



Revisión

Análisis de la diversidad genética de *Ralstonia solanacearum* y su relación con la virulencia en Plátano, Amenaza en Venezuela

José Javier Hernández ✉ *1

¹Universidad Nacional Experimental Sur del Lago. Laboratorio de biotecnología GIBA, Santa Bárbara de Zulia-Venezuela.

Recibido Julio -2009/aprobado Septiembre .2009.

RESUMEN

Ralstonia solanacearum es un patógeno de amplia distribución mundial, infecta alrededor de 200 especies de plantas, entre ellas las musáceas en las que causa la enfermedad del "Hereque" o "Moko", este organismo es una bacteria Gram-negativa muy estudiada por los fitopatólogos y empleada por los biólogos moleculares como modelo para explicar los mecanismos genéticos que gobiernan la patogenicidad en las plantas. La bacteria puede sobrevivir en el suelo, aguas y restos vegetales; además es de rápida diseminación, hasta el momento los controles establecidos han mostrado ser poco eficientes en su erradicación debido a la gran versatilidad del patógeno. El plátano hartón *Musa* AAB, es el principal cultivo de la subregión Sur del lago de Maracaibo, abarca por lo menos 48.000 hectáreas destinadas a la seguridad agroalimentaria del país. La raza 2: biovars 1 y 3 de *Ralstonia solanacearum* son patógenos al plátano, originando necrosamientos sistémicos que inducen a la marchitez y por ende la muerte de la planta lo que incide en una disminución de la producción. En Venezuela representa una seria amenaza. La presente revisión analiza la diversidad genética de *R. solanacearum* aspecto clave en la comprensión de la interacción patógeno-hospedador.

Palabras clave: *Ralstonia solanacearum*, *Musa*, mecanismos biológicos.

ABSTRACT

Analysis of genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* and virulence relation of Plantain, a threat in Venezuela

Ralstonia solanacearum is a pathogen of worldwide distribution, infects about 200 species of plants, including *Musa* in causing the disease "Hereque" or "Moko", this organism is a gram-negative bacteria widely studied by plant pathologists and used by molecular biologists as a model to explain the genetic mechanisms governing pathogenicity in plants. The bacteria can survive in soil, water and plant debris; further rapid spread is so far the controls have proved inefficient in its eradication due to the versatility of the pathogen. The Harton plantain *Musa* AAB, is the main crop in the subregion Sur del Lago de Maracaibo, is at least 48,000 hectares for food security in the country. Race 2: biovars 1 and 3 *R. solanacearum* are pathogenic to plantains and bananas causing systemic necrotic, wilting and hence the death of the plant which affects a decrease in production. In Venezuela poses a serious threat to production. The study of genetic diversity of *R. solanacearum* is key to understanding host-pathogen interaction.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*, *Musa*, biological mechanisms.

INTRODUCCIÓN

El plátano Hartón es una de las variantes genómicas poliploides de la hibridación inter específica de las especies *Musa acuminata* x *Musa balbisiana* (*Musa* AAB), originarias de Asia tropical y taxonómicamente perteneciente familias de las musáceas de la clase monocotiledónea (Robinson, 1998), orden gingerberales. En cuanto al carácter reproductivo es una planta de semillas estériles por lo requiere de una reproducción asexual por rizomas o "cormos" generados a partir de cambium vascular sobre el cual se desarrollan "hijuelos" o clones de la planta madre, el desarrollo vegetativo es completado en un ciclo anual al emitir cerca de 40 hojas (Navas *et al.*, 1998), luego florece y muere (Stover, 1972).

El cultivo del plátano y los bananos ocupan en conjunto a escala mundial el quinto lugar en importancia en la seguridad agroalimentaria de la población humana después de los cereales y la "mandioca" (FAO, 2004 ; Frison y Sharock, 1988), los frutos representan una fuente importante de calorías y vitaminas (Nava, 1995) para las regiones pobres del planeta. Es cultivado en diversos suelos de la franja tropical preferiblemente en zonas bajas donde desarrolla su máximo potencial productivo.

En Venezuela, la fértil planicie del Sur del lago de Maracaibo entre los estados Zulia, Mérida y Trujillo está dedicada en gran parte a las actividades agrícolas, dentro de las que destaca la producción del Plátano Hartón que genera

empleo para unas 6000 familias de manera directa (Delgado *et al.*, 1998; Sáenz y Rivas, 1992). Esta región lideriza en superficie cultivada la producción nacional de frutas y registra cerca de 48.000 hectáreas (M.A.T., 1997) destinadas al monocultivo de plátano, con un rendimiento que promedia los 12.000Kg/ha/año (Nava, 1987) mayormente ubicadas en los Municipios Colón, F.J Pulgar, y Sucre.

Las explotaciones plataneras son perturbadas por diversos factores que actúan de manera aditiva (Palencia *et al.*, 2006; Belalcazar, 1991), dentro de ellos destacan: los eventos atmosféricos, la disponibilidad de mano de obra e incidencia de plagas y enfermedades; el ultimo aspecto, limita seriamente el rendimiento productivo de cultivo (Molina, 1999; Stover, 1992) y contribuye al deterioro ambiental de los agroecosistemas de Musáceas. Los reportes sugieren que la sigatoka negra (Delgado y Paiva, 2001), aunado al impacto del *fusarium* y los nematodos

fitopatógenos han contribuido al estancamiento de la actividad productiva, en tanto que las pérdidas económicas por bacterias patogénicas son cada vez más frecuentes y diversas en las áreas cultivadas (Arenas *et al.*, 2005) razón que justifica una especial atención a la aparición de formas más agresivas y difíciles de controlar. La bacteria *R. solanacearum* (Modelo en fitopatología y biología molecular), causa la marchitez, Hereque o Moko en la mayoría de las Musáceas incluyendo a plátanos y bananos, ya ha sido reportada en Venezuela (Vivas *et al.*, 2008) y amenaza con devastar la actividad productiva. La presente revisión tiene como objetivos: Referir aspectos básicos de la bacteria, analizar su diversidad genética, describir la interacción patógeno hospedador mediante su ecología y rango de hospederos, indicar los principales avances en pruebas de diagnóstico, así como las perspectivas en control de la enfermedad.

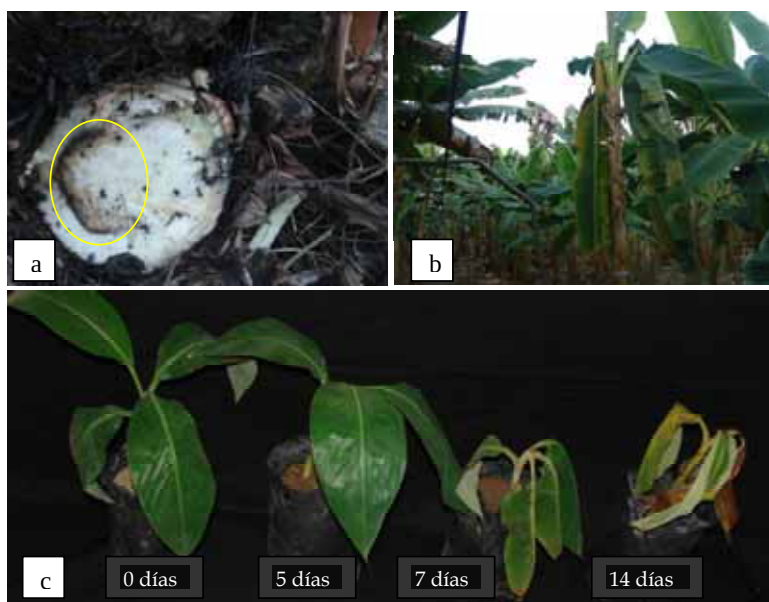


Figura 1. Síntomas del “Hereque” o “Moko” en Plátano Hartón (*Musa AAB*). **a)** El círculo indica un anillo por el necrosamiento del cambium vascular del rizoma. **b)** Cultivo afectado, al centro: planta que exhibe evidencias del marchitamiento bacteriano. **c)** Cronología de los Síntomas de la marchitez en plántulas inoculadas por *R. solanacearum*.

El patógeno

Dentro de las bacterias que causan enfermedades al cultivo de plátano y otras musáceas destaca: *Ralstonia solanacearum*, Gram- negativa, raza 2, biovar 1 y 3 agente causal de la enfermedad del “Hereque” (Buddenhagen *et al.*, 1962; Twaites *et al.*, 1999; Haywart, 2006), también llamada marchitez bacteriana o “Moko”, enfermedad muy distribuida y antigua (Buddenhagen, 1964) las colonias en tetrazolio (French *et al.*, 1995) suelen ser rojizas con halos blancos y se desarrollan a partir de los aislados a 25°C o más durante las primeras 72 horas. Este microorganismo que puede detectarse en el suelo (Álvarez *et al.*, 2008) y en las aguas, presenta una gran diversidad genética (Yu *et al.*, 2003; Poussier *et al.*, 1999 y 2000;) adosada al amplio rango de hospederos (Belalcazar *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2004), sobrevive en condiciones ecológicas extremas para

reproducirse exponencialmente en ambientes favorables (Caruso *et al.*, 2004; Islam y Toyota, 2004; Brian *et al.*, 2001; Bringel *et al.*, 2001). Anatómicamente esta provista de un sistema piloso polar que le otorga gran movilidad dentro de los fluidos de su huésped (Liu *et al.*, 2001) aspecto determinante en la virulencia. Es altamente infecciosa, su manifestación en el cultivo suele darse mediante el ingreso de personal, aguas de escorrentía, riego, canales de drenaje, insectos, prácticas de poda, entre otras (Belalcazar, 1994; Takatsu, 1986). La enfermedad afecta de manera sistémica todos los órganos de la planta, invade los tejidos vasculares causando marchitez, amarillamientos, necrosis y muerte irremediable (Robinson, 1998; Nava, 1997 ; Stover, 1972; Rorer, 1911;), además trabajos en Centroamérica indican que este patógeno es responsable del aborto floral (Rengifo, 2003).

