

Actividad del metam sodio sobre aislamientos de *Ralstonia solanacearum* raza 2, agente causal de Moko en musáceas

Fabiola Alfaro¹; Marylin Sánchez¹; Claudiana Carr^{2*}; Julian Picado²; Juan Delgado³; Ana Tapia⁴; Mario Araya⁵

¹Mycelium Crop Science, ²AMVAC-Costa Rica, ³LIFE-RID AMVAC Costa Rica, ⁴Profesora de Fitopatología jubilada de la Universidad de Costa Rica, ⁵AMVAC Chemical Corporation.

***Autor de**

Correspondencia:

Claudiana Carr
claudianac@amvac.com

Contribución:

Tecnológica

Sección:

Fitosanidad

Recibido:

15 Diciembre, 2023

Aceptado:

15 Enero, 2024

Publicado:

16 Abril, 2024

Cita:

Alfaro F, Sánchez M, Carr C, Picado J, Delgado J, Tapia y Araya M. 2024.

Actividad del metam sodio sobre aislamientos de

Ralstonia solanacearum

raza 2, agente causal de

Moko en musáceas.

Acorbat Revista de

Tecnología y Ciencia 1(1):

57

<https://doi.org/10.62498/AR>

TC.2457

RESUMEN

En condiciones controladas se evaluó el metam sodio (Vapam® 51 GE-AMVAC) en el control de cuatro aislamientos de *Ralstonia solanacearum* (Filotipo II, Secuevar 6), provenientes de fincas comerciales de banano (*Musa* AAA) en Costa Rica con presencia de Moko. Tubos de ensayo se llenaron con suelo estéril, se inocularon con 500 µL de cada aislamiento a una concentración de 1×10^9 UFC mL⁻¹ y se incubaron por 96 horas a 27°C en oscuridad. Según el tratamiento, a cada tubo se le aplicó una solución de metam sodio a 3000, 5000, 7000 o 10000 mg L⁻¹ más un testigo sin inocular y otro inoculado, se incubaron por 8 días a 27°C en oscuridad. Seis tratamientos con 8 repeticiones se evaluaron en un diseño experimental completamente al azar. Diluciones seriadas, del suelo contenido en los tubos se sembraron en medio de cultivo TZC y se incubaron por 5 días a 27°C en oscuridad. Los resultados mostraron que el metam sodio controló la bacteria a todas las concentraciones evaluadas, inhibiendo el 100% del crecimiento de la bacteria, indistintamente del aislamiento evaluado. En condiciones de campo se sugiere continuar con lo propuesto por la Comisión Nacional de Enfermedades en las Musáceas de Costa Rica de 5000 mg L⁻¹ metam sodio®.

Palabras clave: fumigación, metam sodio, Moko, *Musa* AAA, Fitosanidad.

ABSTRACT

Under controlled conditions it was evaluated the metam sodium (Vapam® 51 GE-AMVAC) on the control of four isolates of *Ralstonia solanacearum* (Phylotype II, Secuevar 6) from commercial banana (*Musa* AAA) farms in Costa Rica with the presence of Moko. Test tubes were filled with 10 g of sterilized soil, inoculated with 500 µL of each isolate at a concentration of 1×10^9 CFU mL⁻¹ and incubated for 96 hours at 27°C in the dark. According to the treatment, each tube was applied with 1 ml of a metam sodium solution at 3000; 5000; 7000 and 10000 mg L⁻¹ plus an uninoculated control and another inoculated one and incubated for 8 days at 27 °C at dark. Six treatments with 8 repetitions were evaluated in a completely randomized design. Serial dilutions from the soil contained in the bubs were sown in TZC culture medium and incubated for 5 days at 27 °C at dark. The results showed that the metam sodio controlled since 3000 mg L⁻¹, inhibiting 100% the growth of the bacteria, regardless of the isolation



evaluated. Under field conditions, it is suggested to continue with what is proposed by the National Commission for Musaceae Diseases of 5000 ppm of metam sodium

Keywords: control, metam sodio, Moko, *Musa* AAA, Vapam, phytosanity.

