

Etiología de la marchitez y pudrición basal de *Jatropha curcas* en Arriaga, Chiapas, México

Etiology of wilt and basal rot of *Jatropha curcas* in Arriaga, Chiapas, Mexico

Wester Moisés Salazar-Pinacho, Ricardo René Quiroga-Madrigal, María de los Ángeles Rosales-Esquinca, Universidad Autónoma de Chiapas, Carretera Ocozocoautla-Villaflores km 84.5, Villaflores, Chiapas, CP 30470, México; Eduardo Raymundo Garrido-Ramírez, INIFAP-Campo Experimental Centro de Chiapas, Carretera Ocozocoautla-Cintalapa km 3, Ocozocoautla, Chiapas, CP 29140, México; Francisco Holguín-Meléndez, El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Tapachula, Carretera Antiguo Aeropuerto km. 2.5. Tapachula, Chiapas, CP 30700, México. Correspondencia: quiroga@unach.mx

Recibido: 30 de Julio, 2015.

Aceptado: 16 de Noviembre, 2015.

Salazar-Pinacho WM, Quiroga-Madrigal RR, Rosales-Esquinca MA, Garrido-Ramírez ER y Holguín-Meléndez F. 2016. Etiología de la marchitez y pudrición basal de *Jatropha curcas* en Arriaga, Chiapas, México. Revista Mexicana de Fitopatología 34: 110-115.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1507-5](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-5)

Primera publicación DOI: 26 de Noviembre, 2015.

First DOI published: November 26, 2015.

Resumen. En el municipio de Arriaga, Chiapas, México, a partir del 2009 existe la muerte de plantas de piñón (*Jatropha curcas* L.) de 1 y 2 años de edad, con síntomas de marchitez y pudrición basal del tallo. La incidencia registrada es hasta un 85 %; con una alta virulencia del patógeno ya que ocasiona la muerte de la planta en un lapso de 20 a 30 días. El objetivo del presente trabajo fue determinar el agente causal de la muerte de plantas de piñón. A partir de muestras de campo de tejido enfermo de la base del tallo y raíz, se realizaron a nivel de laboratorio, aislamientos en cajas Petri con medio B de King (BK) y cloruro de trifenil tetrazolio (TTC); las cajas se incubaron a 28 °C durante 48 h. Los

Abstract. In the municipality of Arriaga, Chiapas, the death of physic nut (*Jatropha curcas* L.) 1 and 2-year old plantations has been observed since 2009, with symptoms of wilting and basal stem rot. The registered incidence has been up to 85 %; the virulence of the pathogen is very high because it causes the death of the plant in a period of 20 to 30 days. The objective of this study was to determine the causal agent of the physic nut death. Laboratory isolates were conducted from field samples of diseased plant material of stem and root tissue, in Petri dishes with B King (BK) and triphenyl tetrazolium chloride (TTC) medium, incubated at 28 °C for 48 h. The isolates obtained were purified and subjected to biochemical and hypersensitivity tests on tobacco (*Nicotiana tabacum*) cv. Xanthi. The identification was positive for three isolates of *Ralstonia solanacearum*. However, it was not possible to complete Koch's postulates; therefore, *R. solanacearum* is only consigned at association level.

aislamientos obtenidos fueron purificados y sometidos a pruebas bioquímicas y de hipersensibilidad en tabaco (*Nicotiana tabacum*) cv. Xanthi. La identificación fue positiva para tres cepas de *Ralstonia solanacearum*. Sin embargo, no fue posible completar los postulados de Koch por lo que se consigna a *R. solanacearum* nivel de asociación.

Palabras claves adicionales: piñón, *Ralstonia solanacearum*, diagnosis, pruebas bioquímicas.

