

Detección de *Ralstonia solanacearum* en *Solanum tuberosum* L. en el Estado de Sonora, México

Detection of *Ralstonia solanacearum* in *Solanum tuberosum* L. in Sonora, Mexico

Ana G. Alvarado-Martínez ^{1*}, Edgar O. Rueda-Puente ², Juan F. Ponce-Medina ¹, Leonel Avendaño-Reyes ¹, Jesús Santillano-Cazares ¹, Jesús Borboa-Flores ², Luis Hernández-Montiel ³, Ramón Holguín-Peña ³

Originales: Recepción: 19/11/2012 - Aceptación: 17/04/2013

RESUMEN

Ralstonia solanacearum (Rs) produce la enfermedad cuarentenaria denominada marchitez bacteriana en papa. México es un país importador de semilla de Estados Unidos de América y Canadá, aspecto significativo para provocar una eventual introducción de esta enfermedad en áreas con amplias extensiones de papa. Sonora es una región importante en relación con la producción de este cultivo. Por lo anteriormente expuesto, se realizó la presente investigación, teniendo como objetivos: a) la producción de antisuero para la bacteria Rs; b) diagnosticar Rs en tubérculos de importación que se utilizan para siembra, y en tubérculos de procedencia mexicana para consumo humano, que son utilizados como semilla; c) la detección de la bacteria durante el desarrollo vegetativo de lotes de papa en Sonora, México. Se analizó tubérculo semilla de importación, de consumo humano, plantas de papa, hojas y tubérculos de producción; los métodos de detección utilizados fueron medios de cultivos específicos, ELISA, antisuero producido y pruebas de patogenicidad. Los resultados mostraron positiva la presencia de Rs en tubérculos de consumo; en tubérculos

ABSTRACT

Ralstonia solanacearum (Rs) causes the disease quarantine called bacterial wilt in potatoes. Mexico importseed from United States of America (USA) and Canada, which is a significant aspect to eventual introduction of the disease in areas with large tracts of potato. Sonora is an important region in relation to potato production. Therefore, this research was conducted, with the following objectives: a) production of antibody for Rs; b) diagnosis of Rs in foreign tuber, and in tuber for human consumption which is used for seed; c) detection of Rs in vegetative growth of potato lots in Sonora, Mexico. We analyzed seed, seedling, leaf and tuber; the detection methods used were: specific means, ELISA, antiserum produced and pathogenicity tests. The positive results have shown the presence of Rs in tubers for consumption; in foreign tuber and vegetative stages it was negative. The separate testing should not be used as a unique method of detection; the presence of Rs, represents a risk of eventual manifestation of the disease, so it is necessary to undertake activities with preventive phytosanitary control.

1* Estudiante de doctorado. Instituto de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma de Baja California. Ejido Nuevo León, Mexicali Baja California, México. C. P. 21705.

1 Dpto. de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma de Baja California. Ejido Nuevo León, Mexicali Baja California, México. C. P. 21705.

2 Dpto. de Agricultura y Ganadería. Universidad de Sonora, Boulevard Luis Encinas y Rosales. Hermosillo, Sonora, México. C. P. 23000. erueda04@santana.uson.mx, erueda818@gmail.com

3 Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Mar Bermejo N° 195. Col. Playa Palo. Santa Rita, La Paz, Baja California Sur. Apartado postal 23090.

de importación y en etapas vegetativas fue negativa. Cada prueba de detección por separado no debe ser utilizada como método único; la presencia de Rs representa un riesgo de eventual manifestación de la enfermedad, por lo que es necesario que las áreas productoras realicen actividades de control preventivo fitosanitario.

Palabras clave

diagnóstico fitopatológico • marchitez bacteriana de la papa

Keywords

phytopathological diagnosis • bacterial wilt of potato

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la papa (*Solanum tuberosum* L.) junto con el arroz, el maíz y el trigo, constituyen los cultivos más importantes para la alimentación humana. En 2011 la producción mundial de papa alcanzó el récord de 320 millones de toneladas métricas. Los principales factores que afectan la papa son los de tipo biótico, entre los que figuran enfermedades causadas por bacterias, hongos, nematodos, virus y fitoplasmas. Una enfermedad de importancia cuarentenaria es la marchitez bacteriana o pudrición parda de la papa causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Rs), considerada la primera enfermedad que limita la producción de papa (35). Por el grado de devastación que esta enfermedad ha alcanzado en diversos lugares productores de EUA, ha sido catalogada como de importancia cuarentenaria, dando lugar a una suspensión de venta de semilla de papa en 1995, lo que amenazó con la eliminación definitiva de este cultivo en EUA (29). La comercialización mundial se ha expandido en forma drástica y con ello el intercambio internacional de todo tipo de especies y materiales biológicos. Ello da como resultado que muchos de los agentes fitopatológicos puedan llegar a muy diversas latitudes. Dada la cercanía con los EUA y Canadá, México ha tenido que establecer aranceles y barreras en contra de la probable entrada de materiales vegetativos que pudieran estar contaminados con esta bacteria, la cual ha sido ya reportada en otros países del continente americano (20). El riesgo de entrada de esta enfermedad al territorio mexicano se acentúa debido a que puede transmitirse por semilla de diversas solanáceas (29). Rs es uno de los agentes más graves del cultivo de papa, pues reduce la productividad hasta en un 89% en un lapso de 4 a 12 días en condiciones favorables de alta temperatura (30°C) y humedad relativa (70%). Los síntomas iniciales de la enfermedad son el amarillamiento leve en un solo lado de la hoja o en un tallo y no en otros. Los síntomas avanzados son la marchitez severa y la deshidratación, que preceden a la muerte de la planta (35).

Para la detección de Rs en puertos y aeropuertos fronterizos, uno de los métodos de diagnóstico es el convencional que se basa en pruebas bioquímicas. Sin embargo, en la actualidad, este método, comparado con el DAS-ELISA, no cumple con los requisitos para un diagnóstico con fines cuarentenarios como son la sensibilidad y la replicabilidad. No obstante, aun cuando se realice el método serológico ELISA, para detectar un alto número de muestras de tubérculos semilla de importación y proceder a su diagnóstico, se requiere un número alto de kits, que económicamente el gobierno mexicano no abastece y es costoso, por lo que resulta de gran importancia la producción de un antisuero contra Rs basado en el principio de inmunización e interacción antígeno-anticuerpo.