INTRODUCCIÓN

Ralstonia solanacearum es considerada una de las bacterias fitopatógenas más importantes del mundo ya que puede afectar a más de 200 especies de plantas, tiene amplia distribución geográfica y hospederos alternos (Álvarez *et al.*, 2015; Blomme *et al.*, 2017). Específicamente, *Ralstonia solanacearum* raza 2, es el agente causal del marchitamiento bacteriano del banano y plátano, conocido como Moko y considerado uno de los problemas fitosanitarios de mayor importancia que afectan a las musáceas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Dicho patógeno afecta todos los estados de desarrollo de la planta, posee rápida diseminación, alta variabilidad genética y es una enfermedad que incide directamente en la producción, lo que puede provocar disminución de divisas por concepto de exportación, así como disminución de fuentes de empleo y suministro de alimento en lugares donde las musáceas son la base de la alimentación (Belalcázar, 2003; Blomme *et al.*, 2017; Eden-Green, 2019). En Colombia, en Caquetá durante la década del 70 y 80 Moko llegó a afectar hasta un 100% de un total de 20000 ha del cultivo (Belalcázar, 2003).

La presencia de la bacteria provoca síntomas de marchitamiento vascular, la hoja candela detiene su crecimiento e induce un necrosamiento de la misma, las hojas 1-3 se quiebran en el primer tercio y se observa un amarillamiento generalizado que va desde hojas nuevas a viejas, los tejidos y pudriciones no emiten mal olor y la planta llega a morir. A simple vista se pueden observar haces vasculares decolorados en pseudotallo, pseudopeciolo, cormo y raquis; en los frutos se presenta un agrietamiento y pudrición seca (Eden-Green, 2019).

La enfermedad se disemina rápidamente en la plantación por medio de herramientas contaminadas, maquinaria, agua, suelo, material vegetativo e insectos (Blomme *et al.*, 2017; Eden-Green, 2019; Guzmán *et al.*, 2019). Una vez que la enfermedad llega a la plantación es imposible su control por lo que se recurre al confinamiento, prácticas de bioseguridad y técnicas de erradicación. En Costa Rica para su erradicación, se recomienda seguir el protocolo propuesto por la Comisión Nacional de Enfermedades en las Musáceas, donde se avala el uso de fumigantes de suelo como el Dazomet y metam sodio (Guzmán *et al.*, 2019).

En condiciones locales, por muchos años se contuvo la enfermedad. Sin embargo, actualmente existe un aumento de casos de Moko en las fincas bananeras. La presente investigación determinó en condiciones controladas la eficacia del metam sodio, a diferentes concentraciones, sobre cuatro aislamientos de *R. solanacearum* provenientes de diferentes fincas comerciales de banano de Costa Rica, siguiendo la metodología utilizada por Guzmán y Martínez (2010).

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio Mycelium Crop Science (Pococí, Limón, Costa Rica), durante los meses de abril a junio de 2023. La metodología utilizada fue la descrita en el estudio realizado por Guzmán y Martínez (2010). Muestras de pseudotallo y pseudopeciolo con síntomas característicos de Moko se usaron para el aislamiento de la bacteria (Figura 1).



Figura 1. Muestras de pseudotallo y pseudopeciolo con síntomas característicos de Moko, haces vasculares obstruidos y decolorados, provenientes de 4 fincas comerciales de banano. **A)** Finca-1 (MY-PT-38), **B)**, Finca-2 (MY-PT-39), **C)** Finca-3 (MY-PT-40) y **D)** Finca-4 (MY-PT-41).

Segmentos de tejido con síntomas se colocaron en un tubo con agua estéril por 20 minutos, cuando se observaron exudados de la bacteria se procedió a rayar por desgaste con ayuda de un asa bacteriológica, se sellaron las placas e incubaron a 27°C en condiciones de oscuridad. Se utilizó medio de cultivo semi selectivo TZC, se identificaron y purificaron colonias de la bacteria (Figura 2).

