

DETERMINACION DEL NIVEL DE INOCULO PRIMARIO DE *Pseudomonas solanacearum* EN
SUELOS CON INFESTACION NATURAL¹*/

CESAR AUGUSTO RODRIGUEZ**
LUIS CARLOS GONZALEZ**

Abstract

Several methods were tested for detecting the residual inoculum of *Pseudomonas solanacearum*, Race 1, in inceptisols at Turrialba, Costa Rica, where the bacterium is apparently endemic. Planting healthy potato tubers in soil samples in the greenhouse, then using plant wilt as indicator of the pathogen's presence, was qualitatively the most efficient method; however, it was not possible to quantify precisely the level of primary inoculum in several soils. A selective culture medium containing tetrazolium chloride plus antibiotics allowed detection of *P. solanacearum* at concentrations near 25 000 cells/gram of dry soil, even though a large number of antagonistic bacteria predominated in many samples, completely inhibiting *P. solanacearum*.

Both methods were used to detect *P. solanacearum* in samples from soils subjected for nearly four years to three systems of minimum tillage or one of traditional mechanical tillage, populations were consistently larger in mechanically-tilled soil. This was confirmed by planting potato and tomato directly in the field, where significant contrasts in percentage of bacterial wilt resulted. The decrease of the bacterium in minimum-tilled soils was attributed to an increase in organic matter and thus an increase in antagonistic microorganisms.

1 Recibido para publicación el 22 de abril de 1982.

* Parte de la tesis de *Magister Scientiae* presentada por el primer autor en el Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas de la Universidad de Costa Rica y el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, C.R.

Los autores agradecen la gran ayuda material e intelectual brindada por el Dr. Michael T. Jackson, representante regional del Centro Internacional de la Papa, y por el Dr. Raúl A. Moreno, fitopatólogo del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.

** Estudiante, Programa de Posgrado UCR-CATIE, Turrialba, y Fitopatólogo, Escuela de Fitotecnia, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Dirección actual del primer autor: Estación Experimental de Falcón, Coro, Edo. Falcón, Venezuela

Introducción

La raza I de la bacteria *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith, cuyo ámbito de hospedantes incluye tomate, papa, chile, tabaco, berenjena y numerosas especies no cultivadas, es un habitante de los suelos de muchas regiones tropicales; generalmente causa síntomas típicos de marchitez vascular, pero también infecciones sin síntomas (1). En Costa Rica se encuentra en las zonas medias y bajas, por debajo de los 1 200 msnm aproximadamente (2), atacando principalmente tomate y tabaco; la papa se siembra poco en tales zonas, en gran medida debido a su susceptibilidad a esta enfermedad. La frecuente aparición de marchitez bacteriana en papa-

les y tomatales sembrados en terrenos previamente libres de cultivos susceptibles (2, 3, 12) hace presumir que la bacteria puede permanecer en el suelo por periodos largos, ya sea alojada en el xilema de hospedantes que no dan síntomas (1, 7), en la rizosfera de los mismos o aún de especies no hospedantes (13), o bien en niveles relativamente profundos del suelo (4, 18).

En Costa Rica y otros países se han hecho intentos de disminuir experimentalmente la población de la Raza 1 de *P. solanacearum* en el suelo mediante rotaciones con hospedantes no susceptibles, como maíz, frijol y camote (3, 7). En ningún caso se ha podido disminuir el inóculo con esas rotaciones, si bien se observó que en terrenos donde las malezas fueron controladas con herbicidas, el ataque posterior de marchitez bacteriana en papa fue menor que donde se practicó labranza de suelo para el control de malezas (7).

Se considera importante seleccionar un método confiable pero simple, que no requiera instalaciones especiales, para detectar la presencia de la Raza 1 de *P. solanacearum* en los suelos y que también sirva, de ser posible, para cuantificar el nivel de inóculo. Esto permitiría evitar la siembra comercial de hospedantes susceptibles en terrenos infestados o, por el contrario, programar la siembra experimental de variedades cuya reacción a ese patógeno se desea evaluar. Algunos autores (1, 13) han intentado este reconocimiento mediante el aislamiento de la bacteria de presuntas malezas hospedantes sin síntomas. Otros han hecho siembras de plantas indicadoras directamente en el campo (8, 12, 16), o en muestras de suelo llevadas del campo al invernadero (4, 9, 16, 18); en la mayoría de los casos se ha usado tomate o tabaco, que indican, mediante su reacción de marchitez, la presencia de *P. solanacearum* en las muestras; sin embargo, esto toma varias semanas y requiere considerable espacio y material de invernadero.

También se han desarrollado medios selectivos de cultivo, que se espera puedan detectar, directamente y en pocos días, las poblaciones de *P. solanacearum* en determinado terreno (5, 6, 9, 15). La mayoría de estos medios selectivos, empero, no han sido probados con suelos tropicales, y en general sólo han detectado la bacteria en suelos deliberadamente infestados con suspensiones del patógeno poco tiempo antes del muestreo, y no en terrenos agrícolas con infestaciones naturales.

Esta investigación se hizo con la finalidad de evaluar algunos de esos métodos de detección de la Raza 1 de *P. solanacearum*, en terrenos de zonas bajas tropicales, así como determinar la forma en que ésta

bacteria sobrevive en estas zonas y el efecto del manejo del terreno sobre la misma. El estudio se desarrolló en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) en Turrialba, Costa Rica, durante el año de 1980.

