

Tizón foliar de la teca en vivero causada por *Ralstonia solanacearum* Biovar 4 en Tabasco, México

Leaf blight of the teak in nursery caused by *Ralstonia solanacearum* Biovar 4 in Tabasco, Mexico

Silvia Edith García Díaz,¹ Omar Alejandro Pérez Vera,²
Oscar Hernández Colula,¹ Leopold Fucikovsky-Zak †,³ José Tulio Méndez Montiel¹

García Díaz, S.E.; Pérez Vera, O.A.; Hernández Colula, O.; Fucikovsky-Zak, L.; Méndez Montiel, J.T., Tizón foliar de la teca en vivero causada por *Ralstonia solanacearum* Biovar 4 en Tabasco, México. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 57, 5-10, 2013.

RESUMEN

La teca (*Tectona grandis*) se utiliza en plantaciones comerciales por su rápido crecimiento y la alta calidad de su madera. En Huimanguillo, Tabasco, México, en 2009, se detectó una enfermedad en plantas de teca que provocó daños estimados de 30% de los viveros con dicha especie. Los síntomas característicos de esta enfermedad son marchitez y atizonamiento del follaje. De hojas se aisló una bacteria, se purificó y se inoculó en la planta de teca de cinco meses de edad; hubo marchitez, necrosis en follaje en 50% de la lámina foliar, necrosis en tallo y muerte de la planta. De acuerdo con la identificación morfológica, fisiológica, bioquímica y molecular, se determinó que el agente causal de dicha enfermedad es *Ralstonia solanacearum* biovar 4.

ABSTRACT

Teak (*Tectona grandis*) has been used for commercial plantations in Mexico due to its

Palabras clave: bacteria, biovar, PCR, pruebas de patogenicidad, *Tectona grandis*, vivero.

Keywords: bacteria, biovar, PCR, pathogenicity tests, *Tectona grandis*, nursery.

Recibido: 2 de Julio de 2012, aceptado: 29 de Noviembre de 2012

¹ División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Chapingo.

² División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Chapingo, oalejandroversa11@gmail.com.

³ Instituto de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados.

fast growth and high wood quality. In 2009 Teak plantations in Huimanguillo (State of Tabasco) showed a new disease affecting 30 % of planted trees. Main symptoms included wilting and leaf blight. A bacterial strain was isolated from leaves. It is inoculated in seedlings teak of five months with the bacterial strain. The inoculated seedlings developed wilting, necrosis in the leaf surface, stem and plant death. Morphological, physiological, biochemical and molecular studies made on the bacterial strain led to its identification as *Ralstonia solanacearum* biovar 4.

INTRODUCCIÓN

La teca (*Tectona grandis* L. f.) es la especie forestal más utilizada en zonas tropicales para plantaciones forestales comerciales en México, por su rápido crecimiento, la alta calidad de la madera y su resistencia al ataque de hongos e insectos (Chávez y Fonseca, 1991). En 2007, se destinó a la teca una superficie de 34,700 ha, distribuida en los estados de Campeche, Chiapas, Nayarit, Tabasco y Veracruz (CONAFOR, 2010), con un continuo crecimiento cada año. Los patógenos que causan daño en la teca se han reportado en la India, el Lejano Oriente, África y en plantaciones de América (Weaver, 1993). Arguedas (2007 a, b) y Flores *et al.* (2010) mencionan que los patógenos de la teca reportados en América central afectan diferentes partes del árbol. En brotes jóvenes y follaje se han detectado a *Cercospora rangita*, *Cochliobolus* sp., *Nigrospora* sp., *Olivea tectonae*, *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp., y *Pseudoepicocum* sp. A nivel de tallo, se encuentran a *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwi-*

