

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PERSISTENCIA DE *Pseudomonas solanacearum* EN
SUELOS NATURALMENTE INFESTADOS EN
TURRIALBA, COSTA RICA

tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa
Conjunto de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos
Naturales de la Universidad de Costa Rica y el Centro Agronómico
Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de

Magister Scientiae

por

CESAR A. RODRIGUEZ MEDINA

Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
Programa de Cultivos Anuales
Turrialba, Costa Rica
1980

DEDICATORIA

A mi madre

A la memoria del Padre Aureliano

A mi esposa, Yolanda

A mi hija, Raquel Cristina

A mi hermano

AGRADECIMIENTO

El autor desea expresar su más sincero agradecimiento al Dr. Luis Carlos González, excelente persona y profesional, del cual recibí en todo momento su estímulo, amistad y constante preocupación, su acertada orientación y sus valiosísimos consejos.

A los miembros de su Comité Consejero, Doctores Raúl Moreno, Miguel Holle y Fernando Morales, por su apoyo y acertadas sugerencias.

Al Centro Internacional de la Papa, que por medio de su representante en el CATIE, el Dr. Michael Jackson, me brindaron ayuda material y de asesoramiento en el presente trabajo.

Al personal del Departamento de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la U.C.R., por la colaboración y amistad que todo el tiempo me ofrecieron.

A los Doctores Luis Sequeira y Gustavo Granada de la Universidad de Wisconsin, por la valiosa ayuda prestada.

A los señores Jorge Aguilar, Fernando López y Moisés Pereira, por su amistad y colaboración que gentilmente me brindaron.

Al personal obrero del campo experimental "La Montaña", por la oportuna colaboración prestada.

A los compañeros de estudio por la sincera amistad que me demostraron en todo momento.

A mi esposa Yolanda, por su comprensión y estímulo demostrados durante mis estudios; además, por su excelente trabajo de mecanografía.

A la Fundación Gran Mariscal de Ayacucho, de Venezuela, a la Universidad de Costa Rica y al Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, porque me dieron la oportunidad de efectuar mis estudios de posgrado.

BIOGRAFIA

El autor nació en Caracas, Venezuela, el 21 de diciembre de 1954.

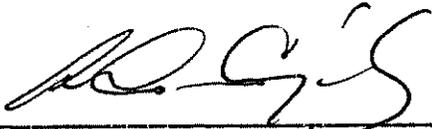
Egresó como Bachiller en Ciencias del Liceo Militar "Gran Mariscal de Ayacucho" de la ciudad de Caracas, en el año 1971.

Sus estudios universitarios los efectuó en la Universidad de Costa Rica, graduándose de Ingeniero Agrónomo en 1976.

Desde febrero de 1977 hasta febrero de 1979, trabajó como Investigador I en el Subprograma de caña de azúcar y encargado de la Sección de Cultivos de la Estación Experimental de Apure, Venezuela, perteneciente al Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias.

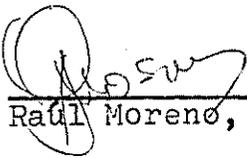
En marzo de 1979, ingresó al Programa de Estudios de Posgrado de la Universidad de Costa Rica - Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (UCR-CATIE), mediante una beca de la Fundación Gran Mariscal de Ayacucho de Venezuela, graduándose de Magister Scientiae en Diciembre de 1980.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica.



Luis Carlos González, Ph.D.

Profesor Consejero



Raúl Moreno, Ph.D.

Miembro del Comité



Miguel Holte, Ph.D.

Miembro del Comité



Fernando Morales, M.S.

Miembro del Comité



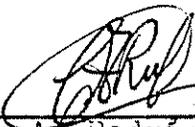
Álvaro Cordero, Ph.D.

Coordinador del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales



Elemer Bornemisza, Ph.D.

Coordinador del Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad de Costa Rica



César A. Rodríguez Medina

Candidato

INDICE

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	ix
SUMMARY.....	xi
LISTA DE CUADROS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
INTRODUCCION.....	1
REVISION DE LITERATURA.....	3
A. El patógeno.....	3
A.1 Morfología.....	3
A.2 Apariencia de las colonias.....	4
A.3 Fisiología.....	4
A.4 Patogenicidad.....	5
B. Desarrollo de la enfermedad.....	5
B.1 Penetración del patógeno.....	5
B.2 Incubación.....	6
B.3 Sintomatología.....	6
C. Persistencia de la bacteria.....	7
C.1 En el suelo.....	7
C.2 En hospedantes alternos.....	9
D. Efecto del uso del terreno en la sobrevivencia de la bacteria.....	11
E. Métodos de detectar la bacteria en el suelo.....	13
E.1 Plantas indicadoras.....	13
E.2 Medios selectivos.....	14
E.3 Serología.....	15
MATERIALES Y METODOS.....	17
I. MEDICION DEL NIVEL DE INOCULO RESIDUAL.....	17
A. Determinación de <u>P. solanacearum</u> en malezas sin síntomas.....	17
Ensayo 1.....	17
Ensayo 2.....	18

B.	Determinación del nivel de <u>P. solanacearum</u> en el suelo por medio de plantas indicadoras.....	19
	Ensayo 1.....	19
	Ensayo 2.....	20
C.	Detección de la bacteria en medios de cultivo selectivos.....	21
	Ensayos 1 y 2.....	23
	Ensayo 3.....	23
II	PERSISTENCIA DE <u>P. solanacearum</u> EN RELACION AL MANEJO PREVIO DEL TERRENO.....	24
A.	Descripción y antecedentes del área de estudio.....	24
B.	Tratamientos.....	24
	B.1 Suelo preparado en forma tradicional.....	27
	B.2 Cobertura vegetal mezclada con tierra.....	27
	B.3 Mantenimiento de cobertura vegetal de residuos de cosecha sobre el suelo.....	27
	B.4 Suelo no alterado.....	27
C.	Labores agronómicas.....	28
	C.1 Siembra.....	28
	C.2 Fertilización.....	28
	C.3 Deshierbas y medidas fitosanitarias.....	29
D.	Evaluación de la persistencia de <u>P. solanacearum</u> en el terreno.....	30
	D.1 Plantas indicadoras en invernadero.....	30
	D.2 Medios selectivos en el laboratorio.....	30
	D.3 Medidas de marchitez en el campo.....	30
	D.4 Rendimiento y sanidad de los tubérculos.....	31
	RESULTADOS Y DISCUSION.....	32
I.	MEDICION DEL NIVEL DE INCCULO RESIDUAL.....	32
A.	Detección de <u>P. solanacearum</u> en malezas sin síntomas	32
	Ensayo 1.....	32
	Ensayo 2.....	33
B.	Determinación del nivel de <u>P. solanacearum</u> en el suelo por medio de plantas indicadoras.....	35
	Ensayo 1.....	35
	Ensayo 2.....	39
C.	Detección de la bacteria en medios de cultivo selectivos.....	41
	Ensayo 1.....	41
	Ensayo 2.....	42
	Ensayo 3.....	43

II	PERSISTENCIA DE <u>P. solanacearum</u> EN RELACION AL MANEJO PREVIO DEL TERRENO.....	44
A.	Detección a través de plantas indicadoras en inver- nadero.....	44
B.	Aislamiento en medios selectivos.....	47
C.	Marchitez y severidad en el campo.....	50
	C.1 Porcentaje de marchitez en papa.....	50
	C.2 Índice de severidad en papa.....	60
	C.3 Porcentaje promedio de marchitez en tomate....	60
D.	Rendimiento y sanidad de los tubérculos de papa....	63
	CONCLUSIONES.....	67
	BIBLIOGRAFIA.....	69
	APENDICE.....	77

RESUMEN

Este trabajo se realizó con dos objetivos básicos: (a) evaluar la eficacia de métodos de medir el nivel de inóculo residual de Pseudomonas solanacearum en un terreno y (b) utilizar estos métodos para determinar el efecto de varios sistemas de labranza de suelo sobre el nivel de inóculo de P. solanacearum, en terrenos naturalmente infestados. El trabajo se realizó en suelos del orden Inceptisol, Typic Distropepts, de textura franco-arcillosa, en el CATIE, Turrialba, Costa Rica.

No se logró detectar la bacteria en los tejidos leñosos de malezas susceptibles que crecían sin síntomas en terrenos altamente infestados. Algunas plantas jóvenes de Melampodium perfoliatum, que invade terrenos recién arados, se marchitan, y de estas sí se aisló la bacteria, pero sólo en esta etapa transitoria sirvió esta maleza como indicador de P. solanacearum.

Para medir el nivel de P. solanacearum en el suelo se probaron varias plantas indicadoras sembradas en muestras llevadas al invernadero, así como varios medios de cultivo selectivos. El método de invernadero más eficaz fue el uso de plantas indicadoras de papa (cv Atzimba) y Nicotiana glutinosa, en ese orden. Los indicadores tomate (cv Tropic) y berenjena (Solanum melongena) fueron inconsistentes en detectar a la bacteria, mientras que Melampodium perfoliatum y plántulas provenientes de brotes separados de papa no fueron capaces de detectarla.

También fue posible detectar a P. solanacearum directamente del suelo, con el medio de cultivo selectivo de TZC más los antibióticos polimyxin B sulfato (100 ppm), tirotricina (20 ppm), chloromicetina (5 ppm), además de timerosal (0.05 ppm) y cristal violeta (50 ppm), pero solamente en suelos donde el porcentaje promedio de marchitez de papa en el campo era muy alto. Esto se debió, principalmente, a la gran cantidad de otras bacterias aparentemente antagónicas a P. solanacearum

presentes en estos suelos, lo que obligó a diluir mucho la muestra.

En la segunda etapa se trató de determinar el nivel residual de P. solanacearum en suelos bajo rotación con maíz y frijol y sometidos, durante tres años y medio, a los sistemas de labranza siguientes: a) labranza convencional (terreno arado); b) labranza reducida (cañas de maíz arrancadas y mezcladas con tierra); c) mínima labranza (cañas de maíz arrancadas y dejadas sobre el suelo); d) cero labranza (cañas de maíz sin remoción).

El método de invernadero (siembra de papa en muestras de suelo) permitió detectar a P. solanacearum en todas las parcelas y dió una indicación cuantitativa, aceptablemente aproximada, del efecto del método de labranza sobre la población relativa de la bacteria. El método de laboratorio (cultivo en medio selectivo) detectó la bacteria sólo en el suelo de las parcelas donde el porcentaje promedio de marchitez bacteriana en papa resultó posteriormente muy elevado, y dió escasa información cuantitativa (cerca de 25.000 células de P. solanacearum por gramo de suelo seco).

Para determinar el verdadero nivel poblacional de la bacteria se usó papa (cv Atzimba) y tomate (cv Tropic) sembradas en el campo, a los cuales se les midió la incidencia semanal de marchitez bacteriana. La población de P. solanacearum, así como la marchitez bacteriana, se incrementaron de manera altamente significativa en terrenos con labranza convencional, en contraste con los tres tratamientos de labranza reducida; no se encontraron diferencias significativas entre estos últimos. El tomate fue mucho más tolerante que la papa a la marchitez bacteriana en el campo, no pudiendo detectar diferencias significativas entre los tratamientos de labranza.

SUMMARY

The primary objectives of this investigation were: a) to evaluate the efficiency of methods for measuring Pseudomonas solanacearum residual inoculum in the soil; b) to use the best methods in determining the effect of several tillage systems upon the level of P. solanacearum inoculum in a naturally infested soil. The work was carried out in soils of the Inceptisol order, classified as Typic Distropepts, with a loamy-clay texture; in CATIE, Turrialba, Costa Rica.

The bacterium could not be detected in woody tissues of susceptible weeds growing symptomless on heavily infested, undisturbed soils. Some young Melampodium perfoliatum plants, which invaded recently-plowed soils, did wilt, and the bacterium was isolated from them, but only in this transient stage did this weed serve as an indicator of P. solanacearum.

Several indicator species planted on soil samples in the greenhouse, as well as several selective culture media, were tested in measuring the level of P. solanacearum. The most reliable greenhouse methods were the use of potato (cv. Atzimba) and Nicotiana glutinosa indicator plants, in that order. Tomato (cv. Tropic) and eggplant were erratic indicators of the bacterium while Melampodium perfoliatum and detached potato sprouts failed to detect it.

It was also possible to detect P. solanacearum directly from the soil, with a selective medium consisting of Kelman's TZC medium plus the antibiotics polymixin B sulfate (100 ppm) tyrothricin (20 ppm) and chloromycetin (5 ppm), as well as tymerosal (0.05 ppm) and crystal violet (50 ppm), but only in soils conducive to a very high average wilt percentage of potatoes in field plantings. This was mainly due to the large numbers of other bacteria, apparently antagonistic to P. solanacearum, which are present in these soils, forcing to very high dilutions of the samples.

In the second stage an attempt was made to determine the residual level of P. solanacearum in soils subjected to a corn-bean rotation for 3.5 years under the following tillage systems: a) conventional tillage (plowed and disked soil); reduced tillage (corn stalks pulled and mixed with soil); c) minimum tillage (corn stalks pulled and left on the ground); d) zero tillage (corn stalks not removed).

The greenhouse method (potatoes planted in soil samples) allowed detection of P. solanacearum in all plots and gave an acceptable quantitative indication of the effect of tillage on the relative population of the bacterium. The laboratory method (culturing in selective media) detected the bacterium only in soil samples from plots where the average percentage wilt of potatoes later proved very high, and gave only scant quantitative information (about 25,000 P. solanacearum cells per gram of dry soil).

To determine the actual population level of the bacterium, potato (cv. Atzimba) and tomato (cv. Tropic) were planted in the field, and weekly incidence of bacterial wilt recorded. Bacterial wilt significantly increased in soils under conventional tillage, in contrast to the three reduced tillage treatments; there were no significant differences among the latter. Tomato was much more tolerant to bacterial wilt than potato in the field, and failed to detect significant differences among tillage treatments.

LISTA DE CUADROS

TEXTO

<u>Cuadro No.</u>		<u>Página</u>
1	Composición de los medios selectivos utilizados para aislar <u>P. solanacearum</u> del suelo.....	22
2	Cantidad de fertilizante (kg/ha) para los cultivos papa y tomate en cada tratamiento de labranza de suelo.....	29
3	Determinación de <u>P. solanacearum</u> en plantas de <u>Melampodium</u> sp con y sin síntomas, muestreadas de un campo recién arado. (5 platos por muestra).....	34
4	Detección de <u>P. solanacearum</u> en invernadero por medio de plantas indicadoras, en muestras de suelo de un campo con diferentes porcentajes de infección previa en papa.....	36
5	Detección de <u>P. solanacearum</u> por medio de plantas indicadoras en las muestras de suelo del Cuadro 4, luego de siembra de maíz bajo condiciones de invernadero.....	37
6	Detección de <u>P. solanacearum</u> en invernadero y por plantas indicadoras, en suelo de un terreno altamente infestado y de uno vecino al mismo (Ensayo 2).....	40
7	Detección de <u>P. solanacearum</u> por medios de cultivos selectivos en un suelo naturalmente infestado y en uno vecino.....	42
8	Colonias de <u>P. solanacearum</u> y otras bacterias obtenidas con tres diluciones de un suelo altamente infestado tras agitación prolongada, en el medio de cultivo selectivo D.....	44
9	Reacción de plantas indicadoras en invernadero como medio de predecir la presencia de la raza 1 de <u>P. solanacearum</u> en terrenos con cuatro diferentes labranzas de suelo. Turrialta, Costa Rica.....	45

<u>Cuadro No.</u>	(Continuación)	<u>Página</u>
10	Cuantificación de <u>P. solanacearum</u> en 16 parcelas de un suelo naturalmente infestado por un medio selectivo de cultivo.....	48
11	Valores promedios, por tratamiento de labranza del suelo y repetición, de los porcentajes de marchitez en papa y tomate y del índice de severidad en papa en el campo.....	56
12	Efecto del manejo previo de suelo sobre la producción de tubérculos de papa sanos e infectados, corregidos por el porcentaje de marchitez de post cosecha.....	64

APENDICE

1A	Ingredientes del medio TZC, utilizado para tratar de aislar <u>P. solanacearum</u> de malezas.....	73
2A	Datos climáticos mensuales correspondientes al período en que se realizó el experimento de campo. Turrialba, Costa Rica 1980.....	79
3A	Análisis de varianza de los grados de detección de <u>Pseudomonas solanacearum</u> utilizando papa como indicadora de invernadero..	80
4A	Análisis de varianza de los grados de detección de <u>Pseudomonas solanacearum</u> utilizando <u>Nicotiana glutinosa</u> como indicadora de invernadero.....	80
5A	Coefficiente de correlación de la cuantificación de <u>Pseudomonas solanacearum</u> en 16 diferentes suelos naturalmente infestados por medios selectivos de laboratorio.....	81
6A	Valores semanales de los porcentajes de marchitez obtenidos en papa, bajo condiciones naturales de campo. Turrialba, Costa Rica.....	82
7A	Valores de los índices de severidad obtenidos a la décima semana de la siembra en papa. Turrialba, Costa Rica.....	83

<u>Cuadro No.</u>	<u>(Apéndice)</u>	<u>Página</u>
8A	Valores semanales de los porcentajes de marchitez obtenidos en tomate, bajo condiciones naturales de campo, Turrialba, Costa Rica.....	84
9A	Análisis de varianza de los valores de porcentajes promedio de marchitez en papa.....	85
10A	Análisis de varianza de los valores del índice de severidad en papa.....	85
11A	Análisis de varianza de los valores de porcentajes promedio de marchitez en tomate...	85
12A	Valores del rendimiento total de los tubérculos sanos y los porcentajes de pudrición post-cosecha.....	86
13A	Análisis de varianza del número de tubérculos sanos reales.....	87
14A	Análisis de varianza del rendimiento de tubérculos sanos reales.....	87
15A	Análisis de varianza del rendimiento total.	87

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura No.</u>		<u>Página</u>
1	Distribución de las subparcelas que se utilizaron en las pruebas de medición de inóculo residual de <u>P. solanacearum</u> en el suelo. Los cultivares de papa en la siembra previa a la muestra fueron Atzimba (Atz) y MS 35-22 (MS); en paréntesis se indica el porcentaje de marchitez promedio en esa siembra.....	18
2	Distribución en el campo de las parcelas utilizadas para analizar el efecto de la preparación del terreno sobre la persistencia de <u>P. solanacearum</u> , indicando los tratamientos y subtratamientos que tuvieron en los tres años y medio previos (59). Las parcelas sombreadas fueron las usadas en este trabajo y los números su ubicación en el campo.....	25
3	Sistemas de labranza de suelo mantenidos durante tres años y medio previos, utilizados para comprobar el efecto de la preparación del terreno sobre la persistencia de <u>P. solanacearum</u> . Tratamientos: TA= terreno arado; CMMT= cañas de maíz mezcladas con tierra; CMSS= cañas de maíz sobre el suelo; CMSR= cañas de maíz sin remoción. En TA hay una gran cantidad de plántulas de <u>Melampodium</u> sp en desarrollo.....	26
4	Crecimiento de <u>P. solanacearum</u> en el medio de cultivo selectivo de Granada y Sequeira (22).	51
5	Detección de <u>P. solanacearum</u> (flecha) en un plato (C) en que se desarrollaron pocas colonias de otras bacterias; en contraste con el plato D, en el cual no se pudo detectar a <u>P. solanacearum</u> , pero existe gran cantidad de colonias de otras bacterias.....	52
6	Progreso del porcentaje de marchitez en papa, por repetición, en parcelas con cuatro distintas labranzas del suelo, Turrialba, Costa Rica	55

<u>Figura No.</u>	<u>(Continuación)</u>	<u>Página</u>
7	Efecto de cuatro sistemas de labranza de suelo sobre el desarrollo de la marchitez bacteriana en papa y tomate en Turrialba, Costa Rica.....	56
8	Diferencias entre el efecto de la labranza convencional (TA) y de la mínima labranza (CMSR) sobre la marchitez bacteriana en papa (al frente) y tomate (al fondo), a las 5 semanas de la siembra.....	58
9	Presencia de la maleza <u>Melampodium</u> sp en estado sano (M.s.) y con primeros síntomas de marchitez bacteriana (M.m.), en una de las parcelas sometidas a labranza convencional (TA), con un 100% de infección en papa.....	59
10	Reseña de la evaluación de distintos métodos para detectar la presencia de <u>Pseudomonas solanacearum</u> en suelo infestado.....	61
11	Comparación del rendimiento total y de la producción de los tubérculos sanos de papa cv. Atzimba, en cuatro distintas labranzas del suelo, Turrialba, Costa Rica.....	65

INTRODUCCION

Pseudomonas solanacearum E.F. Smith es una bacteria de gran potencial fitopatogénico, que se encuentra en suelos de muchas partes del mundo. Su ámbito de hospedantes incluye más de 200 especies de plantas, por lo que las pérdidas que causa son incalculables. Thurston (82) indicó que, en el año 1973, aproximadamente 680.000 hectáreas no pudieron sembrarse con cultivos tales como tomate, papa, chile y otros cultivos, debido a la infestación de los terrenos por P. solanacearum; es posible que actualmente esta cifra sea mayor aún.

En América Central, muchos agricultores siembran maíz y frijol para auto consumo y cultivos hortícolas como cebolla, camote, cucurbitáceas, vainita, papa y tomate para comercializar. En las zonas más cálidas, sin embargo, la marchitez bacteriana hace que la siembra de papa, y a menudo la de tomate, sea demasiado arriesgada; la presencia de P. solanacearum en los suelos es un serio obstáculo para el desarrollo de sistemas de producción agrícola con papa o tomate (31). Por lo tanto, es conveniente estudiar los factores que afectan la persistencia de la bacteria en el suelo, para poder desarrollar técnicas que disminuyan la severidad del ataque y, de esta manera, darle al agricultor la posibilidad de utilizar sistemas de producción apropiado a sus necesidades, que incluya, además de sus cultivos tradicionales, papa y tomate, de alto valor nutritivo y además remunerativos como fuente adicional de ingreso.

P. solanacearum comprende varias razas: la raza 1 es la que se encuentra corrientemente en las zonas más cálidas y tiene muchos hospedantes, agrícolas y silvestres. Se ha determinado que esta raza persiste durante períodos prolongados en terrenos del CATIE, en Turrialba, Costa Rica, aún en ausencia de hospedantes comerciales susceptibles; se ha tratado de disminuir la población de la bacteria mediante la rotación con maíz, frijol, camote y kudzú, sin resultado; por otro lado, se ha notado que la incidencia de la marchitez es más alta en suelos

donde la labranza regular del terreno propicia la renovación de malezas anuales, y hay evidencia preliminar de que el control químico de esas malezas puede disminuir el inóculo (32). Para verificar lo anterior y tratar de determinar los factores que afectan la sobrevivencia de la bacteria, se proyectó un trabajo de investigación con los siguientes objetivos:

1. Evaluar varios métodos de medir el nivel de inóculo de Pseudomonas solanacearum en diversos suelos del área experimental del CATIE, cuyo historial de marchitez bacteriana es conocido.
2. Utilizar el método más eficaz encontrado para determinar el nivel de P. solanacearum en terrenos experimentales del CATIE sin historial reciente de solanáceas, y en los que se ha cultivado durante varios años un sistema de producción basado en maíz y frijol bajo diferentes métodos de labranza del suelo.