Materiales y métodos

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

Se trató de determinar si la bacteria podía sobrevivir en hospedantes alternos sin causar síntomas. Se utilizaron malezas que invadieron un terreno donde, desde 1976 hasta 1980, hubo siembras de diferentes cultivos en rotación con el cultivar de papa 'Atzimba', que es muy susceptible a la marchitez bacteriana, y con el híbrido MS 35-22, que es tolerante (7). La selección del 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. De cada una de las 12 subparcelas muestreadas (6 de cada cultivar) se recolectaron 10 ejemplares de las malezas más importantes que tenían leño en el tallo: *Melampodium perfoliatum* H. B. K., *Bidens pilosa* L. y *Galinsoga ciliata* (Raf) Blake, las tres susceptibles a *P. solanacearum*, ninguna de las plantas recolectadas mostraba síntomas de marchitez.

Por otro lado, se determinó si en plantas de *M. perfoliatum* sin síntomas, pero contiguas a plantas marchitas, se podía detectar la presencia de esta bacteria. Esto se hizo en un terreno recién arado, sin historial reciente de solanáceas, donde había *M. perfoliatum* en diferentes situaciones, así: a—jóvenes marchitas; b—adultas marchitas; c—jóvenes sin síntomas; d—adultas sin síntomas; e—jóvenes sin síntomas pero contiguas a plantas marchitas; f—con los primeros síntomas de marchitez y contiguas a plantas marchitas.

El tallo de cada planta muestreada se pasó a agua estéril tras desinfección superficial y se hizo un estrizado en el medio TZC (11); como control se hizo estrizado de *P. solanacearum* puro, aislado de *M. perfoliatum*.

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

En una primera prueba se utilizaron como indicadoras la papa (cv. 'Atzimba'), el tomate (cv. Tropic), y la maleza *Melampodium perfoliatum*. De cada una de las 12 subparcelas utilizadas para la búsqueda de la bacteria en malezas se obtuvieron 10 submuestras de

suelo a 10-20 cm de profundidad, que se combinaron en una sola muestra por subparcela; la mitad de cada muestra se distribuyó de inmediato en seis potes en el invernadero (4-5 kg de suelo por pote), sembrándose cada especie indicadora en dos potes. Cuando las raíces llenaron el pote, se cortaron verticalmente a 8 cm del tallo en cuatro costados. La segunda mitad de cada muestra se pasó a cajas grandes, donde se sembró maíz para mantener una condición similar a la del campo.

La reacción de las plantas indicadoras se calificó un mes después de la siembra, de acuerdo con la siguiente 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. En los potes donde no hubo marchitez se arrancó la planta indicadora adulta y se sembró una nueva, para verificar la ausencia de la bacteria.

Tres meses después se repitió la misma prueba, utilizando el suelo mantenido con plantas de maíz.

Una segunda prueba se realizó utilizando como indicadoras plántulas de berenjena (*Solanum melongena*), plántulas de *Nicotiana glutinosa*, tubérculos pequeños de papa, cv. 'Atzimba'; y brotes de cuatro semanas, separados de tubérculos de papa. Se utilizaron dos tipos de suelo: uno provino de un terreno donde se acababa de cosechar un papal que sufrió ataque severo de *P. solanacearum* ("suelo infestado"); el otro fue de un terreno vecino al infestado, pero donde no se había sembrado papa ("suelo testigo"). Cada uno de estos tipos de suelo se evaluó dos veces con cada planta indicadora, excepto los tubérculos de papa, con los que se evaluó cada suelo en seis oportunidades. El corte de raíces y la calificación en tres grados de reacción se efectuaron al igual que en la primera prueba.

C. Detección de la bacteria en medios de cultivo selectivos

Se utilizaron cuatro medios de cultivo selectivos, desarrollados por Granada y Sequeira (5) para determinar niveles de *P. solanacearum* en el suelo, que contienen complementos crecientes de antibióticos.

Fórmula A = Glucosa (5 g/l), Peptona (10 g/l), Caseína hidrolizada (1 g/l), Cloruro de tetrazolio (50 ppm), Agar (18 g/l), Cristal violeta (50 ppm), sulfato de Polimixina B (100 ppm). Fórmula B = fórmula A + Mertiolato (0.05 ppm)

Fórmula C = fórmula B + tirotricina (20 ppm) y Cloromicetina (5 ppm).

Fórmula D = fórmula C + Vancomicina (10 ppm) y Bacitracina (50 ppm).

Se probaron dichas fórmulas con cultivos puros de *P. solanacearum*, con suelos de campo conocidos como naturalmente infestados con *P. solanacearum* y con suelos de infestación desconocida, sin antecedentes de siembras de solanáceas. El suelo se muestreó a 10-30 cm de profundidad, se homogenizó y se suspendió mediante agitación lenta en agua estéril; se probaron diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1 000 g:ml. De estas se esparcieron alícuotas de 1.0, 0.5 y 0.1 ml por plato petri de 9 cm diámetro, con el medio de cultivo solidificado.