En los últimos diez años el Estado de Sonora es importante en la producción de esta solanacea (2, 32). En dicho Estado, en el periodo 2005-2010, se presentaron problemas fitosanitarios. La sintomatología de esos problemas fue semejante a la producida por Rs, lo cual generó controversia entre los productores. Sobre la base de lo anteriormente expuesto, en la presente investigación los objetivos consistieron en a) la producción de antisuero contra la bacteria Rs; b) diagnosticar Rs en tubérculos de importación que se dirige para semilla y en tubérculos para consumo humano de procedencia nacional que se utilizan como semilla; c) la detección de Rs durante el desarrollo vegetativo en lotes de papa en el Estado de Sonora.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en dos fases. La primera consistió en el incremento de Rs y el reconocimiento de síntomas en pruebas de patogenicidad; la segunda fase, en la producción de antisuero para Rs, la obtención de tubérculos de importación que se dirige para siembra y de tubérculos de consumo de origen nacional que son utilizados como semilla. Además se realizó un muestreo de plantas de un mes de crecimiento después de la siembra, de hojas desarrolladas y de tubérculos de papa en el Estado de Sonora, y su análisis fitopatológico para la detección de Rs en el Laboratorio Agrícola de la Universidad de Sonora.

Primera fase

Incremento de Rs y reconcimiento de síntomas en pruebas de patogenicidad (PP)

La 1ª fase fue incrementar la bacteria Rs, en medios de cultivo (10, 18, 35, 36), la cual fue proporcionada por Nunhems Vegetable Seeds y Química Agronómica de México. Los medios de cultivos que se utilizaron fueron el SMSA y TZC (medio SMSA: ingredientes por litro: Casamino acid (caseína hydrolysate) 1 g; peptone 10 g; glicerol 5 mL; agar 17 g; se ajustó a un pH 6,5 y se esterilizó a 121°C durante 20 m; se enfrió el medio y se adhirieron 5 mL de solución stock de 2,3 5-tripheny tetrazolium chloride. La solución stock fue esterilizada durante 5 min a 121°C y almacenada a 4°C (Cristal violet 5 mg; polymixin B sulfate 100 mg; Bacitracin 25 mg; Chloromycetin 5 mg; Penicillin 0,5 mg; Ciclohexamide 100 mg (se disolvieron los ingredientes de la solución stock 30 minutos antes de utilizarla en 5 mL de 70% de etanol); (medio TZC: ingredientes por litro: Casamino acid (caseína hydrolysate) 1 g; peptone 10 g; glucose 5 g; agar 17 g; se ajustó a pH 6,5 y se esterilizó a 121°C 20 m⁻¹). Los cultivos se incubaron durante siete días a 34°C.

Una vez que se incrementó el inóculo de acuerdo con la técnica descrita por Kiraly (30), se obtuvieron 100 tubos de ensayo en solución salina al 0,85 % de cloruro de sodio con una concentración de 10⁸ unidades formadoras de colonias UFC mL⁻¹ verificada con ayuda de un hematocímetro (38, 39). Las suspensiones bacterianas en tubos fueron almacenadas en refrigeración a 4°C. Las pruebas de patogenicidad (PP) se desarrollaron en tubérculos de papa y plantas de 30 días después de la siembra. En la primera, se embebieron 20 tubérculos semilla en una suspensión bacteriana de UFC (10⁸) y se plantaron en vasos contenientes de sustrato estéril tipo "peat moss"

(Sunshine, Sun Gro Horticulture Canada, Ltd.) en condiciones de laboratorio en una cámara ambiental (Biotronette® Mark III, Melrose Park, IL, USA). Las plantas para las PP se produjeron en condiciones de esterilidad; a los 35 días se inocularon en las hojass con la ayuda de un cotonete. Posteriormente, los tubérculos de papa y las plantas se incubaron en cámaras húmedas a temperatura de $38 \pm 2^\circ\text{C}$, durante un periodo de 20 días. Para cada una de las pruebas fue considerado un control negativo como testigo, utilizando agua destilada estéril. Para la identificación de Rs en las PP, los órganos vegetales se colocaron individualmente en bandejas de plástico con capacidad de 2 L (36, 38, 39). Cada bandeja, con su respectiva muestra, se dejó con una cantidad de 100 mL de agua destilada, y a cada una se le añadieron 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos, pH 7. Posteriormente, a la mezcla de agua con fosfatos y muestras de PP se le llamó “suspensión madre”. Las bandejas se incubaron durante 12 horas en refrigeración a 4°C con la finalidad de que se liberara la bacteria a la suspensión madre. Después de la incubación se tomaron 10 mL de suspensión madre de cada bandeja, se le realizaron cuatro diluciones (10:1, 10:2, 10:3, 10:4) y de la última dilución se tomó 0,1 mL que se sembró en medio de cultivo específico para Rs (10, 35). Los medios se incubaron primero durante siete días a 34°C y luego, ya inoculados a una temperatura de 30°C , durante otros siete días. También se desarrolló la prueba PPO (lacasas, cresolasas y oxidasas) (27, 28); el agente causal se corroboró con ELISA siguiendo el protocolo general de identificación de bacterias AGDIA (13, 35). Las placas se evaluaron en un lector ELISA a 405 nm. Para decidir si las muestras eran positivas a la presencia de Rs, se llevó a cabo el criterio que utiliza el Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario de la Dirección General de Sanidad Vegetal, el cual consistió en considerar los valores obtenidos del lector ELISA de los tres testigos o controles negativos de la placa en estudio (C_1 , C_2 , y C_3), aplicando la siguiente fórmula: $VD = C_1 + C_2 + C_3 / 3 = * 2$, donde VD = valor de decisión; C_1 = control o testigo negativo uno; C_2 = control o testigo negativo dos; C_3 = control o testigo negativo tres. Se obtuvo una media de los tres valores de los controles y/o testigos negativos y el resultado se multiplicó por dos. Valores superiores al obtenido en esa operación (valor de decisión) se consideraron positivos (13).

