cepas	59
Anexo 3. Análisis de sustrato de germinación vivero Tierra Negra®	59

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Término
<i>ABC</i>	Área Bajo la Curva
<i>ACB</i>	Agente de Control Biológico
<i>ADE</i>	Agua Destilada Estéril
<i>ADN</i>	Ácido Desoxiribunocléico
<i>ANOVA</i>	Análisis de varianza
<i>CAB</i>	Control Absoluto
<i>CMI</i>	Concentración Mínima Inhibitoria
<i>DO</i>	Densidad Óptica
<i>DPI</i>	Días Posteriores a la Infección
<i>egl</i>	Endoglucanasa
<i>EPS</i>	Exopolisacárido
<i>ha</i>	Hectáreas
<i>ITS</i>	“Internal transcribed spacer” – Espaciador de transcripción interna
<i>LSD</i>	“Less Significance Difference” – Diferencia menos significativa
<i>MCRH</i>	Máxima Capacidad de Retención de Humedad
<i>MLST</i>	“Multilocus Sequence Typing” – Transcripción de secuencias multilocus
<i>PCR</i>	“Polymerase Chain Reaction” – Reacción en cadena de la polimerasa
<i>SMSA</i>	Medio Semiselectivo SurAfrica
<i>TBE</i>	Tris-Borato-EDTA
<i>TRB</i>	“Tetracycline Resistant Bacterias” – Bacterias resistentes a tetraciclina
<i>TSA</i>	“Tryptic Soy Agar” – Agar tripticasa de soya
<i>TZC</i>	“Trifenil Tetrazolio Cloruro”
<i>UFC</i>	Unidades Formadoras de Colonias
<i>VBNC</i>	“Viable But Not Culturable” – “Viabiles mas no cultivables”

INTRODUCCIÓN

La economía colombiana se centra en gran parte en la agricultura, especialmente en cultivos de caña de azúcar, plátano, banano, café, flores, entre otros, tanto para consumo interno como para exportación (AUGURA, 2013). En 2012, el banano fue destacado como el octavo producto de mayor producción en Colombia, aportando 502,421 mil dólares en ese año (FAO, 2014). Para el 2013 el banano y plátano participaron con el 1.5% de las exportaciones totales Colombianas, proporcionando para el final del año una exportación de banano equivalente a 96 millones de cajas de 18.14 Kg y de plátano equivalente a 4.8 millones de cajas de 23.24 Kg (AUGURA, 2014). Estos productos son de gran aporte para la economía Colombiana y su producción contribuye a la generación de empleo y el crecimiento socio-económico del país (Perea *et al.*, 2011). Actualmente el banano presenta limitaciones en su producción por problemas fitosanitarios y problemas relacionados con el clima y la calidad de suelo (Arias *et al.*, 2004). Dentro de los problemas fitosanitarios se encuentra la enfermedad del Moko causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum*. Esta enfermedad es limitante para el desarrollo de los cultivos porque causa la marchitez general de la planta y sus métodos de control causan grandes pérdidas económicas (Belalcázar *et al.*, 2004).

La enfermedad del Moko ha presentado dificultades en su control debido a que *R. solanacearum* tiene la capacidad de adaptarse a diferentes ambientes y puede sobrevivir en el suelo y fuentes de agua por largos periodos de tiempo (Álvarez *et al.*, 2010). El único método de control integra un proceso cultural y químico, el cual consiste en detectar un foco de infección y erradicar todas las plantas hospederas del patógeno en una área de 5 metros con glifosato al 20%. La zona de erradicación debe permanecer en cuarentena por un periodo de 6 meses para que la bacteria pueda ser eliminada por déficit de alimento en el área afectada. Esto da como resultado unos tiempos muertos de producción de las zonas afectadas con pérdidas económicas de aproximadamente \$5,400,000/ha/año (Belalcázar *et al.*, 2004; Bornacelly and Mena, 2010; Bornacelly, 2011; Villegas, 2012). Sin embargo estos métodos no son totalmente efectivos por la capacidad adaptativa de la bacteria en el suelo y las fuentes de agua. Además la fácil diseminación por medio de animales, personas, herramientas, material vegetal y el riego del cultivo limitan el control adecuado de esta bacteria (Bornacelly and Mena, 2010; Munar-Vivas *et al.*, 2010).

Por esta razón, Colombia está trabajando en algunas investigaciones con potenciales agentes de control biológico (ACBs) que puedan atacar directamente sobre el patógeno y disminuir la cantidad de su inóculo en el suelo, reduciendo así los tiempos de cuarentena (Ongena *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2012). Hasta ahora para esta enfermedad y este tipo de cultivo no se ha determinado un método que permita evaluar ACBs contra *R. solanacearum* directamente en el suelo. La mayoría de los agentes de control con potencial para el control de *R. solanacearum* son evaluados en a nivel *in vitro* y no en sistemas similares a los sustratos donde se desarrolla un patógeno (Ongena *et al.*, 2007; Schönfeld *et al.*, 2003b; Yang *et al.*, 2012). Por lo anterior, este trabajo busca estandarizar un modelo que permita evaluar en una matriz de suelo a nivel de microcosmos para evaluar en un futuro diferentes productos para el control de esta bacteria fitopatógena en matriz similar al sustrato donde se desarrolla esta bacteria.

1. OBJETIVOS

1.1. GENERAL

Determinar el efecto del tipo de suelo y la tetraciclina sobre el tamaño de las poblaciones de *Ralstonia solanacearum* para estandarizar un modelo de microcosmos.

1.2. ESPECÍFICOS

- Aislar y caracterizar una colección de *R. solanacearum* de cultivos de banano por pruebas morfológicas, moleculares y de patogenicidad.
- Evaluar el efecto de diferentes sustratos sobre el tamaño de población de *R. solanacearum* a nivel de microcosmos.
- Evaluar el efecto de la tetraciclina sobre el tamaño de la población de *R. solanacearum* en el modelo de microcosmos previamente seleccionado.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. GENERALIDADES DE *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum es una beta-proteo bacteria, transmitida por el suelo (Álvarez *et al.*, 2010) y causante de la marchitez bacteriana con un amplio rango de hospederos en el mundo (Denny, 2006; Kang *et al.*, 2002). Esa bacteria ataca alrededor de 250 especies de plantas entre ellas 55 familias botánicas, de las que se destacan el tomate, papa, banano, plátano, heliconia, tabaco, berenjena, maní y otras pertenecientes en su mayoría a las familias de las Solanácea y Musácea (Álvarez *et al.*, 2010; N'guessan *et al.*, 2013).

La enfermedad se presenta como una marchitez generalizada en la mayoría de hospederos susceptibles, sin embargo diferentes nombres son a menudo usados dependiendo del cultivo afectado. En cultivos de *Musa spp.* la enfermedad ha sido conocida como el Moko y en cultivos de papa se ha denominado como la pudrición parda de la papa (Denny, 2006). La enfermedad del árbol del clavo en Sumatra y la enfermedad BDB (Blood disease bacteria) del banano en Indonesia también se agrupan a esta especie bacteriana (Peeters *et al.*, 2013). Por esta razón, las cepas de *R. solanacearum* se han denominado como un complejo de especies por su alta heterogeneidad de cepas y diversidad genética (Álvarez *et al.*, 2010; Genin and Denny, 2012).

Las primeras dos clasificaciones que se otorgaron al complejo *R. solanacearum* se conocieron como razas y biovares; la clasificación por razas se basó en el rango de hospederos y especies de plantas que podía atacar como: Raza 1, 2, 3, 4 y 5. Dentro de esta clasificación la raza 2 fue restringida al banano triploide y heliconias y es causante de la enfermedad del Moko (Álvarez *et al.*, 2010; Chandrashekara *et al.*, 2012; Gómez, 2005). La clasificación por biovares fue basada en la capacidad de las cepas de oxidar diferentes hexosas como el manitol, sorbitol y dulcitol, metabolizar disacáridos como la lactosa, maltosa y celobiosa, y la capacidad de producir nitrito a partir de nitrato y gas a partir de éste último (Genin and Denny, 2012; Schell, 2000). En este complejo bacteriano se ha reconocido la existencia de 5 biovares, además de una variante tropical del biovar 2, conocida como 2T (Genin and Denny, 2012). Sin embargo, la base genética de estas clasificaciones es limitada, por lo cual Fegan y Prior (2005), propusieron una nueva

clasificación conocida como filotipo-secuevar basada en el análisis genético del ADN de las cepas. Estos análisis fueron realizados principalmente con la secuencia de la región del espaciador transcribible interno del 16S y 23S (ITS) y de los genes de virulencia como la endoglucanasa (*egl*) y de patogenicidad (*hrpB*) (Fegan and Prior, 2005). Estos genes permitieron reconocer cuatro grupos filogenéticos llamados filotipos, agrupación que correspondía al origen geográfico de las cepas. Por ejemplo, las cepas provenientes de Asia pertenecen al filotipo I, las de Norte y Sur América al filotipo II, las de África al filotipo III y las de Indonesia, Australia y Japón, al filotipo IV. Castillo y colaboradores en el 2007 usando multilocus sequence typing (MLST) propusieron una división para el filotipo II, separando este grupo en 2 nuevos subgrupos; IIA y el IIB (Fegan and Prior, 2006).

Dentro de los cuatro filotipos se ha reconocido una gran variabilidad en algunos genes de virulencia, lo cual ha separado los filotipos en agrupaciones conocidas como secuevares. Los secuevares se han caracterizado principalmente por la variación de los nucleótidos del gen de la endoglucanasa *egl* (Álvarez *et al.*, 2010; Genin and Denny, 2012; Peeters *et al.*, 2013). Esta clasificación de filotipo-secuevar es reconocida como monofilética y es ampliamente aceptada en la actualidad (Remenan *et al.*, 2011; Wicker *et al.*, 2012).

2.2. CICLO BIOLÓGICO DE *R. solanacearum*

R. solanacearum es una bacteria transmitida por el suelo que puede sobrevivir por largos periodos de tiempo como saprófita. El ciclo biológico es complejo porque puede persistir en diversos hábitats como el suelo o agua, o de manera asintomática en huéspedes alternos hasta encontrar nuevamente un ambiente favorable y algún huésped potencial el cual colonizar (Álvarez *et al.*, 2010; Denny, 2006; Genin and Denny, 2012). Esta bacteria reconoce sus hospederos por compuestos liberados a través de las raíces de las plantas y esto la impulsa a moverse hasta llegar a las raíces de manera natural (Peeters *et al.*, 2013). Una vez en la raíz, la bacteria puede ingresar por heridas físicas o aperturas naturales y comenzar su proceso de colonización y desarrollo de la enfermedad (Álvarez *et al.*, 2010).

El proceso que conlleva al desarrollo de la enfermedad incluye varios pasos y es dependiente de la densidad celular y la comunicación bacteriana (quórum sensing) (Genin and Denny, 2012). La enfermedad inicia con la adherencia de la bacteria en las células de la raíz lo cual activa una cascada de señales en la célula del patógeno para el proceso de patogenicidad (Perea *et al.*, 2011). Luego de la adherencia, *R. solanacearum* invade el córtex a una baja densidad de la población hasta colonizar el haz vascular, usando enzimas degradadoras de pared celular. En el haz vascular, la bacteria aumenta su población y activa todos sus factores de virulencia como el exopolisacárido EPS I y la β -1,4-endoglucanasa (Álvarez *et al.*, 2010; Genin and Denny, 2012; Schell, 2000). Finalmente, la planta muestra síntomas externos de amarillamiento, marchitamiento y colapso de las hojas, terminando en su muerte (Bornacelly and Mena, 2010; Gómez, 2005; Merchan, 2003; Trust, 2010). En los cultivos de Musáceas también se puede notar una maduración prematura de los racimos y alta producción del EPS dentro del fruto, razón por lo cual se la asigna el nombre de Moko a esta enfermedad (Álvarez *et al.*, 2010; Merchan, 2003).

