



**CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD POBLACIONAL DE *RALSTONIA SOLANACEARUM* EN CULTIVOS DE SOLANÁCEAS DEL NORESTE ARGENTINO**

**VERONICA G. OBREGON**

**Tesis**

**Para Optar al Grado Académico de  
Magíster en Cultivos Intensivos**

**Esperanza, 2009**

**CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD POBLACIONAL DE *RALSTONIA SOLANACEARUM* EN CULTIVOS DE SOLANÁCEAS DEL NORESTE ARGENTINO**

**Director: Ing. Agr. Mario Luis Rista**

**Co-Director: M. Sc. María del Huerto Colombo**

**Tribunal Examinador de tesis**

**Dr. Rolf Delhey**

**M. Sc. Carlos Alberto Bouzo**

**M. Sc. Roberto Ricardo Scotta**

**Presentación Académica**

**23 de Octubre de 2009**

**Facultad de Ciencias Agrarias**

**Universidad Nacional del Litoral**

## AGRADECIMIENTOS

- A la doctora Ernestina Galdeano, de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE) quien colaboró en los análisis moleculares y me facilitó bibliografía y su gran ayuda profesional.
- A la doctora María M. Lopez, del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrícola, Moncada, Valencia, España, quien me facilitó el ADN de las cepas controles de *R. solanacearum*.
- A mi novio, amigos y familia quienes estuvieron de manera incondicional acompañando este momento.
- A mi director, Luis Rista, quien me ha servido de guía durante todo este trabajo y me ayudó en mi formación profesional.
- A mi codirectora, María del Huerto Colombo quien ha acompañado en el desarrollo de este trabajo día a día.

## Resumen

Entre los síntomas de enfermedades que afectan el cultivo de tomate en el Nordeste Argentino se destaca el marchitamiento y muerte de plantas en distintos estados de desarrollo del cultivo. Los antecedentes en el mundo que registran este síntoma lo atribuyen a la bacteria *Ralstonia solanacearum*, citada en el Nordeste Argentino en forma sucinta ya hace unos años. La importancia del cultivo de tomate y la reproducción de estos síntomas, observados también en pimiento y berenjena establecieron la hipótesis de *Ralstonia solanacearum* como el agente causal del marchitamiento en las solanáceas mencionadas. Se obtuvieron aislados de tomate, berenjena y pimiento del servicio de diagnóstico del laboratorio de Sanidad Hortícola y recolecciones de campo para determinar la presencia de *R. solanacearum* y establecer la raza y biovar de la misma. Para ello se transfirieron los aislados obtenidos a tetrametil-trifenil-tetrazolium (TTC), se estableció la reacción de hipersensibilidad (RH) en hojas de tabaco, se realizaron tests bioquímicos, pruebas de patogenicidad y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) respecto a cepas de referencia obtenidas para este fin. Se trabajó con 36 aislados que formaron colonias fluidas, redondas, blancas y levemente rojas al centro en TTC; no produjeron RH en tabaco y las cepas de tomate y berenjena causaron reacción de alta patogenicidad en el huésped y entre ellos, mientras que los aislados de pimiento dieron valores intermedios. Se identificaron los aislados como *R. solanacearum* biovar 1 y 2 por la producción de ácido a partir de lactosa, maltosa y celobiosa; la reacción negativa de manitol, sorbitol y dulcitol y por la técnica PCR, que amplificó un fragmento de la banda 718 bp del gen 16S ARN ribosomal de *R. solanacearum* de todas las cepas en estudio. El trabajo desarrollado permitió confirmar la presencia de *R. solanacearum* biovar 1 y/o 2 en todos los aislados de tomate, pimiento y berenjena no descritos hasta el presente y citar pimiento y berenjena como nuevos huéspedes en la región nordeste de Argentina.

**Palabras clave:** tomate, pimiento, berenjena, biovar.

## Summary

Among the most relevant disease symptoms that affect the tomato crops in the Northeast of Argentina are the wilting and death of plants in different growth stages. In previous reports the symptoms have been attributed to the bacterium *Ralstonia solanacearum*, which has been cited some years ago in the Northeast of Argentina. The importance of the tomato crop and the dispersion of these symptoms, also observed in pepper and eggplant, have supported the hypothesis of the presence of *Ralstonia solanacearum* as the causal agent of wilt in the mentioned solanaceae. Isolates were obtained from tomato, eggplant and pepper, sent to the laboratory of vegetable disease and field collections. The isolates were transferred to tetramethyl-triphenyl-tetrazolium (TTC). In order to detect the presence of *R. solanacearum* and identify the predominant biovar and races, hypersensitivity reaction (HR) in leaves of tobacco, biochemical and pathogenicity tests were performed. Biovar identification was confirmed by polymerase chain reaction (PCR). We worked with 36 isolates that formed colonies smooth, round, white and slightly red in the center on TTC medium. No HR occurred in tobacco. The strains isolated from tomato and eggplant caused highly pathogenic reaction in both hosts, while isolates from pepper gave intermediate values. The isolates were identified as *R. solanacearum* biovars 1 and 2 by acid production from lactose, maltose and cellobiose, the negative reaction of mannitol, sorbitol and dulcitol. All the isolates resulted positive by PCR with primers specific for *R. solanacearum* biovars 1 and 2. The research work confirmed the presence of *R. solanacearum* biovars 1 and / or 2 in all isolates of tomato, pepper and eggplant which have not been described so far, and pepper and eggplant cited as new hosts in the Northeastern region of Argentina.

**Keywords:** tomato, pepper, eggplant, biovar.

INDICE		
PORTADA		I
COMITÉ EVALUADOR		II
AGRADECIMIENTOS		III
RESUMEN		IV
SUMARY		V
INDICE		VI
LISTA DE TABLAS		VII
LISTA DE FIGURAS		VIII
INTRODUCCION		1
Objetivo		8
Objetivos Específicos		8
MATERIALES Y METODOS		9
Relevamiento de plantas con síntomas de marchitamiento		9
Aislamiento de la bacteria		11
Identificación de la colonia bacteriana		11
Prueba KOH, la oxidasa y hugh-leifson		11
Evaluación de patogenicidad		12
Reacción de Hipersensibilidad en tabaco		13
Caracterización bioquímicas		14
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)		15
Conservación de las cepas aisladas		16
RESULTADOS Y DISCUSION		17
Descripción de los síntomas observados en plantas con marchitamiento		17
Análisis de las colonias bacteriana		19
Análisis de la reacción a las pruebas del KOH, la enzima oxidasa y Hugh-leifson		20
Pruebas de patogenicidad de aislados de <i>R. solanacearum</i>		21
Reacción de hipersensibilidad		26
Caracterización de biovares		28
Análisis de la amplificación de las cepas mediante PCR		30
CONCLUSIONES		33
BIBLIOGRAFIA		34

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. División de razas de <i>R. solanacearum</i> según el rango de hospederos	5
Tabla 2. Especies y procedencia de materiales con marchitamiento	10
Tabla 3. Determinación de razas en <i>Ralstonia solanacearum</i>	14
Tabla 4. Caracterización de biovares de <i>R. solanacearum</i>	15
Tabla 5. Patogenicidad de aislados de <i>Ralstonia solanacearum</i> de plantas de tomate, pimiento y berenjena inoculados en el mismo huésped, en tabaco y cruzados entre sí.	22
Tabla 6. Determinación bioquímica de biovares de <i>R. Solanacearum</i>	30

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Inoculación por punción	13
Figura 2. Infiltración de suspensión bacteriana en hojas de tabaco	13
Figura 3. Electroforesis en geles de agarosa	16
Figura 4. Transiluminador	16
Figura 5. <i>R. solanacearum</i> conservados en tubos eppendorf	16
Figura 6. Prueba del flujo bacteriano. Exudado lechoso de raíces cortadas	18
Figura 7. Necrosis del tejido medular.	18
Figura 8. Clorosis y marchitamiento en plantas	18
Figura 9. Síntomas en planta de pimiento	19
Figura 10. Colonias en medio de TTC	20
Figura 11. Prueba KOH 3%	20
Figura 12. Test Hugh-Leifson	20
Figura 13-14. Patogenicidad en plantas de tomate. Síntoma de marchitamiento	25
Figura 15. Marchitamiento en plantas inoculadas de berenjena	25
Figura 16. Clorosis internerval en berenjena	25
Figura 17. Estrangulamiento en la zona inoculada en plantas de pimiento	26
Figura 18. Mancha oscura en la zona inoculada en pimiento	26
Figura 19. Plasmolisis del tejido inoculado	27
Figura 20 Reacción dark-brown	27
Figura 21. Marchitamiento y muerte en plantas de tabaco.	27
Figura 22. Síntomas en tabaco del grupo II	27
Figura 23. Áreas infiltradas con agua (Testigo)	27
Figura 24. Reacción provocada por Biovar 2	29
Figura 25. Reacción provocada por biovar 1	29
Figura 26. Reacción provocada por el testigo.	29
Figura 27-28. PCR de las cepas en estudio con set de primers RS-1-F/RS-1-S	32
Figura 29. PCR de los aislados con set de primers RS-1-F/RS-3-R	32

## INTRODUCCION

*Ralstonia solanacearum* (sinónimo *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith) Yabuuchi *et al.*, 1995) es el agente causal del marchitamiento y muerte de cultivos de importancia económica de las regiones tropicales y subtropicales del mundo, presente también en algunas malezas (Hayward, 1991). El rango de hospedantes de *R. solanacearum* incluye cientos de especies de 44 familias de plantas (He *et al.*, 1983, Middleton y Hayward, 1990, Persley, 1986).

Su distribución geográfica es mundial (CABI/EPPO, 1999) habiéndose obtenido registros de su presencia en: Europa: Bélgica, Alemania, Hungría, Países Bajos, España, Islas Canarias, Reino Unido, Inglaterra, Líbano. Asia: Bangladesh, China, India, Indonesia, Irán, Japón, Nepal, Pakistán, Filipinas, Sri Lanka. África: Burundi, Egipto, Kenya, Libia, Reunión, África del Sur, Zambia, América del Sur: Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Perú, Uruguay. América Central y Caribe: Costa Rica, México. Oceanía: Australia, Nueva Guinea. América del Norte: México, USA.

*R. solanacearum* a partir de 1972, se reconoció como un organismo cuarentenario para la Unión Europea, donde la incidencia de la pudrición castaña en papa produjo pérdidas importantes (Elphinstone, 1996; Janse, 1996). A partir de su detección, las medidas de manejo son muy severas prohibiéndose durante 4 años el cultivo de plantas hospederas, recomendándose la eliminación de malezas hospedantes y plantas voluntarias (Anonymous, 1998; 2006). Entre los más importantes se citan bananero (*Musa paradisiaca*); berenjena (*Solanum melongena*); papa (*Solanum tuberosum*); pimiento (*Capsicum annum*); tabaco (*Nicotiana tabacum*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) (Gotuzzo, 1975), también plátano, jengibre, y algunas especies de árboles y arbustos de importancia económica (Hayward, 1991).

En el estado de Mérida, Venezuela, la marchites bacteriana producida por la raza 3, biovar 2-A se presenta en las principales zonas productoras de papa. Estas cepas de *R. solanacearum* se adaptaron al clima frío y la enfermedad se origina en la semilla. Cuando hay alto potencial de inóculo y altas temperaturas favorece la infección incluso puede afectar tomates (French, 1994).

En Estados Unidos, *R. solanacearum* fue aislada de geranios importados desde Guatemala. Hasta ese momento, el geranio era un hospedante natural de *R. solanacearum* raza 1 (Hammer y Rane, 1999; Hayward, 1964; Strider *et al.*, 1981), pero se ha identificado también la raza 3 (Williamson *et al.*, 2002). La raza 3, biovar 2 es considerado un patógeno cuarentenario y un probable agente del agroterrorismo, por lo que existen estrictas normas de seguridad en ese país (Alvarez *et al.*, 2008).

En el estado de Amazonas, Brasil, la bacteria se identificó en las siguientes especies vegetales: *Capsicum annum*, *C. chinensis*, *C. frutescens*, *Cucumis sativus*, *Heliconia* sp, *Solanum lycopersicum*, *Malanthera discoidea*, *Moringa oleifera*, *Musa* sp, *Solanum melongena*, *S. gilo* y *S. nigrum* (Coelho Netto *et al.*, 2004)

En el año 2005 la incidencia del marchitamiento bacteriano causado por *R. solanacearum*, provocó elevadas pérdidas en viveros de eucaliptos en el municipio de Prata, Brasil (Alfnas *et al.*, 2006). Su primera ocurrencia databa de 1980, cuando Sudo *et al.* (1983) describieron la enfermedad en plantines de eucaliptos (*Eucaliptos grandis* Hill ex Maiden) y bracatinga (*Mimosa scabrella* Penth).

En el año 2006 se determinó marchitamiento bacteriano en plantas de tomate en la provincia de Canakkale, Turquía. La bacteria se identificó como *R. solanacearum* por características bioquímicas, inmunofluorescencia, PCR en tiempo real (Ustun, 2007).

En el 2007 el agente causal del marchitamiento se aisló de plantas de tomate en el sur de Cerdeña, Italia. Ese año se realizaron monitoreos en los que se comprobó que el porcentaje de plantas marchitas fue entre 20 a 70 % (Loreti *et al.*, 2007).