Segunda fase

Producción de antisuero

Para este efecto, uno de los primeros pasos realizados fue el incremento de inóculo de Rs en el medio sólido específico TZC (36), para preparar suficientes tubos con suspensión bacteriana de 10^8 UFC/mL en solución salina al 0,85 % (30). Una vez obtenidas, las suspensiones bacterianas en tubos, se almacenaron en refrigeración a 4°C para estabilizar la bacteria y evitar un shock en el animal. La inmunización se realizó en conejos de raza Nueva Zelanda con un peso de 3 kg, una edad de 9-24 meses; se evitó que las hembras estuviesen preñadas (42, 43). Previo a la inmunización, se obtuvo suero normal, con la finalidad de usarlo como testigo. Para obtener el suero normal se realizó una pequeña incisión con una navaja desinfectada. Se colectaron 15 mL por conejo en un tubo de ensayo de marca VD Vacutainer, el cual contiene un gel separador de suero y coágulo, procurando no golpear la sangre en las paredes del tubo y así evitar una posible hemólisis. Los tubos con las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 5000 rpm. Posteriormente el suero normal se concentró en un

tubo previamente esterilizado por adición de una gota del producto orgánico mercurial de capacidad sensibilizante denominado comercialmente "mertiolate"; se conservó estéril y se congeló. Una semana después se realizó el plan de inmunización en tres esquemas, con cinco conejos por esquema (tabla 1).

Tabla 1. Tres esquemas de inmunización utilizados en la producción de antisuero contra *Ralstonia solanacearum* en conejos tipo Nueva Zelanda.

Table 1. Three immunization schedules used in the production of antiserum against *Ralstonia solanacearum* in New Zealand type rabbits.

Esquema 1		
Día	Volumen de la vacuna (mL)	Vía de la inyección
1	1	intramuscular
7	1	intramuscular
14	2	intramuscular
Esquema 2		
Día	Volumen de la vacuna (mL)	Vía de la inyección
1	0,1	intramuscular
3	0,3	intramuscular
7	0,3	intramuscular
10	1,0	intramuscular
15	2,0	intramuscular
Esquema 3		
Día	Volumen de la vacuna (mL)	Vía de la inyección
1	0,1	intravenosa
3	0,3	intravenosa
6	0,5	intravenosa
10	1,0	intramuscular
15	2,0	intramuscular
20	2,0	intravenosa

De acuerdo con la metodología (17), y con la finalidad de potenciar la producción de anticuerpos de cada tratamiento, a los 24 días después de la última serie de inyecciones se realizó una nueva aplicación de dosis de antígeno (2 mL vía intramuscular), denominada como dosis de refuerzo, con la función de impulsar y promover el proceso de síntesis de producción de anticuerpos contra el antígeno inyectado, reacción que fue corroborada con una prueba de titulación antes y después de la inyección del recuerdo.

La prueba de titulación (30) se realizó para evaluar la riqueza en anticuerpos del antisuero. Primeramente se hizo una extracción de sangre a los seis días después de la inyección de recuerdo, con las mismas consideraciones que para la extracción del suero normal previo a la inmunización. Para cada conejo y tratamiento se

prepararon 10 tubos de ensayo independientes con solución salina al 0,85% para mezclarles el antígeno y el antisuero en la forma en que se describe en la tabla 2.

Tabla 2. Prueba de titulación para el antisuero producido, serie de diluciones con solución salina al 0,85% (NaCl) con adición de antígeno y antisuero.

Table 2. Test for the antiserum titulation, serial dilutions containing 0.85% saline (NaCl) with the addition of antigen and antiserum titulation.

Tubo	Solución salina mL	Dilución antisuero mL	Dilución	Dilución antígeno	Dilución final
1	0,9	0,1	1:10	0,5	1:20
2	0,5	0,5 T-1	1:20	0,5	1:40
3	0,5	0,5 T-2	1:40	0,5	1:80
4	0,5	0,5 T-3	1:80	0,5	1:160
5	0,5	0,5 T-4	1:160	0,5	1:320
6	0,5	0,5 T-5	1:320	0,5	1:640
7	0,5	0,5 T-6	1:640	0,5	1:1280
8	0,5	0,5 T-7	1:1280	0,5	1:2560
9	0,5	0,5 T-8	1:2560	0,5	1:5120
10	0,5	0,5 T-9	1:3120	0,5	1:6240

Si la titulación del suero resulta superior a 640 o 1280 (sexto o séptimo tubo) significa que el antisuero producido es rico en anticuerpos.

If the serum titulation is higher than 640 or 1280 (sixth or seventh tube) means that the antiserum is rich in antibodies.

Para llevar a cabo la prueba de titulación se prepararon 10 tubos de ensayo que contenían 0,5 mL de solución salina (0,85% de NaCl), a excepción del tubo número uno con 0,9 mL. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas agregando al tubo número uno 0,1 mL del antisuero producido; luego del tubo uno se transfirieron 0,5 mL al tubo número dos. Este procedimiento se realizó del tubo dos al tres, y así sucesivamente hasta llegar al tubo número 10. A continuación se añadió a cada tubo 0,5 mL de antígeno (Rs) en una concentración de 10^8 UFC/mL. Se agitaron suavemente durante cinco segundos y se dejaron reposar durante 30 min. Una vez transcurrido ese tiempo se pudo observar a contra luz un anillo que se forma en el fondo del tubo, lo que refleja una unión del antisuero con el antígeno -aglutinación = título-. Esta aglutinación fue corroborada colocando 0,1 mL de la solución de cada tubo en portaobjetos y observando la microaglutinación al microscopio óptico. Una titulación (formación de anillo) se considera positiva para un determinado antígeno si presenta un título mayor o igual a 1:640 con el antisuero homólogo.

Obtención de tubérculos semilla de papa de importación y de tubérculos para consumo humano de procedencia nacional utilizados como semilla

La presente fase incluyó entrevistas con productores de papa del Estado de Sonora y el ofrecimiento de charlas sobre la importancia de las enfermedades fitopatógenas, la importancia del diagnóstico fitosanitario e información sobre la enfermedad.

A los mismos productores se les solicitó semilla de importación para siembra. Cada productor otorgó para el análisis 15 a 25 tubérculos semilla. Además se colectó papa de verdulerías y otros establecimientos comerciales de consumo, ya que algunos productores de escasos recursos la utilizan como semilla.

Muestreo en plantas (planta, hojas desarrolladas y tubérculos de producción)

Se desarrolló un muestreo a partir de plantas de 30 días después de la siembra, hojas desarrolladas y tubérculos de papa en las zonas agrícolas del Estado de Sonora. Para el muestreo en plantas se recolectaron aquellas que presentaron la primera hoja verdadera durante los primeros quince días después de su emergencia. Para el caso de hojas desarrolladas se consideraron aquellas entre las cinco y quince hojas a partir de la base del tallo de la planta en fase de floración. Para la obtención de tubérculos se consideraron los más próximos a la cosecha y de posterior venta.