D. Predicción del nivel de inóculo en suelos con diferentes labranzas

Para comprobar su eficacia, los métodos seleccionados de las etapas anteriores se pusieron a prueba mediante la evaluación de suelos con nivel de infestación desconocido, pero manejados (labrados) de diferentes maneras, de tal forma que fuera de esperar diferencias microbiológicas entre ellos. Para ese fin se utilizó un terreno sin historial reciente de solanáceas y sometido, durante los tres años y medio anteriores, a los siguientes cuatro diferentes sistemas de labranza, todos dentro del sistema de cultivo maíz-frijol (14):

- a. Suelo preparado en forma tradicional (TA): terreno roturado dos veces al año con arado y desmenuzado con rotavator; los desechos de cada cosecha anual de maíz y frijol, así como las malezas, se arrancaron de raíz y se sacaron del terreno, dejando el suelo limpio.
- b. Cobertura vegetal mezclada con tierra (CMMT); el terreno no se trabajó con implementos; las cañas de maíz de cada cosecha anterior se arrancaron manualmente, se trozaron junto con las malezas y se mezclaron levemente con tierra de la misma parcela, quedando en una proporción de 1:1. Inmediatamente después de cada siembra se aplicó Gramoxone (Paraquat 0.5 kg/ha i.a.).
- c. Mantenimiento de cobertura vegetal de residuos de cosecha sobre el suelo (CMSS); los desechos de maíz y las malezas más sobresalientes se trozaron y se dejaron sobre el suelo. Este tratamiento es similar al anterior, pero no se realizó ninguna mezcla de los residuos de cosecha con suelo; se usó Gramoxone contra las malezas.
- d. Suelo no alterado (CMSR); cada año las cañas de maíz del cultivo anterior quedaron en pie, dobladas a la mitad. Se realizó únicamente el trabajo de

preparación de suelo necesario para la siembra y la fertilización; se aplicó Gramoxone para controlar las malezas.

El ensayo estaba sembrado en un diseño experimental de parcelas divididas con cuatro repeticiones, como parte de un experimento del CATIE a largo plazo (14). Para la presente prueba, se tomaron muestras de suelo a lo largo de una banda central en cada una de las 16 parcelas, a una profundidad de 10-30 cm. De cada parcela se tomaron 16 muestras, que se mezclaron; luego se distribuyó la mayor parte de este suelo en el invernadero en ocho potes de 24 x 20 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*. Estas fueron las dos mejores especies indicadoras en ese orden encontradas en anteriores ensayos de invernadero.

El resto del suelo se utilizó para aislamientos con medios selectivos en el laboratorio, se usaron tres platos petri con medio de la fórmula C por cada una de las 16 muestras de suelo del experimento; la dilución del suelo en agua fue de 1:300 y la alícuota de 0.1 ml.

Para conocer el nivel real de infestación se sembró papa (cv. 'Atzimba') y tomate (cv. 'Tropic') directamente en el campo, y se correlacionaron los datos de predicción en invernadero y laboratorio con los obtenidos en el campo. En éste 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 (PPM).

Resultados y discusión

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

No se observó exudado bacteriano, ni fue posible aislar la bacteria, de ninguna de las 360 plantas examinadas de las malezas *Melampodium perfoliatum*, *Bidens pilosa* y *Galinsoga ciliata*. El terreno muestreado estaba altamente infestado con *P. solanacearum* a juzgar por el alto porcentaje de marchitez en las siembras de papa anteriores y posteriores al muestreo (7); aún así, ni siquiera se presentaron malezas con síntomas de marchitez durante el reconocimiento.

En plantas de *M. perfoliatum* con síntomas externos de marchitez, de un terreno recién arado, así fue posible detectar la bacteria mediante aislamientos en medios de cultivo. Se obtuvo mayor densidad de población bacteriana en el medio cuando se utiliza-

ron plantas, jóvenes o adultas, con síntomas avanzados de marchitez que cuando se utilizaron plantas con síntomas incipientes. Por el contrario, no se obtuvo ninguna colonia en los platos correspondientes a plantas sin síntomas, aún aquellas que crecieron a sólo 5 cm de plantas totalmente marchitas.

M. perfoliatum se ha reportado como hospedante con síntomas de la bacteria, tanto en combinación como en ausencia de cultivos susceptibles, y así se observó durante el transcurso de esta investigación, en diversos 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 (arados o rastreadas). Sin embargo, en los terrenos sin labranza colonizados por esta y otras malezas, al terminar el cultivo de papa, *M. perfoliatum* no mostró marchitez; es difícil que la bacteria pueda haber estado infectando estas plantas sin causar síntomas, puesto que hubiese sido detectada aunque fuera en unas pocas de las plantas examinadas en esta prueba. El hecho de que haya habido gran infestación en ese suelo y, a pesar de ello, no se hayan encontrado malezas marchitas, posiblemente se deba a la no labranza del suelo después de la cosecha de papa; es de esperar que, si estos terrenos hubieran sido rastreados luego de la cosecha, permitiendo la invasión de *M. perfoliatum*, sí se hubiesen encontrado plantas marchitas en el campo (7). Corrobora lo anterior el hecho de que se aisló consistentemente la bacteria de las malezas que invadieron un terreno que fue arado y rastreado, aún cuando tuvo una siembra previa con un cultivo no susceptible (maíz).

Los resultados sugieren que esta raza de *P. solanacearum* es un componente normal de la microflora de estos suelos, persistiendo al menos temporalmente como saprófita o en asociación no patogénica en la rizosfera de especies hospedantes o no hospedantes (13, 17). No está claro por qué sólo infecta al hospedante susceptible tras la labranza del suelo, y no cuando éste se mantiene en barbecho con una población heterogénea de malezas.

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

La siembra de tubérculos de papa (cv. 'Atzimba') resultó el mejor método de invernadero para detectar la presencia de *P. solanacearum* en el suelo. En todas las pruebas la papa tuvo un grado promedio de detección superior al resto de los indicadores utilizados (Cuadros 1 y 2).