REVISION DE LITERATURA

A. El patógeno

Pseudomonas solanacearum fue la primera bacteria fitopatógena señalada en la literatura, siendo Burrill, en 1891, quien obtuvo el primer cultivo puro de la misma. En 1896, Erwin F. Smith describió y clasificó a este organismo como Bacillus solanacearum y logró reproducir la enfermedad en papa y tomate, inoculándolos con cultivos puros de la bacteria; en 1914 el mismo autor la reclasificó como Pseudomonas solanacearum (40).

Buddenhagen, Sequeira y Kelman (6) han determinado tres razas de esta especie, basándose en los hospedantes afectados en condiciones naturales, la expresión de síntomas en una serie de hospedantes diferenciales y la apariencia de las colonias en el medio TZC. La raza 1 se encuentra en papa, tomate, berenjena, tabaco, muchas malezas y ciertos bananos diploides; la raza 2 causa marchitez en bananos y otras musáceas; y la raza 3 afecta papa y tomate, aunque también otras solanáceas pero no con alta virulencia. Las razas 1 y 2 poseen a su vez varias cepas o subgrupos. Por su parte, Hayward (27) clasificó una colección de 185 aislamientos de varios países en cuatro biotipos, de acuerdo a la capacidad en oxidar tres disacáridos (lactosa, manosa y celobiosa) y tres hexosas (manitol, sorbitol y dulcitol). El biotipo 3 oxida ambos grupos, pero el biotipo 1 ninguno; el biotipo 2 oxida los disacáridos pero no el alcohol hexosa; y el biotipo 4 oxida el alcohol hexosa, pero no los disacáridos. En cuanto a los hospedantes, el biotipo 2 es restricto a papa y tomate, en cambio los biotipos 1 y 3 afectan una gran diversidad de plantas.

A.1 Morfología

La bacteria tiene forma de bastoncillo alargado y de extremos redondeados (bacilo); sus medidas varían entre 0,3 y

0,7 μm de ancho y 0,8 y 1,9 μm de largo, presentando sus máximas dimensiones en cultivos jóvenes y dimensiones reducidas en el exudado de plantas con marchitez. No produce esporas ni se encapsula; el número de flagelos aún no está definido, pero se cree que en habitats naturales posee de 1 a 3 flagelos y que estos están en posición unipolar (11, 40).

A.2 Apariencia de las colonias

La apariencia de las colonias en cuanto al tamaño, forma y color varía con el medio de cultivo utilizado, la edad, el tipo de luz empleada para la observación, la variabilidad natural del organismo y las condiciones de incubación (11). Para Kelman (41), en el medio TZC (cloruro 2,3,5 trifenil tetrazolium), después de 36-48 horas de incubación a 32°C, las colonias tienen de 3 a 5 mm de diámetro, algunas tienen una C central rojiza sobre un fondo cremoso y son irregularmente redondeadas; otras son circulares, de dimensiones más reducidas y de coloración totalmente rojiza; además, entre esos dos tipos extremos pueden encontrarse formas intermedias.

A.3 Fisiología

La temperatura óptima para el crecimiento in vitro de P. solanacearum está comprendida entre 35 y 37°C, siendo la temperatura mínima de 10°C, la máxima de 41°C y el punto de temperatura letal de 52°C. La bacteria no soporta bajas humedades, muriendo después de 6 días de exposición a ambientes de baja humedad relativa, ó a las 48 horas en ambiente seco (40). Según Eddins, citado por Esquivel (11), el crecimiento del organismo se inhibió en un medio de papa acidulado a pH 4,2 y, a pesar de que no determinó el pH máximo, observó crecimiento aún a pH de 8,71. Por su parte, Echandi (9) no obtuvo crecimiento en PDA a valores de pH inferiores a 4 y determinó la producción de amilasa, gelatina y H₂S por el microorganismo.

A.4 Patogenicidad

Kelman (41) halló que el medio TZC servía para determinar en forma rápida la patogenicidad de las colonias en cultivo, por su forma, color y tamaño. Los tipos patógenos presentan, luego de 48 horas de incubación a 32°C, colonias irregularmente redondas, de color blanco cremoso con C central rojiza y de 3 a 5 mm de diámetro; por el contrario, las no patogénicas son circulares, de color rojizo y miden de 1,5 a 2 mm de diámetro.

Se han establecido diferencias en patogenicidad de los aislamientos de P. solanacearum provenientes de distintas regiones, por medio de inoculaciones de los distintos aislamientos en las mismas especies diferenciales, ó por inoculación cruzada del aislamiento de una especie sobre otra y viceversa (21, 42, 43). Lozano y Thurston (51) estiman que, para determinar la patogenicidad de un aislamiento de este organismo, se debe inocular plantas diferenciales de tabaco, papa, tomate y banano, pero que además debe estudiarse el comportamiento de la bacteria en el medio TZC y realizarse una serie de pruebas físico-químicas.

B. Desarrollo de la enfermedad

B.1 Penetración del patógeno

Diversos estudios concuerdan con que los primeros sitios de entrada del patógeno son los lugares donde ocurre la emergencia de raíces del hospedante, aunque en condiciones de campo la penetración ocurre frecuentemente por medio de heridas causadas en las raíces por insectos, trasplante, equipo mecánico y nemátodos. Los síntomas de la enfermedad aparecen generalmente después de 5 a 6 días de haber penetrado el organismo, progresan rápidamente y culminan con la muerte de la planta; sin embargo, se ha demostrado que antes de la muerte de la planta se libera gran número de bacterias en el suelo; estas desempeñan un papel importante en la diseminación del patógeno

a las plantas sanas adyacentes (44, 54, 65, 68). En condiciones de campo, uno de los principales factores que facilita la penetración de la bacteria en el hospedante son los nemátodos, cuyo efecto se ha comprobado en condiciones de invernadero. Entre las especies importantes para el desarrollo de la marchitez bacteriana en papa se encuentra Meloidogyne incognita acrita, la cual hace inoperante la resistencia a marchitez bacteriana (24, 52).

B.2 Incubación

El desarrollo de la marchitez bacteriana depende de la temperatura, luz y longitud del día. La temperatura es, según varios investigadores, el factor determinante para el desarrollo de síntomas y se estima que el óptimo de temperatura del suelo está entre 30 y 35°C, con un mínimo de 8 a 15°C y un máximo de 35 a 41°C. La temperatura del aire influye menos que la del suelo en el desarrollo de síntomas; sin embargo, temperaturas altas del suelo combinadas con temperaturas altas del aire ocasionan síntomas más severos (13, 34, 48, 57, 80).

B.3 Sintomatología

Los síntomas de la enfermedad causada por P. solanacearum varían según la especie, edad y nutrición del hospedante, la temperatura, la humedad relativa, la virulencia del patógeno y la concentración del mismo. La marchitez es el síntoma característico de esta enfermedad y puede aparecer en cualquier etapa de desarrollo de la planta. A veces se marchita una rama solamente, pero a los pocos días sigue el resto de la planta. En la parte baja del tallo se observa oscurecimiento de la madera y puede demostrarse la producción de exudado bacteriano si se pone una astilla de madera en agua. En papa, los síntomas subterráneos se encuentran en los tubérculos y esto se demuestra por el exudado que sale por las yemas, o por el haz vascular cuando los tubérculos se parten (12, 15). Wallis

y Truter (85) indican que inicialmente las bacterias invaden células pequeñas, adyacentes a los vasos largos, pero luego migran hacia células que ya han formado tilosas, en donde, al cabo de 48-72 horas, liberan materiales identificados como polisacáridos extracelulares, que se depositan en las paredes y vasos del tallo y constituyen la mayor causa de marchitez. Husain y Kelman (30) definen a esta sustancia como un polisacárido complejo de alto peso molecular, con glucosa como base de la cadena del polímero. Este exudado aumenta la viscosidad de la corriente vascular e interfiere con el movimiento del agua en vasos del xilema. También han encontrado (29) pectin-metil-esterasa, poligalacturonasa y celulasa, y suponen que la coloración café de los haces vasculares puede originarse de la actividad de la poligalacturonasa en las paredes de los mismos.

C. Persistencia de la bacteria

C.1 En el suelo

Thurston (82) señala que, en general, la enfermedad es más seria bajo condiciones calientes y suelos húmedos, y establece que la alta humedad del suelo aumenta: 1) la supervivencia de la bacteria en el suelo; 2) la infección; 3) la salida de inóculo de plantas hospedantes, diseminándose a través del suelo; 4) el desarrollo de la enfermedad después de la infección.

Seneviratne (69) señala que, en Ceylan, las condiciones biológicas y de ambiente del suelo son determinantes para la distribución de biotipos de P. solanacearum; el biotipo 3 pareció ser el tipo característico de la región seca, mientras que los biotipos 2 y 4 aparecieron en el área de transición entre las regiones secas y húmedas. Además, sugiere que esta bacteria es endémica y componente normal de la microflora de esos suelos, existiendo como saprófito ó no patogénico sobre raíces de especies no hospedantes, y que comienza a ser

patogénica en presencia de hospedantes susceptibles. Tanaka (78, 79) indica que la distribución de la bacteria en suelos tabacaleros del Japón infestados naturalmente ocurre en un estrato de 0-80 cm, estando los niveles de alta infestación a 0-50 cm de profundidad inmediatamente después de la cosecha. Mc Carter, Dukes y Jaworski (55) señalan que en Georgia este organismo se encontró fácilmente alrededor de los 30 cm de profundidad, bajó marcadamente a profundidades de 30-45 cm y no fue encontrada más abajo de los 45 cm; la ausencia de la bacteria a los 15 cm fue resultado de la sequía del suelo al tiempo de la muestra; el tiempo necesario para causar marchitez severa en tomate varió desde 19 días, cuando el patógeno estaba de 0 a 15 cm en el suelo, hasta 104 días, cuando estaba en un estrato de 45-60 cm.

Graham y Lloyd (19), en campos de Australia naturalmente infestados, detectaron a la bacteria entre 15 y 75 cm de profundidad con el uso de plantas de tomate, en un muestreo realizado ocho meses después de haber obtenido gran infestación en una siembra de papa. En suelos infestados artificialmente, la recuperación de la bacteria por medios de cultivo selectivos ocurrió a profundidades de 55-65 cm, tanto en suelos pesados como en arenosos. Lo anterior sugiere que, en ciertos suelos, este organismo suele sobrevivir de manera libre en los estratos profundos, debido a la baja actividad microbial. Además, la cantidad de oxígeno aprovechable es baja a esas profundidades, condiciones a las cuales *P. solanacearum* se ha mostrado tolerante y no así sus organismos antagónicos.

Tanaka (78), en Japón, observó mayor incidencia de marchitez a 27°C, menos a 34°C y aún menos a 17°C, en un suelo franco arenoso. Hsu (28), sin embargo, encontró en Taiwan un mutante resistente que sobrevivió por más tiempo en el suelo a 12°C y en un pH de 6,0 a 7,2; y sobrevivió menos a 28°C y en un pH de 4,1 a 5,3. Vaughan (83) determinó en el sur de Estados Unidos, que la infección ocurre más fácilmente en suelos húmedos, aunque también se da en suelos secos donde el porcentaje de humedad permanezca casi constante y siempre con un

pH de 6,0 a 8,1.

Este organismo tiene una amplia distribución en diferentes tipos de suelo, pudiéndose encontrar en suelos arenosos, francos y hasta arcillosos (84) Keshwal (46), en la India, determinó que la incidencia de marchitez aumenta con el incremento de la capacidad de retención de humedad, aumento del carbón orgánico y con la disminución del CaCO_3 y de las poblaciones de Penicillium sp del suelo. También estableció que el contenido de nitrógeno, fósforo, potasio y poblaciones de bacterias, Aspergillus sp y otros hongos, no afecta la población del patógeno en el suelo. Por el contrario, Tanaka y Noda (77) estimaron que, en superficies del suelo con incrementos de niveles de materia orgánica y microbios, las poblaciones de la bacteria bajaban más rápidamente que en el subsuelo, que contiene poca materia orgánica; al añadir estiércol a un subsuelo infestado, se redujo la población de P. solanacearum considerablemente. Mc Carter (56) estableció que este patógeno persistió por 4 años en Georgia, en dos campos infestados artificialmente, mediante el recorte e incorporación del material infestado de plantas enfermas de tomate.

C.2 En hospedantes alternos

El control de Pseudomonas solanacearum se hace difícil porque, una vez infestado el suelo, sobrevive parasitando solanáceas nativas o en asociación con la rizosfera de un gran número de hierbas invasoras. El número de especies vegetales parasitadas por esta bacteria es muy amplio, incluyendo cultivos de gran importancia económica. La familia Solanaceae es la que contribuye con el mayor número de hospedantes, siguiéndole las de las familias Compositae y Leguminosae (1, 40).

En general, informes que señalan infecciones naturales de un gran número de malezas y especies cultivadas se encuentran frecuentemente en la literatura (2, 3, 5, 45, 66, 67, 76). Harris (25), en Kenya, encontró que la raza 1 de esta bacteria es el principal patógeno de campo, en papa, tomate y berenjena;

la detectó, además, en las malezas Portulaca oleraceae de la familia Portulacaceae y Solanum nigrum de la familia Solanaceae, siendo esta última afectada por las razas 1 y 3. Erinle (10), en Nigeria, encontró varias malezas hospedantes a P. solanacearum, estando entre ellas: Vernonia pauciflora y Ageratum conyzoides de la familia Compositae, Commelina sp de la familia Commelinaceae, Vigna sp de la familia Leguminosae y Solanum nodiflorum de la familia Solanaceae, que fue la más afectada.

Graham y Lloyd (18) indican que Solanum nigrum y Solanum cinereum son hospedantes alternos del biotipo 2 en Australia y resaltan el hecho de que S. cinereum, cuando es inoculada o crece en suelos infestados, no muestra síntomas externos, pero el examen al microscopio muestra descoloración marrón oscura en el sistema vascular y, además, exudado bacteriano.

Jackson, González y Aguilar (31), en terrenos del CATIE, en Turrialba, han notado algunas malezas locales como hospedantes de la bacteria; la más importante es Melanthera perfoliata (Cavanilles) H.B.K., de la familia Compositae, que invade terrenos recién arados, marchitándose tanto en estados de planta joven como adulta. Entre otras malezas en que se observaron los síntomas de marchitez, se aisló la bacteria de una de ellas (Bidens pilosa L.), pero no de la otra (Emilia sonchifolia (L) D.C.). Chinchilla^{1/} logró aislar P. solanacearum de dos malezas que mostraban marchitez en Esparza, Costa Rica. Dichas malezas fueron Croton hirtus, de la familia Euphorbiaceae, e Hypoxis suaveolens de la familia Labiatae.

Por otro lado, Jackson y González (32) encontraron que, en parcelas donde las malezas habían sido controladas con Paraquat, la incidencia de marchitez en el cultivar de papa Atzimba fue significativamente menor que en otros tratamientos de control de malezas por laboreo mecánico. Aún así, la cantidad de marchitez en parcelas con previa aplicación de herbicida alcanzó 60%, si bien la enfermedad se desarrolló más lentamente. En parcelas donde las malezas se desarrollaron libre-

^{1/} Carlos Chinchilla, U.C.R., San José, Costa Rica, octubre 1979, comunicación personal.

mente, la enfermedad se desarrolló más rápidamente en siembras posteriores de papa.

D. Efecto del uso del terreno en la sobrevivencia de la bacteria

Varios autores indican que la duración es más importante que la naturaleza de la rotación de cultivos, para el control de P. solanacearum. Rotaciones de un año han sido suficientes para reducir el nivel de inóculo bajo ciertas circunstancias, pero de dos años o más resultaron más eficaces. Entre los cultivos de rotación no susceptibles más señalados están el arroz y algunos pastos (4, 7, 14).

Sequeira y Averre (71) sugieren que la aparición de la raza 2 de la bacteria en suelos sanos se debe al agua de drenaje proveniente de suelos infestados, y su establecimiento a las malezas susceptibles presentes. Clayton y colaboradores (7) indican que la ocurrencia de la enfermedad en tabaco (raza 1) generalmente está relacionada con la invasión previa de plantas hospedantes y que ni siquiera eliminando todas las malezas hay una disminución de la población del patógeno en el suelo. Por el contrario, Navarro (62), en Colombia, considera que para bajar la incidencia de la raza 3 del patógeno de un suelo infestado se debe dejar por lo menos seis meses de reposo el suelo, con un control de malezas mediante herbicidas; en su opinión, las malezas son los hospedantes de la bacteria en ausencia del cultivo de papa.

Sequeira (70), trabajando con la raza 2 de la bacteria, encontró que en suelos tropicales infestados y abandonados, pero que fueron arados varias veces durante la estación seca y luego replantados con banano, hubo una baja incidencia de la enfermedad del Moko, causada por dicha raza.

Por otro lado, Lloyd (49, 50) ha informado en sus trabajos que las malezas son de poca importancia como hospedantes de la raza 3 de la bacteria en zonas frescas de Australia; más

bien, parece que sobrevive por dos a tres años, protegida dentro de trozos previamente colonizados de desechos de hospedantes, y en pocos casos vive libremente en las profundidades del suelo. Este autor recomienda pastos como cultivo de rotación, debido a que contribuyen a acelerar la destrucción del habitat de esta raza del patógeno. Shamsuddin, Lloyd y Graham (73), en un campo infestado con la raza 3, compararon tres tipos de manejo de suelo y malezas: a) terreno abandonado, limpio de malezas y de desechos de hospedantes; b) terreno abandonado con crecimiento libre de malezas; c) terreno bajo rotación con los pastos Lolium multiflorum Lam., Dactylis glomerata y Trifolium repens L. en una proporción 7:4:1. Observaron, al año y medio, que en el terreno abandonado con malezas se incrementó casi al doble la población del patógeno (estimada mediante la incidencia de la enfermedad), en el terreno abandonado sin malezas se mantuvo igual, pero en el terreno bajo rotación con pastos se redujo tres veces la población. A los dos años y medio, apenas hubo enfermedad en el terreno abandonado con malezas, y en el resto no se presentó la enfermedad.

En cuanto a la raza 1 de la bacteria, Graham, Jones y Lloyd (20) señalan que se adapta mejor a regiones húmedas y cálidas, y que en estas condiciones tropicales y sub-tropicales los residuos de cosecha infestados se descomponen por microorganismos, dando solamente sitios de refugio temporal para la bacteria. Jackson y González (32), en terrenos de Turrialba, Costa Rica, a 600 m de altitud, donde persiste la raza 1, han ensayado varias rotaciones con cultivos como frijol, maíz, camote, tomate resistente, caupí y dejando el terreno en barbecho; encontraron que la marchitez bacteriana posterior no fue reducida significativamente después de ninguna rotación. Concluyeron que las condiciones son favorables para la supervivencia de la bacteria en ausencia de cultivos susceptibles, lo cual se complementa con el hecho de que la sequía total es difícil que ocurra en estos terrenos. En cambio en la zona de papa de Costa Rica, a 1600-2000 m de altitud, la raza 3 gene-

ralmente se erradica del suelo con sólo un año de rotación con pastos (14).

E. Métodos de detectar la bacteria en el suelo

E.1 Plantas indicadoras

Nesmith y Jenkins (63) señalan que la ecología de P. solanacearum en el suelo no es bien conocida, por falta de técnicas adecuadas y que, hasta ahora, la forma en que se ha determinado su sobrevivencia en el suelo ha sido por medio de plantas indicadoras. En condiciones de invernadero, se ha observado que plantas indicadoras jóvenes muestran síntomas más rápidamente que las viejas, siendo el efecto de la edad más notorio en plantas consideradas como más resistentes al patógeno.

Kratky y Ko (47) utilizaron, en invernadero, plantas de tomate susceptibles como indicadoras de suelos infestados con P. solanacearum y obtuvieron síntomas de marchitez típicos; en suelos sanos no obtuvieron marchitez. Por su parte Katsura y Uemura (39) indican que, para que se presenten síntomas de marchitez en plantas de tomate que crecen en suelos infestados, es necesario que se corten las raíces; relacionaron este hecho con la acción de nemátodos en el suelo. Graham y Lloyd (17), al probar varias plantas indicadoras, recomendaron utilizar brotes de tubérculo de papa que se ponen a germinar por 5 a 6 semanas en bandejas de arena, se le podan las raíces con tijeras y se transplantan en potes con suelo infestado para ser probado; no recomiendan utilizar tomate porque bajo sus condiciones no mostró síntomas típicos de marchitez bacteriana.

Existe una gran influencia de la época de la toma de la muestra del suelo infestado en la efectividad del uso de plantas indicadoras. En este sentido, Lloyd (49) encontró que cuando los suelos de campo con desechos de plantas infestadas se almacenaron en tarros y se colocaron en invernadero durante 20 semanas, bajo condiciones de humedad adecuada y temperaturas de 28°C de día y 24°C de noche, no se obtuvo ningún síntoma

de marchitez al sembrar plantas indicadoras de tomate. Por el contrario, en suelos infestados abandonados, no alterados en el campo por 20 semanas, luego de puestos en macetas y sembrados con tomate sí se obtuvo plantas enfermas. Lloyd considera que esos resultados se deben a que, en un suelo disturbado, húmedo y caliente, el patógeno no sobrevive en números detectables por más de 20 semanas, probablemente debido a la mayor actividad microbial.

En cuanto al posible uso de plantas de papa como indicadoras en el campo, Mahmoud y colaboradores (53) establecieron una correlación entre el peso de la semilla de papa, la severidad de la marchitez y el porcentaje de tubérculos infestados en el campo. Semillas de 50 g mostraron mayor incidencia de marchitez que semillas de 100 g, donde hubo una reducción de tubérculos infestados y un aumento de rendimiento.

E.2 Medios selectivos

Debido a la falta de métodos eficientes de hacer aislamientos a partir del suelo, se tiene poca información directa válida de los factores que influyen la supervivencia de P. solanacearum. Se han desarrollado medios para aislamiento y cuantificación directamente del suelo, pero no han sido muy usados, debido a que densidades bajas del patógeno no son detectables. Lo que generalmente se ha hecho es inocular el suelo con cantidades conocidas de la bacteria y luego realizar la medición, para poder cuantificar la población de la bacteria (38, 63).

Estos medios selectivos se basan en un medio base, el TZC, que es un indicador de P. solanacearum; el resto de los ingredientes son antibióticos, cuya función es eliminar otros tipos de bacterias y hongos que se presentan en el suelo (37, 63). La selectividad y la eficacia de estos medios varían según el tipo de suelo, las diferencias de humedad, la microflora, el tipo de variante de P. solanacearum, las especies de malezas que crecen y el pH del suelo (38, 64). Griffiths y Lim

(23) indican que la bacteria puede aislarse del suelo hasta después de las cinco semanas de la inoculación del mismo. Jenkins, Morton y Duques (36) encontraron que la población mínima de P. solanacearum detectable del suelo fue $2,5 \times 10^6$ células/ml de suelo, y que no fue posible detectar poblaciones menores por las siguientes razones: por la heterogeneidad del suelo; porque la mayoría de las bacterias no existen como células individuales; y porque las bacterias se encuentran embebidas por la materia orgánica ó partículas del suelo.

Para Harris (26), el TZC es un medio útil para estimar la población del patógeno en suelos, pero tiene una selectividad limitada, siendo 10^6 células/ml la más baja concentración detectable. Sin embargo, es posible mejorar progresivamente su selectividad aumentando la concentración de TZC y agregando antibióticos tales como neomicina, estreptomycin, polimixina y tiorotricina. En general, existen diversos medios selectivos descritos en la literatura por varios investigadores, los cuales buscan ser selectivos para aislamiento de P. solanacearum directamente del suelo; entre ellos está el de Cuppels y Kelman (8), el medio selectivo de Karganilla y Buddenhagen (38), el medio selectivo final de Nesmith y Jenkins (63) y otros más, que siempre tienen la gran desventaja de que sólo detectan a P. solanacearum luego de que se han hecho inoculaciones artificiales ó, en condiciones naturales, cuando las poblaciones de la bacteria son muy altas; con el agravante de contar a veces con muchos componentes antimicrobiales difíciles de conseguir (8, 38, 63).