Cabe indicar que aquellas plantas, hojas o tubérculos que mostraron una sintomatología similar a la de Rs también fueron colectados. El muestreo de lotes se reprodujo considerando el Manual de muestreo y procesamiento para la identificación de los principales patógenos de la papa (3, 40, 41), y se realizó en el 10% del total de la superficie cultivable de cuatro de los municipios productores de papa. En el 10% de la superficie de cada municipio se realizaron divisiones de 5 ha que se consideró como parcela hipotética a muestrear. Cada parcela se dividió a su vez en hectáreas, cada hectárea fue considerada un punto de muestreo. En cada punto se trazó una línea diagonal imaginaria de esquina a esquina, y en esa recta trazada se colectaron 10 muestras.

Terminado el muestreo en cada punto, la colecta fue repetida en los puntos restantes hasta completar el número de hectáreas (puntos) del lote. Cada una de las muestras colectadas, previamente rotulada, se envolvió con papel húmedo y se trasladó refrigerada para su análisis al laboratorio.

Detección de Rs en medios de cultivo específicos, a partir de tubérculo de importación y de tubérculos nacionales utilizados para siembra

La técnica (10, 36) fue la siguiente: cada muestra de semilla proveniente de cada uno de los lotes de los productores cooperantes se pesó por separado, se lavó en agua corriente durante 30 min y se colocó en bandejas de plástico con capacidad de 2 L. Posteriormente, se desarrolló la técnica descrita en la primera fase de identificación de Rs en las PP (29, 36, 38).

Detección de Rs con el antisuero producido a partir de tubérculos semilla, plantas, hojas desarrolladas y tubérculos

Previo a la detección con el antisuero producido, las plantas, hojas desarrolladas y tubérculos obtenidos por lote, se cortaron en porciones de 0,5 a 1 cm de diámetro, que se introdujeron directamente en una solución salina al 0,85% de NaCl, denominada solución madre. Para la detección de Rs se desarrolló la técnica de aglutinación en portaobjeto (30, 40), la cual consistió en poner en un portaobjetos cóncavo 0,1 mL de antisuero producido y posteriormente disolver 0,1 mL de las soluciones madre. Las preparaciones fueron observadas al microscopio óptico con la finalidad de ver la reacción de aglutinación.

Detección de Rs por la técnica serológica con anticuerpos específicos a partir de tubérculo de importación y de tubérculos nacionales utilizados para siembra

Para la detección de Rs, utilizando ELISA, se consideró el protocolo según AGDIA (35), previamente indicado en la corroboración de Rs en las PP de la primera fase.

Pruebas de patogenicidad de las bacterias positivas con los diferentes métodos de detección

Las PP de las muestras que resultaron positivas a partir de tubérculos importados y de aquellos de procedencia nacional que son para consumo humano usado para siembra, así como del muestreo, se realizaron en tubérculos de papa y plantas conforme a las descritas en las PP de la primera fase.

RESULTADOS

Primera fase

Incremento de Rs y reconocimiento de síntomas en pruebas de patogenicidad (PP)

De acuerdo con la metodología citada, al realizar las PP en el reconocimiento de síntomas de Rs en tubérculos y plantas de papa, los resultados indicaron que de los tubérculos embebidos en la suspensión bacteriana de 10^8 UFC/mL, entre los 6 y 18 días en condiciones favorables para la enfermedad, el haz vascular se oscureció y al hacer un corte transversal una zooglea bacteriana grisácea fue exudada por los "ojos" (yemas) y por el extremo, en la inserción del estolón al tubérculo.

Por su parte, en las plantas inoculadas al hacer un corte transversal a nivel de tallo se notó la exudación de zooglea gris-castaña. Esto se pudo verificar al hacer un corte transversal en la base del tallo de la planta y observar un fluido filamentososo de color blanco lechoso que emanó de los haces vasculares al sumergir un trozo del tallo en agua limpia y estéril.

En las primeras hojas verdaderas, para el caso de planta, se observaron manchas irregulares de aspecto blanquecino con relación al área sana, y finalmente la planta murió. Inicialmente se presentaron manchas irregulares en un principio claras y posteriormente oscuras, y al cabo de siete a catorce días, necrosis. En los controles no se observaron síntomas. Tanto los tubérculos como las plantas utilizados se mostraron sanos, excepto los tubérculos semilla que mostraron en el área pinchada una oxidación de color café claro (2 mm) pero que al ser presionado, mantenían la misma consistencia sólida que el área sana.

Respecto de la siembra de "suspensiones bacterianas" obtenidas de las pruebas de patogenicidad en medios de cultivos SMSA y TZC en el medio TZC las colonias desarrolladas mostraron un color blanco rosado, mientras que en SMSA presentaron una forma irregular, de color blanco y con centros de color rosado, luego de 72 h de incubación a 30°C. Un resultado similar fue obtenido para aquellas PP en las que se infectaron con el control positivo (Rs), mientras que para las muestras generadas de

las PP que sirvieron como control negativo (agua destilada estéril), el resultado sobre ambos medios utilizados fue colonias secas no mucoides.

Mediante la confirmación por ELISA se obtuvo un resultado positivo para la cepa control Rs, así como también para las suspensiones bacterianas aisladas de las PP antes mencionadas y de aquellas crecidas sobre los medios de cultivo SMSA y TZC. El control negativo no dio reacción.

Segunda fase

Producción de antígeno contra Rs

Debido a que no todos los animales de sangre caliente reaccionan igual a un antígeno, solo el esquema 3 (tabla 1, pág. 33) resultó ser eficiente para producir un alto contenido de anticuerpos, ya que una vez que se realizó la prueba de título antes de la inyección de recuerdo, la aglutinación y precipitación fue observada en el séptimo tubo, lo que no ocurrió con los conejos tratados con los esquemas 1 y 2 (tabla 1, pág. 33).

La aglutinación fue reafirmada realizando lecturas para observar una microaglutinación con la ayuda de un microscopio óptico. Después de la inyección de recuerdo, en los conejos bajo tratamiento con este esquema, la aglutinación fue observada hasta el noveno tubo, lo que indicó un alto contenido de anticuerpos. Las pruebas de confirmación por aglutinación fueron positivas, la dilución 1×10^3 resultó la más baja para su detección. Una vez realizada esta actividad se obtuvo la sangre total, se separó el suero del plasma y el antisuero rico en anticuerpos contra Rs y se almacenó en tubos de ensayo a 4°C.

Detección de Rs, a partir de tubérculo de importación y de tubérculos nacionales utilizados para siembra

Los resultados del diagnóstico fitopatológico mostraron positiva la presencia de Rs en tubérculos de consumo que son utilizados como semilla (tabla 3, pág. 38), al desarrollar las pruebas sobre SMSA, TZC y PPO.