Posterior a la muerte del hospedero, la bacteria se incorpora al suelo por el material vegetal en descomposición y puede sobrevivir allí por largos periodos de tiempo como saprófito. También puede incorporarse a los flujos de agua y por este medio dispersarse hasta encontrar nuevos hospederos (Álvarez *et al.*, 2010). Van Elsas y colaboradores en el 2001 mostraron que *R. solanacearum* puede sobrevivir en condiciones adversas a través de su modificación del metabolismo y entrando en un estado de latencia. En este proceso la bacteria es viable pero no cultivable (VBNC) en sistemas de laboratorio. Estos estudios evidencian la capacidad adaptativa de la bacteria para enfrentar condiciones adversas de temperaturas y baja disponibilidad de nutrientes y energía (Caruso *et al.*, 2005; van Elsas *et al.*, 2001)

2.3. CONTROL DE *R. solanacearum*

El método de control más usado en la actualidad comprende la utilización de áreas de cuarentena en las zonas afectadas integrando un componente químico y cultural. El componente cultural se refiere a recomendaciones seguidas por el personal que busca prevenir que la bacteria llegue y se disperse en el cultivo como: 1) Una desinfección de herramientas con hipoclorito antes y después de emplearlas en cada planta. 2) Instalar lava botas con desinfectante para entrar al lote productivo. 3) Evitar realizar heridas innecesarias y 4) No arrojar plantas o partes de ellas a los ríos, canales de riego y de drenaje ya que la bacteria puede dispersarse en el agua (Bornacelly and Mena, 2010). El componente químico se basa en la erradicación de focos de infección mediante la aplicación de un herbicida. Una vez detectado un foco de infección se deben erradicar todas las plantas alrededor de 5 metros, incluidas las malezas. Este proceso se realiza mediante la fumigación o inyección de un herbicida sistémico (glifosato al 20%) de las plantas que se encuentra en el área restringida (Bornacelly and Mena, 2010). A partir de la planta infectada debe dejarse un anillo de seguridad de 10 metros a la redonda, verificando que no haya aparición de nuevos focos. El suelo erradicado, debe quedar en cuarentena aproximadamente por 6 meses y libre de cualquier material vegetal ya que la bacteria puede sobrevivir fácilmente en otros hospederos asintomáticos o en la materia orgánica (Bornacelly and Mena, 2010; Obregón *et al.*, 2008).

Por otra parte, el componente químico se han usado otros compuestos como el formol, el bromuro de metilo y algunos antibióticos (Yamada, 2012). Dentro de los antibióticos la estreptomycin, la oxitetraciclina, la gentamicina y el ácido oxálico (McManus *et al.*, 2002; Stockwell and Duffy, 2012) han sido de uso restringido. Por ejemplo en México se han desarrollado productos conocidos como Farmicina ®, BacterStop ® y Organobacter ® basados en éstos antibióticos para el control del Moko y otras enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas. Sin embargo su acumulación en aguas subterráneas, aguas superficiales y en el suelo ha influido de forma significativa en la aparición de bacterias resistentes, y ha frustrado el control de enfermedades en plantas por éste método (He *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014; McManus *et al.*, 2002).

Por lo tanto, hoy en día existe la necesidad de buscar nuevas alternativas para el control de esta bacteria fitopatógena. Dentro de estas alternativas, el control biológico ofrece varias opciones para disminuir la población de esta bacteria en el suelo. Entre estas se

encuentran las enmiendas orgánicas, la solarización y el uso de microorganismos antagonistas, protozoos y bacteriófagos líticos (Guo *et al.*, 2004; Messiha *et al.*, 2009; Ramesh and Phadke, 2012; Schönfeld *et al.*, 2003a; Yamada, 2012). Los microorganismos con actividad antagónica y los depredadores podrían ser una alternativa para reducir las poblaciones de *R. solanacearum* en el suelo (Ephinstone, 1996). Estas alternativas de control biológico se vienen evaluando en sistemas a nivel *in vitro* y en matrices de turba y vermiculita (Etchebar *et al.*, 1998; Messiha *et al.*, 2007), sin embargo es necesaria la estandarización de sistemas de suelo que permitan simular las condiciones donde se desarrolla la bacteria. Uno de estos modelos podría ser un sistema de microcosmos en el que se pudiera simular estas condiciones, permitiendo obtener resultados más reproducibles de los agentes de control biológico en sistemas de invernadero y campo (Guo *et al.*, 2004). Con base en lo anterior, este trabajo busca estandarizar un modelo de microcosmos, el cual facilite la evaluación de nuevos productos con potencial para control biológico en matrices similares a las condiciones del suelo. Esto permitiría reducir los costos en evaluaciones directamente de invernadero y campo con plantas semi-perennes como el banano, ya que se podría mirar el potencial de los productos en modelos más económicos para los investigadores y las empresas

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LOCALIZACIÓN

Las pruebas *in vitro* y de patogenicidad se llevaron a cabo en el laboratorio de Bioprocesos de la Universidad EAFIT, sede Medellín, Antioquia, Colombia y las pruebas moleculares para la identificación de microorganismos en el laboratorio de Biocontrol y Microbiología Ambiental de la Universidad de Antioquia (BIOMA).

3.2. MICROORGANISMOS

Los aislados de *R. solanacearum* fueron obtenidos a partir de tejido vegetal infectado proveniente de plantas de banano del Urabá Antioqueño y Magdalena. Como control positivo para las diferentes pruebas se empleó la cepa *R. solanacearum* EAP009, conservada en el mismo laboratorio y aislada del Urabá Antioqueño por Ramírez (2012). Adicionalmente se trabajó con la cepa *R. solanacearum* AW1 (donada por el doctor Timothy P. Denny), aislada de un cultivo de tomate y perteneciente a la raza 3, resistente al ácido nalidíxico (Sigma-aldrich ®) y de fácil detección en el suelo.

3.3. MEDIOS DE CULTIVO

Para el aislamiento de *R. solanacearum* a partir de tejido vegetal se utilizó el medio semiselectivo Sur África (SMSA) (French *et al.*, 1995) que está compuesto por: 1 g/L casaminoácidos (BD ®), 10 g/L peptona especial (Oxoid ®), 5 g/L glucosa, 17 g/L agar (Oxoid ®), 5 mg/L cristal violeta (Merck ®), 100 mg/L polimixina β -sulfato (Calbiochem ®), 25 mg/L bacitromicina (Sigma ®), 0.5 mg/L penicilina, 50 mg/L TZC (Panreac ®), 5 mg/L cloranfenicol.

La purificación y crecimiento de los aislados se realizó en medio BGTA (Flavier *et al.*, 1997): 10 g/L peptona especial (Oxoid ®), 1 g/L casaminoácidos (BD ®), 1 g/L extracto de levadura (Oxoid ®), 5 g/L glucosa, 18 g/L agar (Oxoid ®), 50 mg/L TZC (Panreac ®) (French *et al.*, 1995). Para el aislamiento a partir de microcosmos de la cepa AW1 se modificó la composición del medio BGTA, añadiendo 20 μ g/mL de ácido nalidíxico.

Para el análisis morfológico de los aislados se utilizó el medio BGTA (antes descrito), BGA: 10 g/L peptona especial (Oxoid ®), 1 g/L casaminoácidos (BD ®), 1 g/L extracto de levadura (Oxoid ®), 5 g/L glucosa, 18 g/L agar (Oxoid ®) (French *et al.*, 1995) y TSA (Merck ®) al 10%: 2.5 g/L glucosa, 17 g/L caseína pancreática digestiva, 3 g/L enzima digestiva de soya, 5 g/L NaCl, 2.5 g/L K_2HPO_4 , suplementado con 0.1% de sacarosa (Schönfeld *et al.*, 2003b)

El medio de cultivo líquido BG, fue empleado como medio estándar para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la tetraciclina en platos Elisa contra la cepa *R. solanacearum* AW1. La composición de este medio es la misma que el medio BGA (antes descrito) pero en su forma de caldo (sin agar).

Para conservar los aislados de *R. solanacearum* se usó medio BG con 20% de glicerol que es una modificación del BGTA antes descrito, al cual no se le adiciona TZC ni agar.

3.4. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *R. solanacearum*

Para iniciar el proceso de estandarización del microcosmos, se caracterizaron algunos aislados de *R. solanacearum* asociados a cultivos de banano en Urabá y Santa Marta, con el fin de encontrar un aislado virulento y de fácil detección en una matriz de suelo

El aislamiento de diferentes cepas de *R. solanacearum* fue realizado a partir de tejido vegetal infectado, con el fin de determinar las diferencias de virulencia entre cepas, usando como control la cepa EAP009, aislada previamente por Ramírez (2012). Estas muestras fueron colectadas de la zona del Urabá Antioqueño y Santa Marta de las siguientes localidades: Municipios de Carepa, Apartadó (Antioquia) y zona bananera Santa Marta (Magdalena).

El aislamiento fue realizado a partir de tejido (cormo y pseudotallo) de plantas enfermas y este consistió en fragmentar las muestras en trozos de 1 cm³ y una posterior desinfección en hipoclorito al 3% (1 minuto), etanol al 70% (30 segundos) y cinco lavados con agua destilada estéril (ADE). Los trozos desinfectados se maceraron en un mortero estéril con 2 mL de Buffer fosfato 1M (pH 7,2) y luego con la solución del tejido macerado se hicieron diluciones seriadas 1:10 (10⁻¹ hasta 10⁻⁵). Una muestra de 100 µL se sembró en medio semiselectivo SMSA y se llevó a incubación entre 4-10 días (dependiendo del crecimiento de las bacterias presentes en el aislamiento) a una temperatura de 30°C (Álvarez *et al.*, 2008).

Las colonias con apariencia mucosa, blancas y con centros rojos se purificaron en medio BGTA y se caracterizaron por la prueba de Gram y KOH al 3%. Posterior a esto, las cepas fueron almacenadas en 1mL de caldo BG más 20% de glicerol a -80°C. Para confirmar si los aislados pertenecían a *R. solanacearum*, todas las cepas aisladas fueron caracterizadas por medio de una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) específica para *R. solanacearum*, usando los cebadores específicos 759/760, los cuales amplifican un fragmento de 282 pb que corresponde a una porción del gen *lpxC* (N-acetil-glucosamina desacetilasa), ubicado en el cromosoma bacterial de *R. solanacearum* (Cardozo and Rodríguez, 2009). Para la amplificación de la PCR, se usó la enzima GoTaq® Flexi DNA polimerasa (Promega, Madison WI, 53711), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración por cada reacción de la PCR fue preparada en un volumen total de 25 µL conteniendo 0.5 µM de cada cebador, 1U de ADN polimerasa GoTaq® Flexi, 0.2 mM de

dNTP's, 1X de buffer de enzima y 1.5 mM MgCl₂ por cada reacción. Los ciclos incluyeron una fase inicial de desnaturalización a 96°C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de 96°C por 20 segundos, 64°C por 20 segundos, 72°C por 30 segundos y un período final de extensión a 72°C por 5 minutos. Luego de la amplificación, se tomaron 5 µL de los productos de la reacción y se verificó el tamaño del amplicón por medio de la visualización en gel de agarosa al 1,5% en buffer TBE 1X (Tris-Borato-EDTA-Promega), suplementado con 2 µL de bromuro de etidio (Cardozo and Rodríguez, 2009; Cardozo *et al.*, 2010). El control positivo empleado fue la cepa EAP009 según la metodología de Ramírez (2012).

Los aislados positivos a las pruebas microbiológicas y moleculares fueron caracterizados a nivel morfológico en tres medios de cultivo: TSA al 10% suplementado con 0,1% de sacarosa, BGA y BGTA. Luego de sembrarlos en los tres medios y dejarlos en incubación por 96 horas a 30°C, se determinaron características morfológicas como color, elevación, borde, forma y superficie y se agruparon en diferentes morfotipos de acuerdo a la caracterización anterior.