Nicotiana glutinosa (Cuadro 2) fue algo menos eficiente en detectar la presencia de la bacteria, además

Cuadro 1. Detección de *P. solanacearum* en invernadero por medio de plantas indicadoras, en muestras de suelo de un terreno con diferentes porcentajes previos de marchitez bacteriana.

| Siembra previa | | Reacción de plantas indicadoras ^b | | | | | |
|----------------|------------------|--|--------------------|--------|------|--------------------|------|
| Cultivar | PPM ^a | Papa | | Tomate | | <i>Melampodium</i> | |
| | | Rep 1 | Rep 2 ^c | Rp 1 | Rp 2 | Rp 1 | Rp 2 |
| 'Atzimba' | 36 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 'Atzimba' | 28 | 1.5 | 2.5 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 'Atzimba' | 43 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 'Atzimba' | 55 | 2.5 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 'Atzimba' | 62 | 1.5 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 'Atzimba' | 46 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| MS 35-22 | 6 | 3.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| MS 35-22 | 10 | 2.5 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 |
| MS 35-22 | 11 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| MS 35-22 | 23 | 2.5 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| MS 35-22 | 24 | 2.0 | 2.5 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| MS 35-22 | 20 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |

a PPM: porcentaje promedio de marchitez en la siembra previa de papa en el campo (7).

b Escala 1 = sin síntomas; 2 = síntomas después de cortar raíces; 3 = síntomas antes de cortar raíces.

c Hecha 3 meses después de la repetición 1, con suelo mantenido bajo cultivo de maíz en el invernadero.

Cuadro 2. Detección de *P. solanacearum* en invernadero por medio de plantas indicadoras, en dos suelos contiguos, con y sin incidencia previa de marchitez bacteriana ("infestado" y "testigo", respectivamente).

| Suelo | PPM ^a | Reacción de plantas indicadoras ^b | | | |
|-----------|------------------|--|----------------------------|-----------|------------------------------|
| | | Papa (de tubérculos) | <i>Nicotiana glutinosa</i> | Berenjena | Papa (de brotes derraigados) |
| Infestado | 59 | 1.8 | 1.4 | 1.5 | 1.0 |
| Testigo | — | 2.4 | 2.0 | 1.0 | 1.0 |

a Porcentaje promedio de marchitez en siembra previa de papa.

b Escala: 1 = sin síntomas; 2 = síntomas después de cortar raíces; 3 = síntomas antes de cortar raíces.

de mostrar ciertas desventajas prácticas (dificultad de germinación y crecimiento lento; sin embargo, en ciertas circunstancias podría ser un indicador útil, si se considera que su semilla se puede guardar en refrigeración por mucho tiempo, ocupa poco espacio y puede ser utilizada en cualquier momento. La berenjena fue aún menos eficiente. Con la maleza susceptible *Melampodium perfoliatum* se obtuvieron síntomas de marchitez en un solo caso, mientras que en tomate nunca se presentaron síntomas (Cuadro 1). Con brotes de tubérculos de papa (Cuadro 2) no se pudo detectar en el invernadero la presencia de la bacteria, debido a que tuvieron un crecimiento pobre al

ser transplantados al suelo en prueba, lo que aparentemente les hizo poco susceptibles a la infección por *P. solanacearum*.

En las verificaciones de ambas repeticiones, con tomate y *M. perfoliatum* en suelos que dieron reacción negativa, sólo se logró detectar la presencia de la bacteria en tres plantas de tomate y en ninguna de *M. perfoliatum*. esto confirmó la ineficacia de ambos como indicadores de invernadero. Además, nunca hubo evidencia de la bacteria en sus heces vasculares (prueba del exudado), por lo que aparentemente ni siquiera hubo penetración en estas plantas.

En cuanto a los niveles de inóculo de los suelos evaluados, los resultados fueron diferentes de lo que se esperaba obtener. Así, en suelo de subparcelas donde hubo 'Atzimba' se esperaba el nivel de inóculo más alto, y por lo tanto un grado mayor de reacción en el invernadero, que en el de las subparcelas de MS 35-22; sin embargo, ocurrió a la inversa (Cuadro 1). Lo anterior podría deberse a que, en las parcelas donde hubo Atzimba, la salida masiva de exudado bacteriano de las plantas hacia el suelo (9, 16) estimuló a organismos antagónicos a *P. solanacearum* a aumentar su población y por ende bajar la de *P. solanacearum* (6). En cambio, donde hubo MS 35-22 la población primaria de *P. solanacearum*, si bien menor, podría haber estado en cierto equilibrio con la flora microbiana y sobrevivir mejor en el suelo (6, 18). Esto en parte fue confirmado por siembras de papa posteriores en las mismas parcelas de campo (7), donde hubo alta incidencia de marchitez bacteriana, pero de nuevo sin correlación con los niveles de incidencia de la siembra anterior al muestreo.

Se trató de determinar si existía asociación entre los datos de invernadero y campo. Se encontró que no existía tal correlación entre los grados obtenidos con papa en el invernadero y los porcentajes promedios de marchitez previos y posteriores (7) al muestreo, en ninguna de las dos repeticiones.

Un resultado similar, más inesperado aún, ocurrió cuando se compararon un suelo con alta infestación natural conocida y ("suelo infectado") y el suelo vecino al anterior, sin siembras recientes de hospedantes susceptibles ("suelo testigo"). El nivel de inóculo detectado por la papa y *N. glutinosa* fue más alto en el segundo caso (Cuadro 2). De nuevo, esto podría obedecer a la acción de un mecanismo de control biológico en el terreno donde recientemente hubo alta incidencia de marchitez bacteriana. Casos similares han sido señalados por Jaworski y Morton en Georgia (8) y Martin *et al.* en el Perú (12).