E.3 Serología

Varios investigadores han propuesto técnicas serológicas para detectar a P. solanacearum del suelo, que incluyen las siguientes pruebas: la de difusión agar-gel, la de aglutinación y la de anticuerpos fluorescentes. Estos investigadores le dan a la serología una serie de ventajas sobre los medios selectivos y sobre las plantas indicadoras, a saber: mayor sensibilidad, especificidad y rapidez, capacidad de detectar

poblaciones menores de la bacteria en el suelo y capacidad de distinguir entre razas de la bacteria (33, 35, 36, 60, 61). Sin embargo, Jenkins, Morton y Dukes (36) indican que el gran inconveniente de estas técnicas serológicas es que no distinguen entre células vivas y muertas, ni tampoco entre células patogénicas y no patogénicas.

En suma, hasta el momento no existe un buen medio de determinar directamente la presencia de P. solanacearum en un suelo naturalmente infestado.

MATERIALES Y METODOS

Este trabajo se dividió en dos etapas principales. La primera consistió en evaluar métodos para medir el nivel de inóculo residual de Pseudomonas solanacearum, ya fuera en malezas ó en el suelo. En la segunda etapa, se aplicaron los métodos más eficaces para determinar el nivel de P. solanacearum en terrenos sometidos a varios sistemas de labranza del suelo.

I. MEDICION DEL NIVEL DE INOCULO RESIDUAL

A. Determinación de P. solanacearum en malezas sin síntomas

Se trató de determinar, por medio de dos ensayos, si la bacteria podía sobrevivir en hospedantes alternos, como serían las malezas, sin causar síntomas.

Ensayo 1

Se utilizaron malezas de un terreno donde, desde 1976 hasta 1980, hubo siembras de diferentes cultivos en rotación con el cultivar de papa Atzimba, que es susceptible a esta bacteria, y con el híbrido MS 35-22, que es tolerante. La selección de este terreno se hizo bajo la suposición de que, donde estuvo el cultivar Atzimba, el nivel de inóculo sería mayor que donde hubo MS 35-22. La Figura 1 muestra la distribución de las 12 subparcelas utilizadas en esta prueba.

Primeramente se reconocieron las malezas presentes en el terreno; luego, de cada una de las 12 subparcelas se recolectaron 10 ejemplares de las malezas más importantes que tenían leño, todas sin síntomas externos de marchitez bacteriana. Se usaron plantas marchitas de Melanodinium perfoliatum, de otro terreno vecino, como controles.

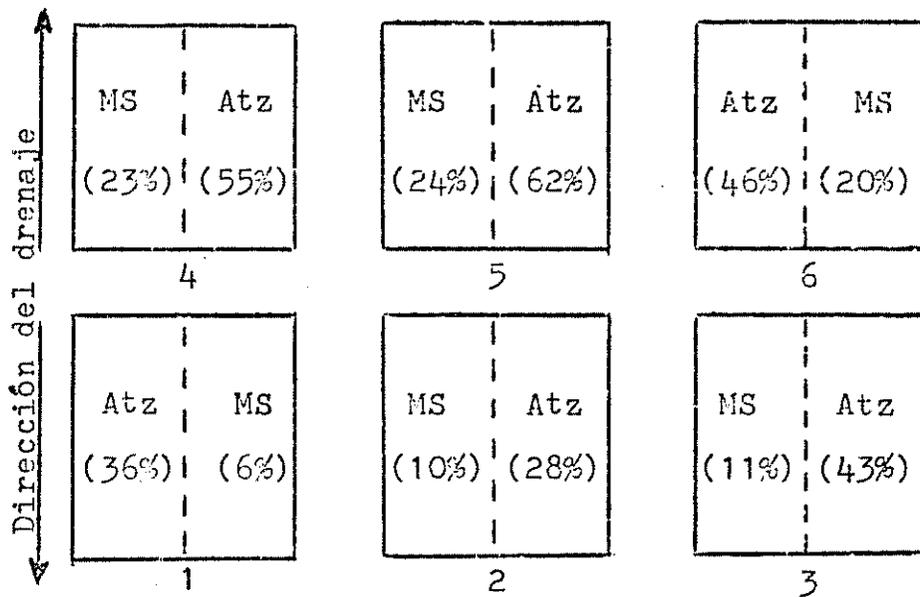


Figura 1 Distribución de las subparcelas que se utilizaron en las pruebas de medición de inóculo residual de P. solanacearum en el suelo. Los cultivares de papa en la siembra previa a la muestra fueron Atzimba (Atz) y MS 35-22 (MS); en paréntesis se indica el porcentaje promedio de marchitez en esa siembra.

De cada ejemplar de maleza se cortaron, con un bisturí esterilizado, secciones finas de tallo que abarcaran haces vasculares, y con una pinza estéril se depositaron dos secciones en 5-7 ml de agua destilada estéril. Luego de varios minutos se observó el agua, para ver si había algún desprendimiento de flujo bacteriano en forma de hilos blanquecinos. Posteriormente, con el asa esterilizada se sacó una porción del agua y se hizo un estriado sobre el medio TZC (Cuadro 1A), descrito por Kelman (41), en platos petri. Como control se hizo estriado en platos con cultivo puro de P. solanacearum aislado de una planta de Melanrodium sp marchita.

Ensayo 2

Esta prueba se hizo para determinar si en plantas de la maleza Melanrodium sp, sin síntomas de marchitez en el campo,

pero contiguas a plantas marchitas, se podía detectar la presencia de P. solanacearum.

Se escogió un terreno recién arado sin historial reciente de solanáceas, donde había Melampodium sp de diferentes edades y con diversos tipos de síntomas. Se hicieron aislamientos de los siguientes tipos de plantas: a) jóvenes marchitas; b) adultas marchitas; c) jóvenes no marchitas; d) adultas no marchitas; e) sin síntomas de marchitez pero contiguas a plantas marchitas; f) con primeros síntomas de marchitez, contiguas a plantas marchitas.

De cada categoría se seleccionaron 5 plantas y se intentó el respectivo aislamiento en el medio TZO, tal como se describe en el Ensayo 1.

B. Determinación del nivel de P. solanacearum en el suelo por medio de plantas indicadoras

La detección de la bacteria en el suelo se realizó de dos formas: en el invernadero, por medio de plantas indicadoras de susceptibilidad natural conocida y en el laboratorio, por cultivo en medios selectivos.

Ensayo 1

Se realizó un primer ensayo utilizando como plantas indicadoras la papa, cultivar Atzimba, el tomate, cultivar Tropic, y la maleza Melampodium perfoliatum; se escogió suelo de cada una de las 12 subparcelas utilizadas para la búsqueda de la bacteria en malezas (Figura 1). Se evaluaron 12 muestras en total, seis de las subparcelas del cultivar de papa susceptible Atzimba y seis de donde creció el híbrido tolerante MS 35-22. Cada muestra se distribuyó a su vez en seis potes en el invernadero (4-5 kg de suelo por pote) y en cada dos potes se sembró la misma especie de planta indicadora. Cuando las raíces llenaron el pote, se cortaron verticalmente a 8 cm del tallo, en cuatro costados.

La reacción de las plantas indicadoras se calificó un mes después, de acuerdo con la siguiente escala:

Plantas sanas al llegar a la madurez..... Grado 1

Plantas con síntomas de marchitez sólo después de cortar raíces..... Grado 2

Plantas con síntomas de marchitez aún antes de cortar raíces..... Grado 3

En los potes donde no hubo marchitez se arrancó la planta indicadora adulta y se sembró una nueva, como prueba corroborativa.

Además, se realizó una segunda repetición con las mismas muestras de suelo, pero después de ser usadas para una siembra con maíz (cv. Tuxpeño, Crema C-7) en el invernadero. Cuando el maíz formó la mazorca, se arrancaron las plantas y cada uno de los suelos de las 12 subparcelas se distribuyó en seis potes, sembrándose cada dos potes con la misma especie de planta indicadora; se cortaron las raíces y se calificó la reacción de la misma forma que en la primera repetición.

Ensayo 2

Se llevó a cabo un segundo ensayo utilizando como indicadores los siguientes: plántulas de berenjena (Solanum melongena); plántulas de Nicotiana glutinosa; tubérculos pequeños de papa, cultivar Atzimba; brotes de tubérculos de papa puestos a germinar previamente en arena. Se utilizaron dos tipos de suelo: uno provino de un terreno donde se acababa de cosechar papa y donde hubo gran infestación con P. solanacearum ("suelo infestado"); el otro fue de un terreno vecino al infestado, pero donde no se había sembrado papa ("suelo vecino").

Cada uno de los dos suelos se distribuyó en tres cajas de 20x60x60 cm, divididas a su vez en cuatro compartimientos. En dos de los compartimientos de cada caja se sembraron dos tubérculos pequeños de papa por compartimiento, que sirvieron de testigos; los otros dos compartimientos se sembraron con Nicotiana glutinosa en una de las cajas, con berenjena en la otra

y en la última con plántulas provenientes de brotes de tubérculos de papa, cuyas raíces se podaron al ser transferidos al suelo en cuestión.

Cada uno de estos tipos de suelos se evaluó dos veces con cada planta indicadora, excepto los tubérculos de papa, con los que se evaluó en seis oportunidades. El procedimiento de cortar raíces y la escala de calificación fue igual al del Ensayo 1.

C. Detección de la bacteria en medios de cultivo selectivos

Se utilizaron inicialmente tres medios de cultivo selectivos, desarrollados en la Universidad de Wisconsin para determinar niveles de P. solanacearum en el suelo, cuyas fórmulas incluyen complementos crecientes de antibióticos (Cuadro 1). Los primeros cinco ingredientes de las fórmulas corresponden al medio TZC (Cuadro 1A); el resto de los ingredientes se añadió en alícuotas de 1 ml de soluciones patrón, preparadas en ampollas de agua destilada estéril y traspasadas mediante jeringas y agujas hipodérmicas estériles, usadas comercialmente para inyecciones; en dichas ampollas se mantuvieron las soluciones bases y soluciones patrones bajo refrigeración. Se hicieron pruebas preliminares para verificar el crecimiento de la bacteria en estos medios selectivos, y dos ensayos para verificar la eficiencia de estos con suelo de campo. Luego de haber hecho pruebas con estas tres fórmulas, se evaluó una cuarta fórmula (D), desarrollada en busca de mejor selectividad que las anteriores.

En las pruebas preliminares se compararon los tres medios de cultivo con el testigo, TZC; las evaluaciones se hicieron por medio de conteo de colonias en cada plato. Se hicieron mezclas de P. solanacearum puro con suelo libre de la bacteria, para probar el efecto de diluciones y alícuotas de la suspensión de suelo. Con dichas pruebas se logró reconocer el crecimiento de P. solanacearum, en contraste con otras bacterias

Cuadro 1. Composición de los medios selectivos utilizados para aislar P. solanacearum del suelo 1/

Ingrediente	Concentración (en agua destilada)
FORMULA A	
1) Glucosa*	5g/l
2) Peptona*	10g/l
3) Caseína hidrolizada (casaminoácidos)*	1g/l
4) Cloruro de tetrazolio*	50ppm
5) Agar*	18g/l
6) Cristal violeta	50ppm
7) Polimixina B. sulfato	100ppm
FORMULA B	
Fórmula A +	
8) Timerosal	0.05ppm
FORMULA C	
Fórmula B +	
9) Chloromicetina.	5ppm
10) Vancomicina.	10ppm
11) Bacitracina.	50ppm
12) Tyrothricina	20ppm
FORMULA D	
Fórmula B +	
Tyrothricina	20ppm
Chloromicetina.	5ppm

* Componentes del Medio TZC de Kelman (41)

1/ Gustavo Granada, Universidad de Wisconsin, Madison, Wisconsin. Febrero 1980, comunicación personal.

de estos suelos, en las distintas fórmulas. De varias diluciones de la suspensión de suelo, se escogió la de 1:100 (g:ml) por ser la más baja que permitió desarrollo de colonias individualmente reconocibles, tanto de P. solanacearum como de otras colonias. Se comparó el uso de alícuotas de 1,0 u 0,5 ml por plato, escogiéndose la segunda en base a la facilidad para distribuir este volumen en el medio.

Ensayos 1 y 2

La metodología descrita se aplicó con suelos donde se había obtenido marchitamiento total en una siembra de papa ("suelo infestado", el mismo del Ensayo 2, sección B), así como en suelo de un terreno vecino, sin siembras recientes de solanáceas ("suelo vecino"); el suelo se muestreó a 10-30 cm de profundidad, se prepararon diluciones en agua estéril de 1:100 (g:ml) y se esparcieron alícuotas de 0,5 ml por plato. En el ensayo 1 se utilizaron 12 platos por cada una de las tres fórmulas con el suelo "infestado" y 12 platos más con el suelo "vecino". En el ensayo 2 sólo se utilizó la fórmula B, por haber resultado de más fácil lectura, con 12 platos para el suelo infestado y 12 para el suelo vecino.

Ensayo 3

Con el fin de mejorar la selectividad de los medios selectivos, se probó una fórmula intermedia entre las B y C, descritas en el Cuadro 1, por recomendación del investigador que las desarrolló^{1/}. Se usó suelo de una parcela de campo donde una siembra de papa alcanzó posteriormente 100% de marchitez; se hizo una suspensión de 10g de suelo en 100 ml de agua destilada estéril (1:10), que esta vez se agitó por 30 minutos, obteniéndose luego diluciones de 1:100 y 1:1000. La alícuota añadida a cada plato con el nuevo medio se redujo a 0,1 ml; de cada dilución se hizo un traspaso a tres platos.

^{1/} C. Granada, Universidad de Wisconsin, Madison, Wisconsin. Junio 1980, comunicación personal.

II. PERSISTENCIA DE P. solanacearum EN RELACION AL MANEJO PREVIO DEL TERRENO

A. Descripción y antecedentes del área de estudio

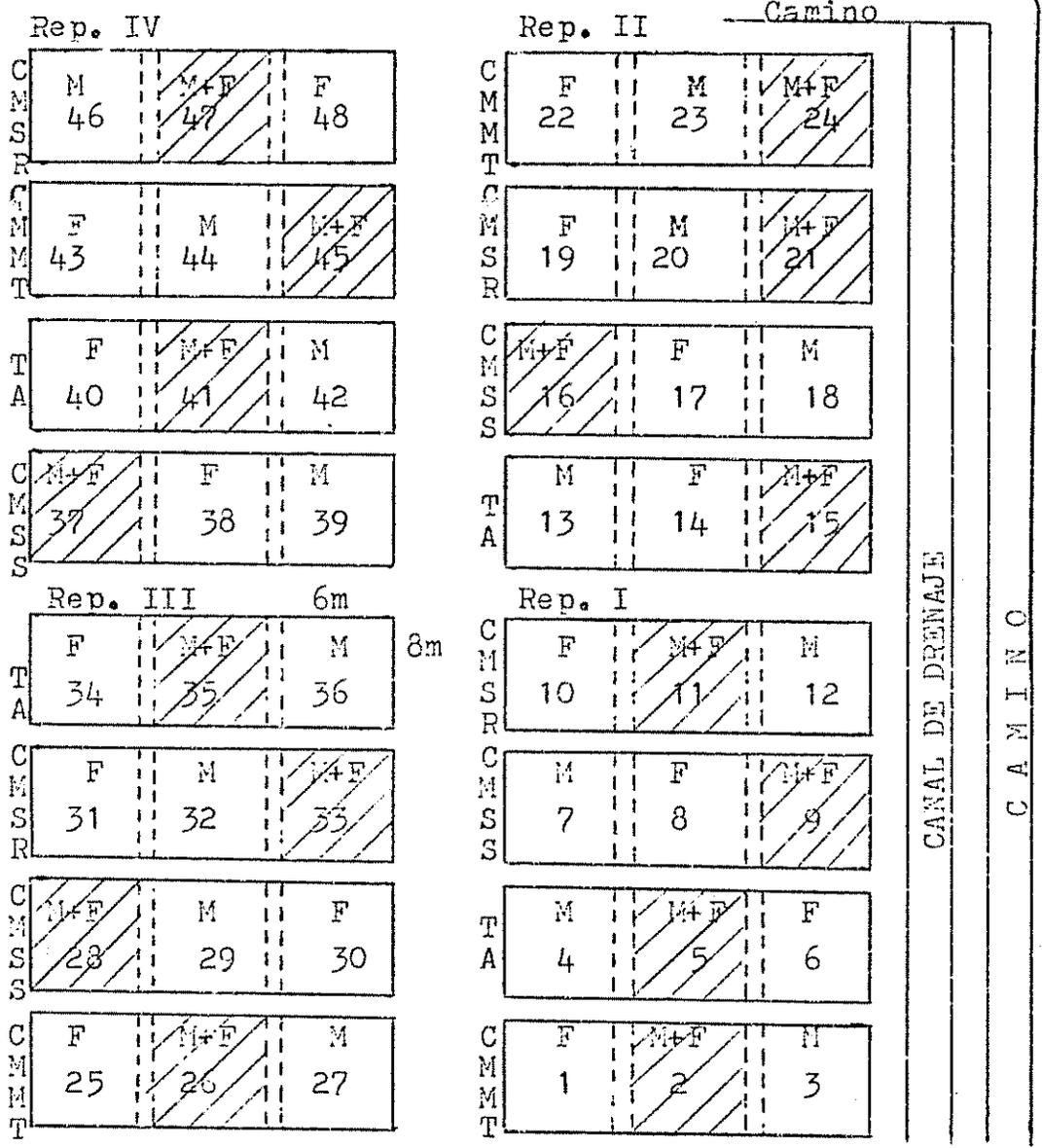
El trabajo se localizó en el campo experimental denominado "La Montaña", del CATIE en Turrialba, Costa Rica, con una elevación aproximada de 600 msnm. La zona pertenece a la formación ecológica de bosque muy húmedo tropical premontano, con promedios de 245 días de lluvia al año y 2640 mm de precipitación total anual. La temperatura media anual es de 22,3°C (máximo promedio 27,0°C y mínimo promedio 17,6°C). Los suelos del área de estudio son de origen aluvial fluviolacustre, perteneciente al orden de los Inceptisoles y clasificados como Typic Distropepts, de textura franco arcillosa. La fertilidad natural varía de mediana a baja y el drenaje de normal a impedido.

Se usó un terreno sin historial reciente de solanáceas, y que había servido, durante los tres años y medio anteriores, para un experimento dirigido por P.A. Moreno, del Programa de Cultivos Anuales del CATIE; con el mismo se ha comparado el efecto del manejo de malezas mediante cuatro diferentes sistemas de labranza (tratamientos), sobre tres diferentes sistemas de cultivo que involucran maíz en dos siembras por año, frijol y maíz asociado con frijol en una época (subtratamientos) (59). La última siembra de dicho experimento se cosechó en marzo de 1980, y en junio se inició el presente trabajo.

B. Tratamientos

Los tratamientos del experimento previo que se aprovecharon fueron únicamente los sistemas de labranza; solamente se usaron las sub-parcelas con el sistema de cultivo "maíz + frijol, seguido de maíz", anualmente (Fig 2). Los cuatro sistemas de labranza de suelo, establecidos desde 1976 por Mora (59), según se muestran en las Figuras 2 y 3, fueron:

Desnivel



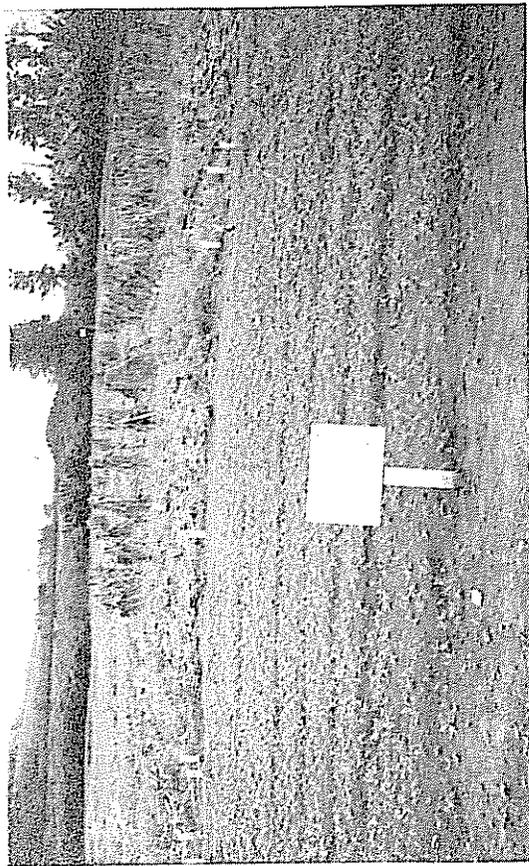
Sistema de cultivo previo

Sistema de labranza previo

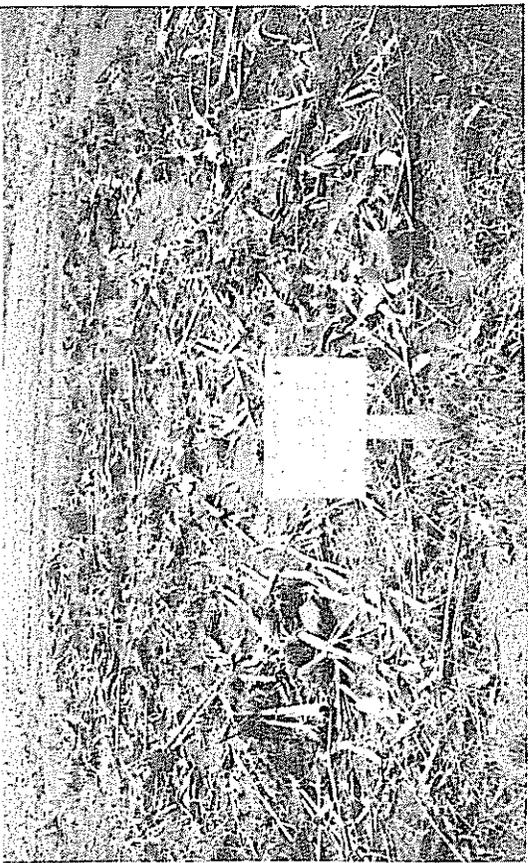
- M = Maíz monocultivo
- M+F = Maíz asociado con frijol (único utilizado)
- F = Frijol monocultivo
- TA= Terreno arado y limpio
- CMST=Cañas maíz mezcladas con tierra
- CMSS=Cañas maíz sobre el suelo
- CMSR=Cañas maíz sin remoción

Fig. 2 Distribución en el campo de las parcelas utilizadas para analizar el efecto de la preparación del terreno sobre la persistencia de *P. solanacearum*, indicando los tratamientos y subtratamientos que tuvieron en los tres años y medio previos (59). Las parcelas sombreadas fueron las usadas en este trabajo.