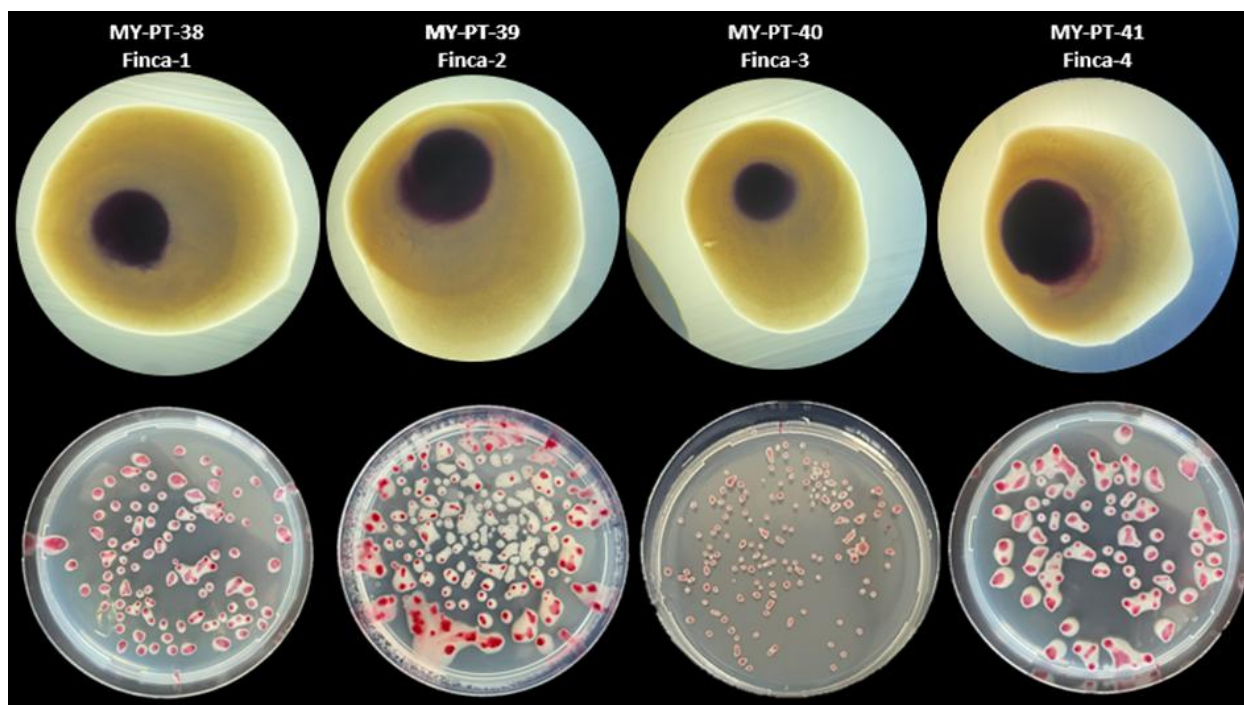


Figura 2. Pureza y morfología de las colonias de los aislamientos de *Ralstonia solanacearum* raza 2 utilizadas. **A.** Finca-1 **B.** Finca-2 **C.** Finca-3 y **D.** Finca-4. Fotografías tomadas con 5 días de incubación a 27°C en medio de cultivo TZC.

Los cultivos puros de la bacteria se enviaron a identificación molecular (Cuadro 1, Figura 3) al laboratorio de Biología Molecular de la Corporación Bananera Nacional CORBANA. Allí se utilizó la técnica de PCR convencional, utilizando el equipo Gene Amp PCR Systems 9700 Applied Biosystems, Macerador RetschMM400 y Mastercycler nexus gradient Eppendorf. Los primers utilizados para la identificación fueron *R. solanacearum* 759/760 (Ito *et al.*, 1998); *R. solanacearum* raza 2 Filotipo II, Secuevares 3, 4 o 6 (Fegan y Prior, 2006).