3.5. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

Para determinar el grado de virulencia de las cepas aisladas, se realizó una prueba de patogenicidad siguiendo los postulados de Koch (Agrios, 2004). La prueba fue llevada a cabo en el Laboratorio de desarrollo de productos de la Universidad EAFIT a condiciones de temperatura entre 20-25°C, bajo ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad y una humedad relativa entre 60-70%.

Para realizar el experimento se utilizaron plantas de banano de la variedad Williams de dos meses de crecimiento, provenientes de sistemas *in vitro* de la Universidad Católica de Oriente. Para el montaje del experimento fue preparado un inóculo de *R. solanacearum* a una concentración aproximada de 10⁸ Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL obtenida por medición de densidad óptica (DO) por medio de espectrofotometría (0.1 a 600 nm). El inóculo de la bacteria fue aplicado en la parte media del pseudotallo de las plantas de banano de 3 meses y a cada planta se le inyectó un volumen aproximado de 1 mL de inóculo. Posteriormente, se hizo un seguimiento del progreso de la sintomatología para determinar el grado de virulencia de las cepas. Para estos se determinó como

variable de respuesta la clorosis y el marchitamiento de las hojas en el tiempo. Los datos obtenidos fueron usados para determinar el porcentaje de hojas con el síntoma y fue comparado con el número de hojas totales de la planta. Finalmente, se determinó el área bajo la curva (ABC) del porcentaje de los síntomas de clorosis y marchitamiento para cada aislado. Posterior a esto, se realizó un análisis de varianza ANOVA con el software Statgraphics Centurión XV ® con un nivel de confianza del 95%. Como control negativo se utilizó agua destilada estéril (ADE) y como control positivo *R. solanacearum* EAP009 (Moncada, 2014).

Al final del experimento se realizó el reisolamiento de las cepas de las plantas afectadas, para determinar si *R. solanacearum* era el agente causal de los síntomas evaluados.

Debido a que en el proceso de caracterización de aislados de *R. solanacearum* no se encontraron diferencias en la virulencia entre los aislados nuevos y la cepa utilizada como control positivo, se seleccionó la cepa EAP009 para continuar con la estandarización del microcosmo del siguiente objetivo.

El interés de esta cepa es que ya había sido evaluada en otros modelos de invernadero y permitía comparar los resultados a nivel de microcosmos.

3.6. EVALUACIÓN DEL TIPO DE SUSTRATO SOBRE EL TAMAÑO DE POBLACIÓN DE *R. solanacearum*

Con este objetivo se pretendió establecer un modelo para evaluar a *R. solanacearum* en un sistema similar al suelo que simulara unas condiciones más aproximadas a las de invernadero y campo, cambiando el sistema en medio líquido comúnmente usado por un sistema de microcosmos de suelo (van Elsas *et al.*, 2000).

Previo a la evaluación del tamaño de población de *R. solanacearum* en los diferentes sustratos, se realizaron pruebas preliminares de detección de la cepa *R. solanacearum* EAP009 y AW1 (resistente al ácido nalidíxico), en suelo estéril y no estéril, buscando estandarizar una forma adecuada y efectiva para detectar a *R. solanacearum* en el tiempo, concluyendo qué, cuando se trabaja con suelo no estéril y con la cepa EAP009, la detección del patógeno se dificulta debido a la presencia de microorganismos antagonistas (datos no

mostrados). Basados en lo anterior se decidió trabajar con suelo estéril y con la cepa *R. solanacearum* AW1, para asegurar la detección constante de la bacteria en el tiempo en un medio con ácido nalidíxico que garantizara el crecimiento únicamente de ésta bacteria. Además estas condiciones permitían asegurar que la reducción de la población de *R. solanacearum* si fuera reducida por el tratamiento evaluado.

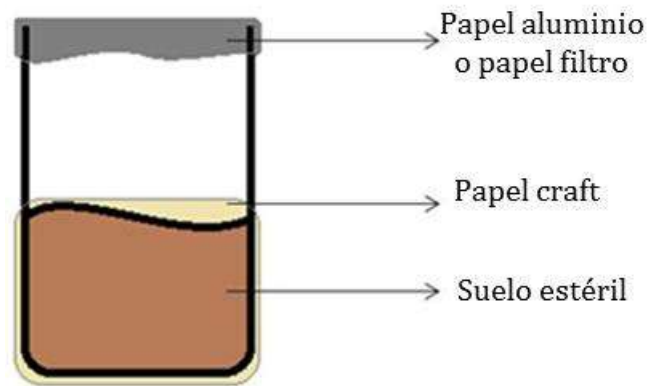
Para determinar el efecto del tipo de suelo sobre el tamaño de población de *R. solanacearum* AW1 se emplearon tres sustratos diferentes: Sustrato 1 (sustrato de germinación Tierra Negra®, cuya caracterización se encuentra en el Anexo 3), Sustrato 2 (Arena 50%v/v + Cisco 50%v/v) y Sustrato 3 (sustrato de germinación Tierra Negra® 70%v/v + Arena 30%v/v). Los microcosmos se prepararon con 50 g de cada sustrato seco estéril (3 veces) en envases de vidrio de 250 mL a los cuales se les adicionaron 5 mL de solución bacteriana a una concentración aproximada de 10^5 UFC/mL y fueron bien homogenizados en el sustrato. Posteriormente se realizaron muestreos en el tiempo cero, cinco, diez, quince, treinta y sesenta días posteriores a la inoculación (DPI).

Para los muestreos se hizo un aislamiento a partir de suelo modificando la metodología descrita por J. A. Álvarez y colaboradores en el 2008. Se adicionaron 10 g de suelo a 100 mL de Buffer fosfato 1M (pH de 7.2) en un recipiente con capacidad de 250 mL con esferas de vidrio de 0.5 mm de diámetro. Las muestras fueron agitadas a 200 rpm por media hora y puestas por 10 minutos en ultrasonido (a 25°C), con el fin de homogenizar las células adheridas al suelo (Moncada, 2014). A partir de la solución resultante se realizaron las diluciones seriadas y la siembra en medio de cultivo SMSA, similar al aislamiento desde tejido descrito en el numeral 3.4.

Se registraron los datos de UFC/g suelo en el tiempo para determinar el tamaño de población de la cepa *R. solanacearum* AW1 en los diferentes sustratos evaluados. A partir de estos datos se estableció el área bajo la curva (ABC) de la concentración en el tiempo. Estos datos fueron analizados con una ANOVA simple con el software Statgraphics Centurión XV ® con un nivel de confianza del 95%, determinando si existen diferencias significativas entre ellos.

Los microcosmos de suelo se mantuvieron al 60-70% de su máxima capacidad de retención de humedad MCRH (Anexo 1) bajo condiciones controladas de temperatura (30°C) por medio de un termostato en un cuarto cerrado e iluminación (12 horas luz- 12 horas oscuridad) con un temporizador, manteniendo la fase sólida cubierta con papel craft y dejando un espacio de aire para simular las condiciones reales. Además se taparon con papel aluminio para evitar la contaminación del sistema (Figura 1).

Figura 1. Esquema del modelo de microcosmos empleado para las evaluaciones. Para la evaluación de sustratos se cubrió con papel aluminio y para el efecto de la tetraciclina sobre *R. solanacearum* con papel filtro.



3.7. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TETRACICLINA SOBRE EL TAMAÑO DE POBLACIÓN DE *R. solanacearum*

Para determinar si el modelo estandarizado del anterior objetivo podría servir para evaluar productos para el control de *R. solanacearum* se puso a prueba con un antibiótico usado en cultivos comerciales. El antibiótico seleccionado fue la tetraciclina que ha sido usada en algunos países para el control de *R. solanacearum* (Farfán and Hoyos, 2009). Antes de comenzar la evaluación del antibiótico, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) a nivel *in vitro* y luego basándose en estos resultados se evaluaron diferentes concentraciones de la tetraciclina a nivel de microcosmos, como se explica a continuación

3.7.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de la tetraciclina contra *R. solanacearum*

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI, concentración a la cual se inhibe el 100% el crecimiento de la bacteria) del antibiótico tetraciclina contra *R. solanacearum* AW1 se emplearon platos de Elisa preparados así: control absoluto con 50 μ L inóculo *R. solanacearum* AW1 a una concentración de 10^6 UFC/mL en medio BG y 50 μ L de medio BG, blanco con 100 μ L de medio BG) y las diferentes concentraciones del

antibiótico con 50 µL de inóculo de *R. solanacearum* AW1 y 50 µL de solución con antibiótico en medio BG. A cada pozo del plato de Elisa se le añadió un volumen total de 100 µL, para lo cual las concentraciones finales evaluadas del antibiótico fueron: 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 ppm (Wiegand *et al.*, 2008). Los platos se dejaron en incubación por 36 horas a 26°C y se determinó la CMI por DO a 595 nm en un lector de Elisa (Bio Rad iMark™) calculando los porcentajes de inhibición por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{DO_{CAB} - DO_{tto}}{DO_{CAB}} * 100$$

Ecuación 1. Cálculo del porcentaje de inhibición obtenido para las diferentes concentraciones del antibiótico por medio de datos de densidad óptica

Dónde:

DO_{CAB} : Densidad óptica del control absoluto medida a 595nm

DO_{tto} : Densidad óptica del tratamiento medida a 595nm

3.7.2. Efecto de la tetraciclina sobre la población de *R. solanacearum* en microcosmos de suelo.

El efecto de la tetraciclina en los microcosmos de suelo fue realizada mediante la metodología de van Elsas y colaboradores en el 2000. Para esto se prepararon microcosmos con 50 g de sustrato seco estéril (3 veces) en envases de vidrio de 250 mL, a los cuales se les adicionó el antibiótico disuelto en 15 mL de solución acuosa y metanol (5:1 v/v), evaluando tres concentraciones: C1 correspondiente a 1000 ppm, C2 correspondiente a 2500 ppm, C3 correspondiente a 5000 ppm y CAB correspondiente a 0 ppm (control positivo). Los sustratos se homogenizaron con el líquido adicionado y se pusieron a secar a 30°C. En el momento en que perdieron 2.5 g debido a la evaporación del agua, se adicionaron 5 mL de inóculo de *R. solanacearum* a una concentración final aproximada de 10⁴ UFC/g. Los microcosmos fueron mantenidos a las mismas condiciones de temperatura, iluminación y humedad relativa mencionadas anteriormente y los envases estuvieron tapados con papel filtro de 125 µm para el intercambio entre el exterior y el interior del microcosmos. El tamaño de población de la bacteria fue evaluada en el tiempo, mediante la metodología del objetivo anterior (numeral 3.6). Las mediciones del tamaño de la población en el tiempo fueron evaluados desde el tiempo cero y

siguiendo con periodos de cada dos y tres días, durante los primeros 15 días y luego por periodos de 15 y 30 días durante 4 meses.

Para el análisis estadístico, se registraron los datos de UFC/g suelo en el tiempo para determinar el tamaño de población de la cepa *R. solanacearum* AW1 bajo las diferentes concentraciones de tetraciclina evaluadas. Estos datos fueron utilizados para determinar el ABC de la concentración de la bacteria en el tiempo y posteriormente fueron analizados con el software Statgraphics Centurión XV® con un nivel de confianza del 95% para establecer diferencias significativas entre las concentraciones de tetraciclina evaluadas. El control absoluto del experimento fue la aplicación de la cepa *R. solanacearum* AW1.

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de ABC del porcentaje de aparición de síntomas de clorosis y marchitamiento, la concentración en el tiempo en los sustratos y la concentración en el tiempo bajo el efecto de la tetraciclina fueron analizados estadísticamente por medio de un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% en el software Statgraphics Centurion XV®. Los supuestos se verificaron obteniendo los valores-P de diferentes pruebas; el supuesto de normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, el de igualdad de varianza por medio del test de Levene, la normalidad de datos por el método gráfico de residuos vs número de fila y la diferencia entre las medias de los tratamientos por medio del test de rangos múltiples por el método LSD.