Las colonias visibles en el medio SMSA después de 36 a 48 horas de crecimiento a 30°C fueron blancas con centros rosados a color crema e irregularmente redondas. En el medio TZC, las colonias tomaron una apariencia blanca con centros rosados. Las pruebas de SMSA, TZC y PPO en tubérculos de importación dieron resultados negativos. No obstante ello, es importante notar que en el tubérculo de importación existió variabilidad de respuesta para los municipios de Agua Prieta, Sahuaripa, Moctezuma, Hermosillo y Ures al resultar positivas con el medio específico TZC, pero negativas a la prueba PPO.

Las colonias bacterianas crecidas en los medios SMSA y TZC, obtenidas de muestras de papa para consumo, resultaron Gram negativas, con forma de bacilo, estrictamente aeróbicas, medidas de 0,5-0,7 x 1,5-2,0 μm . En una prueba de crecimiento adicional en medio nutritivo PDA enriquecido con 2% de cloruro de sodio, su desarrollo fue inhibido. Estas colonias al ser analizadas con el antisuero producido y por ELISA, resultaron ser positivas.

Tabla 3. Detección de *Ralstonia solanacearum* en tubérculos de papa procedente de Canadá y Estados Unidos de América (EUA) y en tubérculos de procedencia nacional de consumo fresco utilizado como simiente.

Table 3. Detection of *Ralstonia solanacearum* in tuber potato from Canada and the United States of America and those tuber's from Mexican country directed for consumption and used as a seed.

	Pruebas de diagnóstico				
	Prueba SMSA	Prueba TZC	Prueba PPO	Técnica serológica	Antisuero producido
Papa procedente de Canadá y EUA					
Navojoa	-	-	-	-	-
Cajeme	-	-	-	-	-
Hermosillo	-	+	-	-	-
Ures	-	+	-	-	-
Caborca	-	-	-	-	-
Agua Prieta	-	+	-	-	-
Sahuaripa	-	+	-	-	-
Santa Ana	-	-	-	-	-
Moctezuma	-	+	-	-	-
Papa muestreada en casas comerciales que es dirigida a consumo fresco y que puede ser dirigida como semilla					
Navojoa	+	+	+	+	+
Cajeme	-	-	-	-	-
Hermosillo	+	+	+	+	+
Ures	-	-	-	-	-
Caborca	-	-	-	-	-
Agua Prieta	+	+	+	+	+
Sahuaripa	-	-	-	-	-
Santa Ana	-	-	-	-	-
Moctezuma	-	-	-	-	-
Control positivo Rs	+	+	+	+	+
Control negativo (agua destilada estéril)	-	-	-	-	-

+ Prueba positiva; - prueba negativa; medios de cultivos específicos: TZC y SMSA.

Rs: *Ralstonia solanacearum*; PPO: prueba de lacasa, cresolasa y oxidasa.

Técnica serológica: formación de capas de inmuno-complejos y revelados enzimáticos (AGDIA Inc.).

+ Proof positive; - proof negative; specific culture media: TZC and SMSA.

Rs: *Ralstonia solanacearum*; PPO: laccase test, and oxidase cresolase.

Serological technique: layer formation and immune complexes revealed enzyme (AGDIA Inc.).

Detección de Rs en plantas, hojas desarrolladas y tubérculos procedentes de lotes agrícolas

Respecto de los análisis efectuados a partir de plantas, hojas desarrolladas obtenidas en etapa de floración y tubérculos cuyo muestreo se realizó en madurez fisiológica, para aquellas muestras obtenidas de los municipios de Agua Prieta, Navojoa, Hermosillo y Caborca, los resultados fueron negativos usando los medios específicos (SMSA y TZC); de igual forma un resultado negativo fue observado en las pruebas serológicas, excepto en la prueba PPO que resultó positiva para hoja y tubérculo (tabla 4, pág. 40).

Al analizar las muestras vegetativas procedentes de Sahuaripa, Cajeme y Ures, los análisis arrojaron resultados negativos en SMSA y pruebas serológicas incluyendo el antisuero producido; lo contrario ocurrió en TZC y PPO.

Asimismo se desarrolló una prueba adicional a las colonias aisladas de los diferentes puntos de muestreo, en las que las bacterias fueron Gram negativas, de forma de bacilo, estrictamente aeróbicas, de 0,3-0,5 x 1,0-1,5 μm , mientras que en una prueba de crecimiento adicional en medio nutritivo PDA enriquecido con 2% de cloruro de sodio no mostraron un desarrollo al incubarlas durante 72 h.

Para el municipio de Moctezuma, los resultados indicaron negativa la presencia de Rs. Un resultado positivo fue obtenido para el control positivo en las pruebas SMSA, TZC, PPO y ELISA.

Pruebas de patogenicidad a bacterias positivas mediante los tres métodos de detección

Los tubérculos de consumo, de las PP de las muestras positivas que fueron embebidos en la suspensión bacteriana de 10^8 UFC mL^{-1} presentaron una acuosidad en el haz vascular, entre los 5 y 15 días en condiciones favorables para la enfermedad.

También se detectó que en tubérculos inoculados con Rs aparecieron exudados blanquecinos de consistencia pastosa. Al evolucionar la infección se produjo un oscurecimiento de todo el anillo vascular, los tejidos adyacentes comenzaron a descomponerse, presentando una coloración amarillenta, crema o marrón y finalmente se pudrieron. Al corroborar estos síntomas por la técnica ELISA, el resultado fue positivo para Rs.

Para el caso de plantas, las PP mostraron en las primeras hojas verdaderas manchas irregulares de aspecto blanquecino con relación al área sana, y finalmente se presentó la muerte de la planta.

Se observaron manchas irregulares, en un principio claras y posteriormente oscuras, un amarillamiento leve coincidente con los síntomas que presenta la marchitez bacteriana. Al cabo de 7 a 14 días ocurrió la muerte y al analizar los órganos de las PP de la etapa temprana, el resultado por ELISA fue positivo para Rs. Lo contrario ocurrió para aquellos órganos de la PP inoculadas con agua destilada estéril.

Tabla 4. Detección de *Ralstonia solanacearum* en plantas, hojas y tubérculos muestreados en áreas agrícolas para ser usados como semilla en cultivos de papa en Sonora, México.**Table 4.** Detection of *Ralstonia solanacearum* in seedling, leaf and tuber sampled in area of potato crop in Sonora, Mexico.