Entre los huéspedes hay malezas hospederas por ejemplo *Solanum carolinense* en USA, *Phyllanthus niruri* y en Filipinas, *Portulaca oleracea* (Hayward, 1991). Se estableció la presencia de la raza 3 en otras especies de la familia solanáceas como *Solanum nigrum* y *Solanum dulcamara*. Malezas no pertenecientes a la familia solanáceas, y a menudo asintomáticas se encontraron infectadas con la raza 3 como *Brassica* spp, *Cerastium glomeratum*, *Drymaria cordata*, *Polygonum capitatum*, *Chenopodium album*, *Melampodium perfoliatum* y *Urtica dioica* (Jense *et al.*, 2002, 2004; NPAG, 2001b; Pradhanang, *et al.*, 2000 a b; Strider, *et al.*, 1981; Wenneker *et al.*, 1999).

En 1919, Zeman citó esta bacteria por primera vez en Argentina en cultivos de tomate y banano, (Gotuzzo, 1975). En el noreste de Argentina, se detectó por primera vez en Corrientes en cultivos de tomate a campo (Mazzanti de Castañón, 1972) y se determinó el agente causal de esta enfermedad como *Ralstonia solanacearum* raza 1 biovar 3 (Colombo *et al.*, 1996). Durante la primavera de 1990, se observó en plantas de tomate en invernaderos de la zona hortícola de Santa Fe, la aparición de un marchitamiento repentino de plantas aisladas. Los aislamientos, análisis bioquímicos y de patogenicidad permitieron identificar la bacteria como *Pseudomonas solanacearum*. En la provincia de Tucumán la incidencia de *Ralstonia solanacearum* en tomate aumentó a partir de la campaña 1998 en invernadero y campo (Hongn, 2002). Durante el año 2005 aparece el marchitamiento bacteriano en la provincia de Jujuy y Salta (Alcoba, 2005).

Durante la temporada 1978-1979 se observó por primera vez en el sudeste bonaerense, la enfermedad del marchitamiento de plantas y pudrición de tubérculos en cultivos de papa para consumo, causada por *Pseudomonas solanacearum*. El activo movimiento de papa para siembra que se producía entre las distintas zonas productoras de la Argentina y desde el exterior llevó a la introducción involuntaria de nuevas enfermedades, como fue el caso del marchitamiento bacteriano. En 1980-1981 se comprobó la presencia de *P. solanacearum* raza 3 biovar 2, a través de test de patogenicidad y pruebas bioquímicas (Melegari y Escande, 1984). Años más tarde, en 1999, en la provincia de Tucumán, se observaron síntomas de marchitamiento y necrosis de los tallos en el cultivo de papa que terminaba con la destrucción de tubérculos. Los estudios permitieron identificar el patógeno como *Pseudomonas solanacearum*, raza 3 (Melegari, *et al.*, 2009).

Carrera (1972) cita por primera vez a *Ralstonia solanacearum* en el cultivo de berenjena (*Solanum melongena*), en Florencio Varela, Provincia de Buenos Aires Argentina.

El cultivo de tabaco es gravemente afectado por el marchitamiento bacteriano. Este patógeno se lo ha encontrado causando daño en cultivos de tabaco en distintas localidades de la provincias de Jujuy durante los años 2005-2008 (Alcoba, 2005). En la provincia de Salta y Misiones, se hicieron monitoreos durante el año 2008 en las principales zonas productoras de tabaco para conocer el estado sanitario de la zona, encontrándose *R. solanacearum* afectando los cultivos (Mercado Cárdenas, 2008, Dummel, 2008).

La primera cita de *Ralstonia solanacearum* en *Arachis hypogaea* (maní) fue en Toldos, provincia de Salta, en el 2005 (Alcoba, 2005). Y en cultivos de *Glycine max* (L.) Merrill (soja) asociada a la podredumbre blanda en semillas, en 1996 (Ploper, 1996).

*R. solanacearum* se manifiesta de manera diferente según los huéspedes, distribución geográfica, patogenicidad, relaciones epidemiológicas y propiedades fisiológicas. Cepas patogénicas específicas de ciertos hospedantes pueden evolucionar en determinadas partes del mundo y no en otras, y se requiere que confluyan factores ambientales y biológicos para la expresión de síntomas en hospedantes susceptibles (Hayward, 1991).

La persistencia de *R. solanacearum* en el suelo ocurre cuando sobrevive en forma latente en los residuos de cosecha infectados. Además este patógeno puede ser transportado por material vegetativo de propagación. Según informes de EPPO (2004) la principal vía de propagación del patógeno en papa es a través de semillas infectadas y los tubérculos con infección latente son los medios más probables de introducir la bacteria en nuevas áreas (Hayward, 1991).

Altas poblaciones de patógeno en la superficie del suelo, pueden infectar plantas después de una lluvia o durante la misma. La evidencia más directa de una fase epifítica y la transmisión aérea es mediante la salpicadura del agua de lluvia considerándose entonces una importante fuente de propagación (Hayward, 1991).

La bacteria se disemina por el suelo y el agua de riego. En Europa muchos informes demostraron que *R. solanacearum* biovar 2 tiene la habilidad de sobrevivir en los canales de los ríos a temperatura bajas en Reino Unido y Países Bajos (Elphinstone, 1998; Janse, 1998 a, b). En trabajos recientes la bacteria fue aislada de cauces de ríos de España y Escocia. En la mayoría de estos países los síntomas de la enfermedad se observaron en plantas susceptibles después del riego con agua contaminada (Caruso, 2004).

La bacteria penetra por heridas producidas en raíces, tallos o estomas. Se mueve por los vasos en un proceso acelerado por las temperaturas altas. La velocidad de movimiento también depende de la parte de la planta que es colonizada, por ejemplo en plantas de tabaco la bacteria penetra más rápidamente por el tallo que por raíces (Ono *et al.*, 1984).

La enfermedad es severa con temperaturas entre 24 a 35° C. Raramente aparece en climas templados, cuando la temperatura, está por debajo de 10° C. Existen requerimientos térmicos diferentes para el óptimo desarrollo de la enfermedad según las diferentes razas. Las temperaturas bajas influyen en la expresión del síntoma (Nyangeri *et al.*, 1984; Swanepol, 1990).

Alta humedad en el suelo, y períodos de tiempo lluviosos están asociados con una mayor severidad. La humedad de la tierra es uno de los factores principales para la reproducción y supervivencia del patógeno; la favorecen rangos entre 0,5-1,0 bar y la inhiben rangos entre 5 a 15 bares (Nesmith y Jenkins, 1985).

Los síntomas según los hospedantes son los siguientes:

En papa: el primer síntoma visible es el marchitamiento, la planta no se recupera y muere. Los síntomas de la enfermedad ocurren mediante el desarrollo de una coloración castaña en los tallos a unos pocos centímetros del nivel del suelo, y las hojas adquieren color bronceado. Puede producir epinastia de los pecíolos. En los tubérculos los síntomas pueden o no ser visibles según el estado de desarrollo de la enfermedad. Cuando se cortan los tubérculos enfermos se observa un bronceado y una necrosis eventual del anillo vascular. Un

exudado cremoso fluido normalmente aparece en la superficie del anillo vascular después de unos minutos de cortar (EPPO, 2004)

En tomate: Las hojas más jóvenes son las primeras que manifiestan síntomas de marchitamiento, normalmente en el momento más caluroso de día. Si las condiciones ambientales son favorables para el patógeno la planta entera se marchita rápidamente. Los tejidos vasculares del tallo muestran una coloración castaña y, al cortar, se observa exudado de color amarillo o blanco (McCarter, 1991). La planta genera raíces adventicias a lo largo del tallo como defensa al déficit hídrico provocado por la obstrucción de los vasos (Gotuzzo, 1975).

En tabaco: uno de los síntomas principales es el marchitamiento unilateral con amarillamiento prematuro de las hojas. Estas pueden mostrar síntomas de marchites de un lado de la planta o incluso media hoja. Como en el tomate, los tejidos vasculares adquieren coloración castaña y las raíces primarias y secundarias pueden manifestar coloración oscura a negro (Echandi, 1991).

En banana: el síntoma lo expresan las hojas más jóvenes que se tornan de color verde pálido o amarillas y marchitas. En una semana se pueden marchitar todas las hojas. Los pseudotallos exhiben color castaño en el sistema vascular. Las frutas inmaduras de las plantas infectadas adquieren color amarillo y se produce una pudrición que afecta la pulpa formando una cavidad; cuando hay infecciones tempranas, o antes de la floración, hay desarrollo anormal del racimo y algunas plantas no producen racimos (De Olivera e Silva *et al.*, 2000).

Es una bacteria Gram-negativa, no fluorescente. Si bien las colonias no son fluorescentes pueden presentar un pigmento castaño en medios de cultivo complejos (Denny y Hayward, 2001). No hidroliza gelatina o lo hace muy débilmente, ni almidón, reduce nitratos, produce gas, oxida glucosa, no crece a 4° C o a más de 40° C, no crece a pH 4 o 9. Es oxidasa y catalasa positiva (EPPO, 2004). *Ralstonia solanacearum* es un bacilo móvil de 0,5-0,7 µm x 1,5-2,5 µm con flagelo polar (uno o cuatro cuando se presentan), aeróbicos estrictos.

La bacteria se multiplica fácilmente en el hospedante pero es de lento crecimiento *in vitro*, en relación con otros patógenos bacterianos. Pierde fácilmente patogenicidad en medios de cultivos (French *et al.*, 1995). Sin embargo, el organismo se puede mantener por años en agua destilada estéril a temperatura ambiente (Shew y Lucas, 1991).

Kelman (1954) utilizó el medio de cultivo Tetrazolio (TTC) para identificar colonias de *R. solanacearum* virulentas, mutantes avirulentas y otras bacterias. Las colonias virulentas o “*wild type*” son de aspecto fluidas (mucoideas) redondas, blancas y levemente rojas en el centro de la misma, mientras que las “*mutantes*” no son fluidas, son traslúcidas, redondas, y presentan una coloración rojo fuerte con un borde angosto azulado.

*R. solanacearum* fue categorizada como *Pseudomonas* no fluorescente y luego se asignó al género *Burkholderia*. En 1992 Yabuuchi *et al* (1995) transfirieron siete especies de bacterias, incluyendo a *P. solanacearum* al grupo II de homología del ARNr.

Una nueva clasificación ubicó este agente en el género *Ralstonia* con base en los datos de análisis filogenéticos de la secuencia de nucleótidos del gen 16S ARNr, hibridación del ARNr-ADN, análisis de lípidos celulares o de ácidos grasos y las características fenotípicas del mismo grupo, donde incluyeron la especie *Ralstonia solanacearum*. El género *Pseudomonas* se limitó exclusivamente a las especies fluorescentes (Grupo I), las fitopatógenas no

fluorescentes *Acidovorax*, al grupo III y *Burkholderia*, al grupo II. (Denny y Hayward, 2001; Yabuuchi *et al.*, 1992, 1995).

Durante las últimas tres décadas se ha utilizado un sistema binario que tiene dos enfoques diferentes. Ésta diferencia hizo hincapié en la afinidad del hospedante y el establecimiento de razas y el uso de propiedades bioquímicas como base para la separación en biovars. De esta manera *Ralstonia solanacearum* se clasificó en cinco razas designadas de acuerdo a el rango de hospedantes primario que afecta y cinco biovars basándose en la utilización y/o oxidación de tres alcoholes de hexosas y tres disacáridos (Buddenhagen *et al.*, 1962; He *et al.*, 1983, Hayward, 1964, 1994, Pegg y Moffet, 1971). No hay una estricta relación entre raza y biovar, excepto la raza 3 que le corresponde el biovar 2 y la raza 5 que corresponde al biovar 5 (Tabla 1) (Denny, 2006).

Tabla 1: División de razas de *R. solanacearum* según el rango de hospederos (Denny y Hayward, 2001).

Razas	Hospedante Natural	Biovar
1	Muchas solanáceas, Bananas diploides y malezas de muchas familias	1, 3 y 4
2	Bananas triploides, ciertas heliconias	1 y 2
3	Papa, tomate y raramente otros hospedantes	2
4	Jengibre	3 y 4
5	Mora	5

La caracterización genética ha aumentado enormemente nuestro conocimiento y comprensión en la diversidad, las relaciones, y la evolución del complejo de especies de *R. solanacearum*. Estos estudios han demostrado que hay dos divisiones dentro de *Ralstonia*, el análisis RFLP de una colección mundial de aislamientos fue el primero en comprobarlo (Cook *et al.*, 1989; Cook y Sequeira, 1994) Así la división I contiene todas las cepas caracterizadas como biovar 3, 4 y 5, que en su mayoría pertenecen a Asia y Oceanía. La división II se corresponde al biovar 1 y 2 pertenecientes a América (Denny, 2006). Además Fegan y Prior (2005) plantean la existencia de cuatro grupos genéticos correspondientes a diferentes grupos geográficos. El filotipo I es equivalente a la división I definida por Cook y Sequeira (1994), el filotipo II es equivalente a la división II con procedencia americana, el filotipo III contiene los aislamientos africanos de los biovars 1 y 2T y el filotipo IV contiene cepas de Indonesia de los biovars 1, 2 y 2T además de algunos aislamientos de Australia, Japón y de las especies relacionadas *R. syzygii* y BDB.

Recientemente se identificó una variación del biovar 2. La marchitez bacteriana de la papa en zonas tropicales y subtropicales es causada por el biovar 2A (raza 3) con un fenotipo RLFP grupo 26 en la clasificación de Cook y Sequeira (1994). Sin embargo existe un fenotipo distinto del biovar 2A, que está presente en Chile y Colombia y corresponde al fenotipo RLFP grupo 27. Por último el biovar 2T (a veces también llamado 2N) se encuentra en las áreas tropicales de América del Sur, principalmente Perú y Brasil (Denny y Hayward, 2001).