C. Detección de la bacteria en medios de cultivo selectivos

En una primera prueba se esparcieron en platos petri con medios de las fórmulas A, B y D, alícuotas de 0.5 ml de diluciones 1:100 (g:ml) del suelo "infestado" y del suelo "testigo", descritos en la segunda prueba de detección por plantas indicadoras. Tras 3 días de incubación a 28°C, solamente se reconoció una colonia de *P. solanacearum* en un total de 112 platos; crecieron colonias de muchas otras bacterias no identificadas, con un promedio por plato de 1679 en A, 1306 en B y 870 en D. No hubo crecimiento de hongos en ningún plato. En los platos testigo, donde se esparcieron suspensiones de suelo mezclado con cultivos puros de *P. solanacearum*, las colonias de esta bacteria fueron reconocidas fácilmente, si bien su crecimiento se redujo ligeramente en el medio D. Al cabo de 3 días de incubación las colonias de *P. solanacearum* eran fluidas, color crema, de 2-3 mm de diámetro y pulvinadas.

En la segunda prueba se usó solamente la fórmula C, con muestras de un suelo sin siembras previas de solanáceas, pero tomadas a 2 m de plantas jóvenes de papa que empezaban a mostrar marchitez bacteriana (la que luego alcanzó 100% de incidencia). El suelo se suspendió 1:10 en agua; la suspensión se agitó por 30 minutos y se diluyó 1:100 y 1:1000; se esparcieron alícuotas de 0.1 ml por plato. Esta vez se obtuvieron cinco colonias de *P. solanacearum*, cuatro de ellas a la mayor dilución (Cuadro 3). Su crecimiento fue similar al de cultivos puros estriados en los medios B y C.

Con la dilución 1:100, el número de colonias de otras bacterias fue comparable al obtenido con el medio D en la primera prueba, pero hubo mucha inhibición mutua a dilución 1:10, lo que evidentemente imposibilitó también el desarrollo de *P. solanacearum*.

Cuadro 3. Colonias de *P. solanacearum* y otras bacterias obtenidas con tres diluciones de la suspensión de un suelo altamente infestado, en el medio de cultivo selectivo C.

| Dilución (g:ml) | <i>P. solanacearum</i> | | | Otras bacterias | | |
|-----------------|------------------------|---|---|-----------------|-----|-----|
| | Plato 1 | 2 | 3 | Plato 1 | 2 | 3 |
| | Número de colonias | | | | | |
| 1:10 | 0 | 0 | 0 | 1 590 | 684 | 827 |
| 1:100 | 1 | 0 | 0 | 254 | 239 | 455 |
| 1:1000 | 1 | 2 | 1 | 22 | 40 | 34 |

En vista de estos resultados, que sugieren la presencia en estos suelos de muy altas concentraciones de bacterias que compiten con *P. solanacearum* en el medio selectivo, se decidió utilizar, en adelante, una suspensión de suelo de 1:300 (g:ml) intermedia entre las dos que dieron resultado en la segunda prueba. Si bien esta dilución evidentemente sólo permitiría detectar poblaciones bastante altas de *P. solanacearum* (10^3 células/gramo o más), tales poblaciones no parecen excepcionales, en vista de las frecuentes epifitias severas de marchitez bacteriana en suelos como los estudiados (7, 8, 13).

D. Predicción del nivel de inóculo en suelos con diferentes labranzas

Cuando se compararon los métodos de detección de *P. solanacearum* en suelos sometidos a cuatro diferentes sistemas de labranza por tres años y medio, la papa en invernadero fue la que predijo con mayor

acierto el nivel de inóculo de las 16 parcelas, nivel determinado luego mediante el desarrollo de marchitez en siembras de papa y tomate directamente en el campo. *Nicotiana glutinosa* y los medios selectivos también detectaron la infestación existente, pero no predijeron con tanto acierto el nivel de inóculo. Hubo un mayor nivel de inóculo en el suelo sometido al método tradicional de labranza (TA) que en los otros tres, manejados con labranza reducida, donde el inóculo generalmente disminuyó.

I. Detección a través de plantas indicadoras de invernadero

La papa, utilizada como indicadora de invernadero, encontró diferencias significativas solamente entre TA (promedio 2.29 en la escala de 1 a 3), y CMMT (promedio 1.75) según la prueba de Duncan al 0.05% (Cuadro 4); no hubo diferencias significati-

Cuadro 4. 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.

| Tratamiento | Repetición | Detección por plantas indicadoras | | |
|-------------|------------|--|---------------------|---|
| | | Papa (tubérculos) | <i>N. glutinosa</i> | Porcentaje marchitez en papa, campo (PRM) |
| | | 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 ^{a2} | 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 |

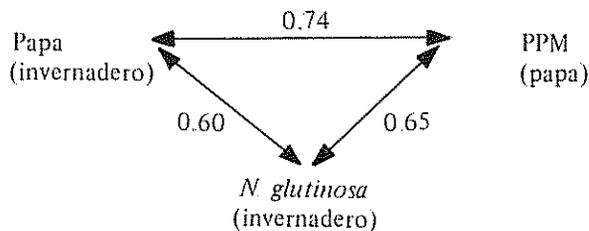
1 Escala: Grado 1 = plantas sanas al llegar a la madurez; Grado 2 = plantas con síntomas de marchitez solo después de cortar raíces; Grado 3 = plantas con síntomas de marchitez aún antes de cortar raíces

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%

vas entre estos y los otros dos tratamientos. A nivel de campo, sin embargo, el tratamiento TA produjo un porcentaje de marchitez (PPM) significativamente superior a los otros tres (Cuadro 4). Es de suponer que en el invernadero no se detectaron el resto de las diferencias entre tratamientos debido a la cantidad limitada de plantas indicadoras utilizadas (seis plantas por repetición por tratamiento).