Municipio muestreado	Pruebas de diagnóstico			Técnica serológica	Antisuero producido
	Prueba SMSA	Prueba TZC	Prueba PPO		
Navjoa					
Planta	-	-	-	-	-
Hoja	-	-	+	-	-
Tubérculo	-	-	+	-	-
Cajeme					
Planta	-	+	+	-	+
Hoja	-	+	+	-	+
Tubérculo	-	+	+	-	+
Hermosillo					
Planta	-	-	-	-	-
Hoja	-	-	+	-	-
Tubérculo	-	-	+	-	-
Ures					
Planta	-	+	+	-	+
Hoja	-	+	+	-	+
Tubérculo	-	+	+	-	+
Caborca					
Planta	-	-	-	-	-
Hoja	-	-	+	-	-
Tubérculo	-	-	+	-	-
Agua Prieta					
Planta	-	-	-	-	-
Hoja	-	-	+	-	-
Tubérculo	-	-	+	-	-
Sahuaripa					
Planta	-	+	+	-	+
Hoja	-	+	+	-	+
Tubérculo	-	+	+	-	+
Santa Ana					
Planta	-	-	-	-	-
Hoja	-	-	-	-	-
Tubérculo	-	-	-	-	-
Moctezuma					
Planta	-	-	-	-	-
Hoja	-	-	-	-	-
Tubérculo	-	-	-	-	-
Control positivo Rs	+	+	+	+	+
Control negativo	-	-	-	-	-

+ Prueba positiva; - prueba negativa; Medios de cultivos específicos: SMSA y TZC.

Rs: *Ralstonia solanacearum*; PPO: prueba de lacasa, cresolasa y oxidasa.

Técnica serológica: formación de capas de inmuno-complejos y revelados enzimáticos (AGDIA Inc.);

Control negativo (agua destilada estéril).

+ Proof positive; - proof negative; specific culture media: SMSA and TZC.

Rs: *Ralstonia solanacearum*; PPO: laccase test, and oxidase cresolase.

Serological technique: layer formation and immune complexes revealed enzyme (AGDIA Inc.) Negative control (sterile distilled water).

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en la primera fase (incremento de Rs y reconocimiento de síntomas en pruebas de patogenicidad), los resultados coinciden con diversos autores (9, 10, 23, 35, 37), haciendo énfasis en la obtención de una decoloración de color gris, lo cual es un primer indicio del establecimiento de la infección (10, 14, 16). Los mismos autores citan, además, que al realizar un corte longitudinal se observa en el haz vascular un anillo de coloración marrón grisáceo, que puede extenderse a la médula o a la corteza. Cuando se aplica cierta presión a las secciones transversales de los tubérculos infectados pueden ser visualizadas a contra luz en el haz vascular gotas de color blanco-grisáceo (10). De igual forma, los resultados obtenidos en la primera fase de este estudio concuerdan con otras investigaciones (4), al indicar que los ojos o nuevas yemas que emergen de los tubérculos se tornan de un color marrón grisáceo, y un exudado pegajoso se puede formar en ellos o en la conexión de nuevas yemas. Los resultados observados en las pruebas de patogenicidad en plantas coinciden con los de otros autores (26), ya que al utilizar cultivos bacterianos de *R. solanacearum* de 48 horas de crecimiento en el medio YCA (agar carbonato de calcio extracto de levadura) y realizar inoculaciones (10^8 UFC ml⁻¹), en raíces heridas y parte basal del tallo de plantas, las plantas mostraron síntomas a los 5 días de la inoculación (1, 5, 19).

Cabe indicar que el amarillamiento, marchitamiento y muerte posterior, observados en las plantas inoculadas con Rs en las PP del presente estudio, al hacer un corte transversal a nivel de tallo, se notó la exudación de zooglea de color gris-castaña. Esta infección se pudo haber iniciado con el avance de células bacterianas de Rs y posterior replicación de las mismas en los vasos de más reciente formación (xilema secundario) y en los vasos del xilema primario (27). Lo anterior es usual visualizarlo como una gran cantidad de puntos de color azul oscuro en las células del floema que denota la presencia de masas bacterianas. De acuerdo con el tiempo transcurrido, dichas masas se presentan con mayor densidad y frecuencia en los vasos de mayor diámetro, ocupando todo el volumen del mismo y en algunos casos ocasionando una obstrucción completa a lo largo de los vasos más desarrollados, mientras que en los de menor desarrollo solo se observan porciones ocluidas y puntos de color oscuro en la región del floema. Las masas bacterianas corresponden a Rs: esto corrobora lo señalado en la literatura respecto de que la bacteria se aloja en el tejido conductor, principalmente en el xilema (23, 26).

Los resultados obtenidos en medios de cultivo SMSA, TZC y PPO en el presente estudio concuerdan con el trabajo de Cartín & Wang (6), en el que al analizar muestras de suelo de la zona alta de Cartago (Costa Rica) para aislar agentes supresores a *Pseudomonas solanacearum* F. E. Smith, en tomate (*Lycopersicon esculentum*), en el medio TZC, se obtuvieron colonias típicas de Rs blancas con centros rosados. De igual forma, Meneses *et al.* (33) obtuvieron colonias típicas del agente causal de la marchitez bacteriana en papa, en medios SMSA al desarrollar el estudio de respuestas de líneas de tomate de mesa a *P. solanacearum* en época de invierno en Costa Rica, aspecto que también concuerda con las mismas características de colonias aisladas

en el presente estudio. Asimismo, nuestros resultados coinciden con la investigación de Yabuuchi *et al.* (44), al indicar que Rs es una bacteria aeróbica Gram negativa, en forma de bacilos que miden 0,5-0,7 * 1,5-2,0 micras en tamaño, que son muy sensibles a la desecación y son inhibidas en cultivo con concentraciones bajas (2%) de cloruro de sodio.

La confirmación por la técnica de ELISA, siguiendo el protocolo general de identificación de bacterias AGDIA. Inc., es una técnica acreditada por el Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario de la Dirección General de Sanidad Vegetal. En este estudio se pudo confirmar que en condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad puede ser utilizada para identificar bacterias en plantas con síntomas, dado que con frecuencia estos contienen altas poblaciones del patógeno (>10⁵ UFC/mL). Varios protocolos para ELISA han sido optimizados para detectar la bacteria de interés en concentraciones tan bajas como 10³ UFC/mL, pero tal sensibilidad no es típica en la mayoría de los ensayos bacterianos donde se usa esta técnica. Según algunos autores (7, 17), en concentraciones bacterianas inferiores a 10⁵ UFC/mL, la bacteria primero debe ser sembrada en medio de cultivo.