Tabla 1. Síntomas y modo alternativo de transmisión de *R. solanacearum* raza 2 en bananos de cocción (Hayward, 2006).

Huéspedes	Frutas		Hojas	Transmisión a través de los retoños
	Síntomas externos	Síntomas internos		
Saba y Cardaba en Filipinas	Sin síntomas	Endurecimiento y coloración negra o roja de la pulpa	Sin síntomas	No reportada
Bleggoe y bananos de cocción relacionados América Latina	Asintomático con respecto a la maduración de la fruta y maduración prematura con amarillamiento de pocos dedos	Podredumbre viscosa marrón o gris seca	Marchitamiento del follaje en hojas adultas	Ocorre comúnmente

Rango de Hospederos

Además de las Musáceas la severidad de la bacteria en los cultivos agrícolas ha sido demostrada en las especies: Papa (Hooker, 1980; García *et al.*, 1999), Tomate (Hernández *et al.*, 1995), Caraota, Tabaco y en gran parte de las solanáceas (French, 2006; Hayward, 1991); donde representan la principal limitante de cultivo, sobre todo en zonas que ambientalmente favorecen la incidencia del patógeno (French, 2006). Estudios recientes señalan el rol de las malezas y arvenses en el desarrollo epidemiológico de la enfermedad como reservorio inaparente (Belalcázar *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2004), este hecho dificulta la erradicación de la enfermedad y promueve la compleja ecología del patógeno. *R. solanacearum* se ha adaptado a cerca de 234 especies, 114 generos y 34 familias según el reporte publicado por Belalcázar *et al.*, 2004, siendo las familias: Solanaceas, Compuestas, Musáceas y Leguminosas la de mayor frecuencia como hospederos de la bacteria.

Ecología

R. solanacearum es un organismo muy versátil vive libremente, en simbiosis, de manera latente o como es habitual: de forma parasitaria. El sistema de clasificación de la bacteria por razas biovars (French, 2006), secuevars y pathobars esta regida por el rango de hospederos, patogenecidad, distribución geográfica y diferencias genéticas.

La bacteria puede ser reanimada incluso después de un estado de suspensión y persistir en la infección de muchas especies vegetales (Grey y Steck., 2001). En el agua la bacteria puede sobrevivir en condiciones desfavorables, logra soportar bajo latencia temperaturas mínimas de manera critica (Islam y Toyota., 2004) y recuperarse en un tiempo breve a intervalos entre 18 y 25 °C (Caruso *et al.*, 2005). La luz es un factor importante en la distribución de las colonias, en los suelos *R. solanacearum* puede convivir con otras especies bacterianas, hongos y organismos superiores, en algunas regiones la presencia de la actividad agrícola ocasiona un desbalance a favor de organismos perjudiciales como *Erwinia*, *Fusarium*, *Rizotocnia* y *Phytophthora* e incluso nematodos (Escalona *et al.*, 2006) Martins *et al.*, 2005 reporta la capacidad de *R. solanacearum* como rizobacteria al colonizar y sobrevivir en especies como Alfalfa, Cebolla, Soja, Pepino y Arroz.

Estudios realizados en Colombia en la zona productora de plátano del Magdalena (CIAT, 2003), describen un escenario en contra de la actividad por la presencia de cepas altamente virulentas, otro estudio, en la región del

Meta, de los llanos Colombianos expone la presencia permanente de *R. solanacearum* en los suelos del pie de monte llanero con tendencia al aumento en la incidencia (Tapeiro *et al.*, 2007), las experiencias demuestran que en las zonas cultivadas a las que se les ha aplicado alguna medida de control con el tiempo vuelven a aparecer brotes constantes de manera reincidente (Vivas *et al.*, 2008; Tapeiro *et al.*, 2007; Arenas *et al.*, 2005). Estos reportes sugieren la alerta en los municipios con sembradíos en el Sur del Lago de Maracaibo que muestran o han presentado “brotes” aislados de la enfermedad en musáceas (Vivas *et al.*, 2008), en tal sentido, se deben adoptar medidas basadas en el desarrollo de tecnologías eficientes y rápidas para el diagnostico y posibles controles del “Hereque” en un futuro cercano.

Diversidad genética de *R. solanacearum*

La variabilidad genética y la evolución de la especie es un aspecto muy estudiado en *R. solanacearum* (Castillo y Greenberg., 2006; Pousiier *et al.*, 2000; Jaunet y Wang, 1999; Dristing y Dianese, 1990) El secuenciamiento completo del genoma bacteriano GM1000 que comprende al cromosoma y el megaplásmido, ver **tabla 1** (Salanoubat *et al.*, 2002) labra el camino para el desarrollo de proyectos de investigación en los laboratorios de biotecnología vegetal, la estrategia se enfoca al uso de la genómica y proteómica con el fin de dilucidar aspectos básicos de la diversidad, virulencia, resistencia e interacción.

Yu *et al.*, 2003 y posteriormente Fegan y Prior en 2006, coinciden en la existencia de filotipos de asilamiento que concuerdan con las regiones de aislamiento de acuerdo a la distancia genética, el filotipo I de origen asiático, el filotipo II, biovars 1, 2 del continente americano, el filotipo III, biovars 1, 2T de procedencia africana y el filotipo IV con cepas de Indonesia, Australia y Japón de los biovars 1, 2 y 2T. ver **figura 2**. así mismo, Cardozo *et al.*, en 2009, emplea diversas cepas provenientes de la zona bananera de Colombia hospedadas en banano y varias especies de arvenses, mediante el uso de las secuencias parciales de los genes *egl*, *fli* y 16S DNAr coincide en que gran parte de las cepas colectadas en Colombia en especies pertenecientes a las familias: *Musaceae*, *Asteraceae*, *Commelinaceae*, *Convolvulaceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae*, *Piperaceae*, *Portulacaceae* y *Vitaceae* están relacionadas en un mismo taxón cuando se comparan con secuencias reportadas en el GENBANK de especies relacionadas.

Tabla 2. Características generales del genoma del *R. solanacearum* GMI1000 (Salanoubat *et al.*, 2002).

Carácter del genoma	Cromosoma	Megaplásmido	Genoma
Longitud (Mbp)	3,716	2,094	5,810
G+C, proporción	67,04%	66,86%	66,97%
Regiones codificante-proteínas	87,8%	86,5%	87,3%
tRNAs	55	3	58
Operon RNA ribosomal	3	1	4
Genes codificantes-proteínas	3448	1681	5129
Average de la longitud de la proteína- genes codificantes(bp)	946	1077	989
Genes funcionales	1609	652	2261
Pseudogenes*	12,6%	18,7%	14,6%
Genes reguladores*	7,2%	9,6%	8%
Secuencias de inserción	3,4%	2,5%	3,1%

*porcentaje del total proteínas codificadas por genes.

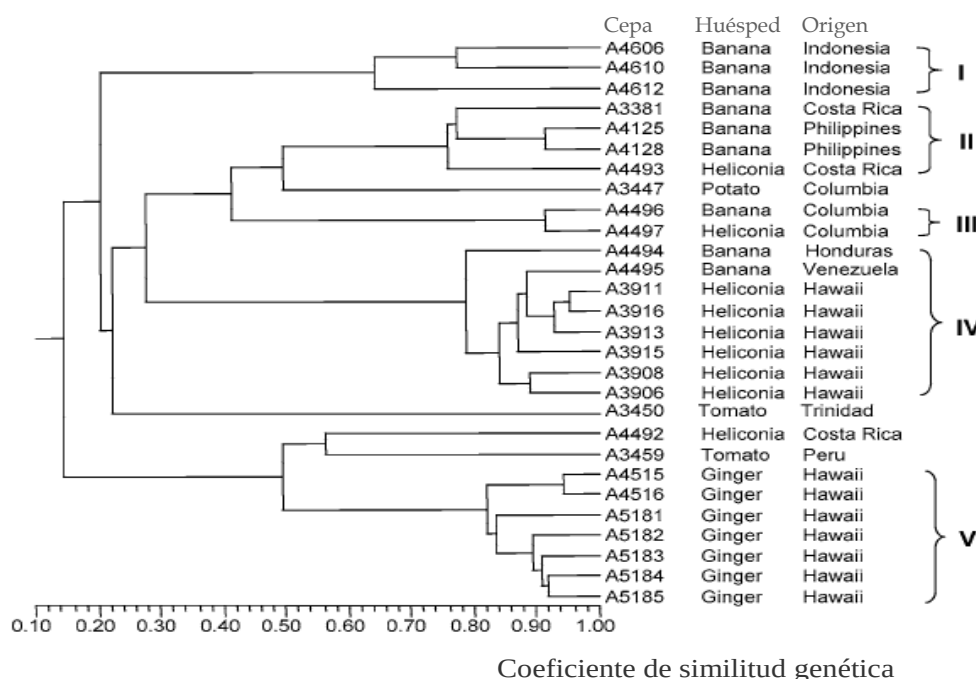


Figura 2. Fenograma en base a la similitud entre la colección de 28 cepas de *R. solanacearum* en diferentes países. Los 5 agrupamientos son indicados por números romanos. Coeficiente de correlación = 0,99. (Yu *et al.*, 2003).