nia sp., *Botryodiplodia* sp., *Botryosphaeria* sp., *Ceratocystis* sp., *Corticium salmonicolor*, *Dothiorella* sp., *Fusarium* sp., *Macrophomina* sp., *Nectria nauritiicola* y *Phomopsis* sp. En raíces se reportan a *Cylindrocladium* sp., *Dematophora* sp., *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* spp. y *Phytophthora* spp. Los daños que ocasionan en México estos patógenos en las diferentes etapas de desarrollo de la planta no se conocen, por ser la teca una especie recién introducida. En el sur del país, en la parte tropical, se presentó una enfermedad en plantas de teca de ocho meses de edad que causó marchitamiento y necrosamiento del follaje, lo que ocasionó una pérdida de 30 a 50% de la producción en vivero, (comunicación personal, Leopold Fucikvosky Zak, 2011). Un daño similar se asoció en Costa Rica con la bacteria del género *Ralstonia*, en plantas jóvenes de teca (Arguedas, 2007a). Para México se reporta la bacteria en clones de *Eucalyptus urophylla*, en viveros forestales de Tabasco (Méndez *et al.*, 2010). El género *Ralstonia* comprende varias especies de importancia agrícola que causan la marchitez de las solanáceas, en regiones tropicales, subtropicales y cálidas (Rodríguez, 2010). Por ser la teca una especie utilizada en plantaciones comerciales en nuestro país y no se ha reconocido al patógeno que causa dicha marchitez, el presente trabajo tiene como objetivo identificar el agente causal del tizón foliar de la teca en vivero, en Huimanguillo, Tabasco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta y aislamiento de la bacteria

Se muestrearon plantas de teca en camas de crecimiento y se seleccionaron aquellas que manifestaron marchitez y atizonamiento en follaje. Se realizaron cortes de tejido enfermo y se desinfectaron con hipoclorito de sodio a 2%, mismas que fueron colocadas en tubos de ensaye con 10 ml de agua estéril y se sembraron por estría cruzada en medio PDA y B de King (BK), las cuales se incubaron a 28 °C durante 48 h. Las colonias de bacterias se purificaron y se conservaron en tubos de ensaye con agua a 4 °C.

Caracterización e identificación del patógeno

La bacteria se identificó por sus características morfológicas, así como por pruebas fisiológicas y bioquímicas, de acuerdo con el protocolo de Schaad *et al.* (2001) y Rodríguez (2006). El biovar se deter-

minó con base en la producción de ácidos a partir de los disacáridos, como lactosa, maltosa y D (+) celobiosa, y la oxidación de los alcoholes, como manitol, sorbitol y dulcitol.

Pruebas de patogenicidad

Se utilizó una colonia bacteriana de 48 h de crecimiento que se inoculó por el método de punción. Éste consistió en tomar, con un palillo de madera estéril (50 x 5 mm) masa bacteriana e insertarla en la axila de la hoja en 10 plantas de teca con cinco meses de edad. Se dejaron dos plantas como testigos que se trataron de la misma forma, pero usando agua destilada estéril. Todas las plantas inoculadas se mantuvieron en cámara húmeda durante 24 h (90 HR y 26 °C), y luego se transfirieron a un invernadero. Se realizaron observaciones diariamente por un período de 70 d.

Análisis mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El ADN se extrajo con el protocolo AP (Sambrook y Russell, 2001) de la cepa bacteriana (TG1) de 48 h de crecimiento aislada de hoja. La calidad se evaluó en un gel de agarosa a 1% (Promega, EUA) y se cuantificó con un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo scientific). La amplificación de la reacción del ADN se preparó con un volumen final de 25 mL que contenía 1X Taq buffer ADN polimerasa, 200 mM dNTPs, 10 ng ADN, 0.2 mM de cada iniciador (FD1/5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3' y RD1/5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'), 1.5 mM MgCl₂ y 2U Go Taq polimerasa ADN (Promega, EUA). La amplificación se llevó a cabo con una desnaturalización inicial a 97 °C por 3 min., seguido por 30 ciclos de desnaturalización con 94 °C durante 1 min., 55 °C por 30 seg. y 72 °C por 1 min. Finalmente; un ciclo de extensión final de 72 °C durante 7 min. (Rodríguez *et al.*, 2003). Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Multigene Gradient (Mod. TC9600-9); los productos de PCR de bacterias se verificaron por electroforesis en gel de agarosa a 1% y se tiñeron con bromuro de etidio; la banda se visualizó en un sistema de fotodocumentación (Gel Logic 200, Kodak). El producto tuvo una secuencia en ambas direcciones y se envió a Macrogen (Gasan-dong, Seoul, Korea). Éstas se compararon con las reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nih.gov).