Por otra parte, la fase de detección en tubérculos semilla de papa procedente de Estados Unidos de América y Canadá, mediante las cuatro diferentes técnicas de detección (medios SMSA, TZC, PPO, antisuero producido y ELISA), indicaron un resultado negativo, lo que demuestra que la semilla procedente del extranjero viene libre del patógeno cuarentenario Rs y que los puntos de verificación de entrada de semilla están cumpliendo las expectativas de muestreo y detección de este tipo de microorganismos. No obstante lo anterior, y debido al resultado positivo de Rs en papa de consumo, y que puede ser utilizada como semilla por productores, indica que las medidas fitosanitarias que deben tener los productores agrícolas, especialmente de Navojoa, Hermosillo y Agua Prieta, como el sembrar únicamente semilla certificada, deben ser reforzadas mediante la continua capacitación y divulgación de los riesgos que se pueden presentar en el campo, cuando la enfermedad está presente. Esto coincide con lo descrito por Nakaho *et al.* (34), Latorre (31) y Priou *et al.* (35), quienes establecieron la importancia que reviste el diagnóstico fitosanitario antes del establecimiento de un cultivo a nivel de suelo, tubérculos semilla y durante las diferentes etapas fenológicas del cultivo.

Respecto de los análisis obtenidos, las pruebas de detección en plantas, hojas desarrolladas obtenidas en etapa de floración y tubérculos muestreados en madurez fisiológica, esta variabilidad de respuesta también ha sido encontrada en otras investigaciones (21, 23, 24, 25, 27), pues la diversidad microbiana que puede ser obtenida de un muestreo vegetativo procedente de un campo agrícola es amplia y abundante. En este sentido otros autores (23), establecen que también ha ocurrido al desarrollar un muestreo de papa a nivel mundial y al haber obtenido una diferenciación en biovares de *Ralstonia*, adjudicándole a una variabilidad en el metabolismo de nitrato, o incluso generarse esta variación por filotipos (excepto filotipo III) por la continua recombinación genética que existe en Rs (4, 7, 8, 11, 12, 22).

Respecto de las PP de los tubérculos de consumo positivos para Rs, plantas, los síntomas que se observaron al evolucionar la infección fueron un oscurecimiento de todo el anillo vascular (5, 23), corroborándose por la técnica ELISA la presencia de Rs.

CONCLUSIÓN

Al estudiar la situación actual de Rs en tubérculos de importación y aquellos de consumo y de procedencia nacional que pueden ser utilizados para siembra, además de conocer el status de la marchitez bacteriana en las zonas agrícolas donde se desarrolla el cultivo de papa en el Estado de Sonora, se concluye que la presencia de la bacteria resultó negativa en tubérculo procedente del extranjero. Por otra parte, se detectó la presencia del agente causal de la marchitez bacteriana en papa de consumo nacional que algunos productores podrían utilizar como semilla, por lo que es necesario considerar medidas de regulación fitosanitarias como son muestreos continuos en las áreas agrícolas donde se produce papa, verificaciones de origen, analizar un mayor número de muestras para el diagnóstico y concientizar a los productores para evitar el uso de este material no apropiado para semilla (15, 16). La presencia de Rs se comprobó mediante el uso de medios de cultivo específicos denominados SMSA y TZC en condiciones controladas, prueba PPO, prueba con el antisuero producido, ELISA con reactivos de AGDIA y pruebas de patogenicidad, las cuales deben ser utilizadas en conjunto y no individualmente como un método único de detección.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, G. 2008. Fitopatología. UTEHA Noriega editores. México, D. F. 838 p.
2. Bolaños, C. 2006. El cultivo de papa. Comunica Diseño. México, D. F. p.12-14.
3. Borboa-Flores; Rueda-Puente, E. O.; Acedo-Félix, E.; Ponce, J. F.; Cruz-Villegas, M.; García- Hernández, J. L.; Ortega-Nieblas, M. M. 2009. Evaluation of antibacterial activity *in vitro* of essential oils vs *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 12: 539-547.
4. Boshou, L. 2005. A broad review and perspective on breeding for resistance to bacterial wilt. In: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. Allen, C.; Prior, P.; Hayward, A. C. (Eds). St. Paul, MN. APS press. p. 225-238.
5. Buddenhagen, I; Kelman, A. 1964. Biological and physiological aspect of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Ann. Rev. Phytop. 2: 203-230.
6. Cartín, J.; Wang, A. 1997. Aislamiento de agentes supresores a *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith, en tomate (*Lycopersicon esculentum*). Agron. Mesoamer. 8: 54-58.
7. Caruso, P.; Gorris, M. T.; Cambra, M.; Palomo, J. L.; Collar, J.; Lopez, M. M. 2002. Enrichment double- antibody sandwich indirect enzyme-linked immunosorbent assay that uses a specific monoclonal antibody for sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in asymptomatic potato tubers. App. Environ. Microb. 68: 3634-3638.
8. Castillo, J. A.; Greenberg, J. T. 2007. Evolutionary dynamics of *Ralstonia solanacearum*. Appl. Environ. Microbiol. 73: 1225-1238.
9. Centro Internacional de la papa (CIP). 2009. Principales enfermedades, nematodos a insectos de la papa. Lima, Perú. CIP. 10 p.
10. Champoiseau, L. 2009. *Ralstonia solanacearum* raza 3 biovar 2. El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos - Programa de Iniciativa Nacional de Investigaciones. USDA. 50 p.
11. Cook, D.; Barlow, E.; 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 Interactions. 2: 113-121.