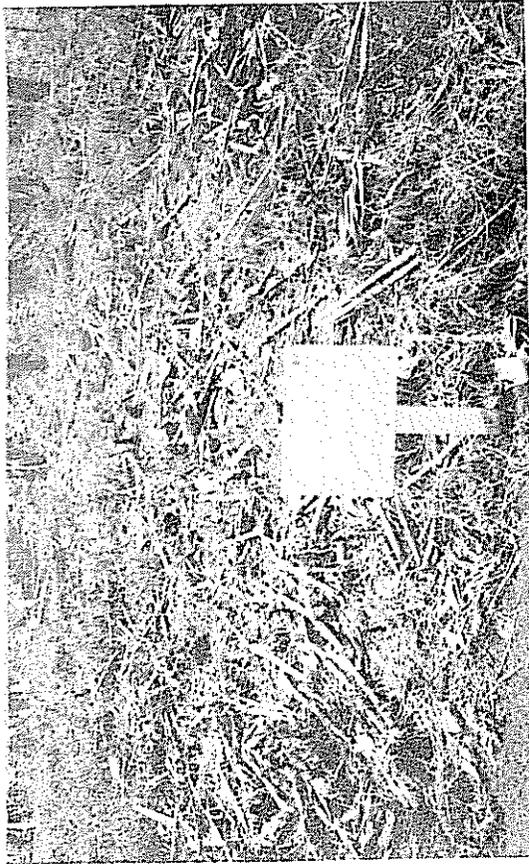
TA



CMMT



CMSS



CMSR

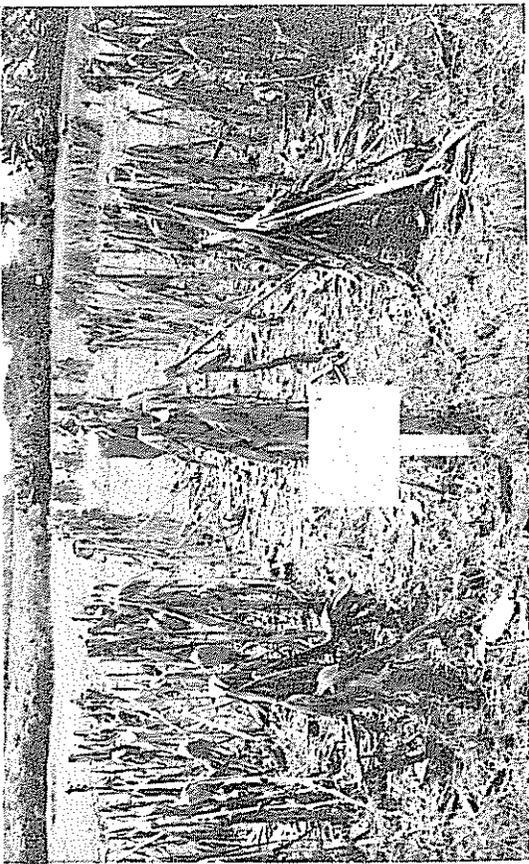


Fig. 3 Sistemas de labranza de suelo mantenidos durante tres años y medio previos, utilizados para comprobar el efecto de la preparación del terreno sobre la persistencia de *P. solanacearum*. Tratamientos: TA=terreno arado; CMMT=cañas de maíz mezcladas con tierra; CMSS=cañas de maíz sobre el suelo; CMSR=cañas de maíz sin remoción. En TA hay gran cantidad de plántulas de *Melampodium* sp en desarrollo.

- B.1 Suelo preparado en forma tradicional: terreno roturado dos veces al año con arado y luego desmenuzado y mullido con rotavator (rotavator manual "Agría" 7 HP). En este tratamiento se sacaron todos los desechos de cada cosecha de maíz y de frijol, así como las malezas, arrancándose de raíz, retirando todo el material vegetal y dejando el suelo limpio (en adelante se denomina TA = terreno arado).
- B.2 Cobertura vegetal mezclada con tierra: el suelo no se trabajó con implementos, sino que las cañas de la cosecha anterior de maíz se arrancaron manualmente; luego, junto con las malezas existentes sobre el terreno, se trozaron y con una pala se mezclaron levemente con tierra de la misma parcela, quedando aproximadamente en una proporción de 1:1. Inmediatamente después de cada siembra se aplicó Gramoxone (Paraquat 0,5 kg/ha i.a.) para el control de las malezas. (En adelante CMMT= cañas de maíz mezcladas con tierra).
- B.3 Mantenimiento de cobertura vegetal de residuos de cosecha sobre el suelo: los desechos de maíz y las malezas más sobresalientes se trozaron y se dejaron sobre el suelo; este tratamiento es básicamente igual al anterior, pero no se realizó ninguna mezcla de los residuos de cosecha con suelo. Para destruir las malezas se usó Gramoxone, al igual que en anterior tratamiento (en adelante CMSS= cañas de maíz sobre el suelo).
- B.4 Suelo no alterado: los restos de cosecha y las malezas se dejaron en el campo sin remover ni trozar; las cañas de maíz del cultivo anterior quedaron en pie dobladas hasta la mitad, y tan solo se cortaron con machete algunas hojas. El cultivo siguiente se sembró entre las hileras de estas cañas de maíz. Se realizó únicamente el trabajo de preparación de suelo necesario para sembrar y adicionar el fertilizante alrededor del hoyo de la semilla, tratando de no alterar la capa superior del terreno. Se aplicó Gramoxone para quemar las malezas de la parcela, al igual que en los tratamientos anteriores (en adelante CMSR = cañas de maíz sin remoción).

A la vez que se tomaron las muestras de suelo para predicción de la infestación por P. solanacearum mediante pruebas de invernadero y laboratorio, se determinó la persistencia real de P. solanacearum utilizando como cultivos indicadores papa cv. Atzimba y tomate cv. Tropic. En cada parcela se sembraron tres hileras de papa de 8 m cada una, a 90 cm entre hileras y 30 cm entre plantas (78 plantas por parcela) y 2 hileras de tomate a 1 m entre sí, con 25 cm entre planta.

Los sistemas de cultivos y de labranza de suelo se habían mantenido, antes de sembrar la papa y el tomate, en un diseño experimental de parcelas divididas con cuatro repeticiones; sin embargo, para efecto de este estudio el diseño quedó como bloques al azar con cuatro repeticiones, debido a que solamente se trabajó, bajo los distintos sistemas de labranza, con las subparcelas de la rotación "maíz + frijol seguido de maíz" (Figura 2).

C. Labores agronómicas

C.1 Siembra

El tomate se tuvo en semilleros en invernadero por 3 semanas, antes de ser transplantado al campo el 6 de junio de 1980; se usó espeque y se colocó una plántula de tomate en cada hoyo. La papa se sembró, ya brotada, el 10 de junio; se abrieron hoyos individuales en plano con palas pequeñas y se colocó un tubérculo por hoyo. En ambos casos se trató de remover la menor cantidad de suelo posible.

C.2 Fertilización

Para la fertilización se tomó en cuenta los requerimientos de cada cultivo y la cantidad de materia orgánica adicionada al suelo por los restos de residuos de cosecha. Sobre esa base en los tres tratamientos de cobertura vegetal se empleó la misma cantidad de fertilizante, asumiendo que en los tres se adicionaba igual cantidad de materia orgánica al suelo; en cambio, el tratamiento limpio y arado (TA) recibió mayor cantidad de fertilizante que los otros (Cuadro 2).

Cuadro 2 Cantidad de fertilizante (kg/ha) para los cultivos papa y tomate en cada tratamiento de labranza de suelo

Cultivo	Tratamiento (sistema de labranza de suelo)	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	MgO	Epoca y posición
Tomate	CMHT, CMSS, CMSR	50	187	100	---	A los 10 días de la siembra en zona de raíces
	TA	100	200	200	---	
Papa	CMHT, CMSS, CMSR	100	287	100	50	A la siembra en el fondo del surco
	TA	150	300	200	50	

Formulaciones de fertilizante= 10-30-10, nitrato de amonio (33,5% N); cloruro de potasio (60% K₂); sulfato de magnesio (17% MgO)

C.3 Deshierbas y medidas fitosanitarias

Se realizaron dos deshierbas manuales con cuchillo tratando de remover lo menos posible el suelo, en todos los tratamientos de labranza del suelo, a los 21 y 51 días de la siembra de ambos cultivos. Debido a la gran susceptibilidad de estos cultivos al ataque de crisomélidos (*Diabrotica* sp) y a los hongos del follaje, se aplicó semanalmente Sevin (0,72 kg/ha) mezclado con Dithane M-45 (2 kg/ha) y el adherente Estravon (0,25 litros/ha); sin embargo, se presentó un ataque muy severo del hongo *Stemphylium* sp en el tomate, por motivo del cual hubo que aplicar hasta dos veces por semana, tanto Daconil (1,7 kg/ha) como Dacobre (2,0 kg/ha), que dieron un control medianamente efectivo.

D. Evaluación de la persistencia de *P. solanacearum* en el terreno

D.1 Plantas indicadoras en invernadero

Para esta prueba, se tomaron muestras de suelo a lo largo de cada una de las 16 parcelas, en un sitio intermedio entre las secciones correspondientes a papa y tomate, a 80 cm o más de cualquiera de estas plantas. El muestreo se realizó cuando comenzaron a salir sobre el suelo las plantas de papa (a las 2 semanas de la siembra) y a una profundidad de 10-30 cm. Por cada parcela se tomaron 16 muestras que se mezclaron; luego se distribuyó este suelo en ocho potes de 24x20 cm, en seis de los cuales se sembró un tubérculo de papa (cv. Atzimba); en los otros dos se sembraron seis plantas de Nicotiana glutinosa; esas fueron las dos mejores plantas indicadoras encontradas en los anteriores ensayos (en ese orden); se cortaron las raíces cuando estas llenaron el pote. Para la calificación se utilizó la escala descrita en la sección I B.

D.2 Medios selectivos en el laboratorio

Las muestras de suelo utilizadas para estos aislamientos fueron las mismas de la prueba con plantas indicadoras. Se utilizaron tres platos con la fórmula D (Cuadro 1), por cada una de las 16 muestras de suelo del experimento; la dilución en agua estéril fue de 1:300, que pareció ser la más adecuada en base a los resultados del ensayo C3.

D.3 Medidas de marchitez en el campo

El parámetro medido fue el porcentaje de plantas marchitas, que se tomó a intervalos semanales; de todas estas lecturas se obtuvo el porcentaje promedio de marchitez (PM). Además, se realizó una lectura de índice de severidad, en la última semana del ciclo vegetativo de la papa, para ver si guardaba correlación con el porcentaje promedio de marchitez;

para calcular el índice de severidad se asignó a cada planta un valor de 1 a 6, en la siguiente escala: 1= planta sana; 2= una hoja marchita; 3= 1/3 de la planta marchita; 4= 2/3 de la planta marchita; 5= toda la planta marchita; 6= planta muerta; luego se obtuvo el promedio por cada parcela (31).

D.4 Rendimiento y sanidad de los tubérculos

La cosecha de la papa se realizó a las 13 semanas de la siembra y se midió la producción por parcela, el número de tubérculos aparentemente sanos y el número de tubérculos con síntomas externos de infección por P. solanacearum. De los considerados como sanos, se tomó una muestra de 100 tubérculos por parcela, que se colocaron en bolsas de papel en invernadero; semanalmente se hicieron observaciones para ver si se presentaban tubérculos podridos. Pasadas 3 semanas, los tubérculos fueron lavados y cortados transversalmente, con un cuchillo estéril, a 1 cm de la base. Los que mostraron síntomas de necrosis en el anillo vascular, característicos de P. solanacearum, se pusieron en cámara húmeda durante 1-2 horas, para estimular la producción de exudado bacteriano; la presencia de este constituyó confirmación de la infección por P. solanacearum.

RESULTADOS Y DISCUSION

I. MEDICION DEL NIVEL DE INOCULO RESIDUAL

A. Detección de *P. solanacearum* en malezas sin síntomas

Ensayo 1

Tras el reconocimiento de las malezas de las parcelas donde estuvieron los cultivares de papa Atzimba, susceptible a *P. solanacearum*, y MS 35-22, tolerante a la misma (Fig 1), se escogieron tres especies en base a su frecuencia y la presencia de leño, todas sin síntomas de marchitez: *Melampodium perfoliatum* H.B.K., *Bidens pilosa* L y *Galinsoga ciliata* (Raf) Blake; se recolectaron 10 ejemplares de cada especie por subparcela.

No se observó exudado bacteriano, ni fue posible aislar la bacteria en ninguna de las 360 plantas; la bacteria se aisló de las plantas control, procedentes de otro terreno y con marchitez. No hay duda de que el terreno muestreado estaba altamente infestado con *P. solanacearum*, ya que se presentó un alto porcentaje de marchitez en las siembras de papa anteriores (Fig 1) y posteriores (32) al muestreo, sobre todo en el cultivar Atzimba. Aún así, ni siquiera se presentaron malezas con síntomas de marchitez durante el reconocimiento.

Melampodium perfoliatum se ha reportado como hospedante con síntomas de la bacteria, tanto en combinación como en ausencia de cultivos susceptibles (31), y así fue observada durante el transcurso de esta investigación en terrenos cercanos. Puede considerarse una planta indicadora de la presencia de *P. solanacearum* en determinadas áreas, cuando invade el terreno después de la labranza mecánica, contribuyendo también de esta forma a la multiplicación de la bacteria. Pero en los terrenos colonizados por malezas al terminar el cultivo de papa, *Melampodium* no mostró marchitez; es difícil que la bacteria

pueda haber estado infectando estas plantas sin síntomas, puesto que hubiese sido detectada aunque fuera en unas pocas de las plantas utilizadas en esta prueba. Por otro lado, el hecho de que haya habido gran infestación en las parcelas y, a pesar de ello, no se hayan encontrado malezas marchitas por P. solanacearum, posiblemente se deba a la labranza del suelo después de la cosecha de papa. Es de esperar que, si estos terrenos hubieran sido rastreados luego de la cosecha, y entonces permitido la invasión de las malezas, sí se hubiesen encontrado malezas marchitas en el campo, tal como lo reportan Jackson, González y Aguilar (31).

En siembras posteriores en las mismas parcelas, luego de rotaciones con kudzú y maíz, con los mismos cultivares de papa, se obtuvo un porcentaje de infestación en ambos cultivares mayor que en la siembra anterior a este muestreo (32).

Ensayo 2

Este segundo ensayo, complemento del anterior, demostró que solamente en plantas de Melampodium sp con síntomas externos de marchitez es posible detectar la bacteria mediante aislamientos en medios de cultivo. Se obtuvo mayor densidad de población bacteriana en el medio cuando se utilizaron plantas, jóvenes ó adultas, con síntomas avanzados de marchitez (trat. 1 y 2, Cuadro 3), que cuando se utilizaron plantas con los primeros síntomas (trat. 6). Por el contrario, no se obtuvo ninguna colonia en los platos en que se utilizaban plantas sin síntomas de marchitez, aún en el caso del tratamiento 5, que eran plantas ubicadas de 5 a 10 cm a plantas totalmente marchitas.

Estos resultados complementan a los obtenidos en el ensayo anterior en los siguientes aspectos: a) se pudo conseguir gran cantidad de Melampodium con síntomas de marchitez bacteriana muestreando en un campo recién arado, lo que sugiere que la remoción de un terreno es necesaria para que P. solanacearum quede a disposición de este tipo de malezas, quizá al ser llevada a la zona de raíces en formación; b) el hecho de

Cuadro 3 Determinación de P. solanacearum en plantas de Melampodium sp con y sin síntomas, muestreadas de un campo recién arado. (5 platos por muestra)

Muestra	Aislamiento en medio de cultivo TZC	
	N° platos con <u>P. solanacearum</u>	Crecimiento de <u>P. solanacearum</u>
1. Plantas jóvenes marchitas	5	Muy denso
2. Plantas adultas marchitas	5	Muy denso
3. Plantas jóvenes no marchitas	0	---
4. Plantas adultas no marchitas	0	---
5. Plantas sin marchitar, junto a plantas marchitas	0	---
6. Plantas con primeros síntomas de marchitez, junto a plantas marchitas	5	Poco denso

que en este caso el terreno escogido tuvo una siembra previa con un cultivo no susceptible (maíz), mientras que en el caso del Ensayo 1 el muestreo fue luego de una siembra de papa donde hubo alta incidencia de marchitez bacteriana, sugiere que la bacteria se manifiesta en Melampodium perfoliatum sólo en la medida en que se remueva el suelo, independientemente del cultivo que la preceda; c) Melampodium sp actuó como una buena indicadora de campo de la presencia del organismo en cuestión pero no un hospedante alterno permanente, puesto que solamente se obtuvieron aislamientos de plantas con síntomas externos de marchitez, pero nunca en las plantas sin síntomas, aunque estuviesen contiguas a las marchitas. Aparentemente todas las plantas jóvenes que se infectan con P. solanacearum sufren marchitez, es decir, constituyen indicadores del estado de infestación por un lapso de pocas semanas; pero luego sólo quedan las plantas sanas, y estas no se infectan posteriormente. En una prueba exploratoria, algunas plantas de estas fueron inoculadas en el tallo con suspensiones concentradas de

P. solanacearum; aún así, ni una sola mostró síntomas.

Los resultados de estos dos ensayos sugieren que esta raza de la bacteria es un componente normal de la microflora de estos suelos, persistiendo al menos temporalmente como saprófita o bien en asociación no patogénica sobre raíces de especies no hospedantes, como lo propuso Seneviratne para el caso de Ceylan (69). Estos resultados también coinciden con los obtenidos por Moffett y Hayward (58) en Australia, quienes no lograron detectar P. solanacearum en el interior de raíces o tallos de malezas sin síntomas colectadas en campos naturalmente infestados por la raza 1; y los de Smith y Godfrey (74) en Carolina del Norte, que no encontraron correlación positiva entre la población de malezas susceptibles y la severidad de marchitez de campo; ambos plantean la posibilidad de que P. solanacearum sobreviva más bien en la rizosfera de estas malezas susceptibles.

B. Determinación del nivel de P. solanacearum en el suelo por medio de plantas indicadoras

Ensayo 1

En este ensayo se probaron tres especies de plantas indicadoras, susceptibles a P. solanacearum; se realizaron dos repeticiones con sus respectivas pruebas corroborativas.

En la primera repetición (Cuadro 4), solamente se obtuvieron síntomas de marchitez cuando se usó papa como indicador, y en un solo caso con Melempodium perfoliatum. Utilizando tomate no se obtuvo plantas con síntomas en ninguna de las muestras. Cuando se utilizó papa como indicador, el grado de detección fue generalmente mayor en las muestras de suelo provenientes de las sub-parcelas donde se cultivó el híbrido MS 35-22 (grado promedio = 2,17) que en las de suelo proveniente de las sub-parcelas en que se cultivó el cultivar Atzimba (grado promedio = 1,42).

Cuadro 4 Detección de P. solanacearum en invernadero por medio de plantas indicadoras, en muestras de suelo de un campo con diferentes porcentajes de infección previa en papa

Tratamiento	Subparcela muestreada		Reacción de plantas indicadoras ^{2/}		
	N°(ver fig 1)	PPM ^{1/}	Papa	Tomate	Melampodium
			Grado promedio de la escala ^{3/}		
Suelo de parcelas donde hubo papa cv. Atzimba	1	35,7	1	1	1
	2	27,9	1,5	1	1
	3	42,9	1	1	1
	4	55,0	2,5	1	1
	5	61,9	1,5	1	1
	6	46,1	1	1	1
Promedio		44,91	1,42	1	1
Suelo de parcelas donde hubo papa cv. MS 35-22	1	5,7	3	1	1
	2	10,4	2,5	1	2
	3	11,2	1	1	1
	4	23,4	2,5	1	1
	5	24,2	2	1	1
	6	19,6	2	1	1
Promedio		15,74	2,17	1	1,17

1/ PPM = porcentaje promedio de marchitez en siembras previas de papa en el campo.

2/ Dos potes por repetición y una planta por pote.

3/ Escala: Grado 1 = plantas sanas al llegar a la madurez. Grado 2 = plantas con síntomas de marchitez sólo después de cortar raíces. Grado 3 = plantas con síntomas de marchitas aún antes de cortar raíces.

Con la segunda repetición del mismo ensayo, en que se utilizaron las mismas muestras de suelo de cada subparcela, pero esta vez tras siembra de maíz en invernadero, se obtuvo el mismo tipo de resultados, en cuanto a que sólo se pudo detectar la presencia de la bacteria por medio de plantas de papa como indicador. Esta vez no se presentó ningún caso de detección con Melampodium ni con tomate (Cuadro 5).

Cuadro 5 Detección de P. solanacearum, por medio de plantas indicadoras en las muestras de suelo del Cuadro 4, luego de siembra de maíz bajo condiciones de invernadero

Tratamiento	Subparcela muestreada		Reacción de plantas indicadoras ^{2/}		
	N° (ver fig 1)	PPM ^{1/}	Papa	Tomate	Melampodium
			___Grado promedio de la escala___ ^{3/}		
Suelo de parcelas donde hubo papa cv. Atzimba	1	35,7	1	1	1
	2	27,9	2,5	1	1
	3	42,9	1	1	1
	4	55,0	3	1	1
	5	61,9	3	1	1
	6	46,1	1	1	1
Promedio		44,91	1,92	1	1
Suelo de parcelas donde hubo papa cv. MS 35-22	1	5,7	2	1	1
	2	10,4	2	1	1
	3	11,2	2	1	1
	4	23,4	3	1	1
	5	24,2	2,5	1	1
	6	19,6	1	1	1
Promedio		15,74	2,08	1	1

1/ PPM = porcentaje promedio de marchitez en siembras previas de papa en el campo.

2/ Dos potes por repetición y una planta por pote.

3/ Escala: Grado 1 = plantas sanas al llegar a la madurez. Grado 2 = plantas con síntomas de marchitez solo después de cortar raíces. Grado 3 = plantas con síntomas de marchitez aún antes de cortar raíces.

Utilizando solamente los resultados obtenidos con papa como indicador, se trató de determinar si existía asociación entre los datos de invernadero y campo en ambas repeticiones; se encontró que no había correlación entre los grados obtenidos con papa en el invernadero y los porcentajes promedios de marchitez previos al muestreo en ninguna de las dos repeticiones

(R-0,41 y 0,12, respectivamente).

Los resultados anteriores varían en principio con los que teóricamente se esperaba obtener; en parcelas donde hubo Atzimba debió ser más alto el nivel de inóculo, y por lo tanto debió obtenerse un grado mayor en invernadero, que con suelo de las subparcelas de MS 35-22, que tuvo mucho menos infección en el campo. Lo anterior podría explicarse de la siguiente manera: a) En las subparcelas que tuvieron Atzimba de la primera repetición, teóricamente debió existir una alta población de P. solanacearum, por el hecho de que existe salida de exudado bacteriano de las plantas hacia el suelo antes de que mueran (40, 82). Sin embargo, pareciera que esa alta cantidad de células compiten entre sí y a la vez estimulan al resto de organismos de la flora microbiana, antagónicos a P. solanacearum, a que aumenten su población y por ende bajen la población de P. solanacearum (49). En cambio, donde hubo MS 35-22 la población primaria de P. solanacearum debió haber sido menor y, por lo tanto, estar en cierto equilibrio con la flora microbiana, pudiendo sobrevivir de manera libre en el suelo (19). b) En siembras posteriores al muestreo en estas mismas parcelas, hechas luego de una rotación con kudzú y maíz, si bien los porcentajes promedios de marchitez fueron altos (alrededor del 53%), las parcelas menos infectadas en la primera siembra no fueron las de nivel más bajo en la segunda siembra (32); es decir, la severidad de infestación de un año no determinó necesariamente el nivel de inóculo residual que se mantuvo hasta el siguiente.