Mecanismos de virulencia

La "virulencia" o patogenicidad es un aspecto muy complejo en la interacción patógeno-hospedador (Brencic y Winams, 2005; Agrios, 1997), *R. solanacearum* un organismo muy evolucionado (Castillo y Greemberg, 2006; Nakatsu, 1998,) ingresa por la vía simplástica donde se moviliza (Kersten *et al.*, 2001) en su hospedante venciendo las defensas que le propone la maquinaria molecular de la planta (Stanskawicz, 2001; Montesinos *et al.*, 2002) alojándose principalmente de manera epifítica en los espacios intercelulares en donde produce exopolisacáridos, característico de las especies patógenas (Hickiki *et al.*, 2007) muchas veces, la bacteria solo reside dentro de su huésped sin presentar el carácter patógeno (Sinohara *et al.*, 2005) este comportamiento

aparente suele darse en plantas infectadas que nunca exhiben signos de la enfermedad (asintomáticas) debido a la identidad de variantes genéticas de las regiones candidatas del genoma bacteriano asociadas a la virulencia (Kiba *et al.*, 2007), en este sentido, el comportamiento patógeno de *R. solanacearum* logra activarse por la presencia de ciertas estructuras especializadas (Robertson, 2004) característico de algunas cepas bacterianas, La virulencia es promovida por la conjugación de señales ambientales que inducen la codificación de sustancias eliciadores como las proteínas *Avr*, propias de la planta que pueden contribuir tanto para la respuesta hipersensible como para la susceptibilidad (Brencic y Winams, 2005).

La movilidad de la bacteria es un aspecto determinante en la capacidad de ocasionar la enfermedad debido a que pueden trasladarse a ricas fuentes de alimento, los individuos con un sistema de movilidad *Pili IV* son más patógenos debido a que logran moverse con mayor rapidez que sus congéneres salvajes. (Liu *et al.*, 2001). En este sentido “la taxis” o la capacidad bacteriana de migrar hacia fuentes energéticas esta regulada por los genes *Aer 1* y *Aer2*, los alelos alternos o mutantes son propios de cepas que neutralizan su poder patógeno al no poder orientarse hacia su huésped inmediato apilándose en biopelículas de la rizosfera (Yao y Allen., 2007).

R. solanacearum presenta dos etapas en la infección de la planta, durante la primera etapa se incluye la invasión y la proliferación en los espacios intercelulares y los vasos de Xilema. La segunda etapa corresponde a la proliferación y producción de proteínas secretoras en el Xilema (Hickici *et al.*, 2007), incluso en el parénquima próximo (Hernández *et al.*, 2005). La patogenicidad esta regulada en la primera etapa y depende de los genes *HrpB* vinculados a la patogenicidad, en la segunda etapa es regulada por los genes *Phc*. Por otro lado, “la regulación global” de la patogenicidad depende de la densidad de bacterias dentro de la célula (Hickici *et al.*, 2007).

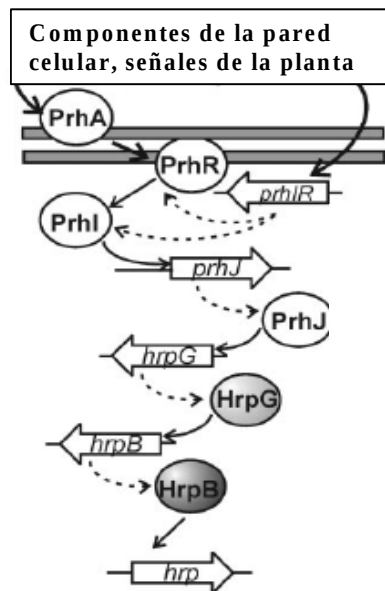


Figura 3. Modelo en cascada de la activación de las regiones de alta patogenicidad en la célula en hospederos del *R. solanacearum* (Brencic y Winams, 2005; Valls *et al.*, 2006).

Cuando la bacteria es aislada de plantas enfermas y es cultivada *in vitro* (Kelman, 1954) por varias generaciones en medios selectivos pierde su propiedad “patogénica” al ingresar en plántulas sanas (French *et al.*, 1995), este hecho puede explicar que en varios de los cultivos, no logre afectar a todas las plantas aún estando presente en gran parte de la rizosfera. En casos de la activación de la patogenicidad se denota la producción de proteínas efectoras de virulencia, En esta situación *R. solanacearum* aumenta en su población, basándose en la activación de sistemas de secreción tipo III (Gonzalez y Dreyfus, 2003; Alfano y Collmer, 1997) y IV (Liu *et al.*, 2001; Murata *et al.*, 2006), utilizando señales de su hospedero relacionadas al contenido de agua, muchas veces ingresa a través de las proteínas de membrana percibiendo

elicitores al interior de citoplasma de la célula de la planta (Scholehn *et al.*, 2003) o destruyendo regiones de la membrana causando la necrosis celular.

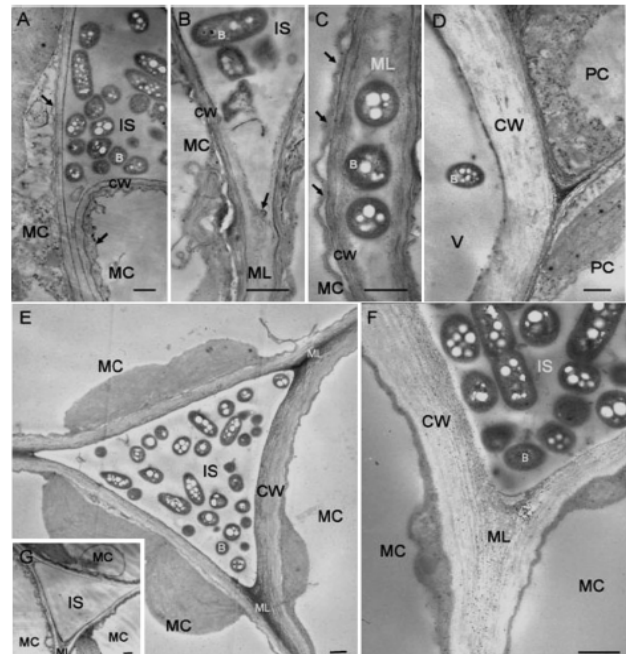


Figura 4. Micrografía electrónica que muestra en hojas de tabaco, luego de tres días de infiltración con una cepa de *R. solanacearum*. Las células del mesofilo en los espacios intercelulares de las hojas infectadas. B, bacteria; CW, pared celular; MC células del mesofilo; ML, lamina media; V, xilema vascular; PC, células del xilema parénquimático. Medida = 0,5 µm. (Hickici *et al.*, 2007).

Desde el enfoque molecular las señales ambientales son detectadas por el receptor *PrhA* y transmitida a la proteína de membrana *PrhR* lo que activa un factor sigma ECF, *PrhI* que a su vez induce a la transcripción de genes codificantes del regulador transcripcional, *PrhI* quien lee la expresión de *hrpG* a su vez activa la expresión de *hrpB*, resultando en los genes de alta patogenicidad *hrp* (Brencic y Winams, 2005), ver figura 3. La bacteria puede interactuar con su hospedero a través de las vías de secreción tipo III y tipo IV.

Diagnostico

La biotecnología ofrece una fuente de estrategias para el estudio genético del patógeno (Montesinos, 2002) el desarrollo de estas metodologías contribuyen a calibrar las pruebas de alta resolución basadas en la amplificación del ADN (Mullis, 1986; Martins, 2000) a fin de detectar la presencia de la bacteria, así como la diversidad de las estirpes existentes en la región, su distribución geográfica y la filogenia de *Ralstonia solanacearum* en estudios subsecuentes. Las técnicas de biología molecular PCR (Seal *et al.*, 1999) y RAPDs (Lee *et al.*, 2000) representan una opción muy fiable en el diagnóstico de la bacteria que complementa a las técnicas bioquímicas (Oepp/Eppo, 2004; Denny y Haywad, 2001; French *et al.*, 1995; Buddenhagen., 1964; Kelman, 1954;) y ELISA (Alvarez 2008), empleadas tradicionalmente para la detección, aislamiento y caracterización; en este sentido, las pruebas basadas en los marcadores moleculares son prácticas de mayor sensibilidad.