El piñón (*Jatropha curcas* L.) se utiliza como cerco vivo en predios agrícolas debido a su fácil propagación, manejo y rápido crecimiento. A nivel mundial se estudia como cultivo bioenergético para la obtención de biodiesel, lo que contribuye a disminuir la emisión de gases efecto invernadero y mitigar el calentamiento global (Zamarripa y Solís, 2013). En Arriaga, Chiapas, desde el 2009 se observan plantaciones comerciales con muerte de plantas de piñón de 1 y 2 años de edad, las plantas afectadas presentan síntomas de marchitez y pudrición basal del tallo. El objetivo del presente trabajo fue determinar la etiología de la marchitez y pudrición basal del tallo del piñón en Arriaga, Chiapas.

Se colectaron muestras de plantas con síntomas de marchitez y pudrición basal del tallo en dos plantaciones de piñón, ubicadas en Arriaga, Chiapas: 1) Lote de 90 ha de piñón originario de la India, sembrado a partir de semilla en 2008, en el Rancho San Jacinto, ubicado a 16° 13' 18" de latitud norte y 94° 01' 07" longitud oeste, con una altitud de 50 msnm; 2) Lote de 3 ha de piñón de Chiapas, sembrado a partir de semilla en 2010, propiedad de la Universidad Autónoma de Chiapas, ubicado a 16° 11' 05" de latitud norte y 93° 55' 57" longitud oeste, con una altitud de 38 msnm. Las muestras se procesaron y se analizaron en condiciones de laboratorio. De material vegetal enfermo se obtuvieron secciones de 5 mm, desin-

Additional keywords: Physic nut, *Ralstonia solanacearum*, diagnosis, biochemical tests.

The physic nut (*Jatropha curcas* L.) is used as a living fence, due to its fast spreading, handling, and quick growth. It is studied worldwide as a bioenergy crop to obtain biodiesel, which helps reduce the emission of greenhouse gases and mitigate global warming (Zamarripa and Solís, 2013). In Arriaga, Chiapas, since 2009, commercial plantations have been observed to contain dead 1- and 2-year old physic nut plants, which presented symptoms of wilting and basal stem rot. The aim of this study was to determine the etiology of the wilting and basal stem rot in the physic nut plant in Arriaga, Chiapas.

Samples with symptoms of wilting and basal stem rot were gathered in two physic nut plantations located in Arriaga, Chiapas: 1) a 90 ha lot with physic nuts from India, planted from seeds in 2008 in Rancho San Jacinto, located at 16° 13' 18" latitude north and 94° 01' 07" longitude west, at an altitude of 50 masl; 2) 3 ha lot with physic nut from Chiapas, planted from seeds in 2010, property of the Autonomous University of Chiapas, located at 16° 11' 05" latitude north and 93° 55' 57" longitude west, at an altitude of 38 masl. The samples were processed and analyzed under laboratory conditions. Cross sections of 5 mm of diseased plant material were obtained, disinfected superficially with 1 % sodium hypochlorite, rinsed with sterile distilled water and planted in Petri dishes with B King. The dishes were incubated at 28 °C for 48 hours; the culture formed was transferred to a new culture medium, using an inoculation loop, using the Streak Plate Method. Different tests were carried out with pure cultures, including: the hypersensitivity reaction test, with the infiltration of a bacterial solution at 1.2x10⁹ UFC/mL in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi)

fectadas superficialmente en hipoclorito de sodio al 1 %, se lavaron con agua destilada estéril y se sembraron en cajas Petri con medio B de King, las cajas se incubaron a 28 °C durante 48 horas, de las colonias formadas con una asa bacteriológica se realizaron transferencias a nuevo medio de cultivo mediante la técnica de estría cruzada. Con colonias puras se realizaron diferentes pruebas, las cuales incluyeron: prueba de reacción de hipersensibilidad, mediante la infiltración de una solución bacteriana a 1.2×10^9 UFC/mL en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi) de plantas de 60 días de edad, la concentración fue estimada con la escala de McFarland (1907); prueba de pudrición en tubérculo de papa del cv. Alpha, mediante inoculaciones de crecimiento bacteriano en incisión en rodajas bajo condiciones asépticas; pruebas bioquímicas auxiliares para la identificación en medio de cultivo cloruro de trifenil tetrazolio (TTC), tinción de Gram, prueba de KOH, producción de la enzima citocromo oxidasa, producción de la enzima catalasa con agua oxigenada (H_2O_2), producción de la enzima ureasa en medio de cultivo de Christensen, metabolismo oxidativo y/o fermentativo de la glucosa en medio de cultivo Hugh y Leifson (Denny y Hayward, 2001).