Tampoco hubo correlación entre el grado de reacción de papa en el invernadero y el porcentaje promedio de marchitez (PPM) de esa segunda siembra en el campo, lo que significa que el uso de plantas de papa en el invernadero detectó solamente de una manera cualitativa la presencia de P. solanacearum en el terreno.

En este ensayo se realizaron además pruebas corroborativas con tomate y Melampodium sp en ambas repeticiones, sembrándolas

en los potes donde no se había presentado infección en la primera siembra. Sólo se logró detectar la presencia de la bacteria en tres plantas de tomate, correspondientes a dos subparcelas de la primera repetición (parcelas 3 y 4 de MS 35-22) y a una subparcela de la segunda repetición (parcela 6 de Atzimba). Con Melampodium sp no fue posible en ningún caso detectar a P. solanacearum en estos suelos.

Estos corroborativos demuestran la ineficacia de tomate y Melampodium sp como indicadora de invernadero; además, nunca se logró detectar la presencia de la bacteria en sus haces vasculares (prueba del exudado), por lo que aparentemente ni siquiera hubo penetración de la bacteria dentro de las plantas. Todo esto sugiere que en la práctica no se justifica realizarlos, cuando no es posible detectar en primera instancia la presencia de la bacteria.

Ensayo 2

Los resultados de este ensayo, al igual que el anterior, indican que la siembra de tubérculos de papa es el mejor método de invernadero para detectar la presencia de P. solanacearum (Cuadro 6). En todos los casos, tanto en el "suelo infestado" como en el "suelo vecino", el grado obtenido con tubérculos de papa fue mayor que con el resto de especies indicadoras probadas. Nicotiana glutinosa fue algo menos eficiente en detectar la presencia de la bacteria, y berenjena aún menos. Con las plántulas de papa provenientes de brotes no fue posible detectar al organismo en ningún caso.

Una posible limitación de los tubérculos de papa, al utilizarlos como indicadores, es que deben venir de campos en que se tenga la certeza de que no existe P. solanacearum (16). En caso contrario, Nicotiana glutinosa puede ser utilizada, aunque con ciertas desventajas en cuanto a dificultad de germinación y lento crecimiento; sin embargo, su semilla se puede tener en refrigeración por mucho tiempo, no ocupa espacio y puede ser utilizada en cualquier momento. La berenjena apenas sería una tercera opción, pues parece ser muy errática, como

Cuadro 6 Detección de P. solanacearum, en invernadero y por plantas indicadoras, en suelo de un terreno altamente infestado y de uno vecino al mismo (Ensayo 2)

Plantas indicadoras	Suelo infestado (PPM= 58,6) ^{1/}	Suelo vecino
	Grado promedio de la escala ^{2/}	
Plántulas de papa provenientes de tubérculos	1,8 ^{3/}	2,4
<u>Nicotiana glutinosa</u>	1,4	2,0
Berenjena	1,5	1,0
Plántulas de papa provenientes de brotes	1,0	1,0
Promedios por muestra de suelo	1,4	1,6

- 1/ Porcentaje promedio de marchitez en siembra previa de papa.
- 2/ Escala: Grado 1 = plantas sanas al llegar a la madurez; Grado 2 = plantas con síntomas de marchitez sólo después de cortar raíces; Grado 3 = plantas con síntomas de marchitez aún antes de cortar raíces.
- 3/ Doce plantas por suelo por indicador.

lo demuestra el hecho de que en el "suelo vecino" no pudo detectar la presencia de la bacteria. Las plántulas de papa provenientes de brotes tuvieron el inconveniente de un crecimiento pobre al ser transplantadas al suelo en prueba, lo que aparentemente les hizo poco susceptibles a la infección por P. solanacearum.

Como antecedentes del terreno en cuestión, en el suelo infestado hubo 58,6% de marchitez promedio, con el cultivar de papa Atzimba, habiendo alcanzado 100% la última semana; esto significa teóricamente una población muy alta de P. solanacearum. En el suelo vecino, el nivel de inóculo debió tam-

bién teóricamente estar más bajo, puesto que no estuvo la papa como fuente de reproducción de la bacteria. Sin embargo, sucedió el mismo fenómeno que en el ensayo anterior, puesto que en el "suelo vecino" en promedio se obtuvo un grado ligeramente mayor en la detección de P. solanacearum. Esto tiende a corroborar lo especulado en el primer ensayo, que en un suelo muy infestado se estimula el incremento de microorganismos antagónicos a P. solanacearum, lo que trae como consecuencia cierta baja en la población detectable en el invernadero. Por el contrario, en el suelo vecino parece existir un equilibrio en este sentido. Algo similar se ha encontrado en suelos de la Estación Experimental Fabio Baudrit, en Alajuela, infestados por la raza 1 ^{1/}.

C. Detección de la bacteria en medios de cultivos selectivos

Ensayo 1

Cuando se incubaron en los medios selectivos extractos de un suelo con infestación natural, no se obtuvo ninguna colonia de P. solanacearum en ninguno de los 84 platos utilizados (28 platos con cada fórmula), según se muestra en el Cuadro 7.

En todos los platos crecieron abundantes colonias de otras bacterias, de tan diversa índole que no se intentó caracterizarlas; solo hubo una moderada disminución de estas bacterias en los medios con más antibióticos (B y C); esto indica que los medios no son tan selectivos para P. solanacearum, al menos en estos suelos tropicales, como lo han sido en suelos de zonas templadas. Lo que sí se obtuvo fue una total inhibición de crecimiento fungoso.

^{1/} Luis C. González, U.S.R., San José, Costa Rica, mayo 1930, comunicación personal.

Cuadro 7 Detección de P. solanacearum por medios de cultivos selectivos en un suelo naturalmente infestado y en uno vecino

Muestra de suelo	Ensayo 1						Ensayo 2	
	fórmulas del medio selectivo						fórmula B	
	A		B		C		P.s.	Otras
P.s. ^{1/}	Otras ^{2/}	P.s.	Otras	P.s.	Otras			
____ Número promedio de colonias por plato ____								
Infestado	0	1764	0	1354	0	871	0,17	1220
Vecino	0	1594	0	1040	0	868	0	1607

1/ Pseudomonas solanacearum

2/ Otras bacterias

Siempre hubo colonias similares a P. solanacearum pero al recultivarlas en platos con TZC y compararlas con el testigo se comprobó que no eran colonias de P. solanacearum; también se hicieron con algunas de ellas pruebas de patogenicidad, que resultaron negativas. El número de otras bacterias varió de acuerdo a la muestra, aunque generalmente fueron mayores en platos con la fórmula A; además, en muchos platos se presentó una masa mucilaginosa de tipo bacteriano, que cubría a veces hasta un 100% de los platos. Se escogió la fórmula B para la siguiente prueba dado que generalmente permitió el desarrollo de un menor número de otras bacterias que en A, y permitió un desarrollo de P. solanacearum ligeramente más vigoroso que en C, además de ser más simple que ésta.

Ensayo 2

En este ensayo, que correspondió a una repetición del anterior pero utilizando esta vez la fórmula B solamente, se obtuvo una sola colonia de P. solanacearum de los 28 platos utilizados (Cuadro 7). Esta colonia fue estriada de nuevo en TZC, comparándola con un testigo aislado del tallo de

M. perfoliatum, y se ratificó que sí era la bacteria en cuestión. Dicha colonia se obtuvo en un plato que recibió una alícuota de 0,5 ml de extracto diluido 1:100 de suelo "infestado", y en el que además creció una población de otras bacterias de aproximadamente 300 colonias, más una masa mucilaginosa, presumiblemente bacteriana, que cubrió el 20% del plato. En el resto de platos, en que no se obtuvo colonias de P. solanacearum, se presentaron muchas colonias más de otros tipos. Además, en casi todos los platos se obtuvo el mismo tipo de masa mucilaginosa de tipo bacteriano del ensayo anterior.

El hecho de que se detectara solamente una colonia de P. solanacearum de suelo altamente infestado, en un total de 112 platos, indica que estas fórmulas son relativamente ineficientes como medio de predecir si un suelo está o no infestado. En contraste, esta predicción se logró indirectamente con facilidad por medio de plantas indicadoras, sembradas en muestras provenientes de los mismos suelos utilizados con los medios selectivos (Sección B, Ensayo 2, página 39).

Ensayo 3

En el medio selectivo intermedio entre B y C, tras una agitación extendida a 30 minutos, y con alícuotas reducidas a 0,1 ml por plato, no se obtuvo ninguna colonia de P. solanacearum en la dilución 1:10, se obtuvo una sola en la dilución 1:100 y cuatro en la dilución 1:1000. En cuanto al número de colonias de otras bacterias, aparentemente hubo inhibición entre ellas en la dilución 1:10, donde el promedio fue de 1033 colonias y no de 3000 como era de esperar, de acuerdo a los resultados de mayores diluciones (Cuadro 8).

Se consideró que pudo haber alguna inhibición hacia P. solanacearum en la dilución 1:100; por otra parte, utilizar la dilución 1:1000 pareció riesgoso, puesto que se reducía la posibilidad de detectar a P. solanacearum en parcelas que no tuviesen tan altas poblaciones en el campo como la utilizada (100% de marchitez en una siembra vecina de papa); en consecuencia, se decidió utilizar una dilución de 1:300 para el res-

Cuadro 8 Colonias de P. solanacearum y otras bacterias obtenidas con tres diluciones de un suelo altamente infestado tras agitación prolongada, en el medio de cultivo selectivo D.

Dilución	<u>P. solanacearum</u>			<u>Otras bacterias</u>		
	plato 1	2	3	plato 1	2	3
	número de colonias					
1:10	0	0	0	1590	684	827
1:100	1	0	0	254	239	455
1:1000	1	2	1	22	40	34

to del trabajo, considerándola, logarítmicamente, un punto intermedio entre 1:100 y 1:1000.

II. PERSISTENCIA DE P. solanacearum EN RELACION AL MANEJO PREVIO DEL TERRENO

A. Detección a través de plantas indicadoras en invernadero

El uso de tubérculos de papa y el de plántulas de Nicotiana glutinosa fueron, en ese orden, los mejores medios de predecir la presencia de P. solanacearum en un suelo naturalmente infestado. En base a ello, ambos se utilizaron en esta parte del experimento también para verificar su eficacia como indicadoras.

Los resultados obtenidos confirman que la papa es la mejor planta indicadora para detectar P. solanacearum de un suelo naturalmente infestado, sin historial reciente de solanáceas (Cuadro 9). Prácticamente en todos los casos la papa dió un valor más alto en el grado de la escala utilizada para tal fin; solamente en un caso (CMMT, repetición II) el

Cuadro 9 Reacción de plantas indicadoras en invernadero como medio de predecir la presencia de la raza 1 de P. solanacearum en terrenos con cuatro diferentes labranzas de suelo. Turrialba, Costa Rica

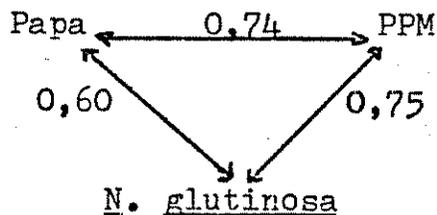
Tratamiento	Repetición	Detección por plantas indicadoras		Porcentaje promedio march. en campo medido en papa (PPM)
		Papa (tubérculos)	<u>N. glutinosa</u>	
—Grado promedio de la escala ^{1/} —				
TA	I	2,2	1,4	49,9
	II	2,2	1,5	61,3
	III	2,7	1,7	77,9
	IV	2,2	2,2	68,6
	Promedio	2,29 a ^{2/}	1,70 a	64,40 a
CMMT	I	1,7	1,0	22,8
	II	1,8	2,2	33,5
	III	1,7	1,2	21,9
	IV	1,8	1,0	8,8
	Promedio	1,75 b	1,35 a	21,75 b
CMSS	I	1,3	1,0	8,6
	II	2,0	1,0	4,2
	III	2,5	1,9	54,0
	IV	2,2	1,9	38,4
	Promedio	2,00 ab	1,45 a	26,31 b
CMSR	I	2,0	1,2	4,5
	II	1,5	1,3	15,6
	III	2,3	1,8	54,6
	IV	1,8	1,0	23,6
	Promedio	1,92 ab	1,33 a	24,56 b
C.V.		14,26	30,92	29,32

^{1/} Escala: Grado 1= plantas sanas al llegar a la madurez; Grado 2= plantas con síntomas de marchitez solo después de cortar raíces; Grado 3= plantas con síntomas de marchitez aún antes de cortar raíces.

^{2/} Promedios de la misma columna seguidos de la misma letra no difieren significativamente entre sí, de acuerdo a la Prueba de Duncan, al 0,05%.

valor del índice de N. glutinosa fue mayor que el de papa.

Debido a que se obtuvieron posteriormente los porcentajes promedio de marchitez de campo (PPM), se pudo verificar la efectividad de las plantas indicadoras como medio de predecir la presencia de P. solanacearum en este campo. El análisis estadístico produjo los siguientes resultados: a) cuando se utilizó papa como indicadora solamente hubo diferencias significativas entre TA (promedio 2,29) y CMMT (promedio 1,75) según la prueba de Duncan al 0,05%; no hubo diferencias significativas entre estos y el resto de tratamientos (Cuadro 9). Es de suponer que no se detectaron el resto de diferencias entre tratamientos en el invernadero, debido a la cantidad limitada de plantas indicadoras utilizadas (6 plantas por repetición por tratamiento); b) cuando se utilizó Nicotiana glutinosa como indicadora, no hubo diferencias significativas entre tratamientos, es decir, este indicador no logró detectar las diferencias existentes a nivel de campo; c) el coeficiente de correlación entre los tres datos, para determinar si existía asociación entre los valores de campo (PPM) y los datos de invernadero, indicó la siguiente relación:



Los resultados confirman el valor de usar a la papa como medio para predecir la presencia de la raza 1 de P. solanacearum en un terreno del que no se tenga conocimiento si está infestado o no. En cuanto a Nicotiana glutinosa, el coeficiente de correlación obtenido indica que se puede confiar en su uso como medio de predecir la presencia de P. solanacearum en un suelo. Sin embargo, resulta menos efectivo que la papa en predecir la presencia de la bacteria en condiciones de campo.

B. Aislamiento en medios selectivos

En este intento de predicción de infestación por P. solanacearum sólo se logró detectar a la bacteria en parcelas que luego mostraron más del 81% de marchitez de plantas de papa en la última semana de evaluación, y más de 38% en promedio general de marchitez (Cuadro 10).

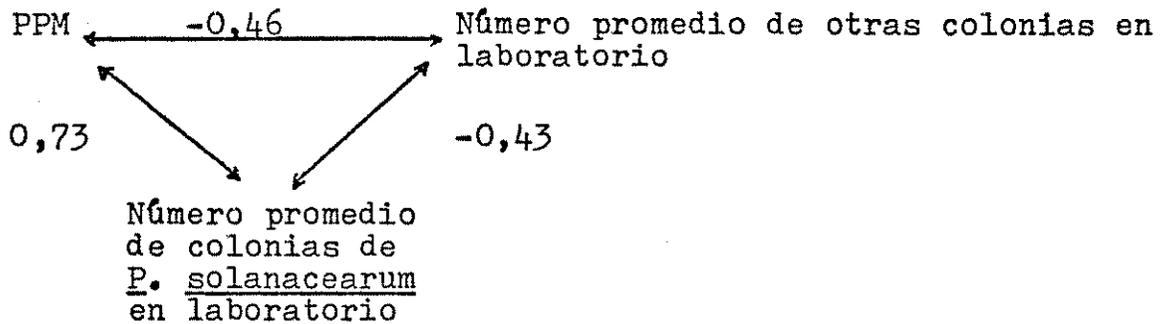
La fórmula utilizada, a pesar de su alta concentración de antibióticos, aparentemente no inhibió el crecimiento de P. solanacearum, como lo indica el hecho de que cuando se diluyó un suelo 1:300 y se le agregó 10^3 cel/ml (población estimada) de P. solanacearum, se consiguió 1145 colonias de esta y 381 colonias de otras bacterias (última línea del Cuadro 10). La dilución de suelo 1:300 pareciera que fue adecuada, porque, comparando los resultados de la dilución 1:1000 del Ensayo IC3 (página 44) y los de la dilución 1:300, con el mismo suelo (Rep. III del tratamiento A) del presente ensayo, se nota que en ambos se obtuvo números similares de colonias de P. solanacearum y de otras bacterias. Esto sugiere que en el segundo caso no hubo autoinhibición, aunque haya aumentado la concentración de suelo; por lo tanto, a la dilución 1:300 aumentan las probabilidades de detectar a P. solanacearum en suelos de bajas poblaciones.

Por otra parte, se notó que los platos en donde se detectó P. solanacearum tenían en general una población baja de otras bacterias (72 colonias por plato, en promedio), mientras que el promedio de estas bacterias en platos sin P. solanacearum fue generalmente elevado (promedio 140 colonias por plato). Esto pudiera indicar un efecto del manejo de suelo sobre las otras bacterias, inverso al efecto sobre Pseudomonas, pudiendo ser la baja población de otras bacterias lo que permitió detectar a Pseudomonas en las parcelas TA.

Para elucidar lo anterior, se determinaron los coeficientes de correlación entre los siguientes parámetros:

Cuadro 10 Cuantificación de P. solanacearum en 16 parcelas de un suelo naturalmente infestado por un medio selectivo de cultivo

Tratamiento	Rep.	Aislamientos de suelo, medio selectivo			Número de colonias			% marchitez en papa	
		plato 1	2	3	plato 1	2	3	PPM	Ult. semana
TA	I	2	1	1	152	114	103	49,9	100,0
	II	1	0	0	99	83	48	61,3	100,0
	III	2	2	0	23	25	34	77,9	100,0
	IV	2	1	1	54	65	41	68,6	100,0
CMMT	I	0	0	0	90	101	115	22,8	53,8
	II	0	0	0	381	223	270	33,5	76,5
	III	0	0	0	43	44	27	21,9	45,6
	IV	0	0	0	286	350	334	8,8	28,6
CMSS	I	0	0	0	161	125	254	8,6	26,7
	II	0	0	0	125	97	270	4,2	19,0
	III	0	0	0	120	318	80	54,0	93,7
	IV	1	1	0	61	94	82	38,4	81,5
CMSR	I	0	0	0	116	103	83	4,5	19,5
	II	0	0	0	109	84	60	15,6	43,0
	III	1	0	0	32	27	24	54,6	100,0
	IV	0	0	0	113	151	112	23,6	53,1
Suelo (1:300) + <u>P. solanacearum</u>				1145			381		
(aprox. 10 ³)									



Los resultados indican que existe asociación entre el número de colonias de P. solanacearum obtenidas en el laboratorio y los valores de PPM obtenidos en el campo. En los dos casos en que no se obtuvo correlación significativa, el signo sugiere que existe una asociación inversa, es decir, que a medida que aumenta el número de otras bacterias (posiblemente antagónicas a P. solanacearum) en el plato, disminuye el porcentaje promedio de marchitez en el campo y el número promedio de colonias de P. solanacearum en el laboratorio, y viceversa. En Japón (77) y en Australia (49) se ha determinado que, en suelos donde se incrementa la materia orgánica, la población de P. solanacearum baja rápidamente, probablemente debido a una mayor actividad microbial.

Todos estos resultados hacen suponer que el detectar la presencia de P. solanacearum en medios selectivos de laboratorio podría ser determinado por el efecto que bacterias antagónicas a P. solanacearum ejercen sobre su manifestación en estos medios selectivos; puesto que el tipo de labranza influye directamente sobre P. solanacearum, así como sobre su relación con sus organismos antagónicos, habría aumento o no de la población de la primera en la medida que quiebre o se guarde esa relación.

El suelo utilizado en estos aislamientos se secó al aire y se calculó el número de células de P. solanacearum detectadas por gramo de suelo seco; en las muestras donde se detectó la bacteria, su población varió de 2,5 a $5,0 \times 10^4$ células por gramo de suelo seco. El hecho de haberse cuantificado poblaciones tan bajas de P. solanacearum de un suelo naturalmente

infestado es importante, puesto que fuera del trabajo de Granada y Sequeira (22) sólo hay informes en la literatura de cuantificación precedida por inoculación artificial del suelo, y aún así con un mínimo de $2,5 \times 10^6$ células/ml de suelo (36); en otros casos, con diferentes medios selectivos, se ha medido solo hasta un mínimo de 10^5 células/g de suelo seco (8, 38, 63).

En las figuras 4 y 5 se muestran las colonias de P. solanacearum en cultivo puro, en mezcla de cultivo puro con extracto de suelo, en sólo extracto de suelo, y se observa un plato sin colonias de P. solanacearum, en el que se nota la gran cantidad de colonias de otras bacterias, en contraste con otro en que sí se pudo detectar a P. solanacearum, con pocas colonias de otras bacterias.