12. Coutinho, T. A. 2005. Introduction and prospectus on the survival of *R. solanacearum*. In: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. Allen, C.; Prior, P.; Hayward, A. C. (Eds). APS press, St. Paul, MIN. p. 29-38.
13. Cruz, F. M. 2007. Ensayo de inmunoadsorción con enzimas ligadas (Elisa) para la detección de virus fitopatógenos. En: Manual de métodos de detección e identificación de fitopatógenos. Departamento de Fitopatología. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. México. D. F. 180 p.
14. Denny, T. P.; Hayward, A. C. 2010. Gram negative bacteria: *Ralstonia*. In: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad, N. W.; Jones, J. B.; Chun, W., (Eds). APS Press, St. Paul, MIN. p. 151-174.
15. Elphinstone, J.; Henessy, J.; Wilson, J.; Stead, D. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 26: 663-678.
16. Elphinstone, J.; Harris, L. 2002. Monitoring and control of the potato brown rot bacterium in irrigation water. British Potato Council, Oxford, U. K. p. 2.
17. Flores, O.A. 2006. Producción de antisuero contra *Agrobacterium tumefaciens*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. p. 9.
18. French, E.; Gutarra, L.; Aley, P.; Elphinstone, J. 1995. Culture media for *Pseudomonas solanacearum* isolation, identification and maintenance. Rev. Mex. Fitopatología. 30: 126-130.
19. Goto, M. 2002. Fundamentals of bacterial. Plant Pathology. New York, EE.UU. Academic Press. 342 p.
20. Guidot, A.; Antes, P.; Schoenfeld, J.; Carrère, S.; Genin, S.; Boucher, C. 2007. Estructura genómica y la filogenia de la planta patógeno *Ralstonia solanacearum* determinado por análisis de genes de distribución. Diario de la bacteriología. 189: 377-387.
21. Hayward, A. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. J. Appl. Bacteriol. 27: 265-277.
22. Hayward, A. 1975. Biotypes of *Pseudomonas solanacearum* in Australia. Australian Plant Pathology Society Newsletter. 4: 9-11.
23. Hayward, A. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Ann. Rev. Phytopathology. 29: 65-87.
24. Hayward, A. 1994. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Hartman, G. L.; Hayward, A. C. (Eds.), CAB International, Oxford, England. p.127 -135.
25. Hayward, A.; El-Nashaar, H. M.; Nydegger, U.; De Lindo, L. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. J. Appl. Bacteriol. 69: 269-280.
26. Hernández, Y.; Marino, N.; Trujillo, G. 2005. Invasión de *Ralstonia solanacearum* en tejidos de tallos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Revista Facultad de Agronomía. 22: 185-194.
27. Hernández-Romero, D.; Solano-Muñoz, F.; Sánchez-Amat, A. 2005. Caracterización del sistema polifenol oxidasa de la bacteria patógena de plantas *Ralstonia solanacearum* y su posible papel fisiológico. En: I Reunión Grupo Especializado Microbiología de Plantas Ceredilla (Madrid, España). 220 p.
28. Hernández-Romero, D.; Sánchez-Amat, A.; Solano, F. 2005. Polyphenol Oxidase Activity Expression in *Ralstonia solanacearum*. App. Environ. Microbiol. 71: 6808-6815.
29. Janse, J. D. 1996. Potato brown rot in Western Europe-history, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 26: 679-695.
30. Kiraly, G. Z. 2004. Methods in Plant Pathology. Elsevier Scientific Publishing Company. New York, U. S. A. 509 p.
31. Latorre, G. 1999. Enfermedades de las plantas cultivadas. Ed. Alfaomega. México, D. F. 530 p.
32. Macías, V.; Reyes, M.; Robles, E. 2006. Guía para cultivar papa en Aguascalientes. Folleto técnico N° 13. INIFAP. Campo Experimental Pabellón. Aguascalientes. México. 16 p.
33. Meneses, R.; Moreira, M.; Jiménez, J.; Bustamante, E. 1990. Respuesta de líneas de tomate de mesa a *Pseudomonas solanacearum* en época de invierno en Costa Rica. Turrialba. 40: 222-228.
34. Nakaho, K.; Hibino, H.; Miyawa, H. 2000. Possible mechanisms movement of *Ralstonia solanacearum* in resistant tomato tissues. J. Phytopathology 148: 181-190.
35. Priou, S.; Gutarra, L.; Aley, P. 2006. An improved enrichment broth for the sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* (biovars 1 and 2A) in soil using DAS-ELISA. Plant Pathology. 55: 36-45.
36. Randhawa, P. 1996. Fruit Blocht Testing Protocol. California Seed and Plant Lab. Roseville, California U. S. A. 5 p.
37. Rouselle, P.; Crosnier, R. J. 2009. La patata. Ed. Mundi-Prensa. España. p. 76-77.
38. Rueda-Puente, E. O. 1996. Producción de antisuero contra *Acidovorax avenae* pv. *citullii* y su detección en la comarca lagunera. Tesis de Maestría en Ciencias. Departamento de parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 87 p.

39. Rueda-Puente, E. O.; Tarazón, M. A. H.; Hernández, F. A.; García, J. L. 2006. Producción de antisuero contra la mancha bacteriana del fruto [*Acidovorax avenae* pv. *citulli* (Schaad, Sowell, Goth, Colwell y Webb) Willems, Goor, Thielemans, Gillis, Kersters y De Ley] y detección en el cultivo de sandía (*Citrullus vulgaris* Schrad.) en la Comarca Lagunera, México. *Rev. Mex. Fitopatología*. 24: 129-135.
40. Rueda-Puente, E. O.; Duarte-Medina, M.; Alvarado-Martínez, A. G.; García, O. M.; Tarazón Herrera, M.; Holguín, P. R.; Murillo, A. B.; García, H. J. L.; Flores-Hernández, A.; Orona-Castillo, I. 2009. *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*: una enfermedad bacteriana en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Sonora, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 10: 169 -175.
41. SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2004. Manual de muestreo y procesamiento para la identificación de los principales patógenos de la papa. Dirección General de Sanidad Vegetal. México, D. F. 16 p.
42. Valdés, D. R. 2008. Cría y explotación del conejo. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Secretaría de Fomento Agropecuario de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México. 115 p.
43. Villarreal, G. L. A. 2009. Supervivencia, dispersión y patogenicidad de *Erwinia carotovora* y su relación con *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. México. 92 p.
44. Yabuuchi, E.; Kosako, Y.; Yano, I.; Hotta, H.; Nishiuchi, Y. 1995. Transfer of two Burkholderia and an Alcaligenes species to Ralstonia gen. nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Douderoff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiology and Immunology*. 39: 897-904

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)
(beca doctoral no. 236483) de Ana G. Alvarado-Martínez.

Al CONACYT y Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
por el proyecto aprobado 12067: Detección de bacterias de importancia cuarentenaria
en la zona noroeste de México.

Al Dr. Seon Woo Lee del Department of Applied Biology, College of Natural Resources and
Life Science, Dong-A University, por el apoyo de *Ralstonia solanacearum*.

A la Empresa Nunhems USA (Dr. Louie Dinitto) y Química Agronómica de México
por el apoyo proporcionado para el desarrollo del presente estudio.

A la Fundación Produce Sonora, por las facilidades obtenidas para el desarrollo del proyecto intitulado:
Estrategias de control para organismos fitopatógenos que afectan la producción de
hortalizas en la región de Guaymas y costa de Hermosillo.