Cuadro 1. Resultados de los análisis moleculares realizados a los aislamientos provenientes de fincas comerciales. CORBANA, 2023. (+) detectado, (-) no detectado.

Muestra	Finca	Tipo de muestra	Muestra aislada	<i>R. solanacearum</i>	Filotipo II	Secuevar 6
MY-PT-38	1	Cultivo en placa	Pseudotallo	+	+	+
MY-PT-39	2	Cultivo en placa	Pseudopecíolo	-	-	-
MY-PT-40	3	Cultivo en placa	Pseudotallo	+	+	+
MY-PT-41	4	Cultivo en placa	Pseudotallo	+	+	+
MY-PT-39	2	Cultivo en placa	Pseudopecíolo	+	+	+

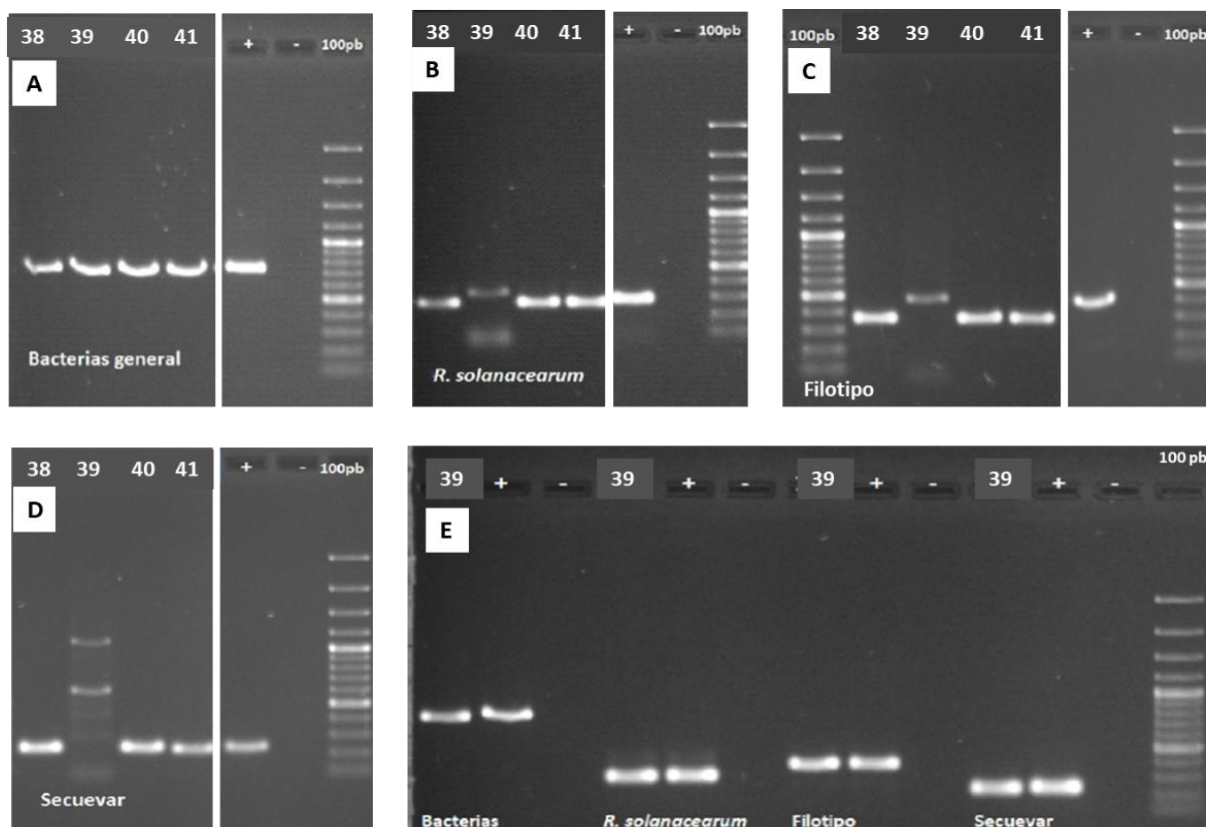


Figura 3. Electroforesis de la identificación molecular de los aislamientos de *Ralstonia solanacearum* raza 2 evaluados. **A.** Identificación de bacterias general fue positiva para los cuatro aislamientos. **B.** Identificación de género y especie *Ralstonia solanacearum*, obsérvese la banda del aislamiento 39 no coincide con el control positivo. **C.** Identificación del filotipo II y **D.** Identificación del secuevar (3, 4 o 6). **E.** Análisis del aislamiento MY-PT-39 muestra 2, donde se observa que amplificó para bacteria, género, especie, filotipo y secuevar correspondiente a la raza 2. En todos los geles el + corresponde al control positivo. Las bandas de los pozos de la derecha corresponden al marcador de peso molecular. Las muestras se consideran positivo sí coinciden con el tamaño de la banda del control positivo.

Se utilizó suelo de los primeros 10 cm del perfil, proveniente de una finca comercial de banano con presencia de la enfermedad (Finca-4). Diez gramos de suelo húmedo se colocaron en tubos de ensayo y se realizó el proceso de esterilización en autoclave a 121°C, 15 libras de presión por 20 minutos.