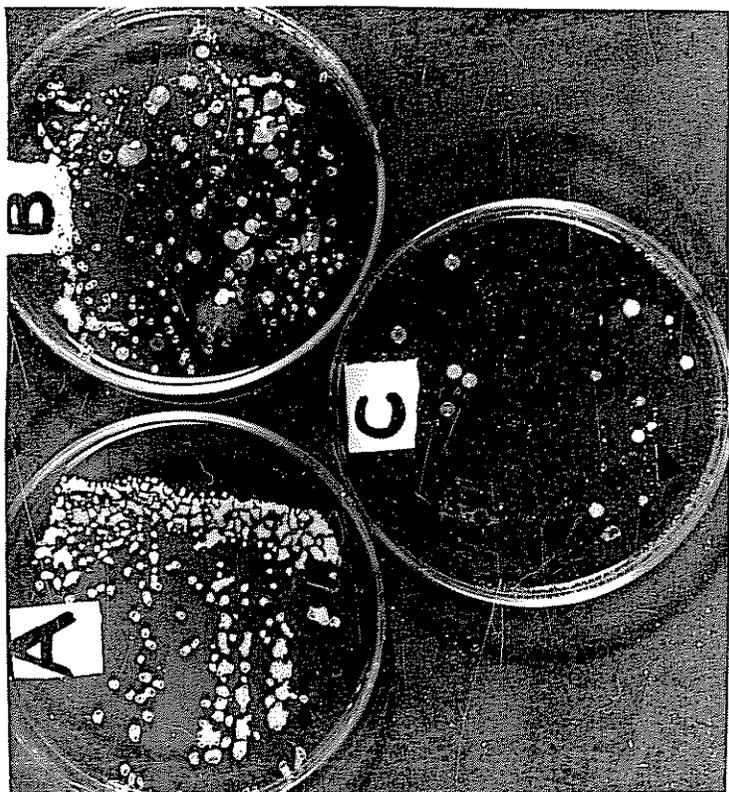
C. Marchitez y severidad en el campo

C.1 Porcentaje de marchitez en papa

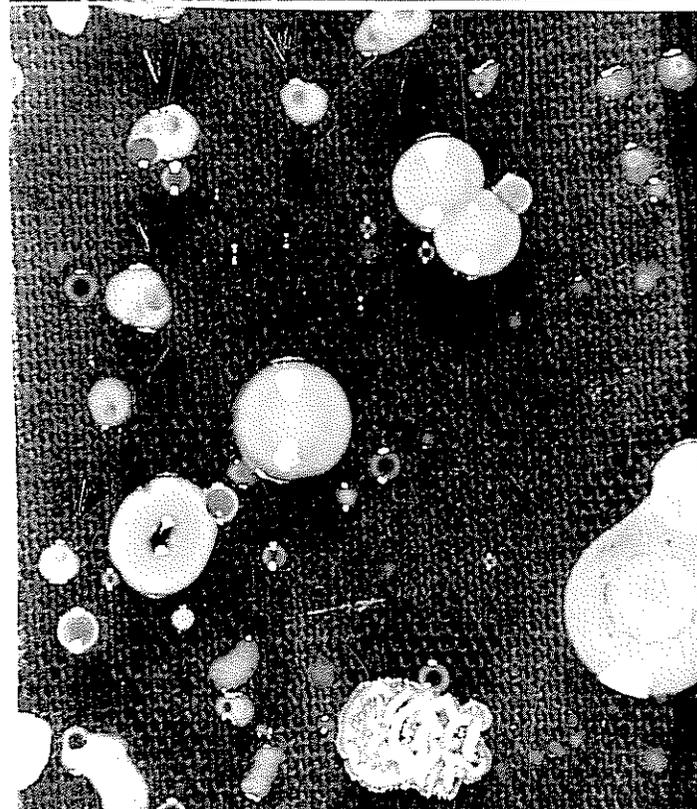
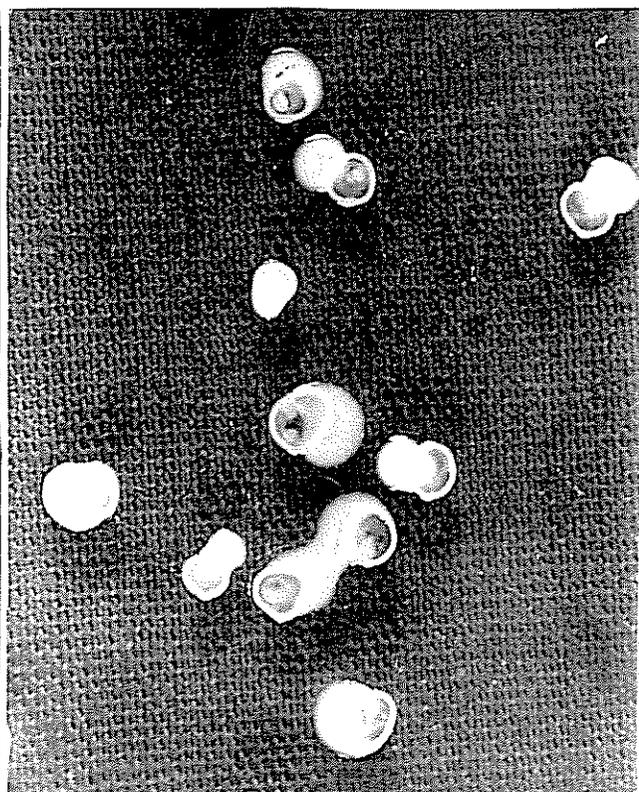
El porcentaje promedio de marchitez (PPM) se obtuvo de nueve lecturas semanales, luego de la emergencia; a la décima semana las plantas estaban ya demasiado maduras como para apreciar con certeza casos incipientes de marchitez. Para efectos de cálculos estadísticos cada uno de los valores de PPM se

Fig. 4 Crecimiento de P. solanacearum en el medio de cultivo selectivo de Granada y Sequeira (22). 4.1 Plato A= crecimiento de P. solanacearum en cultivo puro. Plato B= mezcla de cultivo puro de P. solanacearum con extracto de suelo. Plato C= colonia de P. solanacearum (flecha) proveniente de un extracto de suelo. 4.2 Plato A= colonias individuales de P. solanacearum creciendo en cultivo puro. 4.3 Plato B= crecimiento de colonias de P. solanacearum (previa inoculación) junto con colonias de otras bacterias del suelo. Las flechas señalan las colonias de P. solanacearum. 4.4 Plato C= colonia de P. solanacearum (flecha) aislada directamente de un extracto del suelo. El resto de colonias corresponden a las "otras bacterias" presentes en ese suelo.

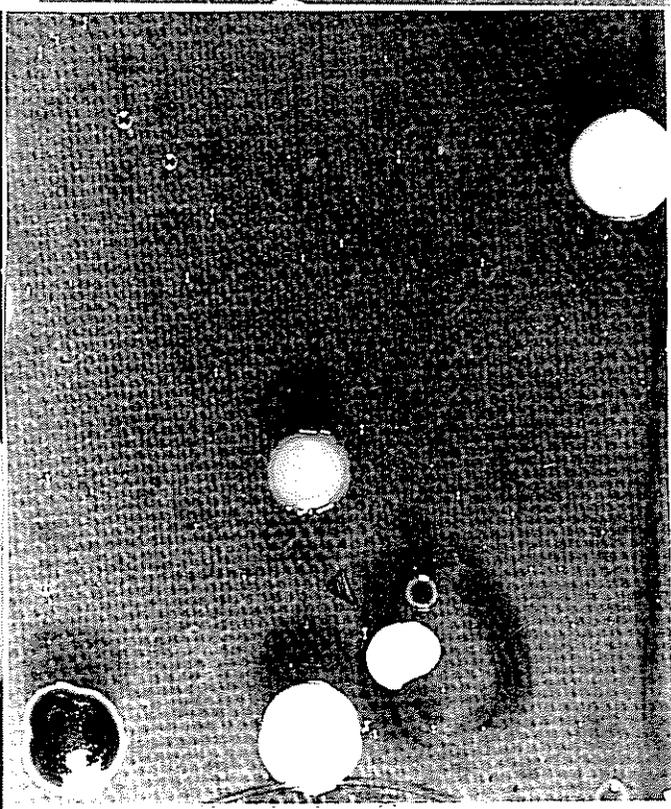
4.1



4.2



4.3



4.4

(Ver leyenda en página 50)

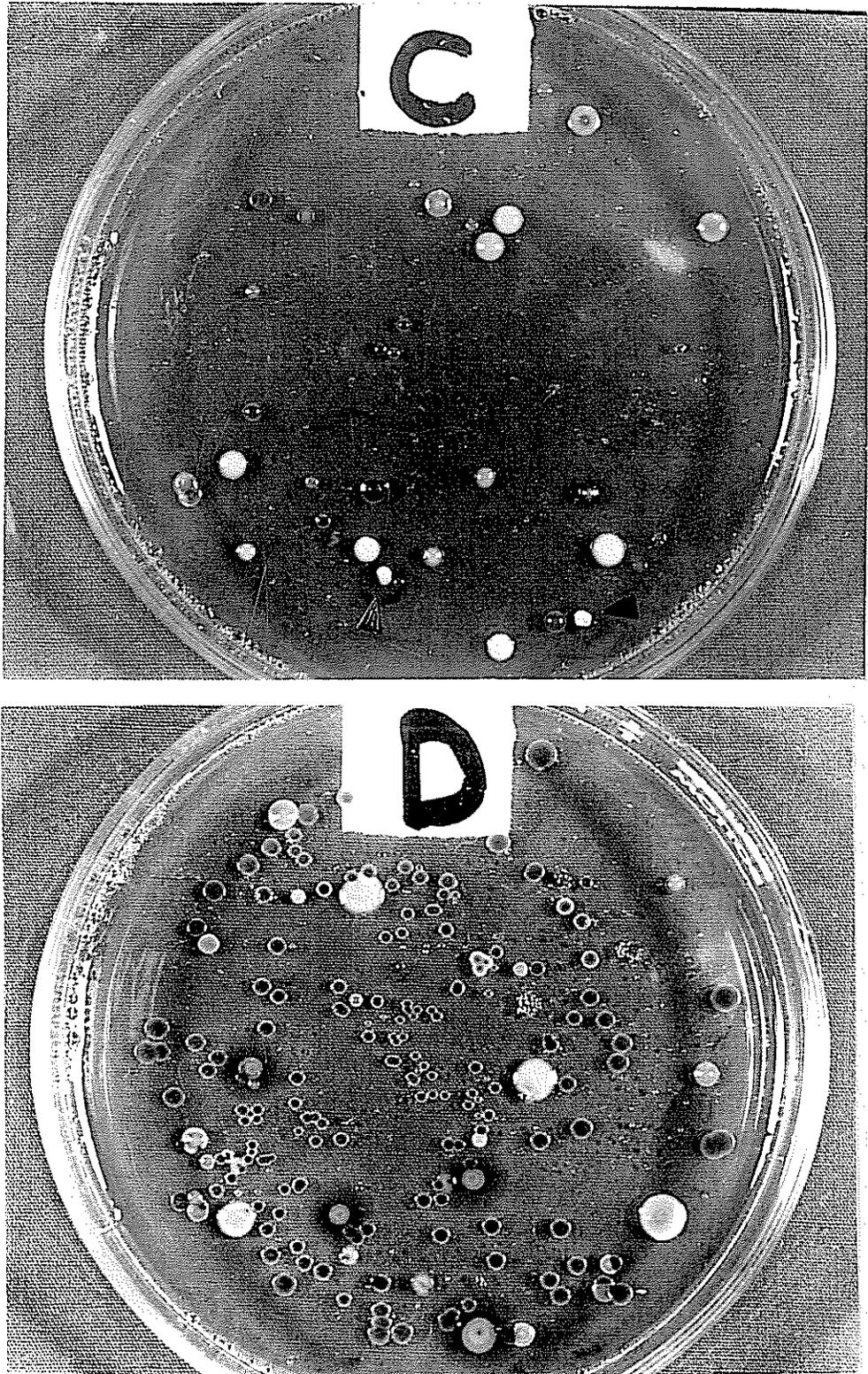


Fig. 5 Detección de P. solanacearum (flecha) en un plato (C) en que se desarrollaron pocas colonias de otras bacterias; en contraste con el plato D, en el cual no se pudo detectar a P. solanacearum, pero existe gran cantidad de colonias de otras bacterias.

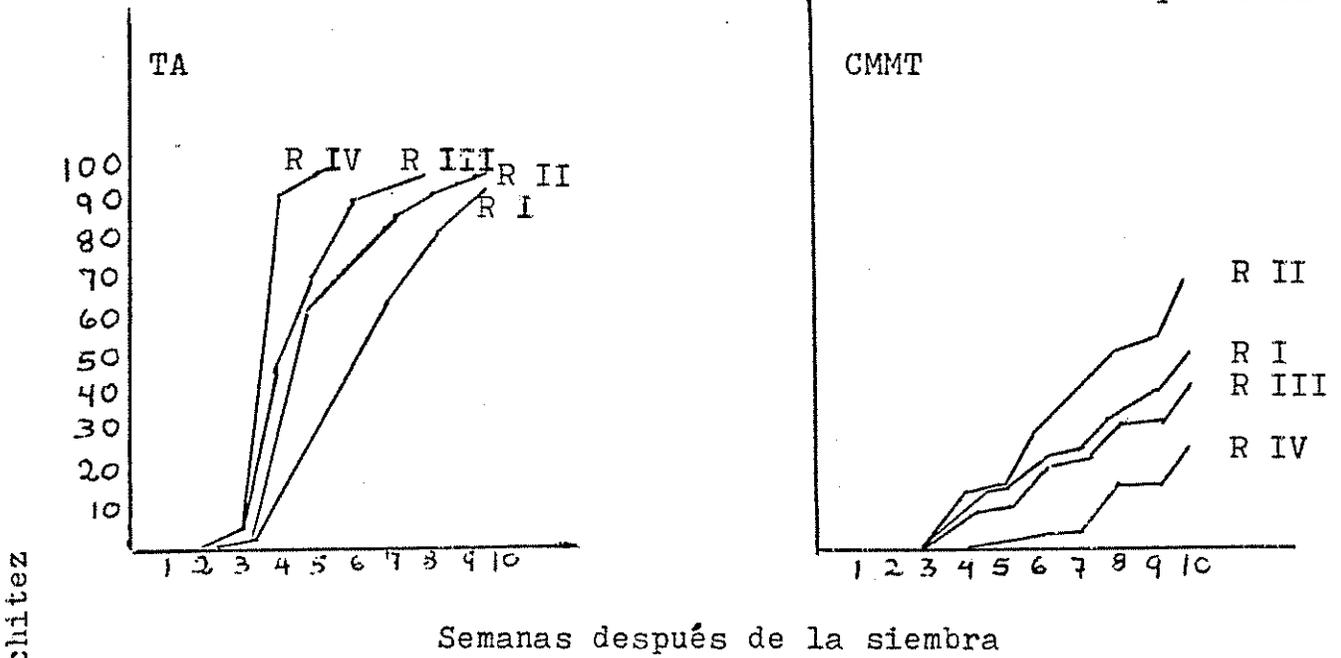
transformó por arcoseno (75). Los valores de marchitez por semana, repetición y tratamiento, se muestran en el Cuadro 6A.

En el tratamiento de terreno arado (TA) hubo un desarrollo continuo de la enfermedad en las cuatro repeticiones (Fig. 6), comenzando dicho ataque inmediatamente después de emerger las plantas. El ataque ocurrió más temprano en la repetición III y más tarde en la I; en la repetición III se había llegado a 100% de infección de las cinco semanas de la siembra; en cambio, en la repetición I se llegó a ese porcentaje en la décima semana. Lo importante es que con este tratamiento de labranza del suelo (TA) hubo un desarrollo acelerado de la enfermedad, llegando en todos los casos hasta un 100% de infección (Fig. 7). Los análisis estadísticos indican que este tratamiento resultó significativamente diferente al 0,01% del resto de los tratamientos (Cuadros 11 y 9A). No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de caña de maíz mezclados con tierra, cañas de maíz sobre el suelo y cañas de maíz sin remoción, que resultaron todos estadísticamente diferentes al tratamiento TA. Todos los tratamientos de labranza reducida tuvieron un comportamiento similar a través del ciclo de vida de la papa, difiriendo marcadamente con el de labranza convencional (Fig. 7).

Pseudomonas solanacearum tiene una distribución muy heterogénea en el suelo, aún en puntos cercanos de suelos relativamente uniformes (40, 71); esto hace que la variabilidad sea alta en ensayos de población o de nivel de enfermedad, y obliga a veces a considerar individualmente el comportamiento de determinadas repeticiones, que difieren de las demás por factores muy localizados. Tal fue el caso de las repeticiones III y IV en este experimento.

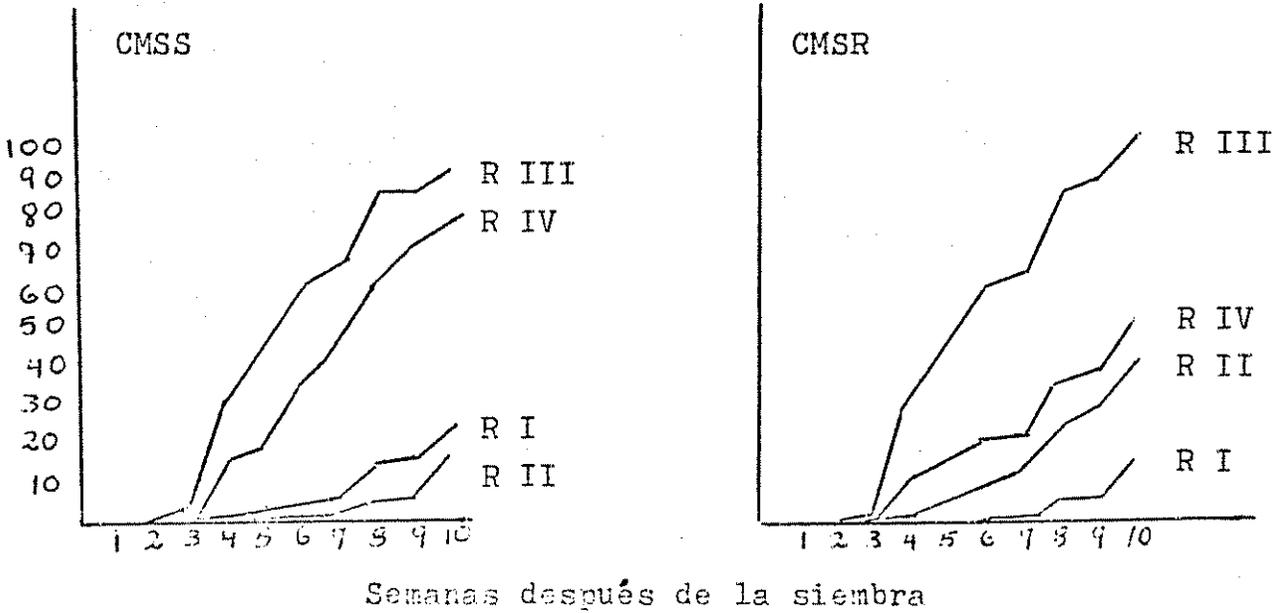
Entre los tratamientos de labranza reducida se establecieron diferencias marcadas de acuerdo a la repetición; en el tratamiento CMSS (Cuadro 6A, Figura 6), repeticiones I y II, la marchitez a la décima semana de la siembra fue apenas de 26,7 y 19,0% respectivamente, mientras que en las repeticiones

I, II, III, IV =
número de repetición



Porcentaje de marchitez

Semanas después de la siembra



Semanas después de la siembra

Fig. 6 Progreso del porcentaje de marchitez en papa, por repetición, en parcelas con cuatro distintas labranzas del suelo, Turrialba, Costa Rica.

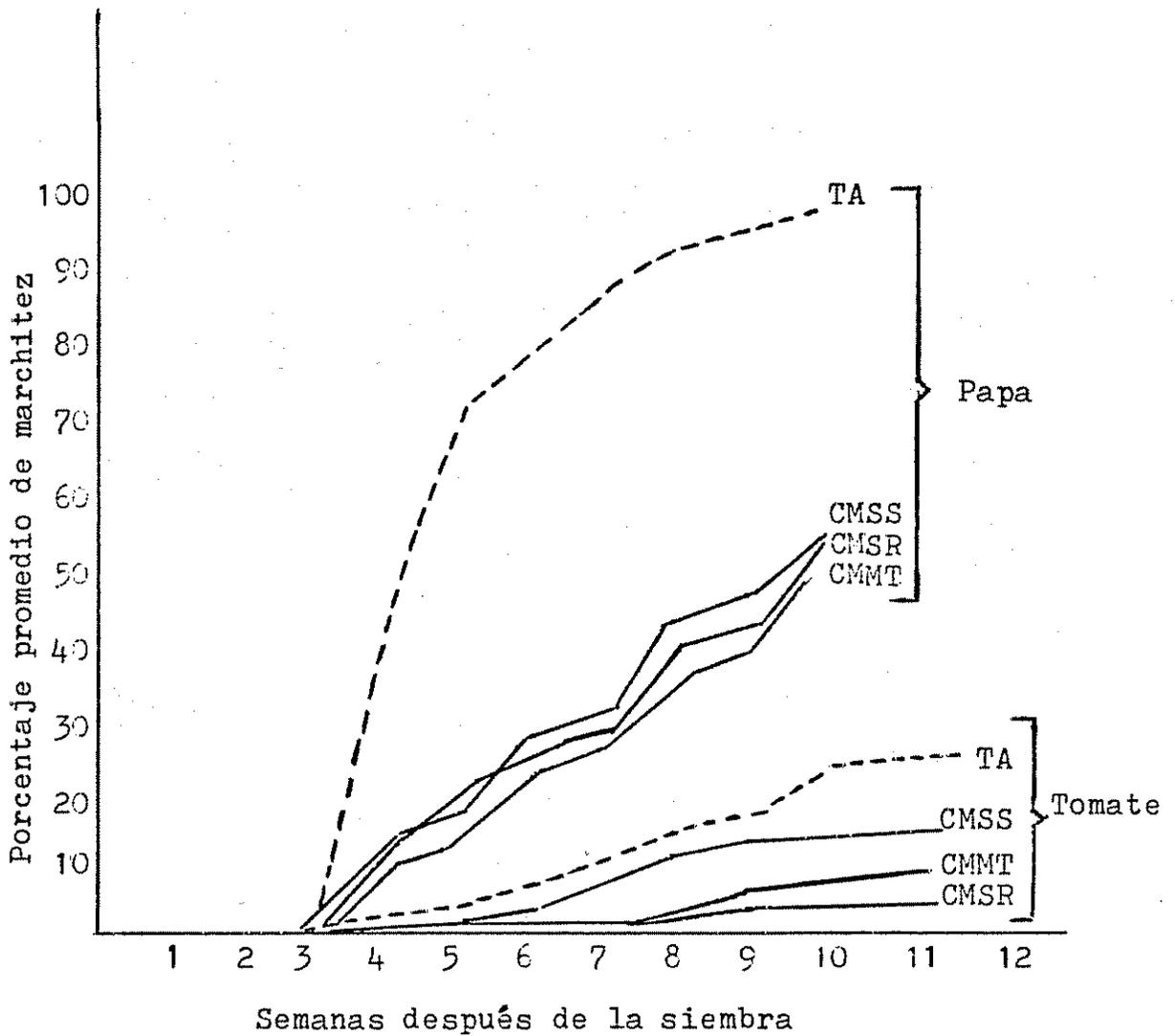


Fig. 7 Efecto de cuatro sistemas de labranza de suelo sobre el desarrollo de la marchitez bacteriana en papa y tomate en Turrialba, Costa Rica.

Cuadro 11 Valores promedios, por tratamiento de labranza del suelo y repetición, de los porcentajes de marchitez en papa y tomate y del índice de severidad en papa, en el campo.

Tratamiento	Repet.	Porcentaje promedio de marchitez		Índice de severidad en papa
		Papa	Tomate	
—Porcentaje promedio—				Grado prom.
TA	I	49,9	3,4	5,8
	II	61,3	33,7	5,9
	III	77,9	5,1	6,0
	IV	68,6	3,2	6,0
	Promedio	64,41	al**11,33 a	5,94 a*
CMMT	I	22,8	5,2	3,2
	II	33,5	3,5	4,4
	III	21,9	1,8	3,0
	IV	8,8	3,0	2,2
	Promedio	21,75	b	3,38 a
CMSS	I	8,6	0	2,0
	II	4,2	2,2	1,7
	III	54,0	12,6	5,5
	IV	38,4	12,0	4,9
	Promedio	26,31	b	6,72 a
CMSR	I	4,5	1,0	1,7
	II	15,6	0	2,9
	III	54,6	3,1	5,6
	IV	23,6	1,8	3,3
	Promedio	24,56	b	1,48 a
Coeficiente de variación		29,32	77,55	32,03

1/ Promedios de la misma columna seguidos de la misma letra no difieren significativamente entre sí, de acuerdo a la prueba de Dunca, al 0,05% (*) y al 0,01% (**).

III y IV la marchitez llegó a 93,7 y 81,5%. La Figura 2 muestra la ubicación de estas parcelas en el campo; las repeticiones I y II, al lado derecho de esta Figura, están en sitios no accesibles al tránsito de gente e implementos, debido al canal de drenaje allí ubicado; en cambio, las repeticiones III y IV están en un lugar en que hay mayor tránsito de gente y llega el agua de drenaje de otros terrenos sujetos a aradas convencionales; las aguas de drenaje se han señalado como responsables de la diseminación local de P. solanacearum (71). Además, las parcelas del tratamiento de CMSS en las repeticiones III y IV estaban ubicadas en la parte oeste de la repetición, es decir, aún más accesibles a todos estos factores. Sucede lo mismo con el tratamiento CMMT, pero esta vez es la parcela de la repetición II la que tiene el mayor porcentaje de marchitez, aparentemente por su ubicación en el extremo de la repetición.