Pruebas bioquímicas

Ralstonia solanacearum es un patógeno ampliamente estudiado y una gran diversidad, Hayward en 1964; establece una estrategia bioquímica para el aislamiento identificación y caracterización de *Pseudomonas solanacearum* (actualmente *Ralstonia*), basado en la utilización de los disacáridos: celobiosa, maltosa, lactosa y la oxidación de alcoholes hexosa: dulcitol, manitol y sorbitol. Así mismo Budenhagen y colaboradores en 1962, clasifica al patógeno en cuatro (4) razas de acuerdo al tipo de hospedantes luego, en 1964 Buddenhagen y Kelman establecen un protocolo para diferenciar hasta cinco (5) biovares basado en las pruebas de metabolismo de disacáridos y alcoholes. El uso de pruebas serológicas para la detección de la bacteria en la planta es señalada por Digat y Cambra en 1976 basado en anticuerpos específicos para el reconocimiento del patógeno en *Solanum tuberosum*.

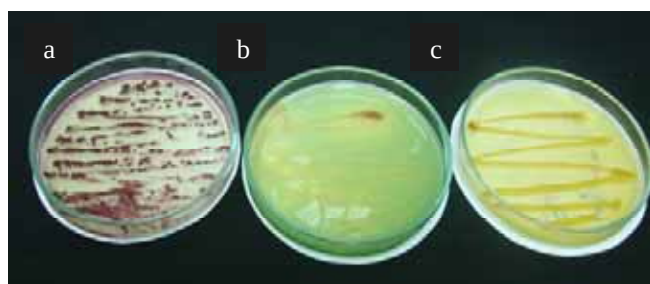


Figura 5. Aislamiento de *R. solanacearum*. a) medio kelman con tetrazolio, b y c) medio semiselactivo kelman SMSA, al que se le agrega por aparte los disacáridos: maltosa, lactosa, celobiosa y los alcoholes: manitol, sorbitol, dulcitol. El viraje de verde a claro indica una reacción acidica (+).

Tabla 3 Razas y biovares de *R. solanacearum* y el rango de hospederos (French *et al.*, 1995).

Raza	Biovaes	Especies, hospederos
1	1, 3 o 4	Varias solanáceas, numerosos cultivos, algunas banananas diploides
2	1, 3	Plátanos y bananos triploides, heliconias.
3	2	Papa, tomate, rara vez otros cultivos
4	5	Geranio

En Venezuela se han realizado reportes científicos de *Ralstonia* raza 2 en papa (Alcalá y Lara, 1995; García *et al.*, 1999), tomate (Hernández *et al.*, 2005), Pimentón (Escalona *et al.*, 2002). García *et al.*, en 1999, realizaron un trabajo en diversas fincas de la zona alta del estado Mérida (aledaño al Sur del lago de Maracaibo), en cultivos de papa y tomate, el estudio se basó en la caracterización morfológica de la bacteria mediante el uso de pruebas bioquímicas, aislamiento con tetrazolio y pruebas de patogenicidad en otras solanáceas; demostraron la presencia de *Ralstonia solanacearum* Biovar 2 en los cultivos de casi todas las fincas muestreadas. Así mismo, Escalona y colaboradores en 2006, registran presencia de la bacteria en los cultivos de Pimentón del estado Lara con una metodología similar.

Tabla 4. Clasificación de biovares de *R. solanacearum* en función de la utilización de disacáridos y la oxidación de alcoholes (French *et al.*, 1995).

Test fisiológico	Biovaes				
	1	2	3	4	5
Uso de Disacáridos					
Celobiosa	-	+	+	-	+
Lactosa	-	+	+	-	+
Maltosa	-	+	+	-	+
Oxidación de alcoholes					
Dulcitol	-	-	+	+	-
Manitol	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	-

Pruebas moleculares

La biotecnología apoyada en la información generada y almacenada en las principales bases de datos (NCBI, EMBL, otras) y el uso de los marcadores moleculares ha impulsado una serie de estudios que abarca la filogenia, diversidad y ecología del patógeno. El avance de la bioinformática ha facilitado el diagnóstico de *R. solanacearum*.

Nakatsu *et al.*, en 1998, empleando los patrones de REP PCR y digestión de segmentos con enzimas de restricción en el RNAr 16S; demostraron que *Ralstonia* tiende a mutar de manera paralela cuando se replica por generaciones sucesivas en medios de cultivo aumentando la distancia genética del ancestro de manera progresiva.

Seal *et al.*, en 1999, describe un sistema de diagnóstico molecular de *Ralstonia solanacearum*, entre los que se pueden discriminar razas y biovares empleando la amplificación de la PCR con el ADN ribosomal 16S de *E. coli*. Los cebadores OLI1 y Y2 diagnostican la presencia molecular de las cepas de *Ralstonia* en hospederos de *Musa* sp. Sobre este descubrimiento Gómez *et al.*, en 2006 diagnostican en diversas zonas productivas de plátano *Musa* AAB y banano *Musa* AAA en Colombia la presencia del patógeno con amplificación de los cebadores publicados por Seal *et al.*, 1999, las pruebas en este estudio son respaldadas con pruebas bioquímicas mediante el uso de disacáridos, metabolismo con alcoholes hexosa y pruebas de patogenicidad en tabaco.

El estudio realizado por Poissier *et al.* en 1999, sobre la diversidad de 129 cepas de *Ralstonia* provenientes de la flora salvaje de la región africana y otras registradas en bases de datos en todo el mundo demuestran la compleja variabilidad en la virulencia del patógeno; los autores de este trabajo emplearon la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) aplicado a la técnica de la longitud de los polimorfismos en los fragmentos de restricción (RFLP) para amplificar una región del ADN asociada a la alta patogenicidad y posteriormente asociaron las secuencias por "cluster" de agrupamiento encontrando una gran diversidad entre la colección de cepas aisladas según la especie y la región. La continuación de esta investigación es publicada un año siguiente por Poissier *et al.*, en el 2000, en esta oportunidad trabaja con las mismas cepas pero empleando otro marcador molecular: Los polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), logrando discriminar con

mayor resolución cepas asociadas en los agrupamientos o dendogramas con PCR-RFLP.

Villa *et al.*, en 2003, emplearon la amplificación de un fragmento de 283 pares de bases (GMI 1000) del 16S con las enzimas de restricción *Nla III*, *McrI*, *BsiEI*, and *MnII* en cepas asiáticas de diversos hospederos incluyendo *Musa* y clasificándolas de acuerdo a la distancia filogenética. Un estudio similar realizó Yu y colaboradores en 2003 con el reporte de la secuencia de una cepa de Venezuela aislada de *Musa* sp, similar hasta un 76% con cepas de heliconia de Hawái y de banana en Honduras.

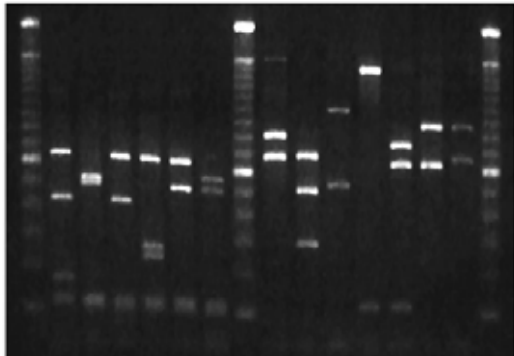


Figura 6. La digestión con enzimas de restricción es empleada para determinar variantes de *R. solanacearum* en diferentes grupos o cepas, en este trabajo se reporta la enzima RS80-RS81 *Bss*HII la imagen corresponde al estudio reportado por (Poissier *et al.*, 1999).

Robertson *et al.*, en 2004 relacionan genes de avirulencia con la diversidad de 139 cepas y analizaron la incidencia de *Ralstonia solanacearum* en papa y tabaco con respecto a las que habitan en los suelos, para ello se empleo PCR para la secuencia *avrA* y contraste con pruebas de hipersensibilidad (+/-). El análisis de la secuencia revela un elemento transponible de repetición invertida cuya constitución determina variantes en la incidencia del patógeno. En este sentido, Muresu *et al.*, en 2005, prueban en una diversidad de cepas de *Rhizobium* a los marcadores de secuencia anidada de inserción *ISRh1* y el ADNr 16S; en el estudio realizado con la leguminosa *Heryandrum* sp. en Europa logran rastrear la posible ruta originaria de la bacteria en función a los polimorfismos en la secuencia de inserción a diferencia de los resultados obtenidos con el ADNr 16S, concuerda de manera más lógica con el origen de las cepas, este precedente sirve de apoyo para lograr rastrear en *R. solanacearum* posibles rutas de infección y dinámica poblacional. posteriormente Gomez *et al.*, 2006 reporta la presencia masiva de *R. solanacearum* el la zona bananera y cafetera en los cultivos de musáceas, utilizando cebadores *Oli 1* y *Y2* del ADN ribosomal 16S que amplifican con éxito en muestras de plantas y suelos (BioPCR), encontrando que la mayoría de las cepas en estudio exhibieron un grado alto de patogenecidad al ser inoculadas en plátano. Por su parte, Chavarro y Ángel en 2006, proponen un sistema diagnostico basándose en la técnica de RAPDs para detectar al patógeno en Papa y plátano, incluso en plantas asintomáticas donde la prueba ELISA-NCM no detecta la presencia de la bacteria, además en este trabajo se demuestra una vez más que la variabilidad de la bacteria se

hace evidente de acuerdo a la región de donde es procedente la cepa.