Para la determinación del biovar 2, fenotipos 2A y 2T se realizan pruebas adicionales con otros azúcares como, ribosa, xilosa, triptofano y tartrato (Hayward, 1994; Hayward *et al.*, 1989, 1991).

Los avances obtenidos con las técnicas de identificación y caracterización de *R. solanacearum* en los últimos años, especialmente con métodos moleculares, han contribuido a aumentar los conocimientos sobre los aspectos evolutivos de este patógeno (Seal y Elphinstone, 1994; Cook y Sequeira, 1994; Martins 2000).

Aunque *R. solanacearum* es una bacteria que ataca a un amplio rango de especies, la dificultad para desarrollar estrategias de control de la enfermedad se atribuyó en gran parte a la falta de conocimientos básicos sobre la ecología y evolución de este patógeno (Cook y Sequeira, 1994).

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiene innumerables aplicaciones en ciencias biológicas, y se utilizó para la identificación de cepas de *R. solanacearum* (Seal *et al.*, 1999). Esta especie bacteriana constituye una unidad cuya taxonomía es compleja, con cepas de una amplia diversidad a nivel fisiológico, serológico, genético y hospedantes. Los primeros trabajos que constituyeron un hito en el estudio de la diversidad genética del patógeno fueron reportados por Cook y colaboradores (1989) y Cook y Sequeira (1994). El análisis a nivel genético de las cepas ofrece la posibilidad de estudiar sus relaciones filogenéticas y evolutivas y proporciona nuevas herramientas para el esclarecimiento de interrogantes como la correlación entre diversidad genética y virulencia (Darrase *et al.*, 1998).

En la interacción planta-patógeno, se identificaron varios genes involucrados, de los cuales algunos son esenciales para conferir lo que se llama compatibilidad básica y otros determinan el rango de hospedantes de las bacterias (Feng *et al.*, 1992).

La virulencia de la enfermedad que causa *R. solanacearum* se define como el resultado de múltiples factores que trabajan en conjunto. La producción de polisacáridos extracelulares (EPS) es importante para el desarrollo de la enfermedad, aunque su mecanismo de acción es incierto. El factor de virulencia más importante para el desarrollo de patogénesis es el EPS1, (polímero compuesto de N-acetil galactosamine, desoxi-L-ácido galacturónico y trideoxi-D-glucosa). Doce genes están involucrados en su biosíntesis. La oclusión y ruptura de los vasos del xilema debido a la alta presión osmótica es lo que probablemente ocasiona el marchitamiento (Agrios, 2005; Huang *et al.*, 1995; Hugouvieux *et al.*, 1996; Schell *et al.*, 1988).

Otro factor de virulencia son las enzimas extracelulares que degradan las paredes celulares de las plantas y aparentemente facilitan la entrada y diseminación de la bacteria. Las células del xilema, floema, corteza y medula adyacentes se desintegran rápidamente, especialmente en plantas herbáceas suculentas (Husain y Kelman, 1958). Los estudios histológicos de plantas de tomate y tabaco, invadidas por la bacteria, revelan la ruptura de las pectinas de la laminilla media y de las paredes celulares. Esta disociación de los tejidos conductores causa el marchitamiento que caracteriza la enfermedad. Las enzimas PME (Pechín metil esterasa) y PPG (poligalacturonasa) fueron encontradas tanto en tejidos de hospedantes enfermos como en filtrados de cultivos de *R. solanacearum* (Husain y Kelman, 1958). También Allen y colaboradores (1991) determinaron la endogluconasa (Egl), y tres poligalacturonasas (PGs), que degradan la pectina, principal componente de la pared primaria de las plantas y de la laminilla media.

*R. solanacearum* produce endo-gluconase, PehA; exo-poly- $\alpha$ -D-galacturonase, PehB y exo-poligalacturonasa, PehC. Las mutantes no poseen PehA, PehB y reducen significativamente la virulencia, lo que demuestra que la actividad de la PG contribuye cuantitativamente al desarrollo de la enfermedad. Cuando la PehA es inactivada, las células bacterianas se vuelven totalmente avirulentas y no producen casi EPS1 (Huang y Allen 1997, 2000; Roberts *et al.*, 1988).

La incompatibilidad entre el hospedante y un patógeno da lugar a la Reacción de Hipersensibilidad (RH) como resultado de un gen de avirulencia en el patógeno y un gen de resistencia en la planta hospedante. Esta técnica fue desarrollada por Klement y colaboradores, en 1964 y facilitó la caracterización de bacterias a través de esta reacción. La

diferenciación de razas de *R. solanacearum* a través de la reacción de hipersensibilidad producida en hojas de tabaco se observa a las 12, 36 y 48 horas siguientes a la infiltración (Lozano y Sequeira, 1970).

La provincia de Corrientes productora de hortalizas por excelencia, supera las 1000 hectáreas de cultivos bajo cubierta además de los cultivos de campo, en distintas regiones de la provincia y el cinturón hortícola de la capital. El cultivo de solanáceas (tomate, pimiento y berenjena) representa el 97 % de la producción.

Entre las distintas enfermedades que afectan estos cultivos el marchitamiento bacteriano producido por la bacteria *Ralstonia solanacearum*, es una de las más importantes. Constituye un factor de riesgo para la producción y las pérdidas llegan hasta un 20 % de las plantas en lotes afectados (Colombo *et al.*, 2000).

En el país, la información sobre el agente causal, su sistemática y hospedantes es escasa. Entre los antecedentes se determinó la presencia de la raza 1, biovar 3 mediante pruebas bioquímicas en tomate (Colombo *et al.*, 1996). No hay antecedentes de identificación mediante estudios moleculares. La información se remite a pruebas de patogenicidad y reacción de hipersensibilidad en ausencia de cepas controles que permitirían una mayor certeza sobre las razas y/o biovares identificados.

En los últimos dos años, se observaron variaciones en la sintomatología según hospedantes y especies, lo que hace suponer la presencia de una población heterogénea del agente causal aunque no existen estudios que lo certifiquen. No obstante, conocer la variabilidad patogénica del agente causal en las diferentes zonas productoras, será útil para implementar estrategias de manejo.

La determinación de patogenicidad es fundamental en la identificación de bacterias fitopatógenas. Algunos grupos de bacterias sólo se individualizan por este atributo, ya que sólo producen enfermedad en determinadas especies de plantas. La reacción de hipersensibilidad en tabaco se usa como herramienta de diagnóstico (Goszczyńska *et al.*, 2000).

Los síntomas de marchitamiento de las plantas causado por *R. solanacearum* se pueden confundir con los inducidos por otros agentes patógenos tales como *Fusarium* sp., *Verticillium* sp., *Clavibacter michiganensis* pv *michiganensis*, con daños mecánicos o con los causados por insectos en la base del tallo. Una prueba de diagnóstico rápido lo constituye el test de flujo bacteriano, para observar la movilidad de las bacterias en materiales frescos.

En regiones donde los cultivos son afectados por el patógeno, la posibilidad de diseminación es múltiple, ya que es un habitante de suelo y tiene la capacidad de persistir en él, aún sin el hospedante específico. La persistencia va a depender de la raza presente, lo que dificulta la aplicación de medidas de control eficientes (Colombo, 2000).

## **OBJETIVO**

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la población de *R. solanacearum* en cultivos de solanáceas del noreste argentino.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar marchitamiento bacteriano en tomate y otras solanáceas cultivadas en la región a través de síntomas.
- Aislar la bacteria y estudiar las características morfológicas de las colonias.
- Confirmar patogenicidad y relacionar tipo de reacción con huésped y raza a la que pertenece.
- Determinar biovares de los aislados de *R. solanacearum*.
- Identificar cepas de *R. solanacearum* obtenidas de cultivos de solanáceas mediante técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### RELEVAMIENTO DE PLANTAS CON SINTOMA DE MARCHITAMIENTO

Los estudios del agente causal del marchitamiento bacteriano se desarrollaron en el laboratorio de Fitopatología Hortícola de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Bella Vista.

**Identificación por síntomas:** se monitorearon cultivos comerciales bajo cubierta y campo de Bella Vista, Colonia 3 de Abril, Colonia Progreso, Santa Lucía, Lavalle, Goya, Empedrado, Saladas, Tata Cuá, Gobernador Martínez, entre otras localidades y departamentos de la provincia de Corrientes. Se tomaron muestras de plantas con marchitamiento para estudios de laboratorio para confirmar los síntomas visuales. También se tomaron muestras de malezas asintomáticas de invernaderos infestados con *R. solanacearum*, entre ellas, *Solanum sisymbriifolium*, *Solanum sp.*, *Portulaca oleracea*, *Amaranthus quitensis*, y se incorporaron materiales recibidos para el Servicio de Diagnóstico del Laboratorio de Fitopatología Hortícola de la EEA procedentes de la provincia y provincias vecinas que se detallan en la tabla 2.

Para comprobar la presencia del agente causal del marchitamiento en plantas colectadas se observaron síntomas macroscópicos como: emisión de raíces adventicias en tallos, coloración en los vasos y sistemas de conducción, desarrollo positivo del test de flujo y observaciones microscópicas de la emisión de zooglea bacteriana en agua sobre portaobjeto de cortes de tallo y raíces de plantas con síntomas.

Tabla 2: Especies y procedencia de materiales con marchitamiento

<b>Nº Muestra</b>	<b>Provincia – Localidad</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Variedad</b>
1	Misiones	Pimiento	Margarita
2	Misiones (colección del laboratorio en agua año 2002)	Tomate	Colibrí
3	Corrientes - Bella Vista	Berenjena	Morocho
4	Corrientes - Bella Vista	Berenjena	Barcelona
5	Corrientes - Bella Vista	Berenjena	Morocho
6	Misiones-Aristóbulo del Valle	Tomate	S.D.
7	Corrientes -Goya	Tomate	Elpida
8	Entre Ríos- Villaguay	Tomate	S.D.
9	Corrientes -Goya	Tomate	Coloso
10	Corrientes - Bella Vista	Tomate	Nixe
11	Corrientes - Bella Vista	Tomate	Dominique
12	Corrientes - Bella Vista	Berenjena	Morocho
13	Corrientes - Bella Vista	Berenjena	Morocho
14	Corrientes - Bella Vista	Tomate	Badro
15	Corrientes -Tatacua	Tomate	Badro
16	Corrientes -Tatacua	Tomate	Badro
17	Corrientes - Bella Vista	Berenjena	Morocho
18	Misiones	Pimiento	Margarita
19	Corrientes - Bella Vista	Berenjena	Morocho
20	Corrientes - Bella Vista	Berenjena	Morocho
21	Buenos Aires	Tomate	RS 96-10
22	Corrientes -Saladas	Tomate	Elpida
23	Corrientes - Bella Vista	Berenjena	Barcelona
24	Corrientes - Bella Vista	Tomate	Elpida
25	Corrientes - Bella Vista	Tomate	Nixe
26	Corrientes - Bella Vista	Berenjena	Morocho
27	Corrientes -Empedrado	Tomate	Tommy
28	Corrientes - Santa Lucia	Tomate	Cacique
29	Corrientes -Lavalle	Tomate	Dominique
30	Misiones -25 de mayo	Tomate	Don José
31	Misiones -25 de mayo	Tomate	Campeón
32	Corrientes - Bella Vista	Berenjena	Mulata
33	Corrientes - Bella Vista	Tomate	Nixe
34	Corrientes - Bella Vista	Tomate	Nixe
35	Corrientes - Lavalle	Tomate	Dominique
36	Corrientes -Gob. Martínez	Tomate	Antilla

SD: sin datos

## **AISLAMIENTO DE LA BACTERIA**

Se obtuvieron aislados de tomate, pimiento y berenjena de segmentos de tejidos de raíces y tallos de los huéspedes con síntomas de marchitamiento. Se lavaron muy bien los órganos seleccionados para aislar el agente con agua de grifo durante un tiempo. Luego se desinfectaron un minuto con hipoclorito de sodio al 0.5 % y se enjuagaron en agua destilada estéril 3 veces consecutivas, posteriormente se agregó otra desinfección de un minuto en alcohol 70 % y tres enjuagues con agua estéril para remover los restos del desinfectante.

Los fragmentos desinfectados se colocaron en tubos de ensayo con agua destilada, para facilitar la salida del flujo bacteriano (Goszczyńska *et al.*, 2000). En los casos donde el material vegetal no era fresco se maceraron fragmentos de tejido en un mortero con agua destilada estéril (atendiendo la disminución de la movilidad de las bacterias), esta metodología también se utilizó en las muestras de malezas asintomáticas. La siembra se realizó en placas de petri, con un ansa de 5 µl, en el medio de cultivo tetrametil-trifenil-tetrazolium (TTC) cuya composición es la siguiente: peptona 10 g, caseína hidrolizada 1 g, glucosa 5 g, agar 17 g, tetrametil-trifenil-tetrazolium 0.005 %, agua destilada 1000 mL (Kelman, 1954). Las placas sembradas se incubaron en estufa a 28° C por un periodo de 2 a 3 días.

De las hojas de berenjena se hicieron pequeños cortes de las nervaduras de las hojas y pecíolo, previa desinfección y fueron sembradas en APG, para descartar la presencia de *Verticillium spp.*, que produce síntomas similares a los provocados por *Ralstonia*.