Todo lo anterior hace suponer que las diferencias tan marcadas entre repeticiones sean por estos factores externos y no por efecto de la repetición. Si esto es cierto, y las parcelas hubiesen estado ubicadas en un lugar sin efecto de esta serie de factores secundarios, los resultados en todas las repeticiones posiblemente hubiesen sido semejantes. Problemas de esta naturaleza fueron encontrados por Seneviratne (69) en Ceylan, en estudios sobre distribución de biotipos de P. solanacearum.

En la Figura 8 se muestran los efectos de la mínima labranza, representados por el tratamiento CMSR, en la reducción de la marchitez bacteriana, en contraste con la labranza convencional (TA), que conlleva a un aumento significativo de la población de malezas (59), algunas de ellas susceptibles a P. solanacearum. La Figura 9 muestra como algunas plantas de Melampodium perfoliatum, que invaden el terreno con labranza convencional, se marchitan al mismo tiempo que las últimas plantas de papa.

TA



CMSR



Fig. 8 Diferencias entre el efecto de la labranza convencional (TA) y de la mínima labranza (CMSR) sobre la marchitez bacteriana en papa (al frente) y tomate (al fondo), a las 5 semanas de la siembra.



Fig. 9 Presencia de la maleza Melampodium sp en estado sano (M.s.) y con primeros síntomas de marchitez bacteriana (M.m.), en una de las parcelas sometidas a la-
branza convencional (TA), con un 100% de infección en papa (P.m.)

C.2 Índice de severidad en papa

Este valor fue obtenido en la última semana en que se hizo la evaluación del porcentaje de marchitez, mediante la escala descrita por Jackson y González (31), fundamentalmente para determinar si había correlación entre este índice y el porcentaje promedio de marchitez (PPM). Los mayores índices de severidad se encontraron en el tratamiento de terreno arado, y fueron significativamente diferentes al resto de tratamientos (CMMT, CMSS y CMSR) (Cuadros 11 y 7A). A su vez, al igual que con el PPM, estos últimos tratamientos de mínima labranza no difieren estadísticamente entre sí. El coeficiente de correlación, entre los valores de índice de severidad y los del PPM en papa, fue de 0,98, lo que indica una asociación muy alta entre ambos. Teóricamente, se pudo haber hecho una sola evaluación, midiendo severidad, sin necesidad de los conteos semanales de porcentaje de marchitez. Sin embargo, el índice de severidad tiene el inconveniente de que es difícil determinar si una planta murió por efecto de P. solanacearum o por otro factor externo durante las primeras semanas del cultivo, de allí que se deba determinar periódicamente las causas de muerte de las plantas.

En general el porcentaje promedio de marchitez en papa, o bien el índice de severidad, constituyeron los más claros indicadores de la persistencia de Pseudomonas solanacearum en estas parcelas. Las pruebas de invernadero, y en menor grado las del medio selectivo, constituyeron una predicción confiable desde el punto de vista cualitativo, pero no cuantitativo (Fig. 10).

C.3 Porcentaje promedio de marchitez en tomate

La evaluación en tomate se realizó por medio de la determinación semanal del porcentaje de marchitez, en este caso en base a 12 semanas. En el Cuadro 8A se presentan los porcentajes semanales de marchitez por repetición, mientras que en la Figura 7 se muestra el progreso de la enfermedad en cada tratamiento.

		<u>Eficacia</u>			
Suelo infestado	Plantas Indicadoras	Campo	Malezas	Sin síntomas...	Nula
				Con síntomas...	Limitada
			Papa.....	Alta	
			Tomate.....	Limitada	
			Invernadero	Papa	Brotos.....
		Tubérculos.....			Alta
		Tomate.....		Dudosa	
		<u>Nicotiana glutinosa</u>		Aceptable	
		Berenjena.....		Limitada	
			<u>Melampodium perfoliatum</u>	Nula	
	Medios selectivos	Fórmula A (dil. 1:100, 0,5 ml)...		Dudosa	
		Fórmula B (dil. 1:100, 0,5 ml)...		Dudosa	
		Fórmula C (dil. 1:100, 0,5 ml)...		Dudosa	
		Fórmula D (dil. 1:300, 0,1 ml)...		Limitada	

Figura 10 Reseña de la evaluación de distintos métodos para detectar la presencia de Pseudomonas solanacearum en suelo infestado.

Cuando se usó tomate como indicador de campo no hubo diferencias significativas entre tratamientos al 0,05%, de acuerdo con la prueba de Duncan; hubo casos, como la segunda repetición del tratamiento TA, en que el porcentaje de marchitez en la última semana llegó hasta 76%, pero en el resto de repeticiones del mismo tratamiento sólo llegó a 9%. Estos resultados indican que el tomate, en comparación con la papa, es un indicador menos eficaz de la presencia de la raza 1 de P. solanacearum en estos terrenos, a pesar de permanecer mayor tiempo en el campo (Figura 7).

Hay antecedentes de ataques severos de marchitez bacteriana en tomates sembrados en terrenos adyacentes al de este experimento, pero en todos los casos fueron terrenos sujetos a labranza convencional. Los resultados aquí descritos sugieren que el tomate podría ser cultivado sin mucho riesgo cuando la labranza de suelo es mínima o cero; el desarrollo de la enfermedad fue lento en los tratamientos de mínima labranza, llegando apenas en el tratamiento CMSR a un máximo de 7% de plantas marchitas en la repetición más afectada, en CMMT a un máximo de 11% y en el de CMSS a un máximo de 28% (Cuadro 8A). Esto indica que la cero labranza puede ser un buen recurso para el cultivador de tomate que confronte la presencia de la raza 1 de P. solanacearum en sus terrenos.

Se encontró asociación entre el PPM de tomate y el índice de severidad a la décima semana en papa, con un coeficiente de correlación de 0,60; esto corrobora el efecto de los tratamientos de manejo sobre el inóculo disponible para tomate, a pesar de la falta de diferencias significativas entre tratamientos.

Se notó que la época de mayor susceptibilidad del tomate (donde ocurrió el mayor incremento de plantas marchitas) estuvo alrededor de la época de floración (Fig. 7). Probablemente esto se debió al "stress" en que entra la planta en esa época, que la hace más susceptible a la bacteria. En cambio después de esa época, ya en la formación y maduración de

frutos, las plantas se volvieron más resistentes a P. solanacearum y prácticamente no hubo nuevos casos de marchitez.

D. Rendimiento y sanidad de los tubérculos de papa

La producción de papa de este experimento no se debe considerar desde el punto de vista comercial, sino más bien como una medida del efecto que tiene P. solanacearum sobre los tubérculos de un cultivar de papa susceptible, y bajo las condiciones, quizá, más extremas que existen de marchitez de campo. Además, la papa en este caso fue usada como indicadora de P. solanacearum en suelos con distintas labranzas y, como tal, no le fueron dadas las condiciones para un óptimo desarrollo agronómico; las únicas labores realizadas fueron la siembra, la fertilización, dos cortes manuales de malezas y la cosecha, pero en ningún momento se hizo aporca, labor muy importante en papa, para no alterar los tratamientos de suelo que durante cuatro años fueron mantenidos en estos terrenos.

En parcelas con el tratamiento TA casi no se cosechó ningún tubérculo, y de los cosechados la mayoría estaban infectados (Cuadro 12). En el resto de tratamientos se cosechó gran número de tubérculos, pero muchos de ellos ya estaban infectados. De la muestra de 100 tubérculos, tomada para determinar el porcentaje de marchitez post-cosecha, se encontró que este varió de 19,58% (CMMT) a 38% (CMSR); con este se corrigieron los valores de tubérculos aparentemente sanos al momento de la cosecha, para obtener el número real de tubérculos sanos por tratamiento; solamente hubo diferencia significativa, al nivel de 0,05% entre los tratamientos CMMT y TA; lo mismo ocurrió con el rendimiento por peso, expresado en toneladas por hectárea. En el rendimiento total (sanos + infectados) no hubo diferencia significativa entre tratamientos, a pesar de las marcadas diferencias que indican los promedios (Cuadro 12, Figura 11).

Los resultados anteriores, en que solamente hubo diferencia significativa entre CMMT y TA, son consecuencia de que

Cuadro 12 Efecto del manejo previo de suelo sobre la producción de tubérculos de papa sanos e infectados, corregidos por el porcentaje de marchitez de post cosecha

Tratamiento	Rep.	Rendimiento total T/ha	Tubérculos sanos		Tubérculos infectados ^{1/}		Rendimiento tuber. sanos T/ha
			N°	%	N°	%	
TA	I		17	31,5	37	68,5	
	II		6	30	14	70	
	III		0	0	0	0	
	IV		0	0	0	0	
	Prom.	0,18 a ^{2/}	6 b	31,08	13	68,9	0,03 b
CMMT	I		80	40	120	60	
	II		71	59,2	49	40,8	
	III		172	60,8	111	39,2	
	IV		160	54,8	132	45,2	
	Prom.	4,92 a	121 a	53,97	103	46,0	2,40 a
CMSS	I		192	46,5	224	53,8	
	II		201	50,1	200	49,9	
	III		21	53,8	18	46,1	
	IV		28	40,6	41	59,4	
	Prom.	4,74 a	110 ab	47,78	121	52,2	1,95 ab
CMSR	I		110	38,1	179	61,9	
	II		109	35,9	195	64,2	
	III		8	26,7	22	73,3	
	IV		98	44,3	123	55,7	
	Prom.	4,35 a	81 ab	38,51	130	61,49	1,44 ab
Coeficiente de variación		80,31	82,61		87,75		

1/ Incluye tubérculos con síntomas al ser cosechados y los que mostraron pudrición interna 3 semanas después de la cosecha.

2/ Promedios de la misma columna seguidos de la misma letra no difieren significativamente entre sí, de acuerdo a la prueba de Duncan al 0,05%.

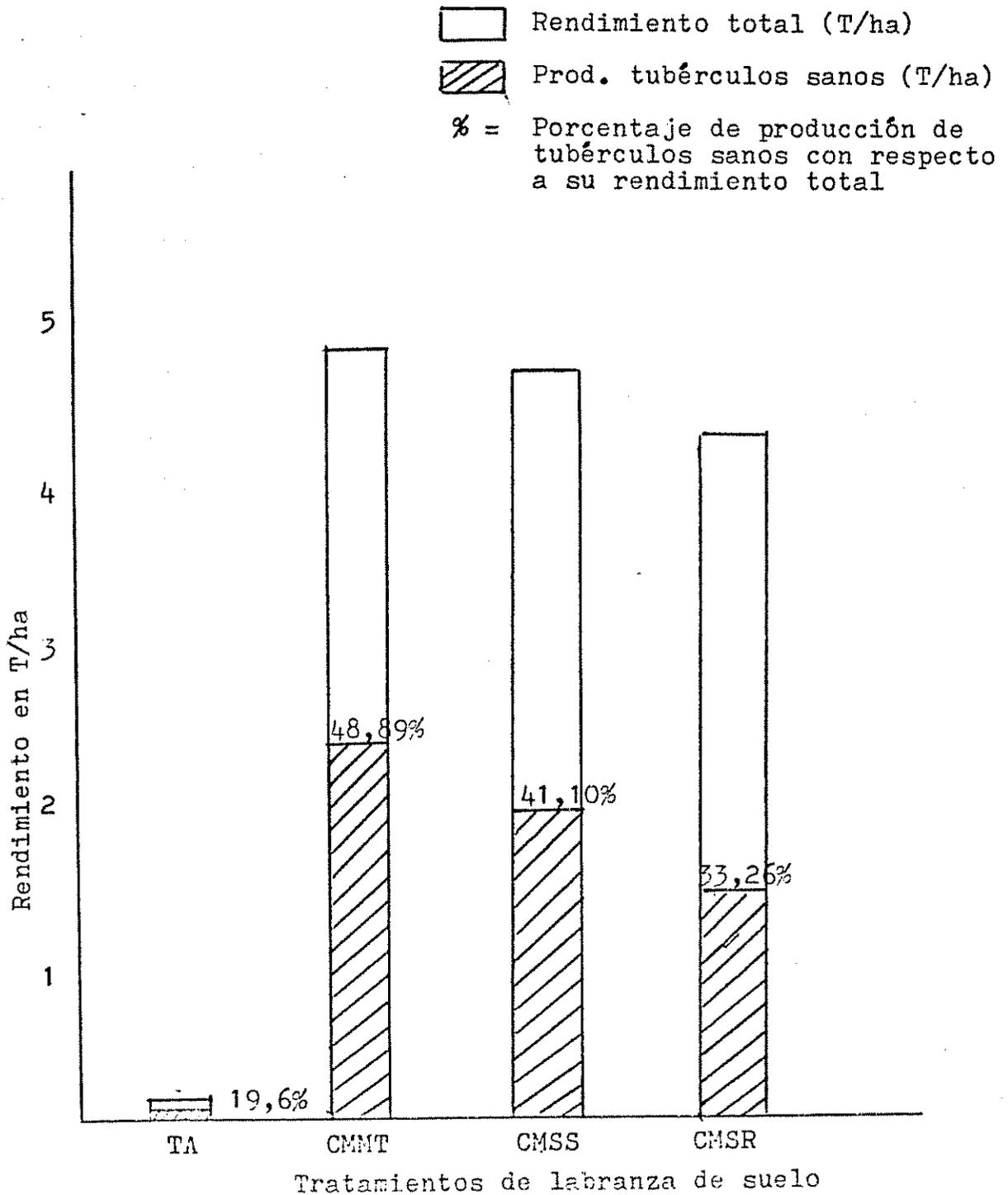


Fig. 11 Comparación del rendimiento total y de la producción de los tubérculos sanos de papa cv. Atzimba, en cuatro distintas labranzas del suelo, Turrialba, Costa Rica.

en las repeticiones III y IV de los tratamientos CMSS y CMSR hubo mucha marchitez por P. solanacearum antes de que las plantas pudieran producir tubérculos (Fig. 11), por las razones explicadas anteriormente (punto C.1, pág. 57), de tal forma que en esas parcelas el rendimiento fue casi nulo. Este dió márgenes de error sumamente altos en el análisis estadístico (Cuadro 15A) y coeficientes de variación igualmente elevados (Cuadro 12).

Para comprobar que fue el efecto de la marchitez en esas repeticiones el que afectó el número y rendimiento de tubérculos sanos, se determinaron los coeficientes de correlación entre el rendimiento total (tubérculos sanos + infectados) y el porcentaje promedio de marchitez (PPM) en papa por parcela, así como el coeficiente entre rendimiento de tubérculos sanos y PPM. La primera comparación dió un valor de $-0,95$ y la segunda comparación $-0,89$; es decir, al aumentar el PPM bajaron proporcionalmente los rendimientos; no hubo efecto compensatorio como ocurre en otras enfermedades, donde las plantas sanas utilizan el espacio que dejan las que mueren.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- 1) No es confiable determinar la infestación por Pseudomonas solanacearum, raza 1, de un terreno dado mediante el aislamiento de la bacteria del sistema vascular de las malezas susceptibles Melampodium perfoliatum, Bidens pilosa o Galinsoga ciliata que crecen sin síntomas, porque la mayoría, si no todas, de las plantas que crecen normalmente no se infectan con la bacteria. Ninguna de estas malezas sufren una epifitias siquiera comparable con la de la papa.
- 2) El método más sensible para predecir cualitativamente el nivel de P. solanacearum, raza 1, de un suelo naturalmente infestado, es el uso de cultivares susceptibles de papa (como Atzimba), sembradas como indicadores en muestras del suelo a evaluar.
- 3) Nicotiana glutinosa se puede usar de manera confiable como indicador para predecir, pero no cuantificar, la presencia de esta bacteria en el suelo, en caso de no disponerse de tubérculos de papa adecuados.
- 4) La maleza Melampodium perfoliatum puede ser un indicador a nivel de campo de la raza 1 de P. solanacearum, aunque generalmente solo transitoriamente, poco después de haber invadido un terreno recientemente removido.
- 5) El uso de medios de cultivo selectivos en suelos tropicales podría tener efectividad limitada, al detectarse P. solanacearum sólo cuando los niveles de población de esta bacteria son muy altos en el suelo en relación a otras bacterias, posiblemente antagónicas.
- 6) Un cultivar susceptible de papa, como Atzimba, es el mejor indicador de campo de la presencia de la raza 1 de esta bacteria, mientras que aún un cultivar considerado como susceptible de tomate, como Tropic, es más resistente que la papa bajo condiciones comparables.

- 7) La labranza convencional del suelo (arada y rastreada) propicia el aumento de la población de P. solanacearum en el suelo y por ende las posibilidades de marchitez bacteriana de los cultivos susceptibles.
- 8) La labranza reducida, la mínima labranza y la cero labranza, con los restos de cosecha formando mantillo sobre el suelo, propician la disminución de la población de P. solanacearum del suelo, con respecto a la labranza convencional.
- 9) Bajo condiciones del trópico húmedo, la reducción de la producción total en el cultivo de papa a causa de la marchitez bacteriana está directamente relacionada con la frecuencia de infecciones tempranas. Sin embargo, ataques tardíos afectan directamente al tubérculo ya producido y pueden ocasionar una pérdida considerable de producto comercializable.

BIBLIOGRAFIA

1. AKIBA, F., et al. Avaliação do comportamento de linhagens de tomateiro introduzidas, em relação a solados nacionais de Pseudomonas solanacearum E.F. Smith; agente da "murcha bacteriana". Arquivos do Instituto Biológico (Brasil) 39(4):243-250. 1972.
2. AMAT, Z. et al. Pseudomonas solanacearum detected in a naturally infested soil containing a new wild host. In International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, 4th, Francia, 1978. Proceedings. INRA, 1978. pp 869-873. (Compendiado en Review of Plant Pathology 59(1):103. 1980).
3. BELALCAZAR, C., URIBE, G.M. y TEURSTON, H.D. Reconocimiento de hospedantes a Pseudomonas solanacearum (E.F. Smith) en Colombia. Revista Instituto Colombiano agropecuario 3(1):37-46. 1968. (Compendiado en Review of Plant Pathology 48:692. 1969).
4. BOESEWINKEL, H.J. Wattery-eye still threatens potato crops. New Zealand Journal of Agriculture 132(1):21-22. 1967. (Compendiado en Review of Plant Pathology 55(9):4258. 1976).
5. BUDDENHAGEN, I.W. Strains of Pseudomonas solanacearum in indigenous hosts in banana plantation of Costa Rica and their relationship to bacterial wilt of bananas. Phytopathology 50(9):660-664. 1960.
6. _____, SEQUEIRA L., y KELMAN, A. Designation of races in Pseudomonas solanacearum. Phytopathology 52:726. 1962.
7. CLAYTON, E.E. et al. Tobacco disease control by crop rotation. Phytopathology 34(10):870-883. 1944.
8. CUPPELS, D. y KELMAN, A. Evaluation of selective media for isolation of soft rot bacteria from soil and plant tissue. Phytopathology 64(4):468-475. 1974.
9. ECHANDI, E. Determinación y estudio de los organismos causantes de dos enfermedades de papa: la maya y podredumbre suave. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, IICA, 1952. 94 p.

10. ERINLE, I.D. Bacterial wilt of potato and tomato in the northern states of Nigeria. In International Planning Conference and Workshop on the Ecology and control of Bacterial Wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*, 1st, Raleigh, 1976. Proceedings. Ed. by L. Sequeira and A. Kelman. Raleigh, North Carolina State University, 1976. pp 73-74.
11. ESQUIVEL, O. Estudio sobre aislamientos de *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith y algunos medios de control. Tesis Ing. Agr. San José, Universidad de Costa Rica, Facultad de Agronomía, 1963. 107 p.
12. FRENCH, E.R. Enfermedades bacterianas de la papa en Latinoamérica. Fitopatología (Perú) 12(2):87-96. 1977.
13. GALLEGLY, M.E. y WALKER, J.C. Relation of environmental factors to bacterial wilt of tomatoes. Phytopathology 39(11):936-946. 1949.
14. GONZALEZ, L.C. Bacterial wilt of potato in Costa Rica. In International Planning Conference and Workshop on the Ecology and Control of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas solanacearum*, 1st, Raleigh, 1976. Proceedings. Ed. by L. Sequeira and A. Kelman. Raleigh, North Carolina State University, 1976. p 90.
15. _____ Introducción a la fitopatología. San José, Costa Rica. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1976. pp 67,90.
16. _____ Determinación de niveles de infección por *Pseudomonas solanacearum* en tubérculos de semilla de papa. Fitopatología (Perú) 12(2):101-104. 1977.
17. GRAHAM, J. y LLOYD, A.B. An improved indicator plant method for the detection of *Pseudomonas solanacearum* race 3 in soil. Plant Disease Reporter 62(1):35-37. 1978.
18. _____ y LLOYD, A.B. *Solanum cinereum* a wild host of *P. solanacearum* biotype II. Journal of the Australian Institute of Agricultural Science 44(2):124-126. 1978.
19. _____ y LLOYD, A.B. Survival of potato strain (race 3) of *Pseudomonas solanacearum* in the deeper soil layers. Australian Journal of Agricultural Research 30(3): 489-496. 1979.
20. _____, JONES, D.A. y LLOYD, A.B. Survival of *P. solanacearum* race 3 in plant debris and in latently infected potato tubers. Phytopathology 69(10):1100-1105. 1979.

21. GRANADA, G.A. y SEQUEIRA, L. Characteristics of Colombian isolates of P. solanacearum from tobacco. *Phytopathology* 65(9):1004-1009. 1975.
22. _____ y SEQUEIRA, L. A selective medium for Pseudomonas solanacearum. In *Proceedings, American Phytopathological Society-Canadian Phytopathological Society, 1980. Annual Meeting, August 24-28, University of Minnesota, Minneapolis, p. 176. 1980.*
23. GRIFFITHS, D.A. y LIM, W.L. Bacterial wilt in Malaya. *Plant Disease Reporter* 53(8):597-600. 1969.
24. GUTARRA, L., JATALA, P. y FRENCH, E.R. Interacción de Meloidogyne incognita acrita y Pseudomonas solanacearum raza 3 en papa. *Fitopatología (Perú)* 10(2):75. 1975.
25. HARRIS, D.C. Bacterial wilt in Kenya with particular reference to potatoes. In *International Planning Conference and Workshop on the Ecology and Control of Bacterial Wilt Caused by Pseudomonas solanacearum*, 1st, Raleigh, 1976. *Proceedings*. Ed. by L. Sequeira and A. Kelman. Raleigh, North Carolina State University, 1976. pp 84-88.
26. _____ Media for estimating a strain of Pseudomonas solanacearum in Kenya soils by the dilution plate technique. In *International Planning Conference and Workshop on the Ecology and Control of Bacterial Wilt Caused by Pseudomonas solanacearum*, 1st, Raleigh, 1976. *Proceedings*. Ed. by L. Sequeira and A. Kelman. Raleigh, North Carolina State University, 1976. pp 148-150.
27. HAYWARD, A.L. Characteristics of Pseudomonas solanacearum. *Journal Appl. Bacteriol* 27:265-277. 1964.
28. HSU, S.T. Survival of Pseudomonas solanacearum in the soil and infected tomato tissues. *Plant Protection Bulletin, Taiwan* 19(2):133-139. 1977. (Compendiado en *Review of Plant Pathology* 57(6):2656. 1978).
29. HUSAIN, A. y KELMAN, A. Presence of pectic and cellulosic enzymes in tomato plants infected with Pseudomonas solanacearum. *Phytopathology* 47(2):111-112. 1957.
30. _____ y KELMAN, A. Relation of slime production to mechanism of wilting and pathogenicity of Pseudomonas solanacearum. *Phytopathology* 48(3):155-165. 1958.