RESULTADOS

Síntomas, aislamiento e identificación

Los síntomas observados en el vivero fueron un marchitamiento con un cambio de coloración de verde amarillento a amarillento en el follaje; con presencia de manchas café claro que coalescen, mismas que se tornaron de color café marrón provocando la caída de hojas (figura 1a). En el tallo hubo desprendimiento de la corteza, con presencia de lesiones hundidas, húmedas y de color café claro a oscuro. Además, se observó pérdida de turgencia en los tejidos, probablemente por los polisacáridos producidos por la bacteria que provocan el bloqueo del transporte del agua y causan una decoloración del xilema. En las muestras colectadas de follaje se obtuvieron, en forma persistente, colonias de bacterias blanco fluida con ligera elevación y contorno entero al principio y después desliziándose. La bacteria creció a 28 °C en medio BK y más lentamente en medio PDA. Además, esta bacteria es positiva en la reacción de hipersensibilidad en tabaco, negativa en la tinción de Gram y fluorescente en BK y produce inclusiones de beta-hidroxibutirato, es oxidasa positiva, reduce nitratos a nitritos; y es negativa para dihidrolasa de arginina. Con base en la morfología, fisiología y características bioquímicas, el aislamiento fue identificado como *Ralstonia solanacearum*.

nacearum. Esta bacteria no produjo ácido a partir de lactosa, maltosa y celobiosa y sí utilizó manitol, sorbitol y dulcitol, con lo cual se determinó que pertenece al biovar 4 (tabla 1).

Pruebas de patogenicidad

Las plantas de teca inoculadas con la bacteria, mostraron síntomas similares a los observados en el vivero. Los síntomas de marchitamiento iniciaron a los cinco días después de la inoculación (ddi) y presentaron un amarillamiento en el margen y parte apical de la hoja con manchas pequeñas de color marrón claro a los ocho ddi. Estas lesiones coalescieron, se tornaron necróticas y cubrieron 50% de la lámina foliar a los 20 ddi (Figura 1b). A los 38 ddi hubo caída de hojas y necrosis del tallo y la muerte de la planta a los 70 ddi. En tanto, las plantas inoculadas con agua destilada (testigo) se mantuvieron sanas. Para completar los postulados de Koch se realizaron aislamientos de la zona infectada, y se obtuvieron colonias bacterianas de las mismas características que la inoculada inicialmente.

Análisis mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La cepa TG1 tuvo un fragmento de aproximadamente 1,600 pb (pares de bases) cuando se amplificó por PCR con los iniciadores universales

Tabla 1. Características fisiológicas y bioquímicas de *Ralstonia solanacearum* aislada de hojas de teca (*Tectona grandis*) procedente de Tabasco, México

Prueba	TG1	Schaad <i>et al.</i> (2001)
Hipersensibilidad en tabaco	+	NR
Oxidasa	+	+
Tinción de Gram	-	-
Crecimiento a 41 °C	-	-
Reducción de NO ₃ a NO ₂	+	+
Gránulos de poli-β-Hidroxybutirato	+	+
Tolerante a NaCl a 2%	-	-
Hidrolasa de arginina	-	-
Hidrólisis de almidón	-	-
Licuefacción de gelatina	-	-
Oxidación de:		
Lactosa	-	-
Maltosa	-	-
D (+) celobiosa	-	-
Utilización de:		
Manitol	+	+
Sorbitol	+	+
Dulcitol	+	+

TG1: Cepa bacteriana de *Ralstonia solanacearum*; + = reacción positiva, - = reacción negativa, NR = no reporta.