## **IDENTIFICACIÓN DE LA COLONIA BACTERIANA**

Luego de la incubación, se seleccionaron las colonias que presentaron color, forma, relieve, opacidad en el medio de TTC, según la descripción de Kelman (1954).

## **PRUEBA DE KOH, OXIDASA Y HUGH-LEIFSON**

Una vez seleccionadas las colonias bacterianas en medio TTC, se purificaron en Agar Papa Glucosado (APG) que se preparó según el siguiente protocolo: tubérculos de papa cortados en cubitos de 200 g, glucosa 8 g, agar 17 g, agua destilada 1000 mL (Shurtleff, 1997). A las 24 h con cultivos puros, se realizó el test de Gregersen con hidróxido de potasio (KOH al 3 %) (Gregersen, 1978). Para el test se coloca una gota de hidróxido de potasio sobre un portaobjetos en la que deberá desleírse una fracción de colonia pura llevada del medio de cultivo con un anza. La reacción es positiva (+) y la bacteria es Gram (-) cuando al levantar con el anza desde la colonia se forma un hilo sin romperse, la suspensión se torna viscosa. Si la reacción es negativa (-) son Gram (+), no se forma el hilo viscoso ya que hay resistencia de las paredes celulares de las bacterias a la acción del hidróxido y resisten la solubilización.

Como prueba adicional se realizó la prueba de oxidasa, para seleccionar bacterias del género *Ralstonia* y *Pseudomonas sp.*, esparciendo las colonias sobre papel de filtro humedecido con dicloro-tetra metil-para-fenilendiamina al 1 %. La reacción es positiva cuando las colonias entre los 30 a 60 segundos se tornan de color púrpura oscuro (Goszczyńska *et al.*, 2000).

Para la determinación del metabolismo oxidativo-fermentativo de las bacterias gram-negativas se utilizó la reacción de Hugh-Leifson. Medio base: peptona 2 g, Cloruro de sodio 5

g, Fosfato bibásico de potasio 3 g, Azul de bromotimol 0,03 g, glucosa 10 g, Agar 3 g, agua destilada 1000 mL. Se ajusta el pH a 7-7,5. Para la reacción se utiliza 8 mL del medio base en tubos de ensayo, se esteriliza a una atmósfera de presión por 15 minutos. Se utilizan dos tubos por cepa, uno de ellos se cubre la superficie con vaselina estéril, para crear condiciones de anaerobiosis, se siembra las cepas por punción hasta más de la mitad del tubo. Se incuban en estufa a 28°C y a partir del cuarto días se puede observar la producción de ácido con la evidencia del viraje del color azul a amarillo. El cambio de color en el tubo sin vaselina indica un metabolismo oxidativo, la bacteria es gram-negativa.

### **EVALUACIÓN DE PATOGENICIDAD**

Se sembraron semillas de tomate (Río grande), berenjena (Morocha), tabaco (Criollo Correntino) y pimiento (Margarita) en macetas múltiples con un sustrato de tierra con mantillo y estiércol, desinfectado con bromuro de metilo (50 gramos por metro cuadrado). A los 30-35 días de la siembra, se transplantaron a macetas de 14 centímetros de diámetro y se llevaron a invernaderos plásticos regándolas diariamente.

A partir de los cultivos puros se preparó una suspensión bacteriana en agua destilada estéril en una concentración de  $1 \times 10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup>, que se verificó con espectrofotómetro® en una longitud de onda de 600 nm (® BAUSCH LOMB modelo 340).

Cuando las plantas de tomate, pimiento y berenjena tenían la cuarta o quinta hoja desarrollada, se inocularon según la técnica de Winstead y Kelman (1952). Esta técnica se ejecuta por punción con jeringa estéril® en la axila de la segunda o tercera hoja extendida con la que se deposita una gota de suspensión bacteriana (® Coronet SEAISEME S. A. 1 mL y aguja 25G x 5/8" ®Bremen SEAISEME S. A.) (Figura 1).

El diseño fue completamente al azar con cuatro repeticiones y los testigos fueron sometidos a la misma inoculación pero con agua destilada estéril. Las plantas inoculadas se conservaron en cámara húmeda en invernadero durante 48 horas y permanecieron en el mismo hasta la expresión de síntomas.

Se observó diariamente la manifestación de síntomas en los distintos huéspedes. La evaluación se realizó según la siguiente escala: 1: sin síntomas, 2: una hoja marchita, 3: dos o tres hojas marchitas, 4: cuatro o mas hojas marchitas y 5: planta muerta (He *et al.*, 1983).

Se caracterizaron las razas de los aislados de acuerdo a la expresión de los síntomas y al hospedante susceptible en que se manifestó según la clasificación de Denny y Hayward (2001).



Figura 1. Inoculación por punción

### REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD EN TABACO

Se sembraron semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) en macetas múltiples, en un sustrato de tierra mezclada con mantillo y estiércol, desinfectado con bromuro de metilo (50 gramos por metro cuadrado); a los 30-40 días se transplantaron en macetas de 14 cm de diámetro. Las plantas se llevaron a invernaderos con cobertura plástica bajo condiciones de humedad y temperatura controladas.

Las plantas de tabaco con cuatro a seis hojas expandidas se inocularon por infiltración con jeringa® en los espacios internervales según la técnica de Lozano y Sequeira (1970) (Figura 2), que localiza la suspensión en el parénquima de empalizada. Se inocularon dos hojas por planta y dos plantas por cepa (se evaluaron 4 hojas /cepa) (Norman y Yuen, 1998; Gómez *et al.*, 2004). Se observó el desarrollo de la reacción de hipersensibilidad descrita por Janse (1991) (tabla 3), durante las siguientes 12, 36 a 48 horas de la infiltración.



Figura 2. Infiltración de suspensión bacteriana en hojas de tabaco.

Tabla 3: Determinación de razas en *Ralstonia solanacearum* (Janse, 1991)

Raza	1	2	3
Reacción en tomate/ Berenjena	Marchitamiento	Sin reacción	Marchitamiento
Tabaco (Tallo Inoculado)	Marchitamiento	Sin reacción	Sin reacción
Tabaco inoculado en hojas, (test de hipersensibilidad HR)	Necrosis (48 hs) y marchitamiento (7 a 8 días)	HR (12 – 24 hs)	Clorosis (2 – 8 días)
Banana	Sin reacción	Marchitamiento	Sin reacción

### CARACTERIZACION BIOQUÍMICAS

La caracterización bioquímica se basó en la técnica de Hayward (1964), que determina la producción de ácidos a partir de 3 disacáridos (celobiosa, lactosa y maltosa) y la oxidación de tres alcoholes de hexosa (sorbitol, dulcitol y manitol), para diferenciar biovares (Tabla 4).

Se utilizó el medio base de Hayward de color verde oliva compuesto por peptona (1 g), fosfato diácido de amonio (1 g), cloruro de potasio (0,2 g), sulfato de magnesio heptahidratado (0,2 g), agar (3 g), azul de bromotimol (0,08 g), agua destilada (1 L) y pH ajustado a 7 (Hayward, 1964). Se distribuyeron alícuotas de 5 mL en tubos de ensayo y se esterilizaron en autoclave a 121°C y a 1 bar de presión durante 15 minutos. Se prepararon los carbohidratos en solución acuosa al 10 % y se añadieron al medio base a 55-60° C a través de filtros de membranas® (® AcetatePlus Filter GAMAFIL S.A. tamaño de poros de 0,22 µm) hasta lograr una concentración final de 1%. Las cepas bacterianas se sembraron por punción en el tercio superior del tubo contrastando con los testigos no inoculados.

Se sembraron tres tubos de cada aislado de 24 horas en agar papa glucosado y se incubaron en estufa a 28° C. Se observaron a 1, 3, 7, 14, 28 días desde inoculación para determinar si cambió de color verde oliva a amarillo desde la parte superior lo que indicaría reacción positiva (Denny y Hayward, 2001).

Tabla 4: Caracterización de biovares de *R. solanacearum* (Hayward, 1964)

Utilización de	Biovar				
	1	2	3	4	5
Maltosa	-	+	+	-	+
Lactosa	-	+	+	-	+
Celobiosa	-	+	+	-	+
Mannitol	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	-
Dulcitol	-	-	+	+	-

### REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para identificar las cepas de *R. solanacearum* se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el protocolo de PCR biovar-específico (Ito *et al.* 1998; Pastrik *et al.*, 2002; Seal *et al.*, 1992). Este set de primers se utiliza para diferenciar cepas pertenecientes a la división I (biovar 3, 4, 5) y división II (biovar 1 y 2), tal como se definió originalmente con el análisis de RFLP (Cook *et al.*, 1989) y secuencia de 16S ADNr (Taghavi *et al.*, 1996).

**Preparación de ADN:** Una muestra constituida por una suspensión de colonias bacterianas en 200  $\mu$ l de agua destilada se centrifugó 3 minutos a 14000 rpm. Al finalizar se desechó el sobrenadante. Se agregó 200  $\mu$ l de CLNa 1M al pellet recuperado y centrifugó dos minutos a 14000 rpm, se descartó el sobrenadante y se agregó 200  $\mu$ l de agua estéril al sedimento centrifugándose nuevamente durante dos minutos a 14000 rpm. El pellet formado se resuspendió en 150  $\mu$ l de una solución acuosa de resina al 6 %. Esta mezcla de células y resina se llevó a un agitador® y se incubó a 58° C durante 10 minutos. Al final de ese tiempo se volvió a agitar y se incubó a 99° C durante 8 minutos (Allipi y Aguilar, 1998) (® FBR Industria Argentina).

El volumen total de la mezcla de amplificación para el primer set de primers (RS-1-F/ RS-1-R) fue: 25  $\mu$ L que contenía 1X de PCR buffer; 1,5 nM MgCl<sub>2</sub> 0,1 mM de cada d-NTP; 0,8 uM de cada primer y 1U de Taq polimerasa. Para el segundo set de primers (RS-1-F/ RS-3-R) se usó la mitad de la concentración; 0,4 uM, el resto fueron iguales concentraciones.

La amplificación de ADN se realizó en un termociclador con el siguiente programa: 5 minutos a 95° C (denaturación de ADN), 35 ciclos de denaturación por 30 segundos a 95° C, 30 segundos a 58° C y extinción por 45 segundos a 72° C, y una extensión final por 5 minutos a 72° C (Pastrik *et al.*, 2002).

Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1 % en buffer TBE 0.5X, teñidos con bromuro de etidio al 0,001 % (Figura 3) y visualizados con luz ultravioleta (Figura 4). Se evaluó la presencia de la banda de 718 – 716 pares de bases (pb) fragmentos del gen 16S ARnr generado por la amplificación con los set de primers RS-1-F/ RS-1-R y RS-1-F/ RS-3-R. El marcador utilizado fue de 1000 pb.

Los controles positivos fueron los ADN de cepas de *R. solanacearum* inactivadas por calor procedentes del IVIA. Estas fueron GMI 1000 (Raza1 biovar 3\*), IVIA 1602.1 (Raza 3 biovar 2\*), y PD 511 (Raza 1 biovar 1\*). (\*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrícolas, Moncada, Valencia, España, Dr. Maria M. Lopez).

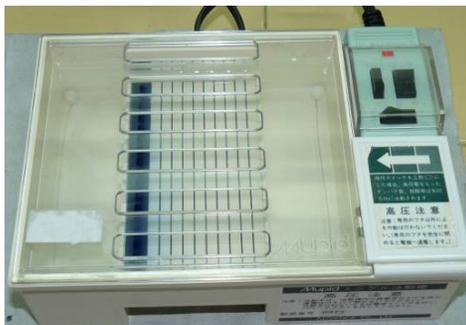


Figura 3. Electroforesis en geles de agarosa

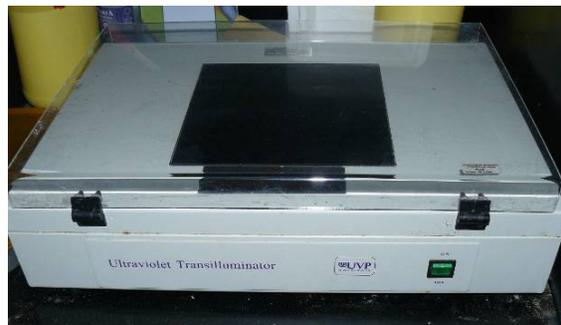


Figura 4. Transiluminador

### CONSERVACION DE LAS CEPAS AISLADAS

Todas las cepas incluidas en este trabajo conforman la colección del laboratorio de fitopatología de hortalizas de la EEA INTA Bella Vista, Corrientes.

Los aislados, para incluir en la colección se sembraron en medio TTC y se repicaron a APG, donde se incubaron 24 h, para obtener una mayor cantidad de células viables. A las 24 h se suspendió una cantidad de cada aislado en tubos eppendorf con 2 mL de agua estéril (Shew y Lucas, 1991). Los eppendorff se sellaron con parafina y conservaron a temperatura ambiente (Figura 5). Periódicamente se deben reaislar para mantener la patogenicidad de los aislamientos.



Figura 5. *R. solanacearum* conservados en tubos eppendorf

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### DESCRIPCIÓN DE LOS SÍNTOMAS OBSERVADOS EN PLANTAS CON MARCHITAMIENTO

De los materiales colectados en los monitoreos en establecimientos de productores y los del Servicio de diagnóstico del laboratorio de fitopatología de la EEA se realizaron aislamientos que se identificaron como *R. solanacearum* por síntomas, test de flujo y características de las colonias en medio TTC.