Cuando se utilizó *Nicotiana glutinosa* como indicador, no se detectaron diferencias significativas al 0.05% entre tratamientos, si bien la tendencia fue similar a la de la papa.

Para determinar si existía asociación entre los valores de campo (PPM) y los datos de invernadero, se calculó el coeficiente de correlación entre los tres parámetros, el cual indicó la siguiente relación:



Esto sugiere la utilidad de la papa como medio para predecir la presencia de la Raza I de *P. solanacearum* en un terreno del que se desea saber si está infestado o no, a pesar del tiempo requerido (cerca de tres semanas). 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 esta bacteria en un suelo, si bien es menos sensible que la papa a la hora de cuantificar el nivel de inóculo.

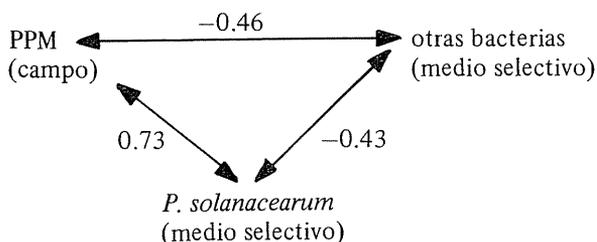
2. Aislamiento en medios selectivos

En este intento de predicción del nivel de inóculo sólo se logró detectar a *P. solanacearum*, mediante cultivo en medios selectivos, en aquellas parcelas que posteriormente mostraron más del 81% de marchitez de plantas de papa en la última semana de evaluación, o un porcentaje promedio de marchitez superior a 38% (Cuadro 5). La fórmula utilizada (C), 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 suspendió 1 g de suelo en 300 ml de estéril y se le agregó 10^3 cel/ml (población estimada) de *P. solanacearum*, se desarrollaron 1 145 colonias por plato

Cuadro 5. Cuantificación de *P. solanacearum* de 16 parcelas de un suelo naturalmente infestado, por un medio selectivo de cultivo.

| Tratamiento | Repetición | Aislamientos de suelo, medio selectivo | | marchitez en papa % | |
|--|------------|--|-----------------------------------|---------------------|-------------|
| | | <i>P. solanacearum</i> Prom. 3 platos | Otras bacterias Prom. 3 platos | PPM | Ult. semana |
| Número promedio de colonias | | | | | |
| TA | I | 13 | 123 | 49.9 | 100.0 |
| | II | 0.3 | 76.7 | 61.3 | 100.0 |
| | III | 1.3 | 27.3 | 77.9 | 100.0 |
| | IV | 1.3 | 53.3 | 68.6 | 100.0 |
| CMMI | I | 0 | 102 | 22.8 | 53.8 |
| | II | 0 | 291.3 | 33.5 | 76.5 |
| | III | 0 | 38 | 21.9 | 45.6 |
| | IV | 0 | 323 | 8.8 | 28.6 |
| CMSS | I | 0 | 180 | 8.6 | 26.7 |
| | II | 0 | 164 | 4.2 | 19.0 |
| | III | 0 | 172.7 | 54.0 | 93.7 |
| | IV | 0.66 | 79 | 38.4 | 81.5 |
| CMSR | I | 0 | 100.7 | 4.5 | 19.5 |
| | II | 0 | 84.3 | 15.6 | 43.0 |
| | III | 0.33 | 27.7 | 54.6 | 100.0 |
| | IV | 0 | 125.3 | 23.6 | 53.1 |
| Suelo (1:300) + <i>P. solanacearum</i> (aprox 10^3) | | 1 145 | 381 | | |

de esta y 381 colonias de otras bacterias (Cuadro 5). Se notó que los platos en donde se detectó *P. solanacearum* tenían en general una población más baja de otras bacterias (72 colonias por plato en promedio), mientras que en platos sin *P. solanacearum* la población de tales bacterias fue generalmente elevada (promedio 140 colonias por plato). Esto pudiera indicar un efecto sobre *Pseudomonas*. Podría entonces ser la baja población de otras bacterias lo que permitió detectar a *Pseudomonas* en parcelas como las de TA. Para verificar lo anterior, se determinaron los coeficientes de correlación entre los siguientes parámetros:



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 medio selectivo, disminuye el número de colonias de *P. solanacearum* y el porcentaje promedio de marchitez en el campo y viceversa. En Japón (18), en Kenia (6) y en Australia (4) 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 microbiana. Todos estos resultados permiten suponer que la posibilidad de detectar la presencia de *P. solanacearum* en medios selectivos de laboratorio depende del efecto que bacterias antagónicas ejerzan sobre su desarrollo en estos medios (6). Aún si el tipo de labranza no influyera directamente sobre *P. solanacearum* pero sí sobre sus organismos antagónicos, a través del incremento en materia orgánica, habría aumentado o no de la población de la primera en la medida que quiebre o se guarde esa relación.

En las muestras donde se detectó la bacteria, su población varió de 2.5 a 5.0×10^4 células por gramo de suelo seco. Esta población resulta elevada si se considera que es natural, no inducida, puesto que se encontró en un terreno donde aún no había indicación alguna de marchitez bacteriana, ni hubo siembras de solanáceas por muchos años. Otros autores (9, 15, 16), han encontrado poblaciones similares

o mayores, pero en suelos directa o indirectamente infestados artificialmente; en suelos naturalmente infestados, Jenkins, Morton y Dukes (9) no lograron detectar a *P. solanacearum*, aún con métodos serológicos muy eficientes. En las tierras altas de Kenia, Harris (6) pudo detectar de 10^3 a 10^4 células/gramo de suelo naturalmente infestado, mediante aislamiento en un medio selectivo. Sin embargo, no se conoce información sobre el nivel de inóculo primario de *P. solanacearum*, Raza 1, en tierras bajas tropicales, por lo que el presente trabajo pareciera ser la primera indicación al respecto.

