

## Identificación de Razas y Biovares de *Ralstonia solanacearum* Aisladas de Plantas de Tomate

### Identification of Races and Biovars of *Ralstonia solanacearum* Isolated From Tomato Plants

José Misael Perea Soto, Raymundo Saúl García Estrada, Raúl Allende Molar, José Armando Carrillo Fasio, Josefina León Félix, Benigno Valdez Torres y Fabiola Sary Mell López Soto, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Coordinación Culiacán, km 5.5 Carr. Culiacán-El Dorado, Culiacán, Sinaloa, CP 80110, México. Correspondencia: rsgarcia@ciad.mx

(Recibido: Junio 07, 2011 Aceptado: Septiembre 02, 2011)

---

Perea SJM, García ERS, Allende MR, Carrillo FJA, León FJ, Valdez TB y López SFSM. 2011. Identificación de razas y biovares de *Ralstonia solanacearum* aisladas de plantas de tomate. Revista Mexicana de Fitopatología 29:98-108.

**Resumen.** La marchitez bacteriana de las solanáceas causada por *Ralstonia solanacearum*, es una de las enfermedades con daño más devastador en cultivos de importancia como tomate, papa, berenjena, chile y tabaco. El objetivo de este trabajo fue identificar a nivel de raza y biovar, cepas de *R. solanacearum* aisladas de plantas de tomate, cultivadas en Valles de Sinaloa, San Quintín, B.C. y de Jalisco en México. Se aislaron un total de ocho cepas de *R. solanacearum* a partir de plantas de tomate afectadas por la bacteria. Todos los aislamientos se realizaron en el medio de cultivo SMSA y fueron identificados como *R. solanacearum*, mediante estudios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, inmunotiras y confirmación por PCR, utilizando un par de oligonucleótidos universales 759/760, se amplificó un fragmento de 280 pb del ADN ribosomal de *R. solanacearum*. La identificación de la raza se realizó con el par de primers 630/631 específicos para raza 3. Mediante la producción de ácidos a partir de disacáridos, se determinó que todas las cepas pertenecen al biovar 2 (Bv2).

Palabras clave adicionales: Marchitez bacteriana, tomate, *Ralstonia solanacearum*, Raza3, Biovar2.

---

La marchitez bacteriana de las solanáceas causada por *Ralstonia solanacearum*, está presente en el mundo en regiones tropicales, subtropicales y templadas, atacando a más de 200 especies de plantas (Hayward, 2000; Elphinstone, 2005). La bacteria invade a las plantas hospederas a través de la raíz y coloniza los vasos del xilema en el sistema vascular. Las plantas infectadas muestran disminución de crecimiento, amarillamiento, marchitamiento repentino y mueren rápidamente (Sánchez *et al.*, 2008).

Debido a su diversidad genética, *R. solanacearum* es una especie heterogénea que se considera como un grupo complejo de aislamientos relacionados (Fegan y Prior, 2005). Por más de cuatro décadas, *R. solanacearum* se ha

**Abstract.** Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is one of the most devastating diseases in economically important crops such as tomatoes, potatoes, eggplant, pepper and tobacco. The objective of this study was to identify strains of *R. solanacearum* isolated from tomato plants grown in Culiacan Valley, San Quintin, B.C. and Jalisco in Mexico to race and biovar levels. Eight strains of *R. solanacearum* from wilted tomato plants were isolated. Isolations were made on SMSA culture medium, and identified as *R. solanacearum* using morphological, physiological and biochemical studies, immunoassay strip and polymerase chain reaction (PCR) by using the universal primers 759/760 to amplify a 280 bp fragment from the ribosomal DNA. Race identification was performed with *R. solanacearum* race 3 specific primers. Based on the ability of isolates to produce acid from a panel of disaccharides and sugar alcohols, all isolates belong to biovar 2 (Bv2).

Additional keywords: Bacterial wilt, tomato, *Ralstonia solanacearum*, Race 3, Biovar 2.

---

Bacterial wilt of solanaceae caused by *Ralstonia solanacearum* is present around the world in tropical, subtropical and temperate regions, attacking over 200 plant species (Hayward, 2000; Elphinstone, 2005). Host plants are invaded by the bacteria through the roots, colonizing the xylem vessels in the vascular system. A reduced growth, yellowing, sudden wilt followed by a rapid death are some of the symptoms revealed by infected plants (Sánchez *et al.*, 2008).

Due to their genetic diversity, *R. solanacearum* is a heterogeneous species considered as a complex group of related isolates (Fegan and Prior, 2005). The *R. solanacearum* has been subdivided for over four decades in five races (R1, R2, R3, R4 and R5), based on its host range and on six Biovars (Bv1, Bv2, Bv3, Bv4, Bv5 and Bv6), in accordance to their metabolic capacity for utilization of various carbon sources (Hayward, 1964; 1991; Denny and Hayward, 2001). The strains that on a regular basis affect tomato within this classification scheme belong to Race 1 (Bv1, Bv3 and Bv4) and to Race 3 [Bv2 and Bv2Tropical (Bv2T)]. The Bv2 strains are less metabolically active than

subdividido en cinco razas (R1, R2, R3, R4 y R5), en base a su rango de hospederos y en seis biovars (Bv1, Bv2, Bv3, Bv4, Bv5 y Bv6), según su capacidad metabólica para la utilización de diversas fuentes de carbono (Hayward, 1964; 1991; Denny y Hayward, 2001). Dentro de este esquema de clasificación, las cepas que normalmente afectan tomate pertenecen a la raza 1 (Bv1, Bv3 y Bv4) y a la raza 3 [Bv2 y Bv2Tropical (Bv2T)]. Las cepas Bv2 son menos activas metabólicamente que las cepas Bv2T (Hayward, 1994; Denny, 2006).

La R3Bv2 de *R. solanacearum* es una bacteria cuarentenada en Norteamérica y la Unión Europea (Lambert, 2002). La R3Bv2 tiene como principales hospederos papa y tomate, aunque también puede afectar a berenjena, plantas de ornato y malezas (Allen *et al.*, 2001; Janse *et al.*, 2004; Swanson *et al.*, 2005). Las cepas R3Bv2 pueden ser identificadas biológicamente mediante pruebas fisiológicas; tales como las pruebas para determinación de biovar y rango de hospedante, a diferencia de varias cepas de la R1. Además, las cepas R3Bv2 no inducen reacción de hipersensibilidad en tabaco (Robertson *et al.*, 2004; Ji *et al.*, 2007).

Las técnicas de identificación y caracterización molecular de *R. solanacearum* son útiles para conocer los aspectos evolutivos de este patógeno (Seal y Elphinstone, 1994; Cook y Sequeira, 1994; Villa *et al.*, 2005; Fegan y Prior, 2005). La identificación de la especie de *R. solanacearum* puede lograrse mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando un par de oligonucleótidos universales (759 y 760) que amplifica parte del gen *IpxC* (Opina *et al.*, 1997). La PCR para identificar la Raza 3, se basa en amplificar parte de un profago presente en el genoma de todas las cepas R3Bv2 probadas (Fegan *et al.*, 1998).

Aunque la bacteria *R. solanacearum*, se encuentra distribuida en diversas partes del mundo y en toda América, en México se ha informado la presencia de la R2Bv1 en plantas de tomate en Guerrero (Dr. Fucikovsky, comunicación personal). Sin embargo, no se ha reportado la presencia de la R3Bv2 de manera oficial afectando cultivos de tomate. Los primeros aislamientos de *R. solanacearum* R1Bv1 y R3Bv2 (reportados en tabaco y papa, respectivamente), se encuentran registrados en la década de los setenta (Ji *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2