Los síntomas que produce la bacteria *R. solanacearum* se pueden confundir con el marchitamiento causado por otros agentes patógenos como *Fusarium* spp, *Verticillium* spp, *Erwinia* spp. o *Clavibacter michiganensis* (EPPO, 2004). No obstante el test del flujo permite una aproximación de diagnóstico tentativo de *Ralstonia* con más certeza (Figura 6) (Goszczyńska *et al.*, 2000) y el diagnóstico definitivo se obtuvo con las técnicas descriptas.

Los síntomas en las plantas de tomate fueron: marchitamiento, coloración castaña y necrosis del tejido medular (Figura 7 y 8). Estos resultados coinciden con los observados por McCarter (1991).

En los materiales de la tabla 1: 10, 14, 15, 16, 25, 33, 34 (todos de tomate) se observaron síntomas atípicos a *R. solanacearum*. Se desarrolló en el exterior de la base de las plantas a pocos centímetros por encima del suelo, una zona oscura con la médula de color marrón, posterior ahuecamiento del tallo y clorosis de las hojas basales que finalizó con el marchitamiento y muerte de la planta. Estos síntomas no fueron observados por otros autores.

En las plantas de berenjena la bacteria produjo marchitamiento, el test de flujo fue positivo y los aislados dieron colonias características en TTC. Los síntomas coinciden con la descripción que diera Palmeter y colaboradores (2006) en Florida. En la muestra 32 se observó necrosis en el cuello y raíz principal además del marchitamiento de la planta. Este síntoma no se presentó en otros materiales. En las hojas se observaba amarillamiento entre las nervaduras alternadas con manchas oscuras, estos síntomas son similares a los causados por hongos patógenos como *Verticillium* spp. Pero en ningún caso se aislaron colonias de hongo, esto permitió aseverar la presencia de *Ralstonia* como agente causal y fue negativa la sospecha de *Verticillium* spp. u otro patógeno fúngico de carácter sistémico.

En el cultivo de pimiento las hojas de las plantas afectadas por la bacteria se mantenían de color verde pero con pérdida de turgencia durante las horas de mayor insolación (Figura 9). Luego la marchitez era permanente como se observó en tomate y berenjena. El tejido vascular de la parte baja del tallo presentó una coloración marrón. Momol y colaboradores (2008) que encontraron los mismos síntomas, aseguran que pueden confundirse con daños por *Phytophthora* sp. Sin embargo, el test del flujo positivo orientó el diagnóstico presuntivo a la infección por *R. solanacearum*.

La marchitez bacteriana del pimiento se presenta en focos asociados a la acumulación de agua en zonas bajas del invernadero. Las muestras 1 y 18 de pimiento se obtuvieron de zonas bajas de invernaderos (con anegamiento temporario). Los lomos expuestos de las canaletas de invernadero también presentaron el mayor porcentaje de plantas muertas en coincidencia con la observación de Momol y colaboradores en invernaderos en Florida, USA (2008). Estos autores también advirtieron que la enfermedad era más importante en cultivos implantados en suelos calcáreos. Al respecto se reciben numerosas muestras para diagnóstico que provienen de la provincia de Misiones con suelos ácidos con pH 5,0-5,5. En este caso, la práctica más común que realizan los productores de esa provincia es el encalado de los

suelos, considerado (el hidróxido de calcio) un desecante que disminuye la humedad para controlar enfermedades. En el caso de esta bacteria, sin duda se logra un efecto contrario por la elevación del pH que provocan.

Las malezas coleccionadas de invernaderos de tomate infectados con *R. solanacearum* no presentaron síntomas de marchitamiento (asintomáticas) y los aislamientos fueron negativos (Figura 10). No obstante numerosos autores observaron malezas infectadas en las zonas de registro y recolección (Hayward, 1991, Jense *et al.*, 2004; Pradhanang *et al.*, 2000 b; Strider *et al.*, 1981; Wenneker *et al.*, 1999). Cabe aclarar que las malezas coleccionadas de los invernaderos de la zona no pertenecían a las misma especie encontradas por los autores, excepto *Portulaca oleracea* que fue reportada en Filipinas con síntoma de marchitamiento identificada como biovar 3 (Hayward, 1991). En este estudio la recolección de malezas se realizó debido a que éstas se encontraban alrededor de las plantas de tomate con síntomas de marchitamiento provocados por *Ralstonia*.



Figura 6. Prueba del Flujo Bacteriano. Exudado lechoso de raíces cortadas



Figura 7. Necrosis del tejido medular



Figura 8. Clorosis y marchitamiento en plantas



Figura 9. Síntomas en planta de pimiento

### **ANÁLISIS DE LA COLONIA BACTERIANA**

Todos los aislados de este estudio (excepto los de malezas) formaron colonias fluidas, redondas, blancas y levemente rojas al centro en TTC (Figura 11). Estas, incrementaban el tamaño a las 48 horas de incubación a 28° C. Para la identificación de las colonias se tuvieron en cuenta los detalles dados por Kelman (1954). Este autor describió dos tipos de colonias, una muy fluida, lisa, regular y redonda y otra una colonia de apariencia seca, redonda, translúcida y no fluida que es mutante no patogénico. Estas características fueron señaladas en medio de cultivo TTC.

En medio de cultivo Agar papa glucosado las colonias son blancas y muy fluidas, después de 48 a 72 horas es imposible abrir las cajas de petri porqué se pegan las tapas por el abundante crecimiento de la bacteria que se desliza por las paredes de las mismas. Por esta razón hay coincidencia con Kelman (1954) en el uso de medios específicos (TTC) para identificar las colonias verdaderas.

El aislado 6, procedente de cultivos de tomate de Misiones, en medio de cultivo APG desarrolló una pigmentación marrón tenue, brillante y menos fluida que los demás aislados. En medio TTC, fueron también menos fluidas que el resto de aislados.



Figura 10. Colonias en medio de TTC

### ANÁLISIS DE LA REACCIÓN A LAS PRUEBAS DEL KOH, LA ENZIMA OXIDASA Y HUGH-LEIFSON

La prueba de KOH 3 % (Figura 12) y oxidasa fue positivo en las 36 muestras en estudio lo que definió que los 36 aislados eran Gram-negativas y género *Ralstonia* (Gotuzzo, 1978).

El test de Hugh-Leifson fue positivo para todos los aislados (Figura 13), excepto las muestras 30 y 31.

Los aislados obtenidos de malezas asintomáticas no reaccionaron a ninguna prueba. Esto también nos indica que no hubo infección por *R. solanacearum*.



Figura 11. Prueba KOH 3%

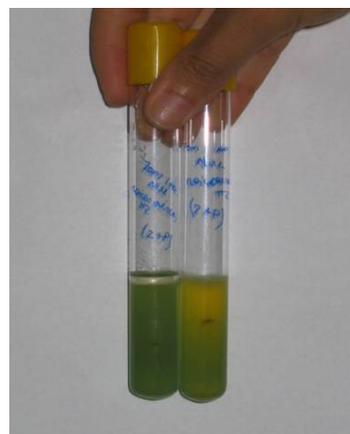


Figura 12. Test Hugh-Leifson

### **PRUEBAS DE PATOGENICIDAD DE AISLADOS DE *R. SOLANACEARUM***

Para cumplir con los postulados de Koch, todas las cepas en estudio se inocularon en el huésped del cual provenía el aislado. Posteriormente se realizaron inoculaciones en forma cruzada entre aislamiento- huésped reproduciéndose en todos los casos síntomas de marchitamiento con variada intensidad. En la Tabla 5 se consignan los resultados de las inoculaciones efectuadas entre las cepas, solanáceas de procedencia y solanáceas inoculadas.

Tabla 5. Patogenicidad de aislados de *Ralstonia solanacearum* de plantas de tomate, pimiento y berenjena inoculados en el mismo huésped, en tabaco y cruzados entre sí.

Aislados	Origen	Patogenicidad testeado sobre			
		Tomate	Berenjena	Tabaco	Pimiento
1	Pimiento	A	A	A	M – A
2	Misiones	N	N	N	N
3	Berenjena	A	A	A	A
4	Berenjena	A	A	A	A
5	Berenjena	A	A	A	A
6	Tomate	A	A	A	M
7	Tomate	A	A	A	M
8	Tomate	A	A	A	M
9	Tomate	A	A	A	B-M
10	Tomate	A	A	A	B-M
11	Tomate	N	N	N	N
12	Berenjena	A	A	A	A
13	Berenjena	A	A	A	A
14	Tomate	A	A	A	B-M
15	Tomate	A	A	A	B-M
16	Tomate	A	A	A	B-M
17	Berenjena	A	A	A	A
18	Pimiento	A	A	A	M-A
19	Berenjena	A	A	A	A
20	Berenjena	A	A	A	A
21	Tomate	A	A	A	B-M
22	Tomate	A	A	A	B-M
23	Berenjena	A	A	A	A
24	Tomate	A	A	A	B-M
25	Tomate	A	A	A	B-M
26	Berenjena	A	A	A	A
27	Tomate	A	A	A	B-M
28	Tomate	A	A	A	B-M
29	Tomate	A	A	A	B-M
30	Tomate	N	N	N	N
31	Tomate	N	N	N	N
32	Berenjena	M	A	A	B
33	Tomate	A	A	A	B-M
34	Tomate	A	A	A	B-M
35	Tomate	A	A	A	M-A
36	Tomate	A	A	A	B-M

Resultados basados en índices de enfermedad 24 h después de inoculado A= Alto (4,1 – 5,0), M= Medio (2,6 – 4,0), B= Bajo (1,1 – 2,5), N= Nulo (1,0).

Diecinueve de los 23 aislados de tomate manifestaron marchitamiento del ápice, con excepción de los aislamientos 2, 11, 30 y 31. Los dos aislados de pimiento y los once de berenjena exhibieron síntomas de marchitamiento inicialmente presente en el ápice de las plantas inoculadas. Estos síntomas indican patogenicidad positiva (Tabla 5).

El aislado 11 produjo estrías longitudinales pardas en el tallo con emisión de raíces adventicias sin marchitamiento. El 2 aislado pertenecía a la colección del laboratorio (año 2002) en agua destilada a temperatura ambiente sin reaislarse lo que explicaría su pérdida de

patogenicidad. Los aislados de tomate 30 y 31 al ser inoculados en el mismo huésped no produjeron síntomas. El test de flujo fue positivo con escasa exudación bacteriana. Estas muestras fueron colectadas por productores y llegaron muy deterioradas al laboratorio y con una alta carga de saprofitos.

Los aislados de tomate inoculados en plantas de la misma especie, bajo condiciones controladas desarrollaron síntomas al segundo día después de la inoculación. Comenzó con epinastia de las hojas más jóvenes seguida de marchitamiento repentino (Figura 14 y 15). Las plantas murieron al cuarto o quinto día posterior a la inyección, los síntomas coincidieron con las descripciones de trabajos publicados (Elphinstone *et al*, 1996; French, 1994 a, 1994b; Hayward y Hartam, 1994; Lemaga, *et al*, 2005). Todas las plantas fueron susceptibles a las inoculaciones con *Ralstonia* pero la expresión y la muerte de plantas fue más rápida en tomate (4 días) que en pimiento, berenjena y tabaco.

El tomate es el cultivo más afectado por *R. solanacearum*, porque tiene una distribución extensa en el mundo y es susceptible a todas las cepas del patógeno (Denny, 2006). Según Thierry (1998) esta susceptibilidad del tomate puede llegar a mantener alta variabilidad de genotipos y agresividad en poblaciones de tomate.

Todos los aislados obtenidos de plantas de berenjena dieron síntomas al ser inoculadas en su propio huésped (Figura 16). Expresaron marchitamiento al quinto día desde la inoculación. Síntomas similares encontraron French y Sequeira (1970). En las hojas más viejas se desarrolló clorosis en los espacios entre nervaduras en forma de “v” y manchas oscuras (Figura 17) síntomas observado en el campo, pero no por otros autores.

Según Janse (1991) el marchitamiento en tomate y en berenjena es producida tanto por Raza 1 como por Raza 3.

La inoculación de los aislados 1 y 18 de pimiento en plantas de la misma especie produjeron oscurecimiento y hasta se estrangulaban los tallos de algunas plantas en la zona inoculada. Estos síntomas se extendieron unos centímetros desde el origen y también presentaron casos de marchitamiento (Figura 18 y 19). En condiciones de alta temperatura (26 a 29° C) las plantas continuaron su crecimiento con acortamiento de entrenudos lo que coincidió con las observaciones de Momol *et al*, (2008) y French y Sequeira (1970). Los síntomas se presentaron entre los 12 y 18 días desde la inoculación

El marchitamiento bacteriano del pimiento en Florida esta relacionado a la raza1 (Momol *et al*, 2001). Estos autores observaron que el pimiento es menos susceptible a la infección por *Ralstonia*. En el noreste de Argentina, hasta el presente solo se tiene referencia de estos dos aislados por marchitamiento bacteriano en pimiento, por lo que coincidimos con los autores que son plantas poco susceptibles a la enfermedad bacteriana y solo aparece bajo ciertas condiciones como suelos anegados y con poca ventilación como las zonas centrales de los invernaderos..

La raza 1 originalmente descrita en tabaco, tomate y malezas de la familia solanáceas (Buddenhagen *et al*; 1962) extendió su rango de hospedantes incluyendo papa, pimiento, berenjena, olivo, geranio, frutilla y eucalipto (Granada y Sequeira, 1975; Kelman y Person, 1961, Cook *et al.*, 1989; Pegg y Moffett, 1971; Sneath y Sokal, 1973).