31. JACKSON, M.T., GONZALEZ, L.C. y AGUILAR, J. Avances en el combate de la marchitez bacteriana de la papa en Costa Rica. *Fitopatología (Perú)* 14(2):46-53. 1979.
32. _____ y GONZALEZ, L.C. Persistence of *Pseudomonas solanacearum* in a naturally infested soil in Costa Rica. *Phytopathology* 71 (in press). 1981.
33. JENKINS, S.F.; MORTON, D.J. y DUKES, P.D. Detection of *Pseudomonas solanacearum* in infested soils by serological techniques. *Phytopathology* 55:1063. 1965.
34. _____, HAMMONS, R.O. y DUKES, P.D. Disease reaction and symptom expression of seventeen peanut cultivars to bacterial wilt. *Plant Disease Reporter* 50(7): 520-523. 1966.
35. _____, MORTON, D.J. y DUKES, P.D. Distinguishing *Pseudomonas solanacearum* infections from other peanut wilt diseases by the use of serological techniques. *Plant Disease Reporter* 50(11):836-838. 1966.
36. _____, MORTON, D.J. y DUKES, P.D. Comparison of techniques for detection of *Pseudomonas solanacearum* in artificially infested soils. *Phytopathology* 57(1): 25-27. 1967.
37. KADO, C.I. y HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60(5):969-976. 1970.
38. KARGANILLA, A. y BUDDENHAGEN, I.W. Development of a selective medium for *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 62(12):1573-1576. 1972.
39. KATSURA, K. y UEMURA, N. The effect of root-knot nematode on the appearance of southern bacterial wilt of tomato. *Sci. Rep. Kyoto Univ. Agri.*, 15:33-36. 1963. (Compendiado en *Review of Plant Pathology* 43:2731. 1964).
40. KEBIAN, A. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. A literature review and bibliography. North Carolina Agricultural Experiment Station. Bulletin 99 1955. 194 p.
41. _____. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44(12):693-695. 1954.
42. _____ y PERSON, L.M. Variation in pathogenicity of isolates of *Pseudomonas solanacearum* on different host. *Phytopathology* 45:348. 1955.

43. KELMAN, A. Strains of Pseudomonas solanacearum differing in pathogenicity to tobacco and peanut. *Phytopathology* 51(3):158-161. 1961.
44. _____ y SEQUEIRA, L. Root-to-root spread of Pseudomonas solanacearum. *Phytopathology* 55:304-309. 1965.
45. KESHWAL, R.L. Note on a new bacterial wilt of Dolichos lablab L. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 46(7):349-350. 1976.
46. _____ Survival in the soil and virulence of Pseudomonas solanacearum. In *International Planning Conference and Workshop on the Ecology and Control of Bacterial Wilt caused by Pseudomonas solanacearum*, 1st, Raleigh, 1976. Proceedings. Ed. by L. Sequeira and A. Kelman. Raleigh, North Carolina State University, 1976. p 133.
47. KRATKY, B.A. y KO, W.H. A virgin-soil technique for controlling bacterial wilt of greenhouse-grown tomatoes (Pseudomonas solanacearum). *Plant Disease Reporter* 58(1):86-87. 1974.
48. KRAUSZ, J.P. y THURSTON, H.D. Breakdown of resistance to Pseudomonas solanacearum in tomato. *Phytopathology* 65(11):1272-1274. 1975.
49. LLOYD, A.B. Bacterial wilt in a cold temperature climate of Australia. In *International Planning Conference and Workshop on the Ecology and Control of Bacterial Wilt Caused by Pseudomonas solanacearum*, 1st, Raleigh 1976. Proceedings. Ed. by L. Sequeira and A. Kelman. Raleigh, North Carolina State University, 1976. p 134.
50. _____ Survival of the potato strain of Pseudomonas solanacearum in soil. In *International Planning Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, 4th, Francia, 1978. Proceedings, INRA, 1978. pp 875-878. (Compendiado en *Review of Plant Pathology* 59(1):104. 1980).
51. LOZANO T., J.C. y THURSTON, H.D. Identificación de la raza 1 de la bacteria Pseudomonas solanacearum E.F. Smith del tabaco (Nicotiana tabacum) en Colombia. *Agricultura Tropical (Colombia)* 23(5):289-294. 1967.
52. LUCAS, G.E., SASSER, J.N. y KELMAN, A. The relationship of root knot nematodes to Granville wilt resistance in tobacco. *Phytopathology* 45(10):537-540. 1955.
53. MAHMOUD, J.A. et al. Effect of seed-piece weight and tuberization on bacterial wilt disease of potato. *Agricultural Research Review* 52(2):101-108. 1974. (Compendiado en *Review of Plant Pathology* 54(11):5063. 1975).

54. McCARTER, S.M. y JAWORSKI, C.A. Field studies on spread of Pseudomonas solanacearum and tobacco mosaic virus in tomato plants by clipping. *Plant Disease Reporter* 53(12):942-946. 1969.
55. _____, DUKES, P.D. y JAWORSKI, C.A. Vertical distribution of Pseudomonas solanacearum in several soils. *Phytopathology* 59(11):1675-1677. 1969.
56. _____ Persistence of Pseudomonas solanacearum in artificially infested soils. *Phytopathology* 66(8):998-1000 1976.
57. _____ y HO, W.C. Effect of soils temperature on resistance of tomato cultivars to bacterial wilt. *Phytopathology* 67(7):909-911. 1977.
58. MOFFETT, M.L. y HAYWARD, A.C. The role of weed species in the survival of Pseudomonas solanacearum in tomato cropping land. *Australasian Plant Pathology* 9:6-8. 1980.
59. MORA, L.E. Efecto de labranza de suelo en la incidencia y severidad de enfermedades foliares del maíz y frijol común en diferentes sistemas de cultivos. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica. UCR-CATIE, 1978. 168 p.
60. MORTON, D.J., DUKES, P.D. y JENKINS, J.F. Serological identification of Pseudomonas solanacearum in four Solanaceous host. *Phytopathology* 55(11):1191-1193. 1965.
61. _____, DUKES, P.D. y JENKINS, J.F. Serological relationships of races 1, 2 and 3 of Pseudomonas solanacearum. *Plant Disease Reporter* 50(4):275-277. 1966.
62. NAVARRO, R. Supervivencia de Pseudomonas solanacearum en suelos cultivados con papas. *Noticias Fitopatológicas (Colombia)* 4(2):160-167. 1975.
63. NESMITH, W.C. y JENKINS, J.F. A selective medium for the isolation and quantification of Pseudomonas solanacearum from soil. *Phytopathology* 69:182-185. 1979.
64. OKABE, N. Population changes of Pseudomonas solanacearum and soil microorganisms in artificially infested natural field soil. *Bull, Fac. Agr. Shizudka. Univ.* 19:1-29. 1969. (Compendiado en *Biological Abstract* 52(10):57059, 1971.
65. PARK, M. y FERNANDO, M. The relative resistance of some tomato varieties to bacterial wilt (Bacterium solanacearum E.F. Smith). *Tropical Agriculturist (Ceylan)* 91(6):333-337. 1938.

66. QUIMIO, A.J. Cowpea, new host of Pseudomonas solanacearum E.F. Smith in the Philippines. Philippine Agriculturist 58(5/6):200-204. 1974.
67. SATHYARAYAN, P.K. y MATHAI, P. New host record for Pseudomonas solanacearum E.F. Smith. Agricultural Research Journal of Kerala 16(1):97. 1978. (Compendiado en Review of Plant Pathology 58(12):5682. 1979).
68. SCHMIDT, J. Microscopic study of early stages of infection by Pseudomonas solanacearum E.F. Smith on "in vitro" grown tomato seedlings. In International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, 4th, Francia, 1978. Proceedings, INRA, 1978. pp 841-856. (Compendiado en Review of Plant Pathology 59(1):100. 1980.
69. SENEVIRATNE, S.N. de S. The occurrence of Pseudomonas solanacearum in the hill country of Ceylan. Journal of Horticultural Science 44(4):393-402. 1969.
70. SEQUEIRA, L. Studies on the dissemination and control of the moko disease of bananas. Phytopathology 46(1):25-26. 1956.
71. _____ y AVERRE, C.W. Distribution and pathogenicity of strains of Pseudomonas solanacearum from virgin soil in Costa Rica. Plant Disease Reporter 45(6):435-440. 1961.
72. _____ y KELMAN, A., eds. International Planning Conference and Workshop on the Ecology and Control of Bacterial Wilt caused by Pseudomonas solanacearum, 1st., Raleigh, 1976. Proceedings. Raleigh, North Carolina State University, 1976. 165 p.
73. SHAMSUDDIN, N., LLOYD, A.B. y GRAHAM, J. Survival of the potato strain of Pseudomonas solanacearum in soil. Journal of the Australian Institute of Agricultural Science 44(3/4):212-215. 1978.
74. SMITH, T.E. y GODFREY, R.K. Field survey of the relation of susceptible weeds to Granville wilt control. Phytopathology 29:22. 1939.
75. STEEL, R.D. y TORRIE, H.F. Principles and procedures of statistics. New York, McGraw-Hill, 1960. 481 p.
76. STEFANOVA, M. y RODRIGUEZ GRILLO, J. Millieria quinqueflora L. nuevo hospedero de Pseudomonas solanacearum. Ciencias de la Agricultura (Cuba) (3):135-139. 1978. (Compendiado en Review of Plant Pathology 59(4):1865. 1980).

77. TANAKA, Y. y NODA, N. Studies on the factors affecting survival of Pseudomonas solanacearum, the caused agent of tobacco wilt disease. Bulletin of Okayama Tobacco Experimental Station N.32, 81-93. 1973. (Compendiando en Review of Plant Pathology 53(8):3171. 1974).
78. _____ Factors affecting survival of Pseudomonas solanacearum. In International Planning Conference and Workshop on the Ecology and Control of Bacterial Wilt caused by Pseudomonas solanacearum, 1st, Raleigh, 1976. Proceedings. Ed. by L. Sequeira and A. Kelman. Raleigh, North Carolina State University, 1976. p 122.
79. _____ Ecological studies on Pseudomonas solanacearum the pathogen of bacterial wilt of tobacco. Bulletin of the Kagoshima Tobacco Experiment Station N.22. 82 p. 1979. (Compendiado en Review of Plant Pathology 59(2):903. 1980).
80. THURSTON, H.D. Bacterial wilt of potatoes in Colombia. American Potato Journal 40(11):381-390. 1963.
81. _____ Breeding for resistance to bacterial wilt. In International Planning Conference and Workshop on the Ecology and Control of Bacterial Wilt caused by Pseudomonas solanacearum, 1st, Raleigh, 1976. Proceedings. Ed. by L. Sequeira and A. Kelman. Raleigh, North Carolina State University, 1976. pp 150-155.
82. _____ Resistance to bacterial wilt (Pseudomonas solanacearum). In International Planning Conference and Workshop on the Ecology and Control of Bacterial Wilt caused by Pseudomonas solanacearum, 1st, Raleigh, 1976. Proceedings. Ed. by L. Sequeira and A. Kelman. Raleigh, North Carolina State University, 1976. pp 58-62.
83. VAUGHAN, E.K. Bacterial wilt of tomato caused by Phytomonas solanacearum. Phytopathology 34(5):443-458. 1944.
84. VOLCANI, Z. y PALTÍ, J. Pseudomonas solanacearum in Israel. Plant Disease Reporter 44(6):448-449. 1960.
85. WALLIS, F.M. y BRUELL, S. Histo-pathology of tomato plants infected with Pseudomonas solanacearum, with emphasis on ultrastructure. Physiological Plant Pathology 13(3): 307-317. 1978.

A P E N D I C E

Cuadro 1A Ingredientes del medio TZC, utilizado para tratar de aislar P. solanacearum de malezas

Ingredientes	Cantidad por litro
1) Peptona	10 g
2) Glucosa	5 g
3) Casamino ácidos (caseína hidrolizada)	1 g
4) Agar	18 g
5) TZC (cloruro de 2,3,5 trifenil tetrazolium)	0.05 g
6) Agua destilada	1000 ml

Cuadro 2A Datos climáticos mensuales correspondientes al período en que se realizó el experimento de campo. Turrialba, Costa Rica. 1980

M e s	Precipitación (mm)		Temperatura (c)			Humedad rel(%)	Evaporación (mm)
	Total	pr/día	Max	Min	Med	Pr/día	Tanque A
Junio	311,7	10,39	27,75	19,66	22,69	88,70	84,8
Julio	182,6	5,89	27,80	19,16	22,48	58,61	103,8
Agosto	184,1	5,94	28,07	18,79	22,16	87,09	112,5
Setiembre	272,9	9,09	28,12	18,87	22,13	87,33	101,4

Estación Meteorológica del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica (9° 53' latitud norte y 83° 39' longitud oeste) 602 m.s.n.m.

Cuadro 3A Análisis de varianza de los grados de detección de Pseudomonas solanacearum utilizando papa como indicadora de invernadero

FV	SC	GL	CM	F.calc.
Bloques	0,57	3	0,19	2,381 n.s
Tratamientos	0,62	3	0,21	2,554 n.s
Error	0,72	9	0,08	
Total	1,91	15		

Cuadro 4A Análisis de varianza de los grados de detección de Pseudomonas solanacearum utilizando Nicotiana glutinosa como indicadora de invernadero

FV	SC	GL	CM	F.calc.
Bloques	0,60	3	0,20	0,988 n.s
Tratamientos	0,36	3	0,12	0,590 n.s
Error	1,83	9	0,20	
Total	2,80	15		

Cuadro 5A Coeficiente de correlación de la cuantificación de Pseudomonas solanacearum en 16 diferentes suelos naturalmente infestados por medios selectivos de laboratorio

Tratamiento	Repet.	Aislamiento de suelo, medio selectivo		Porcentaje promedio de marchitez en papa trans. Arcoseno
		<u>P. solanacearum</u> Promedio 3 platos	otras bacterias Promedio 3 platos	
TA	I	1,33	123,00	44,94
	II	0,33	76,67	51,53
	III	1,33	27,33	61,96
	IV	1,33	53,33	55,92
CMMT	I	0,00	102,00	28,52
	II	0,00	291,33	35,37
	III	0,00	38,00	27,90
	IV	0,00	323,33	17,26
CMSS	I	0,00	180,00	17,05
	II	0,00	174,33	11,83
	III	0,00	172,67	47,29
	IV	0,66	79,00	38,29
CMSR	I	0,00	100,67	12,25
	II	0,00	84,33	23,26
	III	0,33	27,67	47,64
	IV	0,00	125,33	29,06

Coeficientes de correlación:

N. colonias de P. solanacearum vs. otras bacterias = -0,433. N. colonias de P. solanacearum vs. porcentaje promedio de marchitez = 0,728. N. colonias de otras bacterias vs. porcentaje promedio de marchitez = -0,459.

Cuadro 6A Valores semanales de los porcentajes de marchitez obtenidos en papa, bajo condiciones naturales de campo. Turrialba, Costa Rica

Tratamiento	Rep.	Sem.1	Porcentajes de marchitez semanales							Promedio por repetición	
			2	3	4	5	6	7	8		9
TA	I	0	1,3	15,4	32,1	53,8	70,5	84,6	91,0	100	49,86
	II	0	0	30,3	64,5	76,3	88,2	94,7	97,4	100	61,26
	III	0	7,8	93,5	100	100	100	100	100	100	77,92
	IV	0	1,2	49,4	76,5	92,6	97,5	100	100	100	68,59
	Promedio	0	2,6	47,1	72,3	81,9	89,1	94,8	97,1	100	64,41
CMMT	I	0	1,3	10,3	11,8	21,8	25,6	35,9	43,6	53,8	22,79
	II	0	0	11,1	19,7	35,8	45,7	54,3	58,0	76,5	33,4
	III	0	0	15,2	16,5	24,0	26,6	34,2	35,4	45,6	21,94
	IV	0	0	0	2,6	5,2	6,5	16,9	19,5	28,6	8,80
	Promedio	0	0,3	9,1	12,9	21,7	26,1	35,3	39,1	51,1	21,75
CMSS	I	0	0	1,3	2,7	5,3	6,7	16	18,7	26,7	8,59
	II	0	0	0	0	2,5	2,5	6,3	7,6	18,9	4,22
	III	0	5,1	32,9	46,8	62,0	69,6	87,3	88,6	93,7	54,01
	IV	0	0	16,0	22,2	38,2	48,2	64,2	75,3	81,5	38,41
	Promedio	0	1,3	12,6	17,9	27,0	31,7	43,5	47,5	55,2	26,31
CMSR	I	0	0	0	0	2,6	2,6	7,8	7,8	19,5	4,47
	II	0	0	2,5	6,3	11,4	16,5	27,8	32,9	43,0	15,61
	III	0	2,5	32,9	48,1	63,3	67,1	86,1	91,1	100	54,57
	IV	0	0	11,1	18,5	23,5	24,7	39,5	41,9	53,1	23,59
	Promedio	0	0,6	11,6	18,2	25,2	27,7	40,3	43,5	53,9	24,56

Cuadro 7A Valores de los índices de severidad obtenidos a la décima semana de la siembra en papa. Turrialba, Costa Rica

Tratamiento	Rep.	Grado de severidad, décima semana						Promedio
		Grado 1	2	3	4	5	6	
		Número de plantas						
TA	I	0	0	0	3	8	67	5,8
	II	0	0	0	2	1	73	5,9
	III	0	0	0	0	0	77	6
	IV	0	0	0	0	0	81	6
	Σ	0	0	0	5	9	298	5,94
CMMT	I	36	2	3	6	7	24	3,2
	II	19	0	5	4	15	38	4,3
	III	13	1	2	4	3	26	3,0
	IV	55	0	3	2	4	13	2,2
	Σ	123	3	13	16	29	101	3,22
CMSS	I	55	2	3	2	4	9	2
	II	64	1	2	5	3	4	1,7
	III	5	0	3	0	4	67	5,5
	IV	15	0	0	4	8	54	4,9
	Σ	139	3	8	11	19	134	3,54
CMSR	I	62	1	4	1	5	4	1,7
	II	45	0	2	6	3	23	2,9
	III	0	0	3	4	12	60	5,6
	IV	38	0	1	6	11	25	3,3
	Σ	145	1	10	17	31	112	3,39

Cuadro 8A Valores semanales de los porcentajes de marchitez obtenidos en tomate, bajo condiciones naturales de campo, Turrialba, Costa Rica

Tratamiento	Rep.	Porcentaje de marchitez semanales												Valores transf. Arcoseno	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
TA	I	0	0	0	0	1,8	1,8	1,8	3,6	5,4	8,9	8,9	8,9	3,42	10,63
	II	0	0	7,8	11,8	15,7	25,5	31,4	47,1	49,0	66,7	72,5	76,5	33,66	35,49
	III	0	0	0	1,8	1,8	5,6	7,4	7,4	9,3	9,3	9,3	9,3	5,09	13,05
	IV	0	0	0	0	0	2	4	4	6	8	8	8	3,17	10,31
	Pro.	0	0	1,9	3,4	4,8	8,7	10,6	15,5	17,4	23,2	24,7	25,7	11,33	17,37
CMNT	I	0	0	0	0	1,9	3,8	3,8	7,5	11,3	11,3	11,3	11,3	5,19	13,18
	II	0	0	0	0	0	1,9	1,9	1,9	5,8	7,7	11,5	11,5	3,52	10,78
	III	0	0	0	0	0	0	0	2	4	4	6	6	1,83	7,71
	IV	0	0	0	0	2,2	2,2	2,2	2,2	6,7	6,7	6,7	6,7	2,96	9,98
	Pro.	0	0	0	0	1,0	1,9	1,9	3,4	6,9	7,4	8,9	8,9	3,38	10,41
CHSS	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	0	0	0	1,9	1,9	1,9	1,9	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	2,20	8,53
	III	0	0	0	0	1,8	9,3	14,8	20,4	24,1	25,9	27,8	27,8	12,65	20,79
	IV	0	0	0	0	3,9	5,8	11,5	23,1	25	25	25	25	12,02	20,27
	Pro.	0	0	0	0,5	1,9	4,2	7,1	11,7	13,2	13,7	14,1	14,1	6,72	12,39
CMSR	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	0	0	0	0	1,8	1,8	1,8	1,8	1,02	5,74
	III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	IV	0	0	0	0	0	1,9	1,8	3,7	7,4	7,4	7,4	7,4	3,09	10,14
	Pro.	0	0	0	0	0	0,9	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	1,82	7,71
															5,89

Cuadro 9A Análisis de varianza de los valores de porcentajes promedio de marchitez en papa

FV	SC	GL	CM	F.cal.	F.tab.
Bloques	923,24	3	307,75	3,03ns	3,86
Tratamientos	1971,44	3	657,15	6,47*	
Error	914,30	9	101,59		
Total	3808,98	15			

Cuadro 10A Análisis de varianza de los valores del índice de severidad en papa

FV	SC	GL	CM	F.cal.	F.tab.
Bloques	7,40	3	2,87	1,49ns	3,86
Tratamientos	20,04	3	6,68	4,05*	
Error	14,84	9	1,65		
Total	42,27	15			

Cuadro 11A Análisis de varianza de los valores de porcentajes promedio de marchitez en tomate

FV	SC	GL	CM	F.cal.	F.tab.
Bloques	96,39	3	32,13	0,40ns	3,86
Tratamientos	217,33	3	90,44	1,13ns	
Error	718,32	9	79,81		
Total	1036,03	15			

Cuadro 12A Valores del rendimiento total de los tubérculos sanos y los porcentajes de pudrición post-cosecha.

Tratamiento	Repet.	Rendimiento total T/ha	Rendimiento de tubérculos sanos T/ha	% del total	Porcentaje de pudrición tres semanas después de la cosecha
TA	I	0,6	0,1	15,4	22,7
	II	0,1	0,0	33,3	----
	III	0,0	0,0	0,0	----
	IV	0,0	0,0	0,0	----
	Promedio	0,18	0,03	19,55	22,73
CMMT	I	3,9	1,6	40,6	29,0
	II	2,7	1,5	56,2	5,3
	III	6,8	3,6	53,6	21,0
	IV	6,3	2,9	45,9	23,0
	Promedio	4,92	2,41	48,89	19,58
CMSS	I	8,1	3,3	40,6	41,0
	II	9,0	3,9	42,9	33,0
	III	0,4	0,2	44,8	19,2
	IV	1,4	0,4	30,2	17,6
	Promedio	4,75	1,95	41,10	27,72
CMSR	I	6,7	2,3	35,0	30,0
	II	6,0	1,8	29,2	48,0
	III	0,4	0,1	25,0	----
	IV	4,4	1,6	36,8	36,0
	Promedio	4,35	1,45	33,26	38,00

Cuadro 13A Análisis de varianza del número de tubérculos sanos reales

FV	SC	GL	CM	F. calc.
Bloques	6508,69	3	2169,56	0,50 ns
Labranzas	32418,69	3	10806,23	2,50 ns
Error	38878,56	9	4319,84	
Total	77805,94	15		

Cuadro 14A Análisis de varianza del rendimiento de tubérculos sanos reales

FV	SC	GL	CM	F. calc.
Bloques	2,17	3	0,72	0,44 ns
Labranzas	12,66	3	4,22	2,58 ns
Error	14,73	9	1,64	
Total	29,56	15		

Cuadro 15A Análisis de varianza del rendimiento total

FV	SC	GL	CM	F. calc.
Bloques	22,15	3	7,38	0,91 ns
Labranzas	61,22	3	10,41	2,51 ns
Error	73,12	9	8,12	
Total	156,19	15		