En condiciones asépticas, se sub cultivaron los aislamientos de *R. solanacearum* en toda la placa de Petri (90 x 15 mm) y se incubaron a 27°C por 24 horas. Posteriormente, se preparó una suspensión bacteriana de cada aislamiento a una concentración de 1×10^9 UFC ml⁻¹. Para esto, se tomó la cuarta parte de una placa de Petri con cultivo activo de cada aislamiento debidamente identificado, se depositó en

un tubo con 10 mL de agua estéril y se realizó una suspensión de 10^{-1} lo que correspondió al inóculo inicial. En condiciones asépticas, se agregaron 500 μ L de la respectiva suspensión bacteriana a los tubos con suelo estéril y se incubaron por 96 h a 27°C en condiciones de oscuridad. Se agitó el tubo con el suelo para una distribución homogénea de la bacteria en el suelo.

Se evaluaron 4 aislamientos de *R. solanacearum*, 6 tratamientos y 8 repeticiones, en un diseño completamente al azar, donde cada repetición fue un tubo de ensayo con suelo esterilizado e inoculado con la bacteria previo a la aplicación de los tratamientos. Los tratamientos consistieron en concentraciones de 3000, 5000, 7000 y 10000 mg L⁻¹ del metam sodio, un testigo inoculado y otro sin inocular.

En condiciones asépticas y 96 horas después de la inoculación de la bacteria, se aplicó 1 mL de la respectiva concentración de metam sodio a evaluar en cada tubo entomológico, dosis equivalente a 5 L de solución por metro cuadrado, los tubos se taparon, se sellaron con plástico autoadherible e incubaron por 8 días a 27°C en condiciones de oscuridad (Figura 4).