La raza 3 fue descrita como patogénica de papa y tomate pero de baja virulencia en otros cultivos de solanáceas (Buddenhagen *et al.*, 1962), con un rango estrecho de hospedantes respecto a la raza 1 (Persley, 1986). La mayoría de las cepas no son patógenas en tabaco (Lozano y Sequeira, 1970) aunque se logró con aislados de Perú y Colombia

moderada a alta patogenicidad en tomate, berenjena, *Solanum nigrum* y otros en inoculación artificial (Marín y El-Neshaar, 1993; Swanson *et al.*, 2005; Thurston, 1963).

En cuanto a la prueba de patogenicidad, para detectar razas, utilizando huéspedes susceptibles se encontró que todos los aislados de plantas de tomate provocaron marchitamiento y muerte en plantas de berenjena, manifestaron patogenicidad alta en tabaco, y media-baja en pimiento (Tabla 5)

Los aislados de berenjena produjeron marchitamiento de tomate, tabaco y pimiento, y en todos los casos la patogenicidad fue alta. Es importante aclarar que estas cepas fueron muy agresivas en pimiento, tanto en la rapidez como en la intensidad para producir los síntomas (Tabla 5).

Los aislados 2 y 18 de pimiento produjeron marchitamiento de tomate, berenjena y tabaco en inoculación artificial (Tabla 5).

Si bien todas las plantas fueron susceptibles a las inoculaciones con *Ralstonia*, la expresión y la muerte de plantas fue más rápida en tomate (4 días) que en pimiento, berenjena y tabaco.

En todos los casos la manifestación de patogenicidad coincide con una coloración oscura en la medula de los tallos síntoma típico de *Ralstonia* aspecto en el que coinciden otros autores como McCarter (1991); EPPO (2004) y Denny (2006).

French y Sequeira (1970) consideraron la berenjena como el mejor hospedante para diferenciar la raza 1. En su trabajo obtuvieron cepas de la raza 1 de alta susceptibilidad en América central y América del Sur, como también las determinaron Kelman y Person (1961).

Aunque el tabaco también fue considerado el hospedante diferencial de la raza 1, usado con éxito mucho tiempo en América del Norte, se encontraron diferencias de susceptibilidad referidas a la R1 (French y Sequeira 1970).

Debido a la amplia gama de huéspedes susceptibles (tomate, berenjena, pimiento y tabaco) los aislados de este estudio se consideran miembros de la raza 1.

Igualmente hay algunas observaciones en cuanto a la designación de razas, Cook *et al.* (1989) declaró que el rango de hospedante de *R. solanacearum* es ambiguo y el sistema de razas es confuso para la mayoría de los científicos. En general no ayuda a la evaluación del potencial patogénico de *Ralstonia* (Buddenhagen *et al.*, 1962). Por el contrario este sistema se ha convertido en poco fiable como predictor de la patogenicidad, debido al aumento de la diversidad de complejo de especies, y puede provocar errores en el desarrollo de la patobiología de *Ralstonia*.

Aunque el análisis de la patogenicidad es relativamente fácil, es un método que se sigue utilizando en la actualidad, pero Denny (2006) señala que las inoculaciones artificiales están influenciadas por muchas variables, como el cultivar del hospedante, las condiciones en las que crecen las plantas, la concentración del inóculo y el método de inoculación, esto puede incurrir en errores en la asignación de razas.

Las bacterias reaisladas de plantas marchitas inoculadas tuvieron las características típicas de *R. solanacearum* en medio TTC. No se observaron síntomas en las plantas testigo.



Figura 13-14 Patogenicidad en plantas de tomate. Síntomas de marchitamiento



Figura 15. Marchitamiento en plantas de berenjena inoculadas.



Figura 16. Clorosis internerval en berenjena



Figura 17. Estrangulamiento en la zona inoculada en plantas de pimiento



Figura 18. Mancha oscura en la zona inoculada en pimiento

### REACCION DE HIPERSENSIBILIDAD

Ninguno de los aislados incluidos en este estudio produjo reacción típica de hipersensibilidad. En base a la reacción en las hojas de tabaco, se agruparon en grupos I y II considerando la descripción de Lozano y Sequeira (1970).

El grupo I (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 32, 33, 34) inicialmente provocó plasmólisis del tejido a las 24- 36 h de infiltración (Figura 20). El área inoculada se volvió más oscura con deformación de la hoja y clorosis a las 48 - 60 h al borde de la lesión inicial. Este amarillamiento se generalizó después a toda la hoja con marchitamiento de la planta (Figura 21 y 22). Una semana después de la inoculación los síntomas para la raza 1 fueron dark-brown o reacción necrótica en las áreas infiltradas coincidiendo con la observación de Lozano y Sequeira (1970). Sólo hubo diferencia en el tiempo en que se produjo la reacción.

Las cepas del grupo II (21, 35, 36) a las 24 h de infiltradas provocaron plasmólisis del tejido en la zona inoculada. A las 48 horas, la zona colapsó, se volvió color castaño con distorsión de la hoja (Figura 23). Aparece una clorosis alrededor de la zona inoculada y se extiende más allá de esa zona después de 72 h. La diferencia con el grupo I, es que este no produjo muerte de las plantas.

El grupo II tiene algunas coincidencias con las características de la raza 2 (Lozano y Sequeira, 1970), no obstante Buddenhagen y colaboradores (1962); Thwaites y colaboradores, (2000) demostraron patogenicidad de la raza 2 en bananas triploides y *Heliconias* sp. Las inoculaciones artificiales con aislados de la raza 2 de bananas triploides enfermas fueron moderadamente patogénicas en berenjena, pimiento, papa y tomate (French y Sequeira, 1970; Janse, 1991; Raymundo *et al.*, 2005).

La caracterización de razas a través de reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco puede no ser un método confiable (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 1998). Denny (2006) reafirma que el tabaco no es un buen hospedante para diferenciar razas y en el presente trabajo los resultados de la infiltración en hojas de tabaco también fueron confusos. Los aislados 2, 11, 22, 30 y 31 no provocaron reacción visible en hojas de tabaco. Las áreas infiltradas con agua (controles) no fueron afectadas en ningún caso (Figura 24).



Figura 19. Plasmolisis del tejido inoculado



Figura 20. Reacción dark-brown



Figura 21. Marchitamiento y muerte en plantas de tabaco.



Figura 22. Síntomas en tabaco del grupo II



Figura 23. Áreas infiltradas con agua (Testigo)

## CARACTERIZACION DE BIOVARES

La mayoría de las cepas incluidas en el test de azúcar, produjeron ácidos con lactosa en 2 a 6 días; maltosa y celobiosa en 15 días produciendo cambio de color del medio (Figura 25). No utilizaron manitol, sorbitol y dulcitol después de 28 días de incubación (Tabla 6). Estos resultados se corresponden con el biovar 2 según Hayward (1964,1994). Este investigador presume que su origen está en América del Sur (Argentina, Chile y Uruguay) como un patógeno primario de la papa, que a veces puede afectar al tomate, malezas y otras especies, como el geranio, con distribución geográfica amplia (Martin *et al.*, 1982).

Lewis y colaboradores (2007) demostraron que la berenjena es hospedante del biovar 3 y 4 en Filipinas y Sur de Asia. En este estudio los aislados de berenjena correspondieron al biovar 2.

Los aislados 6, 7 y 8, todos provenientes de tomate, no produjeron cambio de color, por lo tanto la reacción fue negativa en todos los casos (Figura 26). Esta reacción corresponde al biovar 1 que predomina en América (Hayward 1964, 1976). El testigo sin inocular no presentó cambio de color (Figura 27).

Según los estudios de Momol *et al.* (2008) el marchitamiento bacteriano en pimiento es causado por el biovar 1 y 3 principalmente. En el presente estudio los aislados corresponden al biovar 2. Colombo *et al.* (1996, 2000) determinó el biovar 3 en plantas de tomate aunque en sus estudios de caracterización no se contrastaron con cepas de control positivo.

Hay una marcada diferencia entre los distintos aislados, con predominancia del biovar 2, de acuerdo a la clasificación de Hayward (1964).

El biovar 2, es muy heterogéneo. Cepas de Biovar 2 de papa de Australia forman un fenotipo uniforme mientras que las de América del Sur mostraron una cierta heterogeneidad que se acrecienta cerca del centro de origen de su principal huésped (Hayward, 1991). Martin *et al.*, 1982 también propone que la diversidad genética de *Ralstonia* es menor a mayor distancia del Ecuador.

La caracterización de biovares es una clasificación con un propósito especial, cuando se utilizan cepas que ya han sido clasificadas como *Ralstonia solanacearum* usando otros métodos. Pueden existir errores debido a la ausencia de controles positivos. No obstante al ser una determinación fácil, económica y reproducible ha sido adoptada ampliamente para la caracterización de cepas (Denny, 2006).



Figura 24. Reacción provocada por Biovar 2



Figura 25. Reacción provocada por biovar 1



Figura 26. Testigo, sin inocular

Tabla 6. Determinación bioquímica de biovares de *R. Solanacearum*

Cepa	Carbohidratos					
	Maltosa	Lactosa	Celobiosa	Manitol	Sorbitol	Dulcitol
1	+	+	+	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-
4	+	+	+	-	-	-
5	+	+	+	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	-	-	-
10	+	+	+	-	-	-
11	+	+	+	-	-	-
12	+	+	+	-	-	-
13	+	+	+	-	-	-
14	+	+	+	-	-	-
15	+	+	+	-	-	-
16	+	+	+	-	-	-
17	+	+	+	-	-	-
18	+	+	+	-	-	-
19	+	+	+	-	-	-
20	+	+	+	-	-	-
21	+	+	+	-	-	-
22	+	+	+	-	-	-
23	+	+	+	-	-	-
24	+	+	+	-	-	-
25	+	+	+	-	-	-
26	+	+	+	-	-	-
27	+	+	+	-	-	-
28	+	+	+	-	-	-
29	+	+	+	-	-	-
30	+	+	+	-	-	-
31	+	+	+	-	-	-
32	+	+	+	-	-	-
33	+	+	+	-	-	-
34	+	+	+	-	-	-
35	+	+	+	-	-	-
36	+	+	+	-	-	-

### ANÁLISIS DE LA AMPLIFICACIÓN DE LAS CEPAS MEDIANTE PCR

Se determinó la presencia de la banda 718 bp en los geles de agarosa al 1 % (resultados de PCR) de todas las cepas en estudio con el set de primers específico RS-1-F/RS-1-S (Figura 28 y 29) pero no con el set de primers RS-1-F/ RS-3-R (Figura 30). Esto significa que las cepas incluidas como testigo positivo IVIA 1602.1 (biovar 2), y PD 511 (biovar1) fueron claramente identificadas por la PCR y confirman la existencia del biovar 1 y/o 2 en todas las muestras incluidas en este estudio, pertenecientes a la división II descrita por Cook *et al.* (2009).

Las cepa GMI 1000 (Raza1 biovar 3) no amplificó en ningún caso, por lo tanto nuestros aislados no pertenecen al biovar 3. Este resultado es de gran importancia ya que el único antecedente hasta el presente era el biovar 3 (Colombo *et al.*, 1996).

En Brasil los relevamientos en distintas regiones identificaron en todos los aislados estudiados como biovar 1, también encontraron el biovar 2 pero en climas más benignos (Sur-Sureste y Centro de Brasil) (Reifschneider y Takatsu, 1985). Estos resultados coinciden con Costa *et al.* (2007) que determinaron los mismos biovares a través de análisis genéticos (BOX-PCR). El trabajo de Costa *et al.* (2007) coincide con Coelho Netto *et al.* (2004) en la prevalencia del biovar 1 en tomate en el Amazonas tanto en tierras firmes como en bajos.

López *et al.* (1994) determinaron mayor cantidad de aislados del biovar 1 en tomate en distintas zonas de Brasil como Coelho Netto *et al.* (2003a) quienes comprobaron que el marchitamiento del tomate era producido por el biovar 1.

En Etiopia se mencionan los biovares 1 y 2 basados en análisis de PCR (Lemessa y Zeler, 2006). También hubo coincidencia con Ji y colaboradores (2007) quienes indicaron que varios casos de marchitamiento en geranio, pimiento, tomate en Florida, USA, fueron causados por el biovar 1 y 3. Estos estudios sugieren la existencia de una gran variedad de relaciones biovar y huésped.

Los primeros trabajos que constituyeron un hito en el estudio de la diversidad genética del patógeno fueron reportados por Cook *et al.* (1989) y Cook y Sequeira (1994). Esto permitió establecer la existencia de dos grupos o divisiones: la división I, incluye los biovares 3, 4 y 5, y la división II, formada por las cepas de biovares 1, 2 y N2. Más del 90% de las cepas de la división I procedían de Asia y Australia (división Asiática), mientras que 98% de las cepas de la división II eran originarias de América (división Americana).

La caracterización genética aumentó el conocimiento y permitió entender la diversidad, relaciones y evolución del complejo de especies de *Ralstonia*. La tendencia en la última década ha sido dividir mas finamente a este grupo de organismos relacionándolo con mas cepas de alrededor del mundo y estudiar así con mayor profundidad (Denny, 2006).