4. RESULTADOS

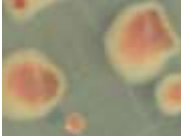





4.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *R. solanacearum*

Los resultados de aislamiento y caracterización de los aislados de *R. solanacearum* permitieron obtener 6 cepas a partir de muestras de tejido de plantas enfermas enviadas de la zona de Urabá y Santa Marta. Estas fueron identificadas por pruebas morfológicas y moleculares. Dentro de la colección se encontraron diferentes morfologías en medio BGTA y se clasificaron en tres morfotipos diferentes; el primero (M1) con forma irregular, borde redondeado, elevación convexa/planoconvexa, consistencia mucosa y color rojo medio/rojo intenso. El segundo morfotipo (M2) con forma circular, borde redondeado, elevación convexa, colonias pequeñas, levemente mucosas y color rojo medio/rojo intenso y el tercer morfotipo (M3) con forma irregular, borde ondulado, elevación convexa, colonias pequeñas, no mucosas y rojas intensas. Se observó además que el tiempo en el que se apreciaba de forma definida y significativa las colonias (tiempo de aparición de las cepas) de la morfología M1 y M2 era de 2 días mientras que la del M3 era de 3 días. En la Tabla 1 se muestran las morfologías observadas con sus respectivas características y el origen del aislamiento. Todos los aislados fueron positivos a la prueba molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica para *R. solanacearum*.

En la Tabla 1 también se puede evidenciar el tamaño de los bacilos, siendo menor el de la cepa EAP023 con un promedio de $1.305 \mu\text{m} \pm 0.106$ y el mayor el de la cepa EAP018 con un tamaño promedio de $3.223 \mu\text{m} \pm 0.415$. Se comprobó que todos los aislados eran Gram negativos realizando las pruebas microbiológicas de KOH y Gram (datos no mostrados).

Tabla 1. Procedencia y morfología de los aislados en diferentes medios de cultivo.

^a Localización de las fincas ubicadas en la zona de Urabá y Magdalena a partir de las cuales se realizaron los aislamientos de *R. solanacearum*. ^b Muestra enviada de plantas de banano enfermas para el aislamiento. La morfología fue determinada pasados 4 días después de siembra en medio BGTA.

Localización ^a		Muestra ^b	Bacteria aislada	Morfotipo	Tamaño bacilo (µm)	Morfología BGTA
Urabá, Apartadó	Finca Praga	Tejido-Cormo	EAP017	M1	1.883 ± 0.103	
Urabá, Municipio de Carepa,	Finca Jaracanada	Tejido-Cormo	EAP018	M2	3.225 ± 0.415	
Urabá - Proban, Uniban	Finca La Lucha	Tejido-Rizoma	EAP019	M1	1.960 ± 0.010	
Urabá, Municipio de Carepa,	Finca Tailandia	Tejido-Cormo	EAP020	M3	1.576 ± 0.139	
Magdalena	Finca María Luisa	Tejido-Rizoma	EAP022	M1	1.595 ± 0.094	
Magdalena	Finca Isabel	Tejido-Rizoma	EAP023	M2	1.305 ± 0.106	

Por otra parte, la morfología de los diferentes aislados determinada en medio sólido BGA y TSA suplementado al 1% con sacarosa no mostraron diferencias morfológicas como si se evidenció en BGTA.

Los aislados fueron registrados en el cepario de la Universidad EAFIT y se les asignaron los siguientes códigos: EAP017, EAP018, EAP019, EAP020, EAP022 y EAP023.

4.2. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

Los resultados de aparición de la marchitez permitieron observar que 5 DPI el aislado EAP019 presentaba un porcentaje del 78.6% de marchitez, siendo más alto que el control positivo (EAP009) con un porcentaje de 54.5 (Figura 2A). Las cepas EAP017 y EAP022 en ese mismo periodo de tiempo sólo mostraban un 12.5% de marchitez y las demás no presentaban síntomas. A pesar de estas diferencias en el desarrollo de la sintomatología en los primeros 5 días, al final del experimento (21 días) todas las plantas alcanzaron un 100% de marchitez, a excepción de la EAP018 (baja sintomatología) y del control negativo agua. Estadísticamente, la cepa EAP009 y EAP019 no presentaron diferencias significativas entre ellas, pero sí con los demás tratamientos en la marchitez de la planta, con un nivel de confianza del 95% (Tabla 2). Los valores de ABC de los datos de marchitez para la EAP019 fueron de 1785.31 y para la EAP009 de 1660.03, mientras que para la cepa EAP018, cepa con la más baja sintomatología en todo el experimento, sólo obtuvo un valor de 172.87.

Para el síntoma de clorosis, a los 5 DPI se obtuvieron porcentajes de 78.6%, 60.7%, 37.5%, 28.1%, 21.9%, 12.5% y 12.5% para los tratamientos EAP019, EAP009, EAP017, EAP023, EAP022, EAP020 y EAP018, respectivamente. Al final de la evaluación los cuatro primeros tratamientos alcanzaron el 100% de clorosis, mientras que los tratamientos de la EAP022 y EAP020 alcanzaron un 93.8% y la EAP018 un 36.8% (Figura 2B). Estadísticamente, las cepas EAP009, EAP019, EAP017 y EAP022 tuvieron diferencias en la sintomatología de clorosis con los demás aislados, incluyendo el control agua con un nivel de confianza del 95%, con valores de ABC de 1085.31, 1172.25, 920.34 y 892.76 respectivamente, mientras que para la EAP018 se obtuvo un valor de 225.33, el valor más bajo del ABC de marchitez en comparación con los demás tratamientos. El control agua fue negativo para las variables de respuesta evaluadas.

En la Figura 2 se muestran las mediciones de marchitez y clorosis durante los 21 días de evaluación del experimento. La Figura 2A muestra las diferencias en la aparición del síntoma de marchitez de las cepas evaluadas. En ésta puede apreciarse que la cepa EAP018 no causó marchitez completa (100%) de la planta durante el tiempo evaluado, evidenciando así una diferencia de patogenicidad con las demás. En la Figura 2B se muestran las diferencias en la aparición de los síntomas de clorosis de las cepas evaluadas y en ésta puede apreciarse que, similar al síntoma de marchitez, la cepa EAP018 tampoco

logra causar clorosis completa en la planta. Además, puede observarse que las cepas EAP020 y EAP023 sólo alcanzan un 90% del síntoma de clorosis al final del tiempo de evaluación (21 días).

Figura 2. Comportamiento en el tiempo de los síntomas de marchitamiento y clorosis en banano para todos los aislados de *R. solanacearum*. Porcentaje del avance de los síntomas causados por los aislados de *R. solanacearum*. **A.** Síntoma de marchitez, **B.** Síntoma de clorosis mostrado por las hojas de las plantas de banano cv Williams luego de ser infectadas con las cepas evaluadas. Control positivo cepa EAP009 y control negativo ADE.

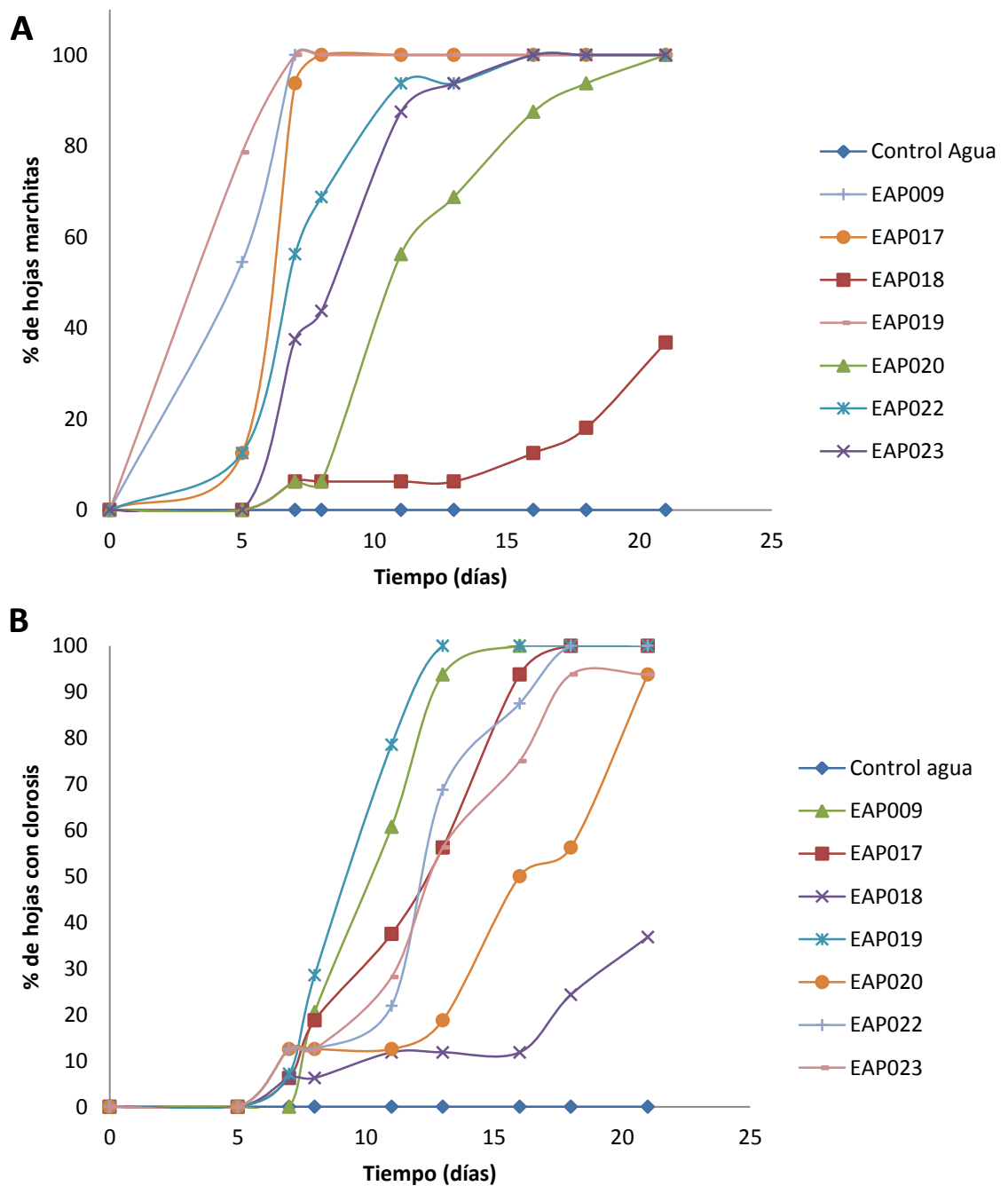


Tabla 2. Prueba de rangos múltiples para el ABC de los síntomas de clorosis y marchitamiento de las cepas de *R. solanacearum* en el tiempo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores de ABC para cada síntoma y aislado de *R. solanacearum* (valor- $P_{\text{clorosis}} = 0.0001$ y valor- $P_{\text{marchitez}} = 0.0000$), mediante la prueba LSD con un nivel de confianza del 95%.

Tratamiento	ABC	
	Marchitamiento	Clorosis
Agua	0.0 (a)	0.0 (a)
EAP018	172.87 (a)	225.33 (ab)
EAP020	933.25 (b)	520.44 (b)
EAP023	1208.28 (bc)	820.76 (c)
EAP022	1345.85 (cd)	892.37 (cd)
EAP017	1443.57 (cd)	920.34 (cd)
EAP009	1660.03 (de)	1085.31 (cd)
EAP019	1785.31 (e)	1172.25 (d)

El desarrollo de la sintomatología mediante fotografías en el tiempo de la cepa EAP019 comparado con el control negativo se pueden apreciar en la Figura 3. Las fotos evidencian los síntomas de marchitez y clorosis a través del tiempo, hasta la muerte final de la planta en los 16 días de evaluación del experimento. Esta bacteria se destacó como la más virulenta junto con el control positivo EAP009.