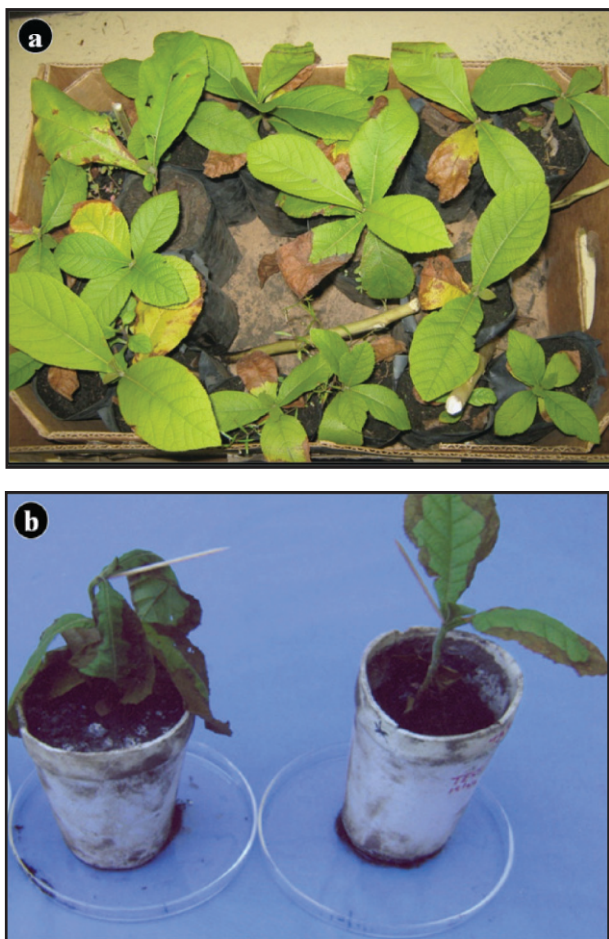


Figura 1. Plantas de teca (*Tectona grandis*) de vivero y pruebas de patogenicidad. a) Plantas con tizón foliar a nivel de vivero. b) Plantas inoculadas por punción con presencia de marchitamiento y necrosis en el margen de la lámina foliar.

FD1 y RD1. La secuencia de TG1 de *Ralstonia solanacearum* (número de acceso en el GenBank JN585828) se alineó con secuencias de esta misma especie, depositadas en el Banco de Genes del NCBI, con una similaridad de 100%.

DISCUSIÓN

En este estudio se reporta por primera vez el tizón foliar en plantas jóvenes de teca en Tabasco. La cepa se identificó como *Ralstonia solanacearum*, coincidiendo con lo reportado por Gómez (2005); Schaad *et al.* (2001) y Rodríguez (2010), quienes la identifican con base en las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Se observó que *R. solanacearum* no utilizó lactosa, maltosa y celobiosa, pero si manitol, sorbitol y

dulcitol, con lo cual se determinó que pertenece al biovar 4 coincidiendo con Schaad *et al.* (2001), quienes utilizaron estas fuentes de carbono para separar biovars. Este biovar ha sido reportado en un amplio rango de hospedantes de importancia agrícola en Asia (Schaad *et al.*, 2001; Allen *et al.*, 2005). Se confirmó la identidad de la bacteria por la caracterización molecular con la técnica de PCR con los oligonucleótidos universales FD1 y RD1, que amplifican el gen ADNr 16s (Rodríguez *et al.*, 2003). Además, se han reportado los oligonucleótidos 759/780 que amplifican el gen *lpxC* (Perea *et al.*, 2011), y OLI1/Y2, que amplían parte del 16S ADNr (Seal *et al.*, 1999) para la identificación de esta bacteria. Fouché *et al.* (2006) mencionan la PCR-RFLP para la identificación de *R. solanacearum* biovar 3 que causa marchitamientos vasculares en *E. grandis* x *E. camaldulensi* en Sudáfrica y Uganda. Además, existen otros métodos, como Rep-PCR, RAPD, AFLP y SDS-PAGE para la identificación de variabilidad genética de *R. solanacearum* (Chavarro y Ángel, 2006). Recientemente, el género *Ralstonia* se clasificó en el grupo II de homología de ARNr, donde reubicaron a *R. solanacearum*, *R. pickettii* y *R. eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*), y las *Pseudomonas* fluorescentes se ubicaron en el grupo I de homología de ARNr de homología de ARNr con base en secuencias de nucleótidos del gen 16S ARNr, hibridación de ARNr-DNA y lípidos celulares (Yabuuchi *et al.*, 1995; Schaad *et al.*, 2001).