Las plantas que fueron colectadas en campo (predios comerciales) presentaron síntomas de marchitamiento en hojas, pudrición bacteriana en la base del tallo y raíz, lo anterior coincide con la descripción de síntomas reportados por Hendroko *et al.* (2008), Ginting y Maryono (2009) y Hidayah y Yulianti (2009). Se observó hasta 85% de muerte de plantas afectadas de entre 1 y 2 años de edad, en un lapso de 20 a 30 días después del inicio del brote epidémico. La incidencia de la enfermedad disminuyó notablemente cuando el cultivo alcanzó el tercer año de edad. A partir de las muestras colectadas en campo se obtuvieron 16 cepas, 11 de las cuales, se descartaron mediante la prueba de

leaves from 60-day old plants. Concentration was calculated using the McFarland scale (1907), a test of rotting in potato tubercula of the cv. Alpha, by inoculations of bacterial growth in incision in slices under aseptic conditions; auxiliary biochemical identification tests in a triphenyl tetrazolium chloride (TTC) culture media, Gram staining, KOH test, production of the enzyme cytochrome oxidase, production of the enzyme catalase with hydrogen peroxide (H_2O_2), production of the enzyme urease in a Christensen culture media, oxidative and/or fermentative metabolism of glucose in a Hugh and Leifson culture media (Denny and Hayward, 2001).

The plants gathered from commercial fields displayed symptoms of wilting on leaves, bacterial rot on the base of the stem and root. This corresponds with the description of symptoms reported by Hendroko *et al.* (2008), Ginting and Maryono (2009), and Hidayah and Yulianti (2009). Up to 85 % less plants aged 1 to 2 years died in a time lapse of 20 to 30 days after the beginning of the epidemic. The incidence of the disease fell noticeably when the crop reached its third year of age. From the samples gathered on the field, 16 strains were obtained, 11 of which were discarded using the test of hypersensitivity on tobacco and the biochemical tests applied on it. Strains 1 and 3B showed positive results on the hypersensitivity test on tobacco after 48 h (Figure 1), and strain P3 also showed positive results or variables after 72 h; in this sense, Ji *et al.* (2007) mentioned that *R. solanacearum* shows variability in the response to hypersensitivity. Finally, negative results were obtained for this test with strains P1 and P2.

In the potato tubercule rotting tests, results were positive for all five bacterial strains, which coincides with Rodríguez (2012), who mentioned that for isolated bacterias from organisms with rotting, pathogenicity can be valued with this test.

hipersensibilidad en tabaco y las pruebas bioquímicas aplicadas. Las cepas 1 y 3B, presentaron resultados positivos en la prueba de hipersensibilidad en tabaco a las 48 h (Figura 1), también, la cepa P3 presentó resultados positivos o variables a las 72 h; en este sentido, Ji *et al.* (2007) mencionaron que *R. solanacearum* muestra variabilidad en la respuesta de la reacción de hipersensibilidad. Finalmente, se obtuvieron resultados negativos para esta prueba con las cepas P1 y P2.

En las pruebas de pudrición en tubérculo de papa los resultados obtenidos fueron positivos para las cinco cepas bacterianas, lo cual coincide con Rodríguez (2012) quien mencionó que para bacterias aisladas de organismos con pudrición, la patogenicidad se puede valorar con esta prueba.