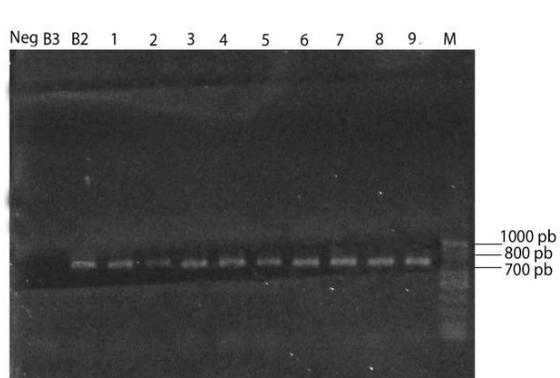


Figura 27. Amplificación por PCR del ADN extraído de muestras de *R. solanacearum* con el set de primers RS-1-F/ RS-1-S. (Neg) Control negativo, (B3) GMI 1000 (biovar 3), (B2) testigo positivo IVIA 1602.1 (biovar 2), (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) N° de muestras de los distintos aislados, (M) marcador de peso molecular 1000 pb

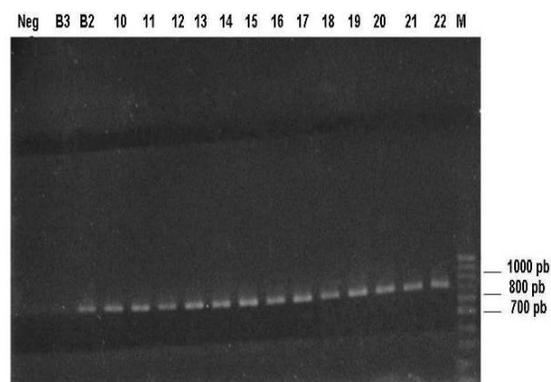


Figura 28. Amplificación por PCR del ADN extraído de muestras de *R. solanacearum* con el set de primers RS-1-F/ RS-1-S. (Neg) Control negativo, (B3) GMI 1000 (biovar 3), (B2) testigo positivo IVIA 1602.1 (biovar 2), (10,11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22) N° de muestras de los distintos aislados, (M) marcador de peso molecular 1000 pb

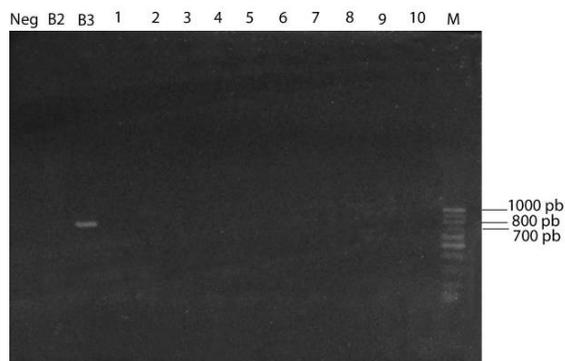


Figura 29. PCR del ADN extraído de muestras de *R. solanacearum* con el set de primers RS-1-F/ RS-3-R, (Neg) Control negativo, (B2) IVIA 1602.1 (biovar 2), (B3) GMI 1000 (biovar 3), (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) N° de muestras correspondientes a los aislados en estudio, (M) marcador de peso molecular 1000 pb.

## CONCLUSIONES

Los resultados de los análisis bioquímicos y moleculares realizados a partir de los aislamientos provenientes de plantas de tomate, berenjena y pimiento de localidades del nordeste argentino, permitieron confirmar la hipótesis inicialmente propuesta. Se comprobó que las cepas de *Ralstonia solanacearum* que causan marchitamiento en las especies de solanáceas estudiadas corresponden al biovar 1 y 2, pertenecientes al filotipo II presente en América.

Los síntomas y el test del flujo fueron válidos para determinar en forma rápida la presencia de la bacteria en estos cultivos y se identificó la raza 1 por test de patogenicidad e hipersensibilidad en hojas de tabaco.

Un mejor conocimiento de la población del patógeno presente en los suelos de la zona, sustenta estudios epidemiológicos como requisito esencial para plantear estrategias de control de esta enfermedad.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Department of Plant Pathology University of Florida. Elsevier academic press. 922pp.

Alcoba, N. J., Bejarano, N., Catacata, J. 2005. Enfermedades de los cultivos de Jujuy y Salta. Diagnosticadas en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNJu. 1ª Edición. Eds. Editorial de la Universidad Nacional de Jujuy. Ediunju. San Salvador de Jujuy. 74pp. ISBN 950-721-226-4.

Alfenas, A. C., Mafia, R. G., Sartório, R. C., Binoti, D. H., Silva, R. R., Lau, D., y Venetti, D. C. 2006. *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de Eucalipto no Brazil. Fitopatología Brasileira. Vol. 31, Nº 4, p: 357-366. ISSN 0100-4158.

Allen, C., Huang, Y., y Sequeira, L. 1991. Cloning of genes affecting Polygalacturonase production in *Pseudomonas solanacearum*. Mol. Plant-Microbe Interact. 4: 147-154.

Allippi, A., y Aguilar, M. 1998. Characterization of isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* from Diverse Geographical Origin by the Polymerase Chain Reaction and Box Primers. Journal of Invertebrate Pathology 72, 21-27.

Alvarez, B., Vasse, J., Le Courtois, V., Trigales-Demery, D., Lopez, M. M., y Trigales, A. 2008. Comparative behaviour of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in diverse plant species. Phytopathology Vol 98. Nº 1. 59-68pp.

Anonymous. 1998. Council Directive 98-57. EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* Off. J. Eur. Communities L 235: 1-39.

Anonymous. 2006. Commission Directive 2006/63/ EC of 14 July 2006: Amending Annexes II to VII to Council Directive 98/57/EC on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* Off. J. Eur. Communities L 206: 36-106.

Buddenhagen, L., Sequeiro, L., y Kelman, A. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum* (Abstr.) Phytopathology 52: 726.

CABI/EPPO, 1999. Distribution Maps of Plant Diseases. Map No. 785. Wallingford, UK: CAB International.

Carrera, C. J. M. 1972. Ficha Fitopatológica Nro 002240. INTA-IMYZA. Castelar. Buenos Aires. *Solanum melongena* L., *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* Florencio Varela, Buenos Aires. 17/11/1952

Caruso, P., Palomo, J. L., Bertolini, E., Álvarez, B., López, M. M., y Biosca, E. G. 2005. Seasonal Variation of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2 Populations in a Spanish River: Recovery of Stressed Cells at Low Temperatures. Applied and Environmental Microbiology, 71 (1): 140-148

Coelho Netto, R. A., Noda, H., y Boher, B. 2003. Agresividad de aislados de *Ralstonia solanacearum* provenientes de solanáceas del Estado de Amazonas. Summa Phytopathologica, 29: 208-211.

- Coelho Netto, R. A., Pereira, B. G., y Noda, H. 2004. Bacterial wilt in Amazonas State, Brazil. *Fitopatologia brasileira*. Vol. 29, N° 1, p. 17-23. Issn 0100-4158.
- Colombo, M. 2000. El marchitamiento del tomate en el litoral argentino. Hoja de divulgación número 10. EEA INTA Bella Vista.
- Colombo, M., Canteros, B., Ishikawa, A., y Lenscak, M. 2000. Presencia de *Ralstonia solanacearum* raza 1 biovar 3 en tomate en el litoral Argentino. *Revista de la Asociación Argentina de Horticultura*. Vol. 19(47): 18-23.
- Colombo, M., Ishikawa, A., y Lenscak, M. 1996. Presence of *Ralstonia solanacearum* Biovar 3 in Tomato Northeast of Argentina. 1<sup>st</sup> International Symposium Tropical Tomato Diseases. Recife, Pernambuco, Brazil.
- Cook, D., y Sequeira, L. 1994. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum*: Detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence the hypersensitive response. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2: 113-121.
- Cook, D., Barlow, E., y Sequeira, L. 1989. Genetic Diversity of *Pseudomonas solanacearum*: Detection of Restriction Fragment Length Polymorphisms with DNA Probes that Specify Virulence and the Hypersensitive Response. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2:113-121
- Costa, S. B., Ferreira, M. A. S. V., y Lopes, C. A. 2007. Pathogenic and molecular diversity of *Ralstonia solanacearum* isolates from the Brazilian Amazon. *Fitopatología Brasileira*. Vol 32, N°4. Brasilia.
- Darrase, A., Trigales, A., y Prior, P. 1998. Phylogeny, Diversity and Molecular Diagnostics of *R. solanacearum*, Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects, INRA Editions, París, pp.19-33.
- De Olivera e Silva, S., De Mello Veras, S., Gasparatto, L., Rires de Matos, A., Maciel Cordeiro, J.Z., y Boher, B. 2000. Evaluación de Musa spp. para la resistencia a la enfermedad de Moko (*Ralstonia solanacearum*, raza 2). *INFOMUSA*. 9 (1): 19-20.
- Denny, T. 2006. Plant Pathogenic *Ralstonia* Species. *Plant-Associated Bacteria*, 573-644.
- Denny, T. P., y Hayward, A. C. 2001. Gram -Negative Bacteria. Pag. 151-173. *In*: Schaad, N. W., Jones, J. B., Chun, W. (Eds.). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. American Phytopathological Society (APS). St. Paul, MN, USA.
- Dummel, D. M., Agostini, J. P., y Urbieta, R. 2008. Determinación de patógenos presentes en hojas de tabaco de la provincia de Misiones. 1° Congreso Argentino de Fitopatología. Libro de Resúmenes: 92. Ciudad de Córdoba. 28 al 30 de mayo.
- Echandi, E. 1991. Bacterial wilt. *In: Compendium of tobacco diseases* (Eds. Shew, H.D.; Lucas, G.B.), pp. 33-35. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- Elphinstone, J. G., Hennessy, J., Wilson, J.K., and Stead. D. E. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) in potato tuber extracts. *EPPO/OEPP Bulletin* 26: 663-678.

- Elphinstone, J. G. 1996. Survival and possibilities for extinction of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in cool climates. *Potato Res.* 39:403-410.
- Elphinstone, J. G., Stanford, J. M., y Steand, E. D. 1998. *Ralstonia solanacearum* in potato tubers, *Solanum dulcamara* and associated irrigation water extracts. p. 133–139. In P. Prior, C. Allen, and J. Elphinstone (ed.), *Bacterial wilt disease. Molecular and ecological aspects.* Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- European y Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). 2004. Diagnostic protocols for regulated pest. *Bulletin* 34:155-157.
- Fegan, M., y Prior, P. 2005. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? In Allen, C., Prior, P., y Hayward, A.C. (eds.), *Bacterial Wit Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex.* St. Paul, MN: APS Press, 449-461.
- French, E. R. y Sequeira, L. 1970. Strains of *Pseudomonas solanacearum* from Central and South America: a comparative study. *Phytopathology*, 60, 506-512.
- French, E. R. 1994. Control Integrado de la Marchites Bacteriana de la Papa. Circular del Centro Internacional de la Papa (CIP), 20 (2): 8-11.
- French, E.R. 1994a. Integrated control of bacterial wilt of potatoes. CIP Circular 20: 8-11.
- French, E.R. 1994b. Strategies for integrated control of bacterial wilt of potatoes. In *Bacterial wilt: the disease and its causative agent Pseudomonas solanacearum* (eds. Hayward, A. C. and Hartman, G. L.) p. 199-207, CAB International, Wallingford (Reino Unido).
- French, E. B., Gutarra, L., Aley, P., y Elphinstone, J. 1995. Culture Media for *Ralstonia solanacearum* Isolation, Identification and Maintenance. *Fitopatología.* 30(3): 126-130.
- Gómez, E. A., Alvarez, E., y Llano, G. 2004. Identificación y caracterización de cepas de *Ralstonia solanacearum* Raza 2, agente causante del Moko del Plátano en Colombia. *Fitopatología Colombiana*, 28 N° 2.
- Goszczyńska, T., Serfontein, J. J., y Serfontein, S. 2000. Introduction to Practical Phytobacteriology. First edition. Safrient. Pretoria-South Africa. 83p.
- Gotuzzo, E. A. 1975. Bacterias.p 3-360. In Fernandez Valiela (Eds) *Introducción a la Fitopatología.* Vol II. Colección Científica del INTA, Buenos Aires, Argentina.
- Granada, G. A., y Sequeira L. 1975. A hypersensitivi reaction induced in tabacco leaves by a compatible isolate of *Pseudamonas solanacearum*. *Phytopathology*, 65: 731-733.
- Gregersen, T. 1978. Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 5: 123-127.
- Hammer, P. A., y Rane, K. 1999. Southern bacterial wilt found in geranios. *Grower Talks.* 63:80-82.
- Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Appl. Bacteriol.* 27:265-277.