3. Desarrollo de la enfermedad en el campo

La marchitez bacteriana atacó con severidad la papa sembrada en las parcelas sujetas a labranza tradicional (tratamiento TA), donde se alcanzó el 100% de marchitez entre la quinta y la décima semanas. En contraste, en los suelos con los tres tratamientos de labranza reducida, el desarrollo de la marchitez fue más lento y apenas afectó, en promedio, cerca de la mitad de las plantas (Figura 1). No hubo diferencias entre estos tratamientos pero sí la hubo (al 0.01%) entre ellos y el laboreo tradicional (Cuadro 4).

En las parcelas manejadas con labranza reducida durante más de tres años, el tratamiento sin remoción de las malezas, controladas periódicamente con herbicidas, así como la ausencia de aradas, hicieron que se mantuviera una capa de mantillo sobre el suelo, donde, la elevada actividad biológica presumiblemente redujo las poblaciones de *P. solanacearum*, como lo sugieren los aislamientos en medio selectivo (Cuadro 5) y en concordancia con los resultados de otros autores (4, 6, 18). Probablemente la falta de diferencias significativas entre los PPM de

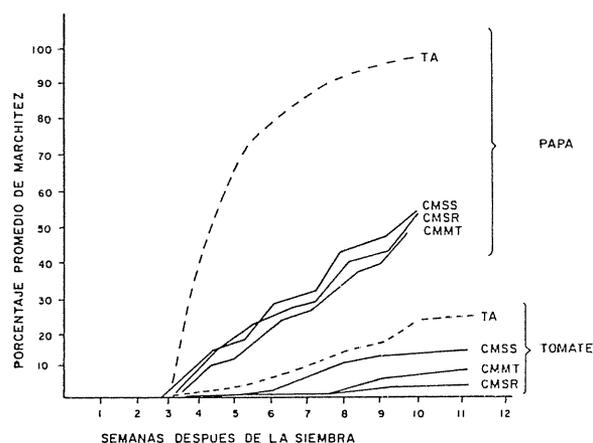


Fig. 1. Determinación del nivel de inóculo primario de *Pseudomonas solanacearum* en suelos con infestación natural.

los tratamientos de labranza reducida se debe, en parte, a una aparente recontaminación de las parcelas ubicadas en un borde del experimento; ahí el drenaje superficial, proveniente de terrenos vecinos arados regularmente, puede haber introducido cantidades importantes de inóculo (Cuadro 4: rep II, trat. CMMT; rep III y IV, trat. CMSS).

Donde el suelo se había arado y rastreado dos veces al año hubo repetidas brotaciones de malezas anuales, que eran controladas manualmente (14); entre ellas predominó *M. perfoliatum*, especie de la que algunas plantas jóvenes se marchitaron; no se llegó nunca, entonces, a la invasión y desarrollo sucesivo de una población diversa y estable de malezas, de manera que no se pudo verificar si se hubiera repetido aquí la situación descrita en el terreno donde se buscó sin éxito la bacteria en malezas sin síntomas. Es aparente que son las malezas jóvenes, que invaden los terrenos recién arados, las que al infectarse incrementan el inóculo de *P. solanacearum* en el suelo; en esta etapa, *M. perfoliatum* podría constituir un indicador de campo de la presencia de la bacteria, aunque sólo sea transitoriamente.

El tomate fue también afectado por marchitez bacteriana, pero más tarde y en menor grado que la papa (Figura 1); además, no indicó diferencias significativas al 0.05% entre tratamientos, si bien mostró correlación con la severidad de marchitez en papa. En una parcela TA el 76% del tomate se marchitó al cabo de 12 semanas; casos similares han ocurrido en terrenos vecinos. El nivel consistentemente bajo de marchitez en tomate en los suelos con labranza reducida (promedio 8.7% a las 12 semanas, nunca mayor de 28%) sugiere que este método de manejo podría ser una alternativa viable para el control de la marchitez bacteriana en suelos de regiones cálidas tropicales infestadas con la Raza I de *P. solanacearum*.

Resumen

Se evaluaron varios métodos de detectar el inóculo residual de *Pseudomonas solanacearum*, Raza I, en inceptisoles de Turrialba, Costa Rica, donde dicha bacteria es aparentemente endémica. El más eficaz cualitativamente fue la siembra de tubérculos sanos de papa en muestras de suelo llevadas al invernadero, utilizándose la marchitez como indicador de la bacteria; sin embargo, no fue posible cuantificar con exactitud el nivel de inóculo primario en varios suelos. Un medio de cultivo selectivo, conteniendo cloruro de tetrazolio más antibióticos, permitió detectar *P. solanacearum* a concentraciones de cerca de 25 000 células/gramo de suelo seco, si bien en

muchas muestras predominaron diversas bacterias antagonicas que inhibieron totalmente a *P. solanacearum*.

En muestras de suelos sometidas por casi cuatro años a tres sistemas de mínimo laboreo se detectaron, por ambos métodos, poblaciones menores de *P. solanacearum* que en las de suelos sometidas al laboreo mecánico tradicional. Esto se confirmó mediante siembra de papa y tomate directamente en el campo, determinándose contrastes significativos en el porcentaje de marchitez bacteriana obtenido. La disminución de la bacteria en suelos con mínimo laboreo se atribuyó al incremento en la materia orgánica y, por ende, en microorganismos antagonistas.