Las pruebas de patogenicidad en plantas de tabaco y teca, evidenciaron la patogenicidad de la bacteria, cumpliéndose los postulados de Koch. En tabaco la reacción de hipersensibilidad fue positiva coincidiendo con lo reportado por Coutinho *et al.* (2000), quienes reportan síntomas de necrosis en hoja y marchitamiento de la planta a los tres ddi con *R. solanacearum*. En teca hubo síntomas de marchitamiento vascular, presencia de manchas necróticas a los ocho ddi, que coalescieron y provocaron la caída de hojas y muerte de la planta a los 70 ddi. Síntomas similares fueron observados por Weaver (1993) en vivero y plantaciones jóvenes de *Tectona grandis* en India, Indonesia, Malasia y Sumatra. En *Eucalyptus* sp. se ha reportado el biovar 1 y 3 (Coutinho *et al.*, 2000; Alfenas *et al.*, 2006; Fouché *et al.*, 2006). El biovar 3, induce síntomas de marchitamiento a los tres ddi y muerte de la planta a los 14 ddi en plantas en clones de *Eucalyptus grandis* x *E. camaldulensi* (Coutinho *et al.*, 2000).

CONCLUSIONES

La bacteria causante del tizón foliar en teca, se identificó como *Ralstonia solanacearum* de acuerdo con las pruebas fisiológicas, bioquímicas y moleculares. De acuerdo con la utilización de diferentes fuentes de carbono, la cepa estudiada pertenece al biovar 4. La *R. solanacearum* fue patogénica en plantas de tabaco y teca. Este es el primer reporte de esta enfermedad en viveros forestales de teca en México.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la empresa MADPREVER S.A. de C. V. y al M. C. Javier Arcos Roa, por su disponibilidad y apoyo. Para ello se contó con recursos económicos provenientes del proyecto del Fondo Sectorial para la Investigación y Desarrollo y la Innovación Tecnológica Forestal, CONAFOR-CONACYT 148206, "Diagnóstico y alternativas para la prevención, control y manejo de diversas plagas y enfermedades que afectan las plantaciones forestales comerciales".