Figura 3. Plantas de banano infectadas con la cepa *R. solanacearum* EAP019. ^a Se ilustra el avance de los síntomas de la enfermedad en plantas de banano cv Williams en diferentes DPI con la cepa EAP019. ^b Control con ADE empleado durante el ensayo.



En la etapa final del experimento se reaislaron las cepas de las plantas infectadas y se confirmó que todas las plantas tenían la misma morfología de las cepas de *R. solanacearum* inoculadas al inicio del experimento. Esto se hizo para cumplir los postulados de Koch y asegurar que la enfermedad causada fue a causa de estos microorganismos y no por factores externos u otros agentes (Anexo 2).

4.3. TAMAÑO DE LA POBLACIÓN DE *R. solanacearum* EN DIFERENTES SUSTRATOS

Para evaluar el cambio del tamaño de la población de *R. solanacearum* AW1 en los tres sustratos estériles se partió de una concentración aproximada de 1.0×10^5 UFC/mL. Los resultados evidencian un incremento del crecimiento de la población en los primeros 5 días con tamaños de 1.1×10^8 UFC/mL, 2.6×10^8 UFC/mL y 4.4×10^8 UFC/mL para el Sustrato 1, Sustrato 2 y Sustrato 3 respectivamente (Figura 4). Esto se mantuvo relativamente constante hasta el final de la evaluación, terminando en un valor promedio de 1.35×10^8 UFC/mL. De acuerdo a los datos obtenidos de ABC del tamaño de la población de *R. solanacearum* AW1 en el tiempo, se evidencia que la bacteria puede mantenerse en un tamaño de población alto en cualquiera de los tres sustratos evaluados, durante 60 días (Tabla 3).

Figura 4. Variación de la concentración de *R. solanacearum* AW1 en los sustratos evaluados. Comportamiento de la supervivencia de la cepa AW1 en microcosmos de suelo en los diferentes tratamientos. Sustrato 1 corresponde a 100% Suelo de germinación de vivero Tierra Negra®, el Sustrato 2 a 50% Cisco + 50% Arena y el Sustrato 3 a 30% Arena + 70% Suelo de germinación de vivero Tierra Negra®. Las barras verticales corresponden al error estándar para cada tratamiento con n=3.

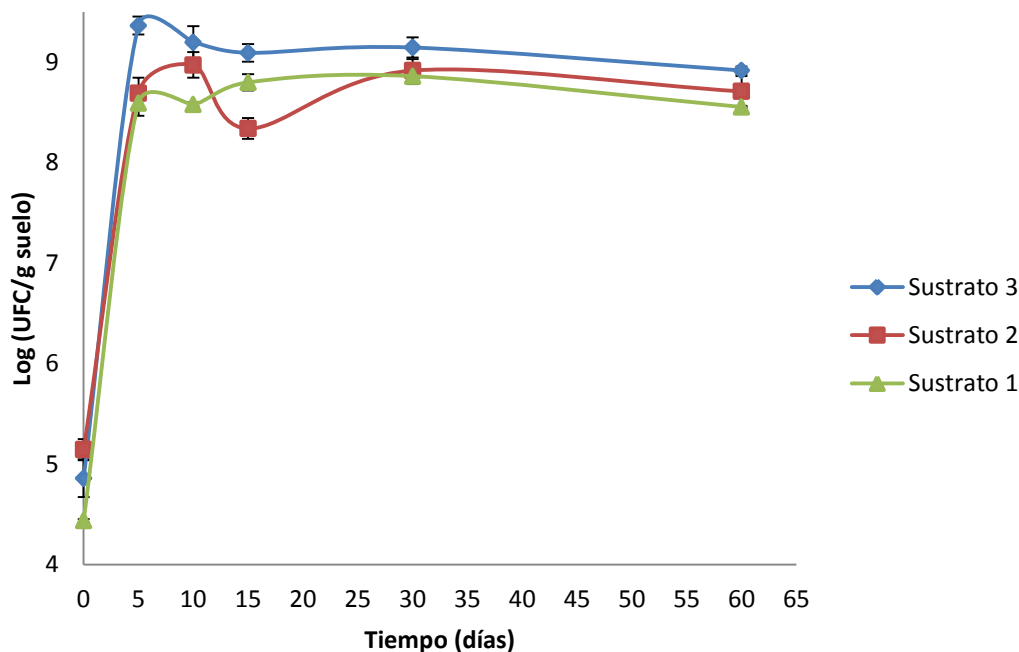


Tabla 3. Grupos homogéneos obtenidos para el ABC de la concentración en el tiempo de las cepas de *R. solanacearum* en los sustratos evaluados. Las letras mostradas evidencian que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores de ABC para cada sustrato (valor-P=0.2952), mediante la prueba LSD con un nivel de confianza del 95%.

Sustrato	ABC
1	482.831(a)
2	464.178(a)
3	506.732(a)

Los resultados evidencian que no hay diferencias significativas entre los tres sustratos evaluados (Tabla 3). Por lo tanto, se decidió seguir los experimentos con el Sustrato 1 que corresponde a un 100% suelo de germinación de vivero Tierra Negra®, debido a que este tiene condiciones similares a los suelos donde se desarrollan las plantas de banano.

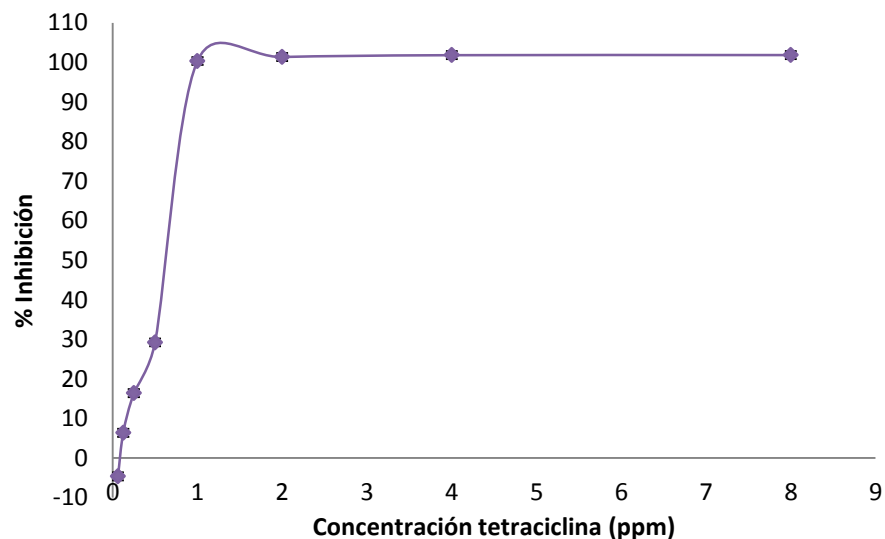
4.4. EFECTO DE LA TETRACICLINA SOBRE *R. solanacearum* AW1

Para evaluar el potencial del modelo estandarizado de microcosmos se evaluó el efecto de la tetraciclina sobre el tamaño de la población de *R. solanacearum* AW1. Las concentraciones evaluadas fueron determinadas a partir de la CMI *in vitro* y de las concentraciones usadas en los productos comerciales.

4.4.1. Concentración mínima inhibitoria de *R. solanacearum* AW1 en medio líquido BG

Los resultados de la CMI de la tetraciclina contra *R. solanacearum* fueron realizados a nivel *in vitro* en medio líquido BG. La Figura 5 muestra las diferentes concentraciones evaluadas para determinar la CMI. En el eje X se presentan los valores de tetraciclina evaluados (0.0625 ppm a 8 ppm) y el eje Y se muestra el porcentaje de inhibición como variable de respuesta. Los resultados permitieron determinar que la concentración a la cual se inhibía el 100% del patógeno era de 1 ppm. A partir de esta concentración se aproximó las concentraciones de trabajo para utilizarse en el sistema de microcosmos.

Figura 5. Porcentaje de inhibición de la cepa *R. solanacearum* AW1 a partir del antibiótico tetraciclina en medio de cultivo líquido BG a nivel *in vitro*. Los datos fueron calculados a partir de mediciones de la DO de los pozos en un lector Elisa a 595 nm. Se presenta el error estándar con n=6.



4.4.2. Evaluación de tetraciclina en microcosmos de suelo

El cambio en el tamaño de población de *R. solanacearum* AW1 bajo el efecto de las diferentes concentraciones de tetraciclina fue evaluado durante un período de 103 días. Los resultados permitieron establecer que después de 7 DPI, los tratamientos de C2 (2500 ppm) y C3 (5000 ppm) mostraron una inhibición del 100% el crecimiento de la bacteria. Sin embargo para el 10 DPI se comenzó a evidenciar un aumento en la población bacteriana en el tratamiento C2 pasando de 0 UFC/g suelo a 1.16×10^7 UFC/g de suelo. Estos mismos resultados se pudieron evidenciar a los 17 DPI en el tratamiento C3 donde la bacteria pasó desde una concentración de 0 UFC/g suelo a 1.83×10^7 UFC/g de suelo. A los 24 días del montaje del experimento se pudo evidenciar que todos los tratamientos (incluyendo el control) tenían una alta concentración de la bacteria con un promedio 5.18×10^8 UFC/g de suelo (Figura 6).

Los datos de ABC de concentración de *R. solanacearum* en el tiempo encontrados durante la evaluación fueron de 129.23 para el control agua, 90.54 para el tratamiento C1, 91.49 para el tratamiento C2 y 67.28 para el tratamiento C3 (Tabla 4). A partir de estos datos, se determinó que el tratamiento C3 tiene una diferencia significativa respecto al CAB (control positivo agua), sugiriendo que esta concentración de antibiótico pudo haber afectado el tamaño de la población de la cepa AW1. Sin embargo la tetraciclina no fue capaz de limitar el crecimiento de *R. solanacearum* AW1 hasta finalizar el tiempo de evaluación en las tres concentraciones evaluadas.

Figura 6. Efecto de las tres concentraciones de tetraciclina evaluadas sobre el tamaño de población de *R. solanacearum* AW1. Los tratamientos evaluados fueron CAB = ADE, C1 = 1000 ppm, C2 = 2500 ppm y C3 = 5000 ppm. Las barras verticales corresponden al error estándar para cada tratamiento con n=3.