Las cinco cepas bacterianas aisladas de piñón dieron positivas en medio TTC, con el desarrollo de colonias de color rojo y bordes blancos, características distintivas de colonias virulentas de *R. so-*

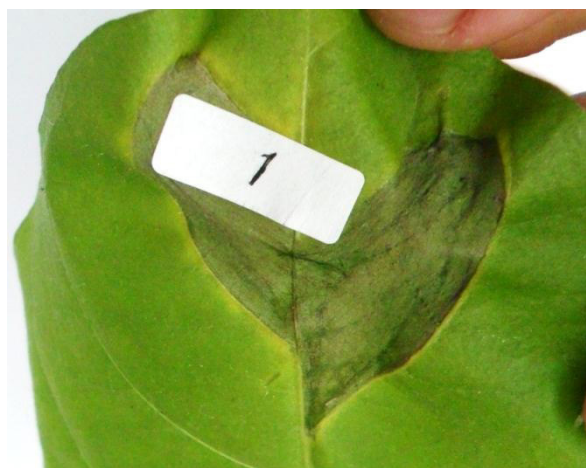


Figura 1. Resultado positivo a las 48 h, de la prueba de hipersensibilidad en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. Xanthi, realizado con la cepa 1 aislada de piñón.

Figure 1. Positive result after 48 h for the hypersensitivity test on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. Xanthi, performed on the isolated strain 1 of physic nut.

The five isolated bacterial strains from physic nut were positive in a TTC media, with the growth of colonies colored red with white edges, distinctive features of colonies infected with *R. solanacearum* (Figure 2). These results coincide with reports by Perea *et al.* (2011), who reported that the growth of *R. solanacearum* colonies in a TTC growth media are characterized by a red color with white edges. The Gram staining and biochemical tests for oxidase, catalase, urease, coincide with reports by Yabuuchi *et al.* (1995), Denny and Hayward (2001), Dhital (2001), EPPO (2004), Rahman *et al.* (2010), Perea *et al.* (2011), Marques *et al.* (2012) and Rodríguez (2012) (Table 1).

The wilting and basal rotting of *Jatropha curcas* in Arriaga, Chiapas, Mexico are characterized by symptoms of flabbiness in petioles, wilting and loss of leaves, rotting in the root and base of the stem, production of adventitious roots and senescence 20 to 30 days after the first symptoms. Out of 16 isolated bacterial strains in physic nut plants that underwent the tobacco hypersensitivity test, three strains coincide with the characteristics for *R. solanacearum*. Although Koch's postulates were

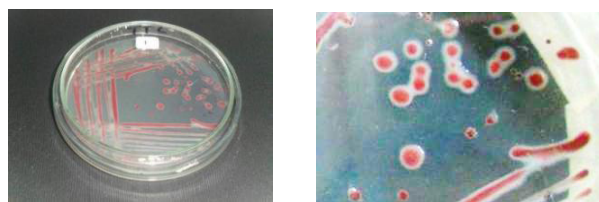


Figura 2. Crecimiento en medio TTC de la cepa P1 aislada de *Jatropha curcas* con síntomas de marchitez y pudrición bacteriana; se observa el color rojo rodeado de una zona blanca, típico de las colonias de *R. solanacearum*.

Figure 2. Growth in a TTC media of the P1 isolated strain of *Jatropha curcas* with symptoms of wilting and bacterial rotting; a red color is observable, surrounded by a white area, typical of *R. solanacearum* cultures.

lanacearum (Figura 2), estos resultados coinciden con lo reportado por Perea *et al.* (2011), quienes reportaron que el crecimiento de colonias bacterianas de *R. solanacearum* en medio de cultivo TTC se caracterizan por una coloración rojiza con bordes blanquecinos. La tinción de Gram y pruebas bioquímicas de oxidasa, catalasa, ureasa coincide con lo reportado por Yabuuchi *et al.* (1995), Denny y Hayward (2001), Dhital (2001), EPPO (2004), Rahman *et al.* (2010), Perea *et al.* (2011), Marques *et al.* (2012) y Rodríguez (2012) (Cuadro 1).