Literatura citada

1. 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*, Raleigh, 1976. Proceedings. L. Sequeira and A. Kelman eds. Raleigh, North Carolina State University, 1976. pp. 73-74.
2. 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.
3. GONZALEZ, L. C., CHINCHILLA, C. M. y GONZALEZ, C. Persistencia de *Pseudomonas solanacearum* en el suelo y susceptibilidad de tres clones de papa en la zona de Alajuela. In Anales del III Congreso Agronómico Nacional, San José, Costa Rica, 3-7 julio 1978. pp. 141-142.
4. GRAHAM, J. 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.
5. GRANADA, G. y SEQUEIRA, L. A selective medium for *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 71(2):220. 1981.

6. HARRIS, D. C. 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*, Raleigh, 1976. Proceedings. L. Sequeira and A. Kelman, eds. Raleigh, North Carolina State University, 1976. pp. 148-150.
7. JACKSON, M. T. y GONZALEZ, L. C. Persistence of *Pseudomonas solanacearum* (Race I) in a naturally infested soil in Costa Rica. *Phytopathology* 71(7):690-693. 1981.
8. JAWORSKI, C. A. y MORTON, D. J. An epiphytotic of *Pseudomonas solanacearum* in tomatoes in newly-cleared Klej sand in relation to potassium, calcium and magnesium levels. *Plant Disease Reporter* 48:88-89. 1964.
9. JENKINS, S. F., 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.
10. KELMAN, A. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. A literature review and bibliography. North Carolina Agricultural Experiment Station. Bulletin 99, 1953. 194 p.
11. KELMAN, A. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44(12):693-695. 1954.
12. MARTIN, C., FRENCH, E. R. y NYDEGGER, U. Bacterial wilt of potatoes in the Amazon basin. *Plant Disease* 65(3):246-248. 1981.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. RAMOS, A. H. Comparison of survival of two *Pseudomonas solanacearum* strains in soil columns under constant perfusion and in field plots devoid of host cover. In: International Planning Conference and Workshop on the Ecology and Control of Bacterial Wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*, Raleigh, 1976. Proceedings. L. Sequeira and A. Kelman, eds. Raleigh, North Carolina State University, 1976. pp. 123-127.
17. SMITH, T. E. y GODFREY, R. K. Field survey of the relation of susceptible weeds to Granville wilt control. *Phytopathology* 29:22. 1939.
18. TANAKA, Y. Factors affecting survival of *Pseudomonas solanacearum*. In International Planning Conference and Workshop on the Ecology and Control of Bacterial Wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*, Raleigh 1976. Proceedings. L. Sequeira and A. Kelman, eds. Raleigh, North Carolina State University, 1976. p. 122.

Reseña de libros

FRISSEL, M. J. y J. A. VAN VEEN (eds) 1981.

Simulation of nitrogen behaviour of soil-plant systems. Centre for Agricultural - Publishing and Documentation, Wageningen. 277 p.

El nitrógeno es el nutriente que más limita, con excepción del agua, la producción de los cultivos en la mayoría de los suelos del mundo. Así para aumentar la producción agrícola en los próximos 20 años no sólo se debe aumentar la utilización de fertilizantes nitrogenados sino también, por razones de poca disponibilidad y alto precio, la eficiencia de su utilización por los cultivos. Para lograr este objetivo es necesario comprender con mayor profundidad la dinámica del nitrógeno en el suelo sobre todo en lo relativo a su disponibilidad y absorción por las plantas así como los procesos que conducen a la pérdida del mismo (nitrificación, desnitrificación, volatilización de NH_3).

Desgraciadamente la falta de información experimental sobre estos procesos impide la postulación de generalizaciones válidas que permitan predecir el comportamiento del nitrógeno en el suelo bajo la influencia de un número de factores ambientales dados. Sin embargo, con la información ya disponible es posible desarrollar modelos matemáticos que permitan un acercamiento al problema. Este fue el motivo de la reunión de trabajo del panel de expertos que se llevó a cabo en Wageningen a principios de 1980 y cuyas ponencias, discusiones y conclusiones recoge esta pu-

blicación. La reunión puso en relieve las grandes dificultades teóricas y prácticas en el campo.

La ventaja de los modelos es el de dar un asidero conceptual sobre cada proceso en particular, en tal forma que se puede comprender las posibles relaciones, causa-efecto de importancia.

En el desarrollo de un modelo se define muy bien los parámetros, así como su mutua interrelación. Desgraciadamente a veces la importancia relativa de cada factor es muy arbitraria y depende del criterio del autor; peor aún, raras veces este énfasis es verificable experimentalmente. Este es el mayor defecto de los modelos presentados, aparte de algunos errores de enfoque pues por ejemplo, para un modelo de desnitrificación de suelos bien estructurados se deja por fuera el papel de la rizosfera.

La gran contribución de esta publicación es precisamente poner en evidencia la enorme brecha de información que existe entre los modelos conceptuales y la información experimental disponible sobre los principales fenómenos responsables de los cambios del nitrógeno del suelo, al mismo tiempo señala aquellas áreas que necesitan atención experimental urgente.

De esta manera se aportan nuevas ideas que dan luz al camino a seguir en las investigaciones relacionadas con el nitrógeno del suelo.

Se recomienda este libro para todos aquellos investigadores dedicados al estudio del nitrógeno en el suelo, así como también para los agrónomos interesados en el tema.

CARLOS RAMIREZ
FAC AGRONOMIA
UNIV COSTA RICA
SAN JOSE, COSTA RICA