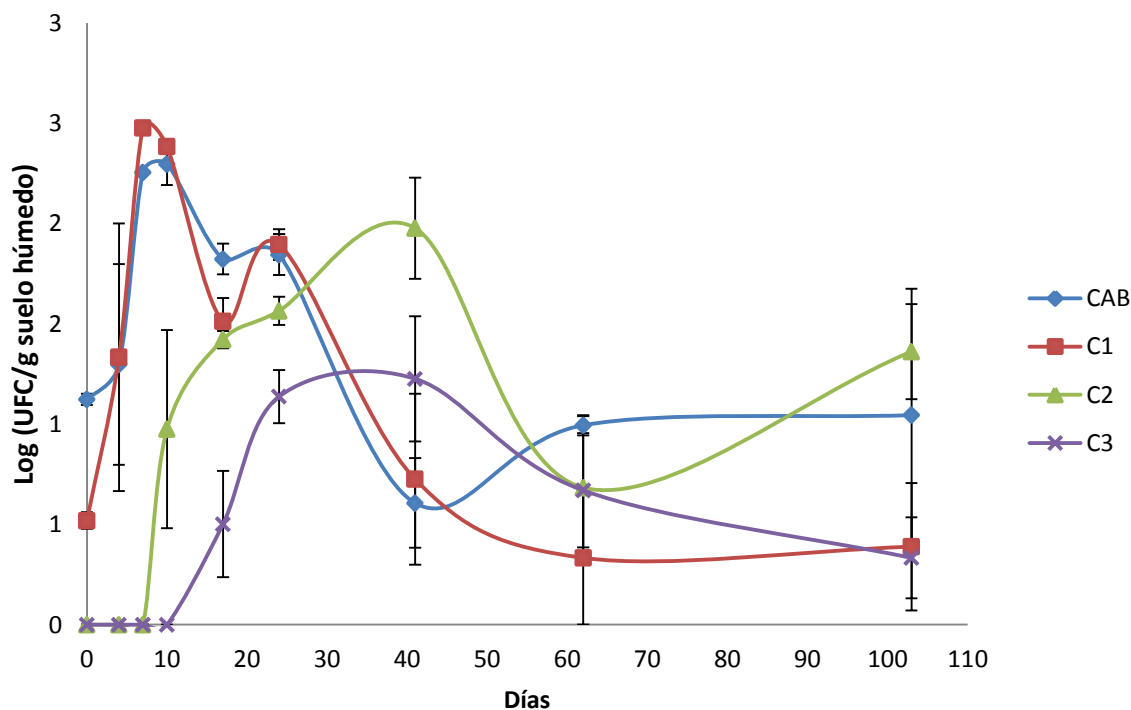


Tabla 4. Grupos homogéneos obtenidos para el ABC del tamaño de población de *R. solanacearum* en el tiempo bajo el efecto de diferentes concentraciones de tetraciclina. Las letras mostradas evidencian que hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores de ABC entre C3 y CAB (control positivo), mediante la prueba LSD con un nivel de confianza del 95%. Valor-P=0.1429.

Tratamiento	ABC
CAB	129.232 (a)
C1	90.5371 (ab)
C2	91.4859 (ab)
C3	67.2757 (b)

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

R. solanacearum es el agente causal de la enfermedad del Moko y ataca diversos cultivos de importancia agrícola como el banano y plátano. Actualmente no existe ningún método de control que ataque a esta bacteria directamente y ayude a reducir los tiempos de cuarentena de los focos de infección. Aunque existen investigaciones evaluando productos químicos y biológicos para el control de este patógeno a nivel de suelo, la mayoría de éstas se desarrollan en medios de cultivo a nivel *in vitro*. Por lo tanto, se requieren investigaciones que estandaricen nuevos métodos para la evaluación de estos productos en sistemas similares a la matriz de suelo. Por esta razón, este trabajo tuvo como objetivo estandarizar un modelo a nivel de microcosmos para evaluar el efecto del sustrato y un antibiótico sobre el tamaño de la población de *R. solanacearum*. Los resultados evidenciaron que bajo el sistema estandarizado es posible determinar el efecto de cualquier producto químico o biológico sobre el tamaño de la población de la bacteria.

Durante la fase inicial del proceso de estandarización del modelo, se tuvo como objetivo la búsqueda de una cepa virulenta. Esto permitió obtener una colección de 6 aislados de *R. solanacearum* con diferencias morfológicas en medio BGTA (medio con sal de tetrazolio que evidencia un color rojo en la colonia) (Tabla 1). Los 6 aislados fueron clasificados en tres morfologías diferentes: El morfotipo 1 (M1) se agrupó por similitud con la cepa típica reportada en la literatura (forma irregular, halos grandes y beige y centro rojo y mucoide) (Chandrashekar *et al.*, 2012; James *et al.*, 2003; Ocho, 2006; Sullivan *et al.*, 2013). Mientras que los aislados del morfotipo 2 (M2) y 3 (M3) se caracterizaron por ser colonias atípicas, con un tamaño de colonia pequeño (redondas), menos fluidas, halo pequeño y un centro de color rojo intenso. Estas diferencias morfológicas entre los aislados podrían estar relacionadas con el tipo de secuevar asociado a plantas de banano (3, 4, y 6). Cardozo y Rodríguez en el 2009 establecieron que las cepas de Santa Marta pertenecían al secuevar 6, mientras que las de Urabá al secuevar 4. Los dos morfotipos encontrados en la zona de Urabá podrían aportar evidencia de la presencia de ambos secuevares en esta zona.

Los cambios en la morfología de las cepas también obedecerían a diferencias en la virulencia de la cepa en ciertos hospederos. Zheng y colaboradores en el 2014 mostraron que las diferencias morfológicas de los aislados de *R. solanacearum* de plantas de tomate estaba asociado al grado de virulencia de las cepas: 1) virulentas, con colonias irregulares,

fluidas, centro rosa y amplia periferia blanquecina 2) intermedias, con colonias inmóviles, centro rojo con estrecha periferia blanquecina y 3) no virulentas, con colonias redondas, secas, inmóviles, con centro rojo y con periferia blanquecina nula. Las características morfológicas reportadas por estos autores para cada tipo patogénico, coinciden con las obtenidas en este trabajo, sugiriendo que las de morfotipo M1 pueden ser cepas virulentas, y las del morfotipo M2 y M3, cepas de virulencia intermedia o nula. Esto fue evidenciado en la prueba de virulencia realizada, donde las cepas mostraron diferencias en el desarrollo de la enfermedad. Los aislados EAP018 (M3), EAP020 (M2) y EAP023 (M2) fueron los de menor virulencia, presentando diferencias significativas con respecto a la cepa control EAP009 y EAP019 (M1) ($p < 0.05$) para el síntoma de marchitez, sugiriendo que hay una relación entre la morfología exhibida en BGTA y la virulencia de las cepas.

La relación de la morfología y la virulencia también podría estar asociada a la cantidad de ex polisacárido producido por la cepa, ya que este compuesto es el factor de virulencia más importante para la cepa (Clough *et al.*, 1997). En este trabajo se pudo establecer que las cepas con menor halo eran menos virulentas. Estas diferencias encontradas en el tamaño del halo podrían estar relacionadas con la producción del EPS de la cepa y explicar porque las cepas del morfotipo M2 y M3 (halos pequeños) fueron menos virulentas que el morfotipo M1.

Por otra parte, la estandarización del sistema de microcosmos presentó ciertas limitaciones para la detección de las cepas nativas de *R. solanacearum* en sustratos no estériles. Esto se puede explicar por la presencia de metabolitos antibacterianos provenientes de otras bacterias, que limitan la detección de la bacteria a nivel *in vitro*. Para solucionar este problema y garantizar que el efecto de los tratamientos fuera realmente los factores causales de la reducción de la población de *R. solanacearum* en el microcosmos, se decidió usar una cepa marcada al antibiótico Ácido Nalidíxico (AW1) y sustratos estériles. Aunque este nuevo sistema no simularía las condiciones reales del suelo, podría ser un buen modelo para evaluar productos en matrices similares al suelo, en vez de medios de cultivo. Este inconveniente se ha apreciado en diversas técnicas de evaluación de agentes de control biológico (Messiha *et al.*, 2009; Poussier *et al.*, 2002; Pradhanang *et al.*, 2000), pues la presencia de la microbiota del suelo reduce significativamente el tamaño de la población del patógeno de interés.

El sistema establecido anteriormente permitió evaluar el efecto de tres tipos de sustratos sobre el tamaño de la población de *R. solanacearum* en el tiempo. Los resultados del tipo de sustrato evidenciaron que no hubo diferencias en el tamaño de la población de la cepa

AW1 durante todo el periodo de evaluación (60 días). Esto posiblemente se deba a las condiciones de trabajo y los tipos de sustratos trabajados, los cuales favorecieron el desarrollo de la bacteria. Resultados similares en cuanto al comportamiento de la población en microcosmos de suelo, bajo condiciones estériles, fueron reportados por López y colaboradores en 1999. Los autores pudieron observar que la concentración de *Xhantomonas campestris*, en suelo estéril se mantuvo alta durante el tiempo de evaluación (20 días) mientras que cuando se trabajó con suelo no estéril esta variable disminuía drásticamente.

Los sustratos evaluados también permitieron un buen crecimiento de la cepa AW1 en los microcosmos pasando de una concentración de 1.0×10^5 UFC/g de suelo hasta una escala de 10^8 . Estas altas concentraciones de biomasa obtenidas, pueden atribuirse al sistema cerrado y a la carencia de competidores por ser un sistema estéril (Álvarez *et al.*, 2010). Sin embargo, los sistemas estériles tienen la ventaja de permitir asegurar que el efecto sea por el tratamiento aplicado y evita que los efectos sean confundidos con otros factores externos en el experimento (López *et al.*, 1999). Otra ventaja de los sistemas estériles es que permite que el compuesto evaluado no se degrade fácilmente en el suelo. Por ejemplo, Grenni y colaboradores en el 2012 mostraron que la reducción de diferentes compuestos químicos en suelo no estéril se da aproximadamente cuatro veces más rápido que en suelo estéril.

La tetraciclina fue escogida para establecer el potencial del microcosmos como técnica de tamizaje para evaluar agentes de control contra patógenos del suelo. Las concentraciones para evaluar en el microcosmos fueron establecidas de acuerdo a la CMI de la tetraciclina obtenida en platos de Elisa y correspondieron a valores de 1000 ppm, 2500 ppm y 5000 ppm. Estas fueron seleccionadas porque en valores menores a 1000 ppm el antibiótico no mostraba ningún efecto en la población (datos no mostrados). Los resultados del efecto de la tetraciclina sobre el tamaño de la población evidenciaron que el microcosmos estandarizado podría ser un buen método para evaluar el efecto de algunos productos para el control de *R. solanacearum* en suelo, ya que se pudo observar cambios en el tamaño de la población de los tratamientos respecto al control durante el tiempo. En el modelo se pudo evidenciar que la tetraciclina fue capaz de inhibir en un 100% la bacteria con los tratamientos C2 (2500 ppm) y C3 (5000 ppm) en los primeros 10 días de evaluación. Sin embargo, a partir del 10 DPI y del 17 DPI se comenzó a evidenciar una reaparición de la bacteria en el tratamiento C2 y C3 respectivamente. Estos resultados pueden explicarse por dos hipótesis: 1) que la bacteria generó resistencia al antibiótico o 2) el mecanismo de acción del antibiótico es bacteriostático.

La resistencia al antibiótico tetraciclina se ha venido estudiando debido a la aparición de cepas resistentes y a la complicación que este asunto conlleva en el uso final del mismo, que va desde el tratamiento de enfermedades infecciosas en humanos y animales hasta el tratamiento de aguas residuales y en la agricultura (Griffin *et al.*, 2011; He *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014; Stockwell and Duffy, 2012; Xu *et al.*, 2007). A la fecha se han caracterizado hasta 530 especies de bacterias resistentes de tetraciclina (TRB por sus siglas en inglés) y 41 tipos de genes responsables de la resistencia a este antibiótico (Li *et al.*, 2013), siendo identificado para *R. solanacearum* uno de estos genes de acuerdo a la base de datos de genes resistentes a antibióticos (Antibiotic Resistant Genes Database (ARDB), n.d.). Aunque para la cepa *R. solanacearum* AW1, no se realizó ninguna prueba molecular para identificación de alguno de estos genes, queda la hipótesis de la generación de resistencia por parte de la cepa trabajada como explicación al comportamiento mostrado bajo las diferentes concentraciones de tetraciclina.

La segunda hipótesis que podría explicar el crecimiento repentino de la bacteria luego de haberse inhibido en un 100% estaría relacionado con un mecanismo de acción bioestático mas no biotóxico, por la cual hasta el 7 DPI y 10 DPI (tiempos donde comenzó a aumentar la población de nuevo), una cantidad de la bacteria pudo haber permanecido en un estado latente, efectuando su respiración mediante la oxidación de fuentes de energía interna (Stockwell and Duffy, 2012; Thiele-Bruhn and Beck, 2005) y para este tiempo la biodisponibilidad del antibiótico se habría reducido debido a su adsorción en el suelo, dando como resultado que la concentración fuera tolerada por parte del microorganismo. Este fenómeno de adsorción y disminución de la biodisponibilidad de la tetraciclina fue observado por Thiele-Bruhn & Beck (2005), cuando evaluaron en diferentes tipos de suelo el efecto de diferentes concentraciones de tetraciclina sobre la diversidad microbiana, concluyendo que para el día 14, la tetraciclina es adsorbida en su totalidad por el suelo.