LITERATURA CITADA

- ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G.; SARTÓRIO, R.C.; BINOTI, D.H.B.; SILVA, R.R.; LAU, D.; VANETTI, C.A., *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 31: 357-366, 2006.
- ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A.C., *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 510 p., 2005.
- CHÁVES, E.; FONSECA, W., *Teca (Tectona grandis) especie de árbol de uso múltiple en América Central*. Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 54 p., 1991.
- COUTINHO, T.A.; ROUX, J.; RIEDEL, K.H.; TERBLANCHE, J.; WINGFIELD, M.J., First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on eucalypts in South Africa. *Forest Pathology*, 30: 205-210, 2000.
- FOUCHE, W.J.; POUSSIER, S.; TRIGALET, D.D.; BERGER, D.; COUTINHO, T.A., Molecular identification of some African strains of *Ralstonia solanacearum* from eucalypt and potato. *Journal of General Plant Pathology*, 72: 369-373, 2006.
- MÉNDEZ, M.J.T.; GARCÍA, D.S.E.; DON JUAN M.B.; ÁNGEL, A.L., *Diagnóstico fitosanitario en plantaciones forestales comerciales en las Choapas, Veracruz y Huimanguillo, Tabasco*. Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) y Universidad Autónoma Chapingo (UACH), México, 97 p., 2010.
- PEREA, S.J.M.; GARCÍA, E.R.S.; ALLENDE, M.R.; CARRILLO, F.J.A.; LEÓN, F. J.; VALDEZ, T.B.; LÓPEZ, S.F.S.M., Identificación de Razas y Biovars de *Ralstonia solanacearum* Aisladas de Plantas de Tomate. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 29: 98-108, 2011.
- RODRÍGUES, J.L.M.; GÓMES, J.E.; LÓPEZ, J.R.S.; TSAI, S.M., Detection and diversity assessment of *Xylella fastidiosa* in field-collected plant and insect samples by using 16S rRNA and gyrB sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 4249-4255, 2003.
- RODRÍGUEZ M.M.L., *Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas*. México: Universidad Autónoma Chapingo (Parasitología Agrícola), 146 p., 2006.
- RODRÍGUEZ, M.M.L., *Enfermedades bacterianas en hortalizas*. México: Universidad Autónoma Chapingo, 2010.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W., *Molecular cloning. A laboratory manual*. USA; third edition. 1:1.32-1.34. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001.
- SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W., *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria* 3rd edition. USA: The American Phytopathological Society, 373 p., 2001.
- SEAL, S.; TAGHAVI, M.; FEGAN, N.; HAYWARD, A.; FEGAN, M., Determination of *Ralstonia solanacearum* rDNA subgroups by PCR test. *Plant Pathology*, 48: 115-120, 1999.
- WEAVER, P.L., *Tectona grandis L.f. Teak*. SO-ITF-SM-64. USA: Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, 18 p., 1993.
- YABUUCHI, E.; YANO, I.; HOTTA, H.; HISHIUCHI, Y., Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Pleroni and Douderoff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiology and Immunology*, 39: 897-904, 1995.

Dictiotipografía

- ARGUEDAS, M., Clasificación de síntomas de enfermedades forestales. Primera parte. *Kúru: Revista Forestal (Costa Rica)*, 5: 1-6, 2007a. Disponible en: www.tec.cr/sitios/Docencia/forestal/Revista_Kuru/antiores/antrior15/pdf/solucion%206.pdf.
- ARGUEDAS, M., Plagas y enfermedades forestales en Costa Rica. *Kúru: Revista Forestal (Costa Rica)*, 4: 1-77, 2007b. Disponible en: www.tec.cr/sitios/Docencia/forestal/Revista_Kuru/antiores/antrior11/pdf/Arguedas%2012%20ago%2008.pdf.
- CHAVARRO, M.E.; ÁNGEL, D.J.E., Establecimiento de un sistema diagnóstico para la detección de *Ralstonia solanacearum* y diferenciación genética utilizando marcadores moleculares RAPD. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 8 (1): 14-31, 2006. Disponible en: www.dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2351474.
- CONAFOR. Programa ProÁrbol. Zapopan, Jalisco, México. 2010. Disponible en: www.conafor.gob.mx.
- FLORES, V.T.; CRESPO, G.R.; CABEZAS, G.F., Plagas y enfermedades (*Tectona grandis* L.f.) en la zona de Balzar, provincia del Guayas. *Ciencia y Tecnología*, 3: 15-22, 2010. Disponible en: www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C1_3n12010.pdf.
- GÓMEZ, C.A.E., ÁLVAREZ, E.; LLANO, G., Identificación y caracterización de cepas de *Ralstonia solanacearum* raza 2, agente causante del moko de plátano en Colombia. *Fitopatología Colombiana*, 28 (2): 71-75. 2005. Disponible en: www.ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos_ciat/cepas_ralstonia_moko%20_2.pdf.