Castillo y Greemberg en el 2007, analizaron la secuencia de varios genes relacionados a regiones del cromosoma y del megaplásmido incluyendo las regiones de alta patogenecidad (*HrpB*). Para ello se apoyaron en la determinación de filotipos de los PCR múltiple, logrando demostrar la dinámica evolutiva del patógeno rastreando a cuatro filotipos entre las cepas estudiadas. Los autores apuntan a una gran recombinación entre los genes del cromosoma y el megaplásmido que explica en función de la diversidad la capacidad patogénica de *Ralstonia*.

En la región de Urabá en la zona bananera de Colombia, Cardozo *et al.*, 2009 realiza una caracterización de varios colecciones de *Ralstonia solanacearum* empleando PCR múltiple y los genes *egl*, *flhC* y un fragmento ADNr 16S, sus resultados sugieren que las cepas bacteriales extraídas de *Musa* AAA sp. y arvenses estudiadas están asociadas al filotipo II, secuevar 4.

Control biológico

El control de la enfermedad de la “marchitez bacteriana” causada por *R. solanacearum* es uno de los retos con mayores inconvenientes en los cultivos susceptibles, En este sentido la comprensión de la ecología microbiana es vital para desarrollar medidas efectivas de biocontrol, los reportes indican serios problemas con los productos derivados de antibióticos como la gentamicina, estreptomycin, formol, derivados del cloro y otros que alteran por igual a organismos benéficos de la rizosfera de la planta como las bacterias promotoras de crecimiento (BRPC, del inglés PGPR) y por ende la salud del suelo; estos métodos efectivos en el corto tiempo son nefastos en el futuro inmediato, considerando que no eliminan de un todo al patógeno y favorecen a la adquisición de resistencia múltiple a los productos de control, específicamente a los antibióticos. En la actualidad se están desarrollando tecnologías para la aplicación de productos que estimulen la respuesta de defensa de la planta y el uso de bacterias beneficiosas para el control biológico de la enfermedad y la producción de biofertilizantes (Montesinos *et al.*, 2002). Arenas *et al.*, 2005 señala la importancia de las prácticas culturales y ecológicas en un manejo integrado en el cultivo de plátano para contrarrestar la presencia del “Moko” e indica un efecto importante del control de las arvenses y los lixiviados sobre la presencia de la bacteria. Park *et al.*, 2007, en plantas de tomate reporta el efecto del mecanismo biológico de la inducción de la resistencia sistémica (IRS) utilizando en la rizosfera la cepa EXTN-1 de *Bacillus vallismortis*, organismo que genera una antibiosis contra *R. solanacearum* disminuyendo la población (UFC) de este ultimo, la medida de biocontrol sugiere una opción interesante para el cultivo de “especies susceptibles” en suelos infectados con el patógeno. Un estudio similar realizado por Lwin y Ranamukhaarachchi en 2006 demostró la supresión del patógeno ante diferentes comunidades incluyendo a *Basillus subtilis*.

Una opción significativa es el uso de practicas ecológicas asociando al cultivo con especies arvenses como *Tagetes patula* o “Flor de muerto” que puede reducir la población del patógeno de manera considerable (Arenas *et al.*, 2002). Estas

especies generan productos en el rizoplasma que inhiben el crecimiento de las bacterias de manera prolongada con extensión a la rizosfera aledaña.

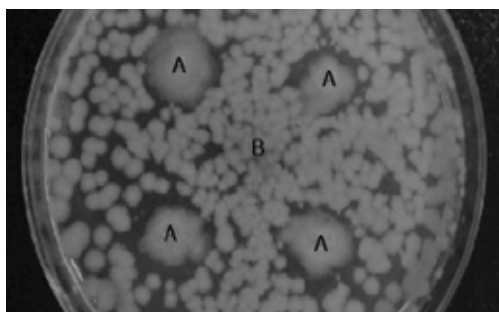


Figura 7. Test de antibiosis entre la cepa EXTN-1 de *Bacillus vallismortii* (A) y *R. solanacearum* (B), en el cultivo se puede observar la acción antagonista (Parck *et al.*, 2007).

La rotación de cultivos (Tapeiro *et al.*, 2007) es una táctica que contribuye al aumento de la diversidad microbiana en la rizosfera, en consecuencia favorece de manera sostenible las actividades de simbiosis, mutualismo y de forma paralela el parasitismo (Denninson y Kiers, 2004), estas interrelaciones son determinantes en la disminución de incidencia de *R. solanacearum* (Parck *et al.*, 2007), sin embargo en los agrosistemas alternantes o “rotativos” que emplean especies reservorias como las solanáceas (pimentón, papa), leguminosas (soya) y arvenses suelen frecuentemente presentar brotes endémicos (Escalona *et al.*, 2006) por albergar a cepas con resistencia a los antibióticos. Producto del manejo convencional de la enfermedad. Las

estirpes con potencial patogénico permanecen disimuladas entre la diversidad de comunidades alojadas en el rizoplasma de plantas hospedadoras (Martins *et al.*, 2001) en espera de un factor desencadenante.

Una técnica, eficiente y económica para el control de *R. solanacearum* es la solarización, el método consiste en el sometimiento del sustrato (suelos) a la mecanización y exposición del terreno desnudo al sol, algunas variantes de método se basan en cubiertas de polietileno. En un estudio realizado por Patricio *et al.*, en 2005 en tres localidades de Brasil en los primeros 20 cm. del suelo demostró que en los suelos solarizados se disminuye la incidencia de la marchitez bacteriana casi en su totalidad, durante los primeros 60 días, no obstante, la supervivencia del patógeno en niveles inferiores del perfil del suelo puede reactivar la enfermedad en posteriores ciclos productivos.

El mejoramiento genético asistido por técnicas basadas en el ADN recombinante y los marcadores moleculares (Krisnha *et al.*, 2006) son sin lugar a dudas la opción más prometedora en el diagnóstico, prevención y control de la enfermedad de la marchitez bacteriana causada por *R. solanacearum*. La resistencia en la planta es un elemento importante en el manejo de suelos con presencia de cepas patogénicas, en *Arabidopsis* se han reportado genes que promueven un mecanismo resistencia (recesivos) a la bacteria (Deslandes *et al.*, 2002), estos patrones sugieren estrategias novedosas para el uso de tecnologías con ADN recombinante o transgenie y el desarrollo de cultivares resistentes que avancen a la par del mecanismo evolutivo del patógeno a fin de restringir la enfermedad de la marchitez y el “salto” a otras especies de interés productivo.

Tabla 5. Identificación Bioquímica del Biovar en *R. solanacearum*, en la planta de plátano hartón, *Musa AAB* en la finca “El Roble”, límite de los Municipios Alberto Adriani (Mérida) y Colón (Zulia), Sur del lago de Maracaibo (Vivas *et al.*, 2008).

Órgano	Presencia de colonias rojizas: <i>Ralstonia</i> sp. Medio basal TZC		Metabolismo: medios con hidratos de carbono y alcoholes hexosa								BIOVAR
			Maltosa		Sorbitol		Lactosa		Manitol		
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
<u>Pobo 1</u>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
Hoja**	9	0	3		3		3		3		3
Seudotallo*	9	0	3		2	1	3		3		3
Cormo*	9	0	3		2	1	3		3		3
Colino*	9	0	3		2	1	3		3		3
Control ¹	11	1									
<u>Pobo 2</u>											
Hoja**	9	0	3		3		3		2	1	3
Seudotallo*	8	1	3		2	1	3		3		3
Cormo*	9	0	2	1	3		3		2	1	3
Colino*	8	1	3		3		3		2	1	3
Control ¹	10	2									
<u>Pobo 3</u>											
Hoja **	8	1	3		3		3		3		3
Seudotallo*	9	0	3		2	1	3		2	1	3
Cormo**	9	0	3		3		3		3		3
Colino*	9	0	3		2	1	3		3		3
Control ¹	10	2									
Total	136	8	35	1	30	6	36	0	32	4	

¹ Planta asintomática dentro de la plantación con reporte de brotes de “Hereque”.