La implementación de modelos de microcosmos como técnica certificada por el ICA para evaluar productos químicos y biológicos contra patógenos del suelo es de gran urgencia en el país. Especialmente con patógenos del suelo como *R. solanacearum* y *F. oxysporum* que amenazan la sostenibilidad de los cultivos de banano y plátano en Colombia. Los microcosmos son modelos sencillos y económicos para evaluar el efecto de diferentes productos en el desarrollo de patógenos en un ambiente dado. Estos sistemas permiten realizar tamizajes de diferentes compuestos antes de evaluaciones en invernadero o campo, la cuales son costosas y requieren una mayor logística en su desarrollo.

Este trabajo permitió la estandarización de un modelo a nivel de microcosmos con potencial para realizar tamizajes de agentes de control biológicos o moléculas químicas en matrices de suelo. Este sistema cerrado y bajo condiciones estériles permite ver el efecto de estos productos sobre el tamaño de la población a través del tiempo. La importancia de estos radica en que este método puede ser certificado por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) e implementado en los laboratorios para la evaluación de productos para el control de fitopatógenos del suelo.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. CONCLUSIONES

Los aislados de *R. solanacearum* obtenidos de plantas de banano del Urabá Antioqueño y Santa Marta presentaron tres morfologías (M1, M2 y M3), diferenciadas por el tamaño de la colonia, su apariencia mucoide y periferia blanquecina con respecto a la cepa típica reportada en la literatura.

Las 6 cepas aisladas de *R. solanacearum* tienen la capacidad de infectar plantas de banano y presentan diferencias en el grado de virulencia.

Los tres sustratos evaluados no presentaron diferencias en el tamaño de la población de *R. solanacearum* AW1 durante un periodo de 60 días.

La CMI del antibiótico tetraciclina a nivel *in vitro* y en medio líquido BG contra *R. solanacearum* AW1 fue de 1 ppm.

Las tres concentraciones de tetraciclina evaluadas en el microcosmo de suelo estandarizado, no redujeron el tamaño de población de *R. solanacearum* AW1.

El microcosmos estandarizado podría ser implementado como método de tamizaje de productos contra patógenos del suelo.

Los microcosmos de suelo son una técnica económica y rápida para evaluar el potencial de productos para el control de patógenos del suelo porque la matriz de suelo es similar a donde se desarrolla el patógeno.

6.2. RECOMENDACIONES

Para evaluar el efecto de los antibióticos a nivel del microcosmos contra un patógeno de suelo se recomienda usarlos en mezcla para evitar la resistencia por parte del patógeno. También se recomienda realizar una aplicación periódica de los antibióticos, ya que con el paso del tiempo son adsorbidos por el suelo.

Para evitar las variaciones drásticas en el tamaño de la población de *R. solanacearum* AW1 en el tiempo, se recomienda tamizar el suelo de trabajo con un tamiz de mínimo 2 mm de abertura para obtener una mejor distribución de la bacteria.

El modelo estandarizado requiere ser evaluado con otros productos químicos y biológicos para poder determinar su potencial como técnica en la evaluación de productos de patógenos del suelo.

7. BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G., 2004. Plant pathology.

Álvarez, B., Biosca, E.G., López, M.M., 2010. On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol. 267-279.

Álvarez, J.A., Rodríguez, P.A., Marín, M., 2008. Detección molecular de *Ralstonia solanacearum* en agroecosistemas bananeros de Colombia. Trop. plant Pathol. 33, 197-203.

Antibiotic Resistant Genes Database (ARDB), n.d. Antibiotic resistant genes database [www Document]. Resist. Div. Transp. Syst. Multidrug Resist. efflux pump. URL <http://arbd.cbcb.umd.edu/cgi/search.cgi?db=R&and0=O&submit=Search&term=rals-tonia solanacearum&field=af&> (accessed 9.25.14).

Arias, P., Dankers, C., Liu, P., Pilkauskas, P., 2004. La economía mundial del banano 1985-2002 [www Document]. URL <http://www.fao.org/docrep/007/y5102s/y5102s00.htm#Contents> (accessed 8.5.14).

AUGURA, 2013. El banano Colombiano [WWW Document]. Inf. Grem. URL http://www.augura.com.co/index.php?option=com_content&view=article&id=11&Itemid=21

AUGURA, 2014. Coyuntura bananera Colombiana.

Belalcázar, S., Rosales, F.E., Pocasangre, L.E., 2004. El "Moko" del plátano y banano y el rol de las plantas hospederas en su epidemiología. XVI Reun. Int. ACORBAT 16-35.

Bornacelly, H., 2011. Status de la enfermedad del moko (*Ralstonia solanacearum*) en banano en Colombia.

Bornacelly, H., Mena, J., 2010. Conozca, prevenga y erradique el Moko en bananeras y plataneras.

Cardozo, C., Rodríguez, P., 2009. Caracterización molecular del complejo de especies *Ralstonia solanacearum* en la zona bananera de Urabá. Agron. Colomb. 27, 203-210.

Cardozo, C., Rodríguez, P., Cotes, J.M., Marín, M., 2010. Variabilidad genética de la bacteria *Ralstonia solanacearum* (*Burkholderiales: Burholeriaceae*) en la zona bananera de Urabá (Colombia). Rev. biológica Trop. 58, 31-44.

Caruso, P., Palomo, J.L., Bertolini, E., López, M.M., Biosca, E.G., 2005. Seasonal variation of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 populations in a spanish river: Recovery of stressed cells at low temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 71, 140-148. doi:10.1128/AEM.71.1.140

- Castillo, J. a, Greenberg, J.T., 2007. Evolutionary dynamics of *Ralstonia solanacearum*. Appl. Environ. Microbiol. 73, 1225–38. doi:10.1128/AEM.01253-06
- Chandrashekara, K.N., Prasannakumar, M.K., Deepa, M., Vani, A., Khan, A.N.A., 2012. Prevalence of races and biotypes of *Ralstonia solanacearum* in India. J. plant Prot. Res. 52, 53–58.
- Clough, S.J., Lee, K.E., Schell, M.A., Denny, T.P., 1997. A two-component system in *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* modulates production of PhcA-regulated virulence factors in response to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. J. Bacteriol. 11, 3638–3648.
- Denny, T.P., 2006. Plant pathogenic *Ralstonia Species*, in: Gnanamanickam, S.S. (Ed.), Plant Associated Bacteria. Springer, pp. 573–644.
- Ephinstone, J., 1996. Survival and possibilities for extinction of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in cool climates. Potato Res. 39, 403–410.
- Etchebar, C., Trigalet-demery, D., van Gijsegem, F., Vasse, J., 1998. Xylem colonization by an HrcV – Mutant of *Ralstonia solanacearum* is a key factor for the efficient biological control of tomato bacterial wilt. Am. Phytopathol. Soc. 11, 869–877.
- FAO, 2014. Commodities by country.
- Farfán, L., Hoyos, L., 2009. Sensibilidad a antibióticos y productos cúpricos de bacterias fitopatógenas asociadas a bacteriosis en pasifloras.
- Fegan, M., Prior, P., 2005. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* Species Complex”, in: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia Solanacearum* Species Complex. pp. 449–461.
- Fegan, M.A., Prior, P.B., 2006. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana 93–101.
- Flavier, A.B., Clough, S.J., Schell, M.A., Denny, T.P., 1997. Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. Mol. Microbiol. 26, 251–259.
- French, E., Gutarra, J., Aley, P., Elphinstone, J., 1995. Culture media for *Ralstonia solanacearum* isolation, identification and maintenance, in: Fitopatología. pp. 126–130.
- Genin, S., Denny, T.P., 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. Annu. Rev. Phytopathol. 50, 67–89. doi:10.1146/annurev-phyto-081211-173000
- Gómez, E.A., 2005. Aislamiento, identificación y caracterización del agente causal del moko del plátano, *Ralstonia solanacearum* raza 2, proveniente de plantaciones afectadas en Colombia.
- Grenni, P., Falconi, F., Caracciolo, A.B., 2012. Microcosm experiments for evaluating natural bioremediation of contaminated ecosystems. Ital. Assoc. Chem. Eng. 28, 7–12.

- Griffin, M.O., Ceballos, G., Villarreal, F.J., 2011. Tetracycline compounds with non-antimicrobial organ protective properties: possible mechanisms of action. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* 63, 102–7. doi:10.1016/j.phrs.2010.10.004
- Guo, J.-H., Qi, H.-Y., Guo, Y.-H., Ge, H.-L., Gong, L.-Y., Zhang, L.-X., Sun, P.-H., 2004. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol. Control* 29, 66–72. doi:10.1016/S1049-9644(03)00124-5
- He, D., Sun, Y., Xin, L., Feng, J., 2014. Aqueous tetracycline degradation by non-thermal plasma combined with nano-TiO₂. *Chem. Eng. J.* doi:10.1016/j.cej.2014.07.089
- Huang, M.-H., Zhang, W., Liu, C., Hu, H.-Y., 2014. Fate of trace tetracycline with resistant bacteria and resistance genes in an improved AAO wastewater treatment plant. *Process Saf. Environ. Prot.* 1–7. doi:10.1016/j.psep.2014.04.004
- James, D., Girija, D., Mathew, S., Nazeem, P., Babu, T., Sukumara, A., 2003. Detection of *Ralstonia solanacearum* race 3 causing bacterial wilt of solanaceous vegetables in Kerala, using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *J. Trop. Agric.* 41, 33–37.
- Kang, Y., Liu, H., Genin, S., Schell, M. a, Denny, T.P., 2002. *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Mol. Microbiol.* 46, 427–37.
- Li, B., Zhang, X., Guo, F., Wu, W., Zhang, T., 2013. Characterization of tetracycline resistant bacterial community in saline activated sludge using batch stress incubation with high-throughput sequencing analysis. *Water Res.* 47, 4207–16. doi:10.1016/j.watres.2013.04.021
- López, N., Haedo, A.S., Méndez, B.S., 1999. Evaluation of *Xanthomonas campestris* survival in soil microcosm system. *Int. Microbiol.* 2, 111–114.
- McManus, P.S., Stockwell, V.O., Sundin, G.W., Jones, A.L., 2002. Antibiotic use in plant agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 443–65. doi:10.1146/annurev.phyto.40.120301.093927
- Merchan, V.M., 2003. Situación actual del Moko (*Ralstonia solanacearum* raza 2) en Musáceas, in: Rivas, G., Rosales, F. (Eds.), Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nemátodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos. pp. 181–182.
- Messiha, N.A.S., van Bruggen, A.H.C., Franz, E., Janse, J.D., Schoeman-Weerdesteijn, M.E., Termorshuizen, A.J., van Diepeningen, A.D., 2009. Effects of soil type, management type and soil amendments on the survival of the potato brown rot bacterium *Ralstonia solanacearum*. *Appl. Soil Ecol.* 43, 206–215. doi:10.1016/j.apsoil.2009.07.008
- Messiha, N.A.S., van Diepeningen, A.D., Wenneker, M., van Beuningen, A.R., Janse, J.D., Coenen, T.G.C., Termorshuizen, A.J., van Bruggen, A.H.C., Blok, W.J., 2007. Biological soil disinfection (BSD), a new control method for potato brown rot, caused by *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Eur. J. plant Pathol.* 117, 403–415. doi:10.1007/s10658-007-9109-9