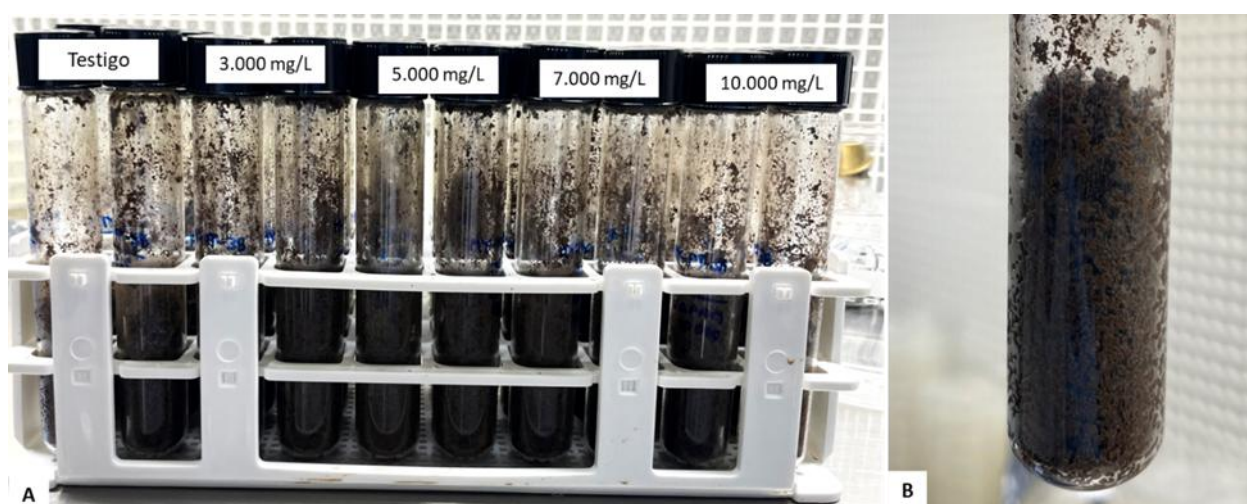


Figura 4. A. Tubos de ensayo con suelo estéril, inoculados con la bacteria y aplicados con el tratamiento respectivo. B. Nótese la humedad del suelo después de haberse aplicado el tratamiento.

Después de aplicados los tratamientos y transcurrido el periodo de incubación, se procedió a realizar diluciones seriadas hasta la 10^{-5} y se inoculó una alícuota de 100 μ L en placas de Petri con medio de cultivo TZC (Kelman, 1954), estas se incubaron por 96 horas a 27 °C para determinar el efecto del tratamiento sobre el crecimiento de las bacterias inoculadas. Transcurrido el periodo de incubación, se realizó un conteo de

UFC y se calculó la concentración de la bacteria según la dilución sembrada (10^{-3} o 10^{-5}).

Los conteos de UFC se analizaron por medio de una tabla de contingencia 2 x 2, complementado con una prueba de independencia de Chi cuadrado para demostrar que la dosis de metam sodio determina la cantidad de UFC de *R. solanacearum* raza 2. Se realizó una comparación de la concentración de UFC de los aislamientos en los tratamientos testigos, para confirmar que la inoculación, conteos de UFC, fue similar en todos los tratamientos. El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete Stats del programa estadístico R.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las concentraciones de 3000, 5000, 7000 y 10000 mg L⁻¹ de metam sodio inhibieron por completo el crecimiento de la bacteria en el suelo ($P < 0,0001$), 100 % de eficacia en condiciones controladas (cuadro 2 y figura 5). Esto indica que en las unidades experimentales de cada una de las concentraciones evaluadas se inhibió por completo el crecimiento de la bacteria, independientemente del aislamiento evaluado. Esto se ratificó al observar el crecimiento de la bacteria en los testigos inoculados, donde el conteo de UFC varió de 2,20 a $2,72 \times 10^7$ entre los aislamientos. No se observó efecto de dosis, dado que en las diferentes concentraciones la inhibición siempre fue del 100%.

Cuadro 2. Concentración de UFC g⁻¹ de suelo después de la aplicación de los tratamientos tras 7 días de incubación. Cada dato es el promedio de 8 repeticiones (una placa de Petri de cada tubo con suelo).

Trat	Descripción	Dosis (mg L ⁻¹)	Finca-1	Finca-2	Finca-3	Finca-4
			Concentración (UFC g ⁻¹ suelo)			
1	Testigo inoculado		$2,59 \times 10^7$ b	$2,59 \times 10^7$ b	$2,59 \times 10^7$ b	$2,59 \times 10^7$ b
2	Testigo sin inocular		0a	0a	0a	0a
3	Metam sodio	3000	0a	0a	0a	0a
4	Metam sodio	5000	0a	0a	0a	0a
5	Metam sodio	7000	0a	0a	0a	0a
6	Metam sodio	10000	0a	0a	0a	0a

*Probabilidad= $2,2 \times 10^{-16}$ por lo que se considera 0.