** significativo al P<0,01 *significativo al P<0,05 con data transformada

La amenaza de *R. solanacearum* en Venezuela

La marchitez bacteriana ha sido reportada en Venezuela en los cultivos de Papa (García *et al.*, 1999), Tomate (Hernández *et al.*, 2005) Pimentón (Escalona *et al.*, 2006) y Musáceas (Yu *et al.*, 2003; Vivas *et al.*, 2008). Además el hecho de que cerca de 200 especies tropicales que crecen en los agroecosistemas de plátano y banano son hospederos de *R. solanacearum* (Belalcázar *et al.*, 2004) lo que potencialmente empeora la perspectiva. Todos los reportes coinciden en la infección progresiva del patógeno en los cultivos por su aptitud de sobrevivir en suelos, aguas y barbechos; razón por la cual desde el enfoque agronómico se hace énfasis en el manejo profiláctico de la enfermedad. Una de las causas que contribuyen a la dispersión constante de la enfermedad en áreas infectadas es la coexistencia de especies reservorios sin síntomas aparentes (Stefani *et al.*, 2005; Mwangi *et al.*, 2008) como el "Cambur Manzano" (*Musa AAB*) (De Oliveira *et al.*,

2000), muy común en los bordes de los sistemas productivos de Musáceas.

En el país los sembradíos del Plátano y Banano son amenazados por la presencia de la bacteria en los suelos con aptitud agrícola (Escalona *et al.*, 2006), la acción patogénica de *R. solanacearum* generaría una merma importante en los rendimientos (Belalcázar *et al.*, 2004). Para la zona productiva de musáceas comestibles en Venezuela, el reporte realizado por Vivas *et al.*, 2008 expone un peligro apremiante, considerando que varias fincas han sido diagnosticadas de forma bioquímica con una cepa altamente patogénica de raza 2 biovar 3 en varios Municipios del Sur del lago de Maracaibo (ver tabla 5). El escenario plantea un incremento del área de incidencia como lo reportado en Brasil por Takatsu *et al.*, 1986 y Colombia por Tapeiro *et al.*, 2007 debido al manejo tradicional que facilita la propagación de la marchitez.

CONCLUSIONES

R. Solanacearum es una bacteria de amplia variabilidad genética cuyo genoma y megaplásmido en conjunto contienen información vinculada a la virulencia que desencadena la marchitez bacteriana en diversas especies vegetales incluyendo el plátano hartón en respuesta a condiciones ambientales favorables.

El diagnóstico del patógeno en campo se hace tradicionalmente en base a los síntomas de plantas,

alternativamente las pruebas bioquímicas y moleculares ofrecen mayor resolución para detectar al patógeno en huéspedes asintomáticos y suelo.

El control de la enfermedad es preventivo, no obstante el biocontrol ha demostrado resultados significativos.

La presencia del patógeno en las zonas de cultivo de Musáceas representa una amenaza a la actividad productiva en Venezuela.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alcalá, D. y Lara, B. (1995). Estudio de la marchitez bacteriana de la papa en tres localidades del estado Lara. *Agron. Trop.*, 48 (3): 275-289.

Alfano, J. and Collmer, A. (1997). The Type III (Hrp) Secretion Pathway of Plant Pathogenic Bacteria in: Trafficking Harpins, Avr Proteins, and Death. *Journal Of Bacteriology*, 179 (18): 5655-5662.

Allen, C., Prior, P. and Hayward, A. (2004). Bacterial wilt disease and the *Ralstonia Solanacearum*. Species complex. St. Paul (Minnesota): APS Press.

Álvarez, J., Rodríguez, P. y Montoya, M. (2008). Detección Molecular de *Ralstonia solanacearum* en Agroecosistemas Bananeros de Colombia. *Tropical Plant Pathology*, 33 (3): 197-203.

Álvarez, E., Iglesia, A., García, A. y Blanco, E. (2008). Optimización de Métodos Serológicos para la Detección de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabauuchi. *Rev. Protección Veg.* Vol. 23 No. 1 (2008): 26-31.

Arenas, A., López, D., Álvarez, D., Llano, G., y Loke, J. (2005). Efecto de Prácticas Ecológicas sobre la Población de *Ralstonia solanacearum* Smith, Causante del Moko del Plátano. *Fitopatología Colombiana*, 28 (2): 76 - 80.

Belalcázar, S. (1991). El cultivo del plátano en el trópico. Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. Edit. Feriva. Cali (Colombia). 367 p.

Belalcázar, S., Rosales, F. y Pocasangre, L. (2004). El "Moko" en el Plátano y Banano y el Rol de las Plantas Hospederas en su Epidemiología. Memorias de la XVI reunión de Acorbat. Pp16-36.

Bentsink, L., Leone, G., Van Beckhoven, J., Van Schijndel, H., Van Gemen, G. and Van der Wolf, J. (2002). Amplification of RNA by NASBA allows Direct Detection of Viable Cells of *Ralstonia solanacearum* in Potato. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 647-655.

Bertolla, F., Van Gijsegem, F., Nesme, X. and Simonet, P. (1997). Conditions for Natural Transformation of *Ralstonia solanacearum*. *Applied And Environmental Microbiology*, 63(12): 4965-4968.

Brencic, A. and Winnams, S. (2005). Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69 (1): 155-194.

Buddenhagen, I. W. (1961). Bacterial Kilt of Bananas: History and Known Distribution. *Tropical agriculture*, 38: 107-121.

Buddenhagen, I. W., Sequeiro, L. y Pelma, A. (1962). Designation of Races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*.

Buddenhagen, I.W. and Kelman, A. (1964). Biological and Physiological Aspects of Bacterial Wilt Caused by. *Pseudomonas solanacearum*. *Ann. Rev. Phytopathology*.

Cardozo, C., Rodríguez, P. y Marin, M. (2009). Caracterización Molecular del Complejo de Especies *Ralstonia solanacearum* en la Zona Bananera de Urabá. *Agronomía Colombiana*, 27(2): 203-210.

Caruso, P., Palomo, J., Bertolini, E., Álvarez, B., López, M. and Bioscan, E. (2005). Seasonal Variation of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2 Populations in a Spanish River: Recovery of Stressed

Cells at Low Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (1): 140-148.

Castillo, J. and Grennberg, J. (2007). Evolutionary Dynamics of *Ralstonia solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (4): 1225-1238.

Cayón, D. (2004). Ecofisiología y Productividad del Plátano (*Musa* AAB Simmonds). Acorbat, Memorias XVI reunión México. Pp. 172-183.

Chavarro, M. y Ángel, J. (2006). Establecimiento de un Sistema Diagnóstico para la Detección de *Ralstonia solanacearum* y Diferenciación Genética Utilizando Marcadores Moleculares RAPD. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 8(1): 14-31.

CIAT. (2003). Memorias del Curso Manejo Integrado de la Enfermedad del Moko del Plátano. CIAT, Cali, Junio 9 a 13 de 2003. 52 pp.

Dean, G., Allen, C., Schell, M., Denny, T., Greenberg, J., Duan, Y., Flores-Cruz, Z., Huang, Q., Clifford, J., Presting, G., González, E., Reddy, J., Elphinstone, J., Swanson, J., Yao, J., Mulholland, V., Liu, L., Farmerie, W., Patnaikuni, M., Balogh, B., Norman, D., Alvarez, A., Castillo, J., Jones, J., Saddler, G., Walunas, T., Zhukov, A., and Mikhailova, N. 2006. Identification of Open Reading Frames Unique to a Select Agent: *Ralstonia solanacearum* Race 3 Biovar 2. *MPMI*, 19(1): 69-79.

Delgado, E. y R. Paiva. (2001). Estudio del Efecto de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet) sobre la Sostenibilidad de la Producción de Musáceas en Barinas, Venezuela. *Rev. Fac. Agrn. (LUZ)*, 15:1-10.

Delgado, M., García, A., Nava, J., Carroz, G. y Barboza, F. (1998). Diagnóstico Técnico-socioeconómico de la Zona Platanera Subregión Sur del Lago de Maracaibo. Informe Técnico CORPOZULIA-FUSAGRI.

Deninson, R. and Kiers, T. (2004). Lifestyle Alternatives for Rhizobia: Mutualism, Parasitism, and Forgoing Symbiosis. *FEMS Microbiology Letters*, 237: 187-193.

Denny, T. and Hayward, A. (2001). Gram – Negative Bacteria. en: Schaad, N.W.; Jones, J.B.; Chum, W. (eds). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, American Phytopathological Society (APS) St Paul, MN, USA. Pag. 151-173.

De Oliveira, E., Silva, S., De Mello, V., Gasparotto, S. and Rires de Boher, L. (2000). Evaluación de *Musa* spp. para la Resistencia a la enfermedad de Moko (*Ralstonia solanacearum*, raza 2). *Infomusa*, 9(1): 19-20.

Deslandes, L., Olivier, J., Theulieres, F., Hirsch, J., Feng, D., Bittner-Eddy, P., Beynon, J. and Marco, Y. (2002). Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *PNAS*, 99(4): 2404-2409.

Digat, B. and Cambra, M. (1976). Specificity of Antigens in *Pseudomonas solanacearum* (E.F. Smith) and Application of Serology for Studying Bacterial wilt. p. 38-57. In: Sequeira, L. and Kelman, A. eds. *Proc. 1st Int. Plann. Conf. Workshop Ecol. Control Bact. Wilt*. Raleigh, North Carolina State University, U.S.A. 18-24.