- Moncada, R.N., 2014. Evaluación de extractos de *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0123 para la recuperación de suelos bananeros contaminados con *Ralstonia solanacearum*. Universidad EAFIT.
- Munar-Vivas, O., Morales-Osorio, J.G., Castañeda-Sánchez, D.A., 2010. Use of field-integrated information in GIS-based maps to evaluate Moko disease (*Ralstonia solanacearum*) in banana growing farms in Colombia. *Crop Prot.* 29, 936–941. doi:10.1016/j.cropro.2010.04.021
- N’guessan, C.A., Brisse, S., Le Roux-Nio, A.-C., Poussier, S., Koné, D., Wicker, E., 2013. Development of variable number of tandem repeats typing schemes for *Ralstonia solanacearum*, the agent of bacterial wilt, banana Moko disease and potato brown rot. *J. Microbiol. Methods* 92, 366–74. doi:10.1016/j.mimet.2013.01.012
- Obregón, M., Rodríguez, P.A., Morales, J.G., Salazar, M., 2008. Hospedantes de *Ralstonia solanacearum* en plantaciones de banano y plátano en Colombia. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* 61, 4518–4526.
- Ocho, F.L., 2006. Biochemical, pathological and genetic characterization of strains of *Ralstonia solanacearum* (Smith) from Ethiopia and biocontrol of *R. solanacearum* with bacterial antagonists.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.-L., Thonart, P., 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9, 1084–90. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x
- Peeters, N., Guidot, A., Vailleau, F., Valls, M., 2013. *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Mol. Plant Pathol.* 14, 651–62. doi:10.1111/mpp.12038
- Perea, J.M., García, R.S., Allende, R., Carrillo, J.A., León, J., Valdez, B., López, F.S., 2011. Identification of races and biovars of *Ralstonia solanacearum* isolated from tomato plants. *Rev. Mex. Fitopatol.* 29, 98–108.
- Poussier, S., Chéron, J., Couteau, A., Luisetti, J., 2002. Evaluation of procedures for reliable PCR detection of *Ralstonia solanacearum* in common natural substrates. *J. or Microbiol. methods* 51, 349–359.
- Pradhanang, P.M., Elphinstone, J.G., Fox, R.T., 2000. Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil: a comparison of different detection techniques. *Plant Pathol.* 49, 414–422.
- Ramesh, R., Phadke, G.S., 2012. Rhizosphere and endophytic bacteria for the suppression of eggplant wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Crop Prot.* 37, 35–41. doi:10.1016/j.cropro.2012.02.008
- Ramírez, E.M., 2012. Bacterias asociadas a raíces de *Musa* spp.: Densidad poblacional y potencial promotor de crecimiento vegetal. Universidad de Antioquia.
- Remenan, B., de Cambiaire, J., Cellier, G., Jacobs, J.M., Mangenot, S., Barbe, V., Lajus, A., Vallenet, D., Medigue, C., Fegan, M., Allen, C., Prior, P., 2011. *Ralstonia syzygii*, the

- Blood Disease Bacterium and some Asian *R. solanacearum* strains form a single genomic species despite divergent lifestyles. *PLoS One* 6, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0024356
- Schell, M.A., 2000. Genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38, 263–292.
- Schönfeld, J., Gelsomino, A., van Overbeek, L.S., Gorissen, A., Smalla, K., van Elsas, J.D., 2003a. Effects of compost addition and simulated solarisation on the fate of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 and indigenous bacteria in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 63–74.
- Schönfeld, J., Heuer, H., Elsas, J.D. Van, Smalla, K., Scho, J., 2003b. Specific and Sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Soil on the Basis of PCR Amplification of *fliC* Fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7248–7256. doi:10.1128/AEM.69.12.7248
- Stockwell, V.O., Duffy, B., 2012. Use of antibiotics in plant agriculture Fire blight: the primary use of antibiotics on plants activity and mechanisms of resistance in *Erwinia amylovora*. *Rev. Sci. Tech.* 31, 199–210.
- Sullivan, M., Daniells, E., Southwick, C., Mackesy, D., 2013. *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2.
- Thiele-Bruhn, S., Beck, I., 2005. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere* 59, 457–465. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.01.023
- Trust, N.P., 2010. Molecular traits host range controlling and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytol.* 187, 920–928.
- Van Elsas, J.D., Kastelein, P., de Vries, P.M., van Overbeek, L.S., 2001. Effects of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* bv. 2 in irrigation water. *Can. J. Microbiol.* 47, 842–854. doi:10.1139/cjm-47-9-842
- Van Elsas, J.D., Kastelein, P., van Bekkum, P., van der Wolf, J.M., de Vries, P.M., van Overbeek, L.S., 2000. Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and microcosm soils in temperate climates. *Am. Phytopathol. Soc.* 90, 1358–1366.
- Villegas, V., 2012. Cálculos del costo erradicación del moko.
- Wicker, E., Lefeuvre, P., de Cambiaire, J.-C., Lemaire, C., Poussier, S., Prior, P., 2012. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *ISME J.* 6, 961–74. doi:10.1038/ismej.2011.160
- Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R.E.W., 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* 3, 163–75. doi:10.1038/nprot.2007.521

- Xu, W., Zhang, G., Li, X., Zou, S., Li, P., Hu, Z., Li, J., 2007. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China. *Water Res.* 41, 4526–34. doi:10.1016/j.watres.2007.06.023
- Yamada, T., 2012. Bacteriophages of *Ralstonia solanacearum*: Their Diversity and Utilization as Biocontrol Agents in Agriculture, in: Kurtboke, I. (Ed.), *Bacteriophages*. InTech, pp. 113–138.
- Yang, W., Xu, Q., Liu, H.-X., Wang, Y.-P., Wang, Y.-M., Yang, H.-T., Guo, J.-H., 2012. Evaluation of biological control agents against *Ralstonia* wilt on ginger. *Biol. Control* 62, 144–151. doi:10.1016/j.biocontrol.2012.05.001
- Zheng, X., Zhu, Y., Liu, B., Zhou, Y., Che, J., Lin, N., 2014. Relationship between *Ralstonia solanacearum* diversity and severity of bacterial wilt disease in tomato fields in China. *J. Phytopathol.* 162, 607–616. doi:10.1111/jph.12234

ANEXOS

Anexo 1. Determinación de la máxima capacidad de retención de humedad (MCRH)

Para determinar la MCRH se toman 3 crisoles del suelo evaluado, cada uno con papel filtro en la base, a los cuales se les adiciona 1 gota de agua y se pesan para obtener tres primeros pesos (P1-1, P1-2 y P1-3). Luego se adicionan 3cm³ de suelo previamente secado en el microondas (2 veces por 3 minutos y 1 vez por 1 minuto) y se toman tres segundos pesos (P2-1, P2-2 y P2-3), se tapan los crisoles y se pone su base en contacto con agua (sin sumergir el crisol en el agua) y pasadas 24 horas de secan, se dejan escurrir por 2 horas y se toman los tres últimos pesos (P3-1, P3-2 y P3-3).

La MCRH se encuentra con estos pesos tomados, así:

$$\theta = \frac{SH - SS}{SS} = \frac{(P3_{prom} - P1_{prom}) - (P2_{prom} - P1_{prom})}{(P2_{prom} - P1_{prom})}$$

Ecuación 2. Fórmula para calcular el valor de teta necesario para calcular la máxima capacidad de retención de humedad de un sustrato a partir de 3 pesos

La humedad a la que se desea mantener los sustratos fue del 60%, por esto el valor hallado debe multiplicarse por 0,6 y se procede a reemplazar el valor en la siguiente fórmula, que es una re-organización de la Ecuación 2:

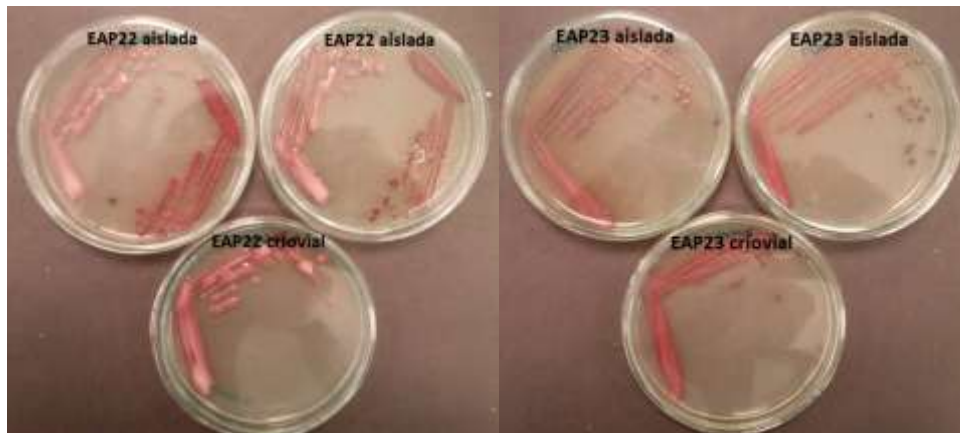
$$SH = (\theta + 1) * SS$$

Ecuación 3. Fórmula para encontrar los gramos de suelo húmedo que se tendrán a la humedad especificada

La cantidad de suelo que se trabajará en los ensayos será de 1000g y este es el valor correspondiente al suelo seco (SS), con la Ecuación 3 se despeja el peso que tendrán esos 1000g con una humedad constante de 60% y así se puede encontrar la cantidad de agua que debe adicionarse diariamente, restando el valor de SS trabajado del valor de SH encontrado.

Anexo 2. Re-aislamiento de cepas de *R. solanacearum*

El anexo 2 evidencia la morfología obtenida en el reaislamiento de las cepas EAP022 y EAP023 en medio BGTA a partir de tejido infectado comparado con la cepa inoculada. Estos resultados fueron similares para todas las cepas evaluadas en el ensayo de patogenicidad, lo cual confirmó los postulados de Koch.



Anexo 3. Análisis de sustrato de geminación vivero Tierra Negra®

Código	Identificación en el campo	Textura		pH	C.E. dSm-1	M.O. %	Al	Ca	Mg	K	Na	CICE	P	S	Fe	Mn	Cu	Zn	B	N-NO3	N-NH4	N %		
		A%	L%																				Ar%	Clase
		cmolc kg ⁻¹																					mg kg ⁻¹	
SP19343	Sustrato de Germinacion	76	22	2	AF	6,4	17,6	-	11,8	6,5	1,76	0,17	20,2	8	33	71	5	3	7	0,18				

Identificación

Nombre: UNIVERSIDAD EAFIT
 Nit o C.C.: 890901389-5
 Direccion: 316 698 258 55
 Telefono: 316 698 258 55
 Fax: nataliaochoa@msn.com
 Email: nataliaochoa@msn.com
 F. Recibo: 28-NOV-13

Análisis de Suelos

Municipio: Uraba (Antioquia)
 Vereda: Sin Especificar
 Finca: Tierra Negra
 Área: - Ha.
 Profundidad: - cms.

Reporte No. 36369

Cultivo actual: _____
 Cultivo anterior: _____

Métodos
 Textura : Bouyoucos; pH : Agua (1:1); Conductividad eléctrica: Extracto de saturación; Materia orgánica: Walkley Black; Al : KCl 1M; Ca, Mg, K, Na : Acetato de amonio 1M; CICE : Suma de cationes de cambio; S : Fosfato monocálcico 0.008M; Fe, Mn, Cu, Zn : Olsen - EDTA; B : Agua caliente; NO3 : Sulfato de aluminio 0.025N; NH4 : KCl 1M; P : Bray II.

Tener en cuenta:
 N.D.=No detectable
 N.A.=No aplica
 Para las unidades considere:
 dSm-1 =mmho cm-1
 cmolc kg-1 =meq/100 g suelo
 ppm =mg kg-1

Revisión Agronómica

Observaciones SP19343* :Para la textura este material no dispersa --