Se caracteriza a la marchitez y pudrición basal de *Jatropha curcas* en Arriaga, Chiapas, México con síntomas de flacidez de pecíolos, marchitamiento y caída de hojas; pudrición de raíz y base del tallo, producción de raíces adventicias y se-

not fulfilled, this is the first report on the relation of *Ralstonia solanacearum* in wilting and basal rotting of the physic nut plant in Chiapas, Mexico.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

nescencia entre 20 a 30 días después de los primeros síntomas. De 16 cepas bacterianas aisladas de piñón, al someterlas a la prueba de hipersensibilidad de tabaco y pruebas bioquímicas, tres cepas coinciden con las características para *R. solanacearum*. Aunque los postulados de Koch no fueron realizados, este es el primer reporte de la asociación de *Ralstonia solanacearum* en la marchitez y pudrición basal del piñón en Chiapas, México.

**Cuadro 1.** Pruebas bioquímicas y de patogenicidad realizadas a cinco cepas bacterianas aisladas de *Jatropha curcas*.  
**Table 1.** Biochemical and pathogenicity tests performed on five bacterial strains of *Jatropha curcas*.

| Prueba                                   | Cepa bacteriana |    |    |    |     |                      | <i>Ralstonia solanacearum</i> <sup>2</sup> |
|------------------------------------------|-----------------|----|----|----|-----|----------------------|--------------------------------------------|
|                                          | 1               | 3B | P1 | P2 | P3  | Testigo <sup>1</sup> |                                            |
| TTC colonias rojas y bordes blancos      | +               | +  | +  | +  | +   | +                    | +                                          |
| BK pigmento fluorescente                 | -               | -  | -  | -  | -   | -                    | -                                          |
| BK pigmento difusible                    | -               | -  | -  | -  | -   | -                    | -                                          |
| YDC colonia amarilla-crema               | -               | -  | -  | -  | -   | -                    | -                                          |
| YDC colonia mucoides 30 °C               | +               | +  | +  | +  | +   | +                    | +                                          |
| Tinción de Gram                          | -               | -  | -  | -  | -   | -                    | -                                          |
| Reacción KOH                             | +               | +  | +  | +  | +   | +                    | +                                          |
| Oxidasa                                  | +               | +  | +  | +  | +   | +                    | +                                          |
| Ureasa                                   | +               | +  | +  | +  | +   | +                    | +                                          |
| Catalasa                                 | +               | +  | +  | +  | +   | +                    | +                                          |
| Hugh y Leifson aerobiosis                | +               | +  | +  | +  | +   | +                    | +                                          |
| Hugh y Leifson anaerobiosis              | -               | -  | -  | -  | -   | -                    | -                                          |
| Hipersensibilidad en tabaco <sup>3</sup> | +               | +  | -  | -  | +/V | +                    | +/V                                        |
| Pudrición de tubérculo de papa           | +               | +  | +  | +  | +   | +                    | +                                          |

<sup>1</sup>Testigo = Cepa de referencia aislada de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) identificada y proporcionada por el Lab. de Fitopatología, Depto. de Microbiología, Esc. Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F. / <sup>1</sup>Control = Isolated reference strain from tomato (*Solanum lycopersicum* L.) identified and provided by the Lab. Of Plant Disease, Dept. of Microbiology, National School of Biological Science, Instituto Politécnico Nacional, Mexico City.

<sup>2</sup>Respuesta de *R. solanacearum*, según Denny y Hayward (2001), Dhital (2001), EPPO (2004), Rahman *et al.* (2010), Perea *et al.* (2011), Marques *et al.* (2012), Rodríguez (2012) / <sup>2</sup>Response of *R. solanacearum*, according to Denny and Hayward (2001), Dhital (2001), EPPO (2004), Rahman *et al.* (2010), Perea *et al.* (2011), Marques *et al.* (2012), Rodríguez (2012).