Escalona, Y., Rodríguez, D., Contreras, N. y Jiménez, N. (2006). Patógenos del Suelo en el Cultivo de Pimentón de la Zona Baja del Municipio Jiménez del Estado Lara, Venezuela. *Bioagro*, 18 (1): 3-13.

FAO. (2006). Datos agrícolas faostat. Disponible en línea en: http://faostat.fao.org/faostat/colletions?subset=agricultura&len_guaje

Fegan, M. and Prior, P. (2006). Diverse Members of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex Cause Bacterial Wilts of Banana. *Australasian Plant Pathology*, 35:93-101.

Figuerola, M. (1990). Dinámicas Poblacionales de Cuatro Géneros de Nematodos Parasitas en Plátano (*Musa* AAB, sub grupo plátano cv Currare). *Asbana*, 14 (33): 5-7.

French, E. (2006). Interaction between strains of *Ralstonia solanacearum*, its host and the environment. CIP sección 10.

French, E., Gutarra, L., Alley, P. y Elphinstone, J. (1995). Culture Media for *Ralstonia solanacearum* Isolation, Identification and Maintenance. *Fitopatología Peruana*, 30 (3): 126-130.

Frison, E. and Sharrock, S. (1988). The Economic, Social and Nutritional Importance of Banana in the World. Bananas and Food security/Les Productions Bananieres: UN Enjeu économique Majeur Pour la Sécurité Alimentaire. International symposium, Douala, Cameroon, 10-14 November 1988. INIBAP, Montpellier, France. Pp 21-35.

García, R., García, A. y Delgado, L. (1999). Marchitez Bacteriana del Tomate Causada por el Biovar 2-a, de *Ralstonia solanacearum*, en Algunas Localidades del Estado Mérida – Venezuela. *Revista Forestal Venezolana*, 43 (2): 183-189.

Gómez, E., Álvarez, E. y Llano, G. (2006). Identificación y Caracterización de Cepas de *Ralstonia solanacearum*, Raza 2, Agente Causal del Moko de Plátano en Colombia. *Fitopatología Colombiana*, 28 (2). Disponible en línea: http://ciat-library.ciar.org/Articulos_Ciat/cepas_ralstonia_Moko%202.pdf. Consulta 20 julio.

González, E. y Allen, C. (2003). Caracterización of a *Ralstonia solanacearum* Operon Required for Poligalacturonate Degradation and Uptake of Galacturonic Acid. *MPMI*, 16(6): 536-544.

González, B. y Dreyfus G. (2003). Sistemas de Secreción de Proteínas en las Bacterias Gram Negativas: Biogénesis Flagelar y Translocación de los Factores de Virulencia. Reporte técnico. UNAM, facultad de medicina.

Gonzalez, I., Arias, Y., Peteira, Y. (2009). Interacción Planta-Bacterias Fitopatógenas: Caso de Estudio *Ralstonia Solanacearum*-Plantas Hospedantes. *Rev. Protección Veg.*, 24 (2): 69-80.

Grey, B. and Steck, T. (2001). The Viable but Nonculturable State of *Ralstonia solanacearum* May be Involved in Long-term Survival and Plant Infection. *Applied And Environmental Microbiology*, 67 (9): 3866-3872.

Jaunet, T. and Wang, J. (1999). Variation in Genotype and Aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* Race 1 Isolated from Tomato in Taiwan. *Phitopatología*, 89 (4): 320-327.

Khakvar, R., Sijam, K., Yun, W., Radu, S. and Lin, T. (2008). Improving a PCR-Based Method for Identification of *Ralstonia solanacearum* in Natural Sources of West Malaysia. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 3 (2): 490-493.

Kiba, A., Maimbo, M., Kanda, A., Tomiyama, H., Ohnishi, K., and Hikichi, Y. (2007). Isolation and Expression Analysis of Candidate *Ralstonia solanacearum*-Tobacco Interaction. *Plant Biotechnology*, 24: 409-416.

- Kloepper, J.,** Tuzun, S., Liu, L. and Wei, G. (1993). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as Inducers of Systemic Disease Resistance. Management: Biologically Based Technologies, 156-165 in: Pest
- Hayward, A.** (1964). Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. J. Appl. Bacteriol., 27 :265-277.
- Hayward, A.** (1991). Biology and Epidemiology of Bacterial Kilt Caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology, 29:64-87.
- Hayward, A.** (2006). Pudrición de las Frutas de Banano Causada por *Ralstonia solanacearum*, Raza 2: Materias de Nomenclatura, Transmisión y Control. Infomusa, 15 (1): 7- 11.
- Hernández, Y.,** Mariño, N., Trujillo, G. y Urbina, C. (2005). Invasión de *Ralstonia solanacearum* en Tejidos de Tallos de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2005, 22: 181-190.
- Heuer, H.,** Yan-Ni, Y., Qing-Yun, X. Smalla, K. and Guo, J. (2007). Repeat Domain Diversity of *avrBs3*-Like Genes in *Ralstonia solanacearum* Strains and Association with Host Preferences in the Field. Applied And Environmental Microbiology, 73 (13): 4379-4384.
- Hikichi, Y.,** Yoshimochi, T., Tsujimoto, S., Shinohara, R., Nakaho, K., Kanda, A., Kiba, K. and Ohnishi, K. (2007). Global Regulation of Pathogenicity Mechanisms in *Ralstonia solanacearum*. Plant Biotechnology, (24): 149- 154.
- Hooker, W.** (1980). Compendio de Enfermedades de la Papa. Centro Internacional de la papa (CIP) Lima, Perú. pp. 37-42.
- Horita, M.** and Tsuchiya, K. (2001). Genetic Diversity of Japanese Strains of *Ralstonia solanacearum*. Bacteriology, 91 (4):399-407.
- Hueck, C.** (1998). Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. Microbiology And Molecular Biology Reviews, 62 (2): 379-433.
- Islam, T.** and Toyota, K. (2004). Effect of Moisture Conditions and Pre-incubation at Low Temperature on Bacterial Wilt of Tomato Caused by *Ralstonia solanacearum*. Microbes of Environments, 19 (3): 244-247.
- Kelman, A.** y Sequeira, L. (1965). Root-to-root Spread of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology, 55: 304-309.
- Kelman, A.** (1954). The Relationship of Pathogenicity in *Ralstonia solanacearum* to Colony Appearance on a Tetrazolium Medium. Phytopathology, (44):693.
- Krishna P.,** Mondem, S. and Satyanarayana, T. (2006). Molecular Techniques for Understanding the Microbial Community Structure in Mycorrhizosphere. Soil Biology, Volume 7: Microbial Activity in the Rhizosphere.
- Tans-Kersten, J.,** Huang, H. and Allen, C. (2001). *Ralstonia solanacearum* Needs Motility for Invasive Virulence on Tomato. Journal Of Bacteriology, 183 (12): 3597-3605
- Lee, A.** and Wang, Ch. (2000). The Design of Specific Primers for Detection of *Ralstonia solanacearum* in Soil Samples by Polymerase Chain Reaction. Bot. Bull. Acad. Sin., 41: 121- 128
- Liu, H.,** Kang, Y., Genin, S., Schell, M. y Denny, T. (2001). Twitching Motility of *Ralstonia solanacearum* Requires a Type IV Pilus System. Microbiology, (147): 3215-3229.
- Lwin, M.** and Ranamukhaarachchi, S. (2006). Development of Biological Control of *Ralstonia solanacearum* Through Antagonistic Microbial Populations. International Journal of Agriculture and Biology, 8 (5): 657-660.
- Martín, C.** y French, E. (1985). Bacterial Kilt of Potato: *Pseudomonas solanacearum*. Technical Information Bulletin 13. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú 16 p.
- Martins, J.** (2002). Caracterização Bioquímica, Patogênica e Molecular de Isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 de Batata e Berinjela. Tesis doctoral, Universidad de San Paulo-Brasil.
- Martins, J.,** Takatsu, A. y Uesugi, C. (2001). Colonização Radicular de Plantas Cultivadas por *Ralstonia solanacearum* biovars 1, 2 e 3. Scientia Agricola, 58 (3): 497-500.
- MAT.** 1997. Censo Agrícola, Dependencia Santa Bárbara de Zulia.
- Matos, A.,** Silva, S. y Pereira, J. 1996. Doenças da Bananeira no Médio Solimões, Amazonas: Moko, Mal - do - Panamá e sigatoka amarela. Informativo SBF, Brasília, 15(4).
- Molina, A.** (1999). Enfermedades de la Podredumbre de las Frutas de los Bananos en el Sudeste de Asia. Infomusa. 8 (1).
- Montesinos, E.,** Bonaterra, A., Badosa, E., France's, J., Alemany, J., Llorente, I. and Moragrega, C.. (2002). Plant-microbe Interactions and the New Biotechnological Methods of Plant Disease Control, Int. Microbiol., 5: 169-175.
- Murata, Y.,** Tamura, N., Nakaho, K. and Mukaihara, T. (2006). Mutations in the *lrpE* Gene of *Ralstonia solanacearum* Affects Hrp Pili Production and Virulence. MPMI, 19 (8): 884-895.
- Muresu, R.,** Sulas, L., Polone, E. and Squartini, A. (2005). PCR Primers Based on Different Portions of Insertion Elements Can Assist Genetic Relatedness Studies, Strain Fingerprinting and Species Identification in Rhizobia. FEMS Microbiology Ecology, (54): 445-453.
- Mwangi, J.,** Nyende, A., Demo, P. and Matiru, V. (2008). Detection of Latent Infection by *Ralstonia solanacearum* in Potato (*Solanum tuberosum*) using stems instead of tubers. African Journal of Biotechnology, 7 (11):1644-1649.
- Nakatsu, C.,** Korona, R., Lenski, R., Bruijn, F., Marsh, T. and. Forney, L. (1998). Parallel and Divergent Genotypic Evolution in Experimental Populations of *Ralstonia* sp. Journal Of Bacteriology, 180 (17): 4325-4331
- Nava, C.** (1989). Problemática del Cultivo de Plátano en Venezuela: Memorias IX Reunión ACORBAT. Mérida. Venezuela. pp. 643-653.
- Navas, C.,** Villareal, E. y Villalobos, R. (1998). Comportamiento de Plántulas del Clon de Plátano Hartón (*Musa* AAB) en el Sur del Lago de Maracaibo. Rev. Fac. Agron. (Luz), 15:1-10.
- OEPP/EPPO.** (2004). Diagnostic Protocols for Regulated Pests, Protocolos de Diagnostico Pour les Organismes Réglementés *Ralstonia solanacearum*. Bulletin, pp. 173-178.
- Palencia, G.,** Santos, R. y Martín, J. (2006). Manejo sostenible del manejo del plátano. *Corpoica*, Hoja l divulgativo.
- Park, K.,** Paul, D., Kim, Y., Nam, K., Lee, Y. Choi, H. and Lee, S. (2007). Induced Systemic Resistance by *Bacillus vallismortis* EXTN-1 Suppressed Bacterial Wilt in Tomato Caused by *Ralstonia solanacearum*. Plant Pathol. J., 23 (1) : 22-25.