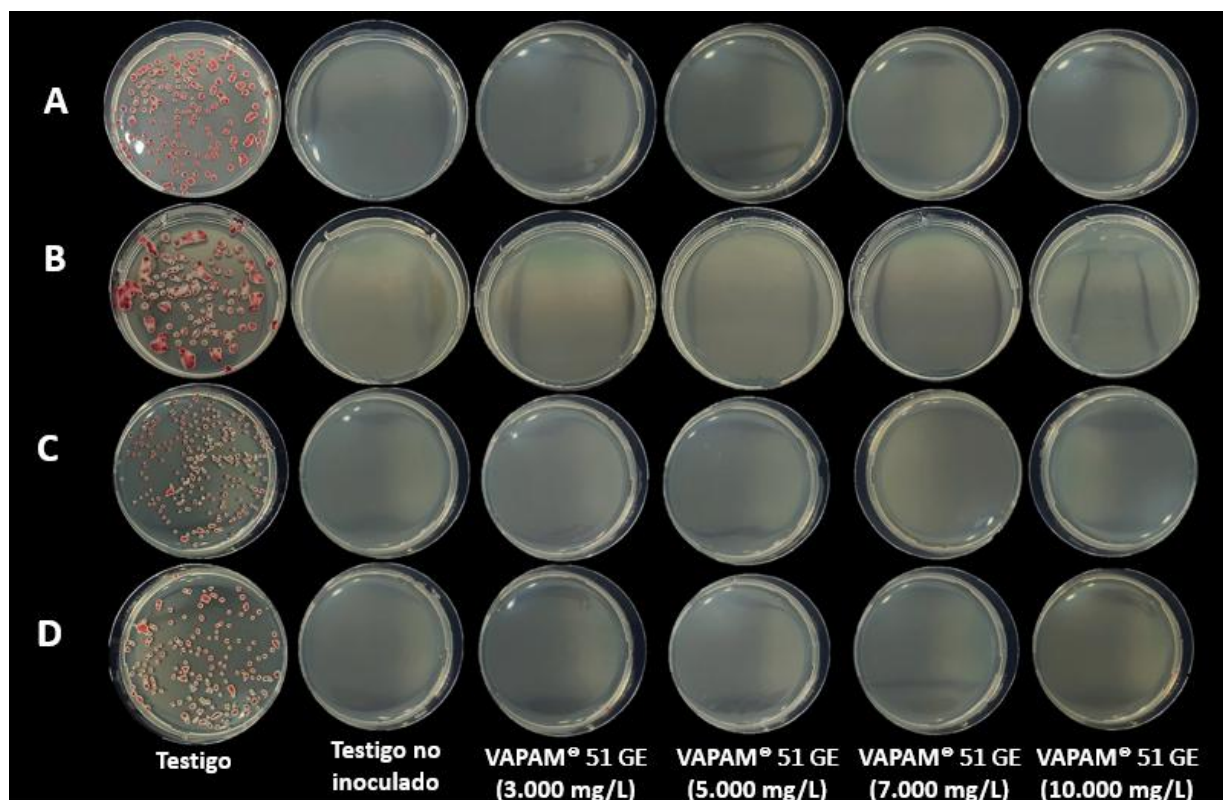


Figura 5. Efecto del metam sodio a 3000, 5000, 7000 y 10000 mg L⁻¹ en el crecimiento de cuatro aislamientos de *Ralstonia solanacearum* tras 7 días de contacto con suelo infectado con la bacteria. Obsérvese en la columna de la izquierda el testigo de la siembra de la dilución de suelo esterilizado, inoculado y sin tratamiento, el crecimiento abundante de UFC de los cuatro aislamientos. La segunda columna corresponde a la siembra de la dilución de suelo esterilizado sin inocular y sin tratamiento, donde no hubo crecimiento de bacteria. En las columnas 3 a 6 corresponde a la siembra de la dilución suelo esterilizado, inoculado y tratado con las diferentes concentraciones de metam sodio, donde se observó inhibición completa del crecimiento de la bacteria. **A.** Aislamiento proveniente de finca-1, **B.** Aislamiento proveniente de finca-2, **C.** Aislamiento proveniente de finca-3 y **D.** Aislamiento proveniente de finca-4.

El control observado con metam sodio en este experimento es congruente con lo reportado por Guzmán y Martínez (2010), quienes evaluaron el metam sodio contenido en el Bunema® 55GE el cual inhibió el 100% del crecimiento de *R. solanacearum* raza 2 a una concentración de 5000 mg L⁻¹.

A pesar de que en condiciones controladas la concentración de 3000 mg L⁻¹ de metam sodio (Vapam 51 GE-AMVAC) evidenció un 100% de inhibición del crecimiento de la bacteria, se sugiere continuar utilizando la concentración de 5000 mgL⁻¹, propuesta por la Comisión Nacional de Enfermedades en las Musáceas, ya que las aplicaciones en campo (deficiente forqueo o floculación de suelo y reducido

volumen de la solución fumigante) pueden generar variaciones en concentraciones que interfieran en el desempeño del producto.

CONCLUSIONES

En condiciones controladas el metam sodio (Vapam 51 GE-AMVAC) logró inhibir por completo el crecimiento de la bacteria a todas las dosis evaluadas. Los resultados corroboran el potencial del producto para ser utilizado en los programas de erradicación de Moko en plantaciones de musáceas.