<sup>3</sup>V = Variable.

## BIBLIOGRAFÍA

- Denny TP and Hayward AC. 2001. *Ralstonia*. In: Schaad NW, Jones JB and Chun W (eds.). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Third Edition. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN, USA. Pp. 151-174.
- Dhital SP, Thaveechai N and Shrestha SK. 2001. Characteristics of *Ralstonia solanacearum* strains of potato wilt disease from Nepal and Thailand. Nepal Agriculture Research Journal 5:42-47. <http://www.nepjol.info/index.php/NARJ/article/download/4868/4034>.
- EPPO. 2004. EPPO Standards: Diagnostic protocols for regulated pests. European and Mediterranean Plant Protection Organization. EPPO Bulletin 34:155-157. [http://archives.eppo.int/EPPOStandards/PM7\\_DIAGNOS/pm7-21\(1\).pdf](http://archives.eppo.int/EPPOStandards/PM7_DIAGNOS/pm7-21(1).pdf)
- Ginting C and Maryono T. 2009. Physic nut (*Jatropha curcas* L.) diseases in Lampung province. Biotropia 16(1):45-54. <http://journal.biotrop.org/index.php/biotropia/article/view/66/45>
- Hendroko R, Karmawati E, Mahmud Z and Soekamto. 2008. The attack of disease occurred at ETF *Jatropha* seed garden. Cikarang, Indonesia. Presented in poster at Kuala Lumpur *Jatropha* Summit, Indonesia. [www.slideshare.net/greenmile/jatropha-presentation](http://www.slideshare.net/greenmile/jatropha-presentation) (consulta, febrero 2014).
- Hidayah N and Yulianti T. 2009. Development of bacterial wilt of physic nut (*Jatropha curcas* L.) in Muktiharjo Experimental Station. Proceedings of the Third National Workshop on *Jatropha*. Indonesia Tobacco and Fiber Crops Research Institute. Malang, East Java, Indonesia. Pp. 308-312. <http://balittas.litbang.pertanian.go.id/eng/images/jarpag3/pen/nurul%20mp.pdf> (consulta, febrero 2014).
- Ji P, Allen C, Sánchez PA, Elphinstone JG, Jones JB and Momol MT. 2007. New diversity of *Ralstonia solanacearum* strains associated with vegetable and ornamental crops in Florida. Plant Disease 91:195-203. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-91-2-0195>
- Marques E, Uesugi CH, Ferreira MASV and Rezende DV. 2012. Characterization of isolates of *Ralstonia solanacearum* biovar2, pathogenic to *Eucalyptus* "urograndis" hybrids. Tropical Plant Pathology 37(6):399-408. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762012000600004>
- McFarland J. 1907. The nephelometer: an instrument for estimating the numbers of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. Journal of the American Medical Association 49(14):1176-1178. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1907.25320140022001f>
- Perea-S JM, García-E RS, Allende-M R, Carrillo-F JA, León-F J, Valdez-T B y López-S FSM. 2011. Identificación de razas y biovares de *Ralstonia solanacearum* L. aisladas de plantas de tomate. Revista Mexicana de Fitopatología 29(2):98-108. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222864002>
- Rahman MF, Islam MR, Rahman T and Meah MB. 2010. Biochemical characterization of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt of brinjal in Bangladesh. Progressive Agriculture 21(1-2):9-19. <http://dx.doi.org/10.3329/pa.v21i1-2.16744>
- Rodríguez-M. ML. 2012. Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas. 3ª edición. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 146 p.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H and Nishiuchi Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. & *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. Microbiology and Immunology 39:897-904. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.1995.tb03275.x>
- Zamarripa-Colmenero A y Solís-Bonilla JL. (eds.). 2013. *Jatropha curcas* L., alternativa bioenergética en México. Libro Científico No. 1. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Regional Pacífico Sur, Campo Experimental Rosario Izapa. Tapachula, Chiapas, México. 157 p.