- Hayward, A. C. 1976. Some techniques of importance in the identification of *Pseudomonas solanacearum*, p. 137-142. *In*: Sequeira, L., y Kelman (Eds). Proc. Ist Intern. Planning Conf. and Work shop on the ecology and Control of bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas solanacearum*. North Carolina State Univ., Raleigh. 166p.
- Hayward, A. C., El-Nashoor H. M., De Lindo M., y Nydegger V. 1989. The use of microtiter plates in the phenotypic characterization of phytopathogenic *Pseudomonas*. Pp. 595-598. *In*: Proc. 7 th.Int. Conf. Plant Pathog. Bact. Budapest, Hungary.
- Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:65-87.
- Hayward, A. C. 1994. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria . Pages 123-135. *In*: Bacterial Wilt: The disease and Its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. Hayward A. C., and Hartman, G. L. Eds. CAB International, Wallingford, U. K.
- Hayward, A. C., y Hartman. G. L. 1994. Bacterial wilt: the disease and its causative agent *Pseudomonas solanacearum*. 259 p. CAB International, Wallingford (Reino Unido).
- He, L. Y., Sequeira, L., y Kelman A. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Dis.* 67:1357-1361.
- Hongn, S. I., Baino, O. M., Gil Fourquet, M. J., y Ramallo, J. C. 2002. Efecto de enmiendas orgánicas y desinfectantes químicos en la incidencia de *Ralstonia solanacearum* en tomate en invernadero. Xi Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Libro de Resúmenes: 75. Fac. de Agronomía y Veterinaria, UNRío Cuarto. Córdoba. 26-28 de junio.
- Huang, Q., y Allen, C. 1997. A nexo-poly- $\alpha$ -D-galacturonosidase, PehB, is required for wildtype virulence in *Ralstonia solanacearum*. *J. Bacteriol.* 179:7369-7378.
- Huang, Q., y Allen, C. 2000. Polygalacturonases are required for rapid colonization and full virulence of *Ralstonia solanacearum* on tomato plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 57: 77-83.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W., y Reverchon, S. 1996. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu Rev Microbiol.*; 50:213-257
- Husain, A., y Kelman , A.1958. The role of pectic and cellulolytic enzymes in pathogenesis by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 48: 377-386.
- Ito, S., Ushijima, Y., Fujii, T., Tanaka, S., Kameya-Iwaki, M., Yoshimara, S., y Kishi, F. 1998. Detection of Viable Cells of *Ralstonia solanacearum* in Soil Using a Semiselective Medium and PCR technique. *Journal of Phytopathology.* 146: 379-384.
- Janse, J. D. 1991. Infra-and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains, using whole cell fatty acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology.* 14: 335-345.
- Janse, J. D. 1996. Potato brown rot in Western Europe- History, presence occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. *Bull. OEPP/ EPPO Bull.* 26: 679-985.

- Janse, J. D., Araluppan, F. A. X., Schans, J., Wenneker, M., y Westerhuis, W. 1998a. Experiences with bacterial brown rot *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3, in The Netherlands, p. 147–152. In: Prior, P. Allen, C., and Elphinstone, J. (ed.), Bacterial wilt disease. Molecular and ecological aspects. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Janse, J. D., Elphinstone, J., y van Vaerenbergh, J. 2002. Introduction of *R. solanacearum* biovar 2 race 3 in *Pelargonium* cuttings from Kenya. 3rd International Bacterial Wilt Symposium, February 4-8, South Africa.
- Janse, J. D., y Schans, J. 1998b. Experiences with the diagnosis and epidemiology of bacterial brown rot (*Ralstonia solanacearum*) in The Netherlands. Bull. EPPO 28:65–67.
- Jense, J. D., Van den Beld, H. L., Ephinstone, J., Simpkins, S., Tjou-Tam Sin, N. N. A., y J. Van Vaerenbergh, J. 2004. Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 race 3 en *Pelargonium zonale* cutting. Journal of plant pathology 87, 147-155.
- Ji, P., Allen, C., Sanchez-Perez, A., Yao, J., Elphinstone, J. G., Jones, J., y Mogol, T. 2007. New diversity and diagnostic challenges associated with *Ralstonia solanacearum* strains in Florida. Plant Disease 91:195-203.
- Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to coloni appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology. 44:693-695.
- Kelman, A. y Person, L. H. 1961. Strains of *Pseudomonas solanacearum* differing in pathogenicity to tobacco and peanut. Phytopathology, 51: 158-161.
- Klement, Z., Farkas, G. L., y Lovrekovich, L. 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tabaco leaf. Phytopathology 54: 474-477.
- Lemaga, B., Kakuhenzire, R., Kassa, B., Ewell, P.T., y Priou, S. 2005. Integrated control of potato bacterial wilt in Eastern Africa: The experience of African Highlands Initiative. pp. 145-157. In: *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. Allen, C., Prior, P., and Hayward, A.C. (Eds.). APS Press, St. Paul, Minnesota USA, 510 p.
- Lemessa, F., y Zeller, W. 2006. Isolation and characterisation of *Ralstonia solanacearum* strains from Solanaceae crops in Ethiopia. Journal of Basic Microbiology, 47: 40-49.
- Lewis Ivey, M. L., McSpadden Gardener, B. B., Opina, N., y Miller, S. A. 2007. Diversity of *Ralstonia solanacearum* Infecting Eggplant in the Philippines. Phytopathology Vol.97, N° 11: 1467-1465.
- Lopes, C. A. 1994. Situación de murcha bacteriana en batata en Brasil. In: Memorias del Taller sobre Enfermedades Bacterianas de la Papa. Brasilia. Embrapa/CNPH, 7-9pp.
- Loreti, S., Fiori, M., De Simone, D., Falchi, G., Gallelli, A., Schiaffino, A., y Ena, S. 2007. Bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum*, on tomato in Italy. Plant Pathology, v.57(2):368, 2008.
- Lozano, J. C., y Sequeira, L. 1970. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infiltration technique. Phytopathology 60: 833-838.

- Marin, J. E. y El-Nashaar, H. M. 1993. Pathogenicity of the new phenotypes of *Pseudomonas solanacearum* from Peru. In: Hartman, G. L. y Hayward, A. C. (Eds.), Bacterial Wilt. ACIAR Proceeding N° 45, 75-84. Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research.
- Martin, C., French, E. R. y Nydegger, U. 1982. Strains of *Pseudomonas solanacearum* affecting *Solanaceae* in the Americas. Plant Dis. 66:458-60.
- Martins, O. L. 2000. Polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum* biovars 1, 2 e 3. Scientia Agricol. V 58. N° 3: 497-500.
- Mazzanti de Castañón, M. A. 1972. Enfermedades de las plantas registradas en la provincia de Corrientes. IDIA (Int. Inv. Agr. INTA Buenos Aires) Supl. 28:7.
- McCarter, S. M. 1991. Bacterial wilt. In: Compendium of tomato diseases (Ed. by Jones, J.B.; Jones, J.P.; Stall, R.E.; Zitter, T.A.), p. 28-29. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- Melegari, A., y Escande, A. 1984. Fuentes de dispersión y etiología de un marchitamiento bacteriano y pudrición de tubérculos de papa en el sudeste de la provincia de buenos aires. En: Marchitez bacteriana de la Papa (*Pseudomonas solanacearum*) en América Latina. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú.
- Mercado Cárdenas, G., Carmona, M. A., March, J. G., y Pérez Brandán, C. 2008. Relevamiento de microorganismos de suelo patógenos del cultivo de tabaco. 1º Congreso Argentino de Fitopatología. Libro de Resúmenes: 136. Ciudad de Córdoba, Córdoba. 28-30 de mayo.
- Middleton, K. J., y Hayward, A. C. 1990 Bacterial Wilt of Groundnuts. Proc. ACIAR/ICRISAT collaborative res. Plan. Meet., Genting Highlands, Malaysia, 18-19 March. ACIAR Proc. N° 31.
- Momol, T., Pradhanang, P., y Lopes, C. 2008. Bacterial Wilt of Pepper. In: Plant Pathology [en línea]. 2008, no. 189. [fecha de consulta: diciembre 2008] <http://edis.ifas.ufl.edu/PP103>
- Nesmith, W.C., y Jenkins, S. F. 1985. Influence of antagonists and controlled matric potential on the survival of *Pseudomonas solanacearum* in four North Carolina soils. Phytopathology 75, 1182-1187.
- Norman D. J., y Yuen, J. M. F. 1998. A distinct pathotype of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* race 1, biovar 1 entering Florida in pothos (*Epipremnum aureum*) cuttings. Canadian Journal of Plant Pathology 20, 171-175.
- NPAG. 2001b. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 Teleconference, October 25, 2001. New Pest Advisory Group, USDA-APHIS-PPQ-CPHST, Raleigh, NC. NPAG teleconference minutes.
- Nyangeri, J. B., Gathuru, E. M., y Mukunya, D. M. 1984. Effect of latent infection on the spread of bacterial wilt of potatoes in Kenya. Tropical Pest Management 30, 163-165.

- Ono, K., Hara, H., y Akazawa, J. 1984. Ecological studies on the bacterial wilt, caused by *Pseudomonas solanacearum*. In: The movement of the pathogen in tobacco plants. *Bulletin of the Okayama Tobacco Experiment Station* No. 43, pp. 41-46.
- Palmeteer A. J., Harmon C. L., Hodges, A. C., Peres, N., Chung, K. R., Roberts, P. D., Buss, L., Crow, W. T., Xin, J., McGovern, R. J., Kimbrough, J. W., y Momol, M. T. 2006. The Florida Plant Diagnostic Network. University of Florida / IFAS, EDIS Extens Fact Sheet pp:229, 6 pp
- Pastrk, K. H., Elphinstone, J. G., y Pukall, R. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 831-842.
- Pegg, K., y Moffet, M. 1971. Host range of the ginger strain of *Pseudomonas solanacearum* in Queensland. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 11:696-698.
- Persley, G. J. 1986. Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Proc. Int. Workshop, PCARRD, Los banos, Philippines, 8-10 Oct. 1985. ACIAR Proc. 13. 145pp.
- Ploper, L. D. 1996. Patología de semillas de soja. En: Enfermedades de Soja. Manual de Diagnóstico y Manejo. Pág. 33-39. Eds. Botta, G., A. Ivancovich, D. Ploper, I. Laguna. 54pp. C.R. Buenos Aires Norte. EEA INTA Pergamino.
- Pradhanang, P. M., Elphinstone, J. G., y Fox, R. T. V. 2000 a. Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil: a comparasion of different detection techniques. *Plant Pathology* 49: 414-422.
- Pradhanang, P. M., Elphinstone, J. G., y Fox, R. T. V. 2000 b. Identification of crop and weed host of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in the hills of Nepal. *Plant Pathology* 49, 403-413.
- Raymundo, A. K., Orlina, M. E., y Opina, N. L. 2005. Comparative genome plasticity of tomato and banana strains of *Ralstonia solanacearum* in the Philippines. In: Allen, C., Prior, P., y Hayward, A. C. (Eds.), *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*: 387-393. St. Paul, MN: APS Press.
- Reifschneider, F. J. B., y Takatsu, A. 1985. *Pseudomonas solanacearum* en Brasil: Aspectos macro epidemiológicos. *Fitopatología brasileira*, Supl.10: 213.
- Roberts, D. P., Denny, T. P., y Schell, M. 1988. Cloning of the *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. *J. Bacteriol.* 170:1445-1451.
- Seal, S. E., y Elphinstone, J. G. 1994. Advances in identification and detection of *Pseudomonas solanacearum*. Pages 35-57 In: A. C. Hayward and G. L. Hartman, eds., *Bacterial wilt: The disease y its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford.
- Seal, S. E., Jackson, L. A., y Daniels, M. J. 1992. Use of tRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 3759-3761.
- Seal, S. E., Taghavi, M., Fegan, N., Hayward, A. C., y Fegan, M. 1999. Determination of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* DNAr subgroups by PCR test. *Plant pathology* 48: 115-120.

- Shew, H. D., y Lucas, G. B. 1991. Compendium de las enfermedades del tabaco. EPS, St. Paul.
- Shurtleff, M. C., y Avarre, A. W. 1997. The plant disease clinic and field diagnosis of abiotic disease. APS Press. USA.
- Sneath, P. H. A., y Sokal, R. R. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.
- Strider D. L, Jones R. K., y Haygod, R. A. 1981. Southern bacterial wilt of geranio caused by *Pseudomonas solanacearum*. Plant disease 65, 52-53.
- Sudo, S. Oliveira, G. H., y Pereira, A. C. 1983. Eucaliptus (*Eucaliptus* sp) e bracatinga (*Mimosa scabrella* Penth) novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum*. E. F. Smith. Fitopatología brasileira 8: 631. Resumen.
- Swanepol, A. E. 1990. The effect of temperature on the development of wilting and on progeny tuber infection of potatoes inoculated with South African strains of biovar 2 and 3 of *Pseudomonas solanacearum*. *Potato Research* 33, 287-290.
- Swanson, J. K., Yao, J., Tans-Kersten, J., y Allen, C. 2005. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of Geranium. *Phytopathology*, 95: 136-143.
- Thierry, X. J., y Jaw-Fen, W. 1998. Variation in Genotype and Aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* Race 1 isolated from Tomato in Taiwan. *Phytopathology*, Vol. 89, N° 4: 320-327.
- Thurston, H. D. 1963. Bacterial wilt of potatoes in Columbia. *American Potato Journal*, 40: 381-390.
- Thwaites, R., Eden-Green, S. J., y Black, R. 2000. Diseases caused by bacteria. In: Jones D. R. (Ed.), *Diseases of Banana, Abacá and Enset* 213-239. Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Ustun, N., Ozakman, M., y Karahan, A. 2007. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* biovar 2 on tomato in Turkey. *Plant Pathology*. v.57 (4): 773.
- Wenneker M, Verdel M. S. W., Van Beuningen, A. R., Derks, J. H. J., y Janse, J. D. 1999 *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* race 3 (biovar 2) in surface water and natural weed host: first report on stinging nettle (*Urtica dioica*). *European Journal of Plant Pathology* 105, 307-315.
- Williamson, L., Nakaho, K., Hudelson, B., y Allen, C. 2002. *Ralstonia solanacearum* Race 3, Biovar 2 Strains Isolated from Geranio are Pathogenic on Potato. Publication N° D-2002-0715-01R. The American Phytopathological Society.
- Winstead, N. N., y Kelman, A. 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 42: 628-634.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, L., Hotta, H., y Nishiuchi, Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia picketti* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 39:897-904.

Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., y Hashimoto, Y. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology grup II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. Nov. *Microbiology and Immunology*, 36, 1251-1275.