REFERENCIAS

1. Álvarez E, Pantoja A, Gañán L, Ceballos G. 2015. Current status of Moko disease and Black Sigatoka in Latin America and the Caribbean, and options for managing them. CIAT Publication No. 404, Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia; Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 40p.
2. Belalcázar S, Rosales FE, Pocasangre LE. 2003. El “Moko” del plátano y banano y el rol de las plantas hospederas en su epidemiología. In: Rivas G; Rosales F, eds. Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos. Minutes of the workshop on “Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas”, held in Guayaquil, Ecuador, 11–13 August 2003. p 159–179.
3. Blomme, G., Dita, M., Jacobsen, K, Pérez-Vicente, L., Molina, A., Ocimati, W., Poussier, S., Prior, P. 2017. Bacterial diseases of bananas and Enset: current ctate of knowledge and integrated approaches toward sustainable management. *Frontiers in Plant Science* 8: 1290. doi: 10.3389/fpls.2017.01290.
4. Eden-Green, S. J. 2019. Moko bacterial wilt and Bugtok. En: Jones D.R. (ed.). *Diseases of Banana, Abacá and Enset*. CABI publishing, Wallington, UK. Pp. 314-323.
5. Fegan, M., Prior, P. 2006. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana. *Aust. Plant Pathol.* 35: 93–101. doi: 10.1186/s12864-016-2413-z.
6. Guzmán, M., Martínez, I. 2010. Actividad *in vitro* y en suelo de diferentes desinfectantes contra *Ralstonia solanacearum*, agente causal del Moko. Informe anual de investigaciones 2009, CORBANA. Pp: 225-226.
7. Guzmán, M., Sánchez, M., Villalta, R. 2019. Moko o marchitamiento bacteriano del banano y plátano. Hoja divulgativa N° 19, Corporación Bananera Nacional. 2p.
8. Ito, S., Ushijima, Y., Fujii, T., Tanaka, S., KameyaIwaki, M., Yoshiwara, S and Kishi, F. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semi-selective medium and a PCR technique. *J. Phytopathol.* 146: 379-384.
9. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44: 693-695.