- Patrício, F., Almeida, I., Santos, A., Cabral, O., Tessarioli, J., Sinigaglia, C., Beriam, L. y Rodrigues, J. (2005).** Avaliação da Solarização do Solo para o Controle de *Ralstonia solanacearum*. Fitopatol. bras., 30(5): 475-481.
- Poussier, S., Thoquet, P., Trigalet, M., Barthet, S., Meyer, D., Arlat, M. and Trigalet, A. (2003).** Host Plant-dependent Phenotypic Reversion of *Ralstonia solanacearum* From Non-pathogenic to Pathogenic Forms Via Alterations in the *phcA* gene. Molecular Microbiology, 49 (4): 991-100.
- Poussier, S., Trigalet-Demery, D., Vandewalle, P., Goffinet, B., Luisetti, J. and Trigalet, A. (2000).** Genetic Diversity of *Ralstonia solanacearum* as Assessed by PCR-RFLP of the *hrp* Gene Region, AFLP and 16S rRNA Sequence Analysis, and Identification of an African Subdivision. Microbiology, 146: 1679-1692.
- Poussier, S., Vandewalle, P. and Luisetti, J. (1999).** Genetic Diversity of African and Worldwide Strains of *Ralstonia solanacearum* as Determined by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *hrp* Gene Region. Applied and Environmental Microbiology, 65 (5): 2184-2194.
- Priou, S., Barea J. y Aley, P. (2006).** Manejo Integrado de la Marchitez Bacteriana de la Papa. Centro internacional de la Papa CIP.
- Rengifo, J. (2003).** Bacterias Asociadas al Cultivo del Plátano (*Musa* sp.) y su Relación con el Aborto del Racimo. Tesis de maestría. Universidad de Puerto Rico.
- Rezzonico, F., D'fago, G. and Loccoz, Y. (2004).** Comparison of ATP ase-Encoding Type III Secretion System *hrcN*. Applied And Environmental Microbiology, 70 (9): 5119-5131
- Robertson, A., Wetchter, W., Denny, T., Forthum, B. y Kluepfel, D. (2004).** Relationship Between Avirulence Gene (*avrA*) Diversity in *Ralstonia solanacearum* and Bacteria Wilt Incidence. MPBI e-xtra, 17(12):1376-1384.
- Robinson, J. (1998).** Bananas and Plantains. Crop Production Science in Horticulture. CAB Internacional. 230p.
- Roman, J. (1978).** Fitonematología tropical. Colegio de Ciencias Agrícolas. Universidad de Puerto Rico. 256pp.
- Rorer, J. (1911).** A Bacterial Disease of Banana and Plantains. Phytopathology, 1 (2):45-49.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J., Cattolico, L., Chandler, M., Choisine, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Âbault, A., Whalen, M., Wincker, P., Levy, J., Weissenbach, M. and Boucher, C. (2002).** Genome Sequence of the Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum*. Nature, 415: 497-502
- Sáez, V. y Rivas, C. (1992).** Zonificación Agroclimática de Cultivos en la Región Sur del Lago de Maracaibo (Estado Zulia). MARNR. 108 pp.
- Seal, S., Taghavi, M., Fegan, N., Hayward, A. and Fegan, M. (1999).** Determination of *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum* rDNA subgroups by PCR tests. Plant Pathology, 48: 115-120.
- Sinohara, R., Kanda, A., Ohnishi, K., Kiba, A. and Hickichi, Y. (2005).** Contribution of Folate Biosynthesis to *Ralstonia solanacearum* Proliferation in Intercellular Spaces. Applied and Environmental Microbiology, 71 (1):417-422.
- Staskawicz, B. (2001).** Genetics of Plant-pathogen Interaction Specifying Plant Disease Resistance. Plant Physiology, (125): 73-76.
- Stefani, E., Giosuè, S. and Mazzucchi, U. (2005).** Detection of Latent Infections of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2, Race 3 in Tomato Crops. Journal of Plant Pathology, 87 (3): 167-171.
- Stover, R. H. (1972).** Banana, Plantain and Abaca Disease. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England. 316p.
- Takatsu, A. (1986).** Ricos e Consequencias da Disseminacao do Moko para outras Regioes do Brasil. Pp 54-59 In simposio sobre moko da bananeira, Manaus, AM (1984). Anais. Embrapa-CNPMP, documento 19. Embrapa- CNPMP, Cruz das almas, BA.
- Tamura, N., Murata, Y. and Mukaihara, T. (2005).** Isolation of *Ralstonia solanacearum* *hrpB* Constitutive Mutants and Secretion Analysis of *hrpB*-Regulated Gene Products that Share Homology with Known Type III Effectors and Enzymes. Microbiology, 151, 2873-2884.
- Tapiero, A., Morales, A. y Rodríguez, S. (2007).** Dispersión de *Ralstonia solanacearum* en Suelos Cultivados con Plátano en el Piedemonte Llanero. Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 8(1): 52-60.
- Thwaites, R., Eden-Green, S. and Black, R. (1999a).** Diseases Caused by Bacteria. In: Diseases of Banana, Abacá and Enset. Editor David R. Jones. P.213-238.
- Thwaites, R., Mansfield, J., Eden-Green, S. and Seal, S. (1999b).** RAPD and Rep PCR-based Fingerprinting of Vascular Bacterial Pathogens of *Musa* spp. Plant Pathology, 48: 121-128.
- Trujillo, G. (1998).** Fundamentos de Bacterias Fitopatógenas. Revista Alcance de la Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 56:211 p.
- Valls, M., Genin, S. and Boucher, C. (2006).** Integrated Regulation of the Type III Secretion System and Other Virulence Determinants in *Ralstonia solanacearum*. Plos Pathogens, 2 (8): 0798-0807.
- Villa, J., Tsuchiya, K., Horita, M., Natural, M., Opina, N. and Hyakumachi, M. (2003).** DNA Analysis of *Ralstonia solanacearum* and Related Bacteria Based on 282-bp PCR-Amplified Fragment. Plant disease, 87 (11): 1337-1343.
- Vivas, Y., Urdaneta, I. Rangel, S. y Hernández, J. (2009).** Incidencia de *Ralstonia solanacearum* en Plantas de Plátano Hartón *Musa* AAB en una Finca del Sur del lago de Maracaibo. Revista UDO Agrícola. Aprobado para publicación.
- Williamson, L., Nakaho, K., Hudelson, B. and Allen, C. (2002).** *Ralstonia solanacearum* Race 3, Biovar 2 Strains Isolated from Geranium Are Pathogenic on Potato. Plant Disease, 86 (9): 987-991.
- Yao, J. and Allen, C. (2007).** The Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* Needs Aerotaxis for Normal Biofilm Formation and Interactions with Its Tomato Host. Journal Of Bacteriology, 189 (17): 6415-6424
- Yu, Q., Alvarez, M., Moore, P., Zee, F., Kim, M., Silva, A., Hepperly, P. y Ming, R. (2003).** Molecular Diversity of *Ralstonia solanacearum* Isolated from Ginger in Hawaii. Bacteriology, 93 (9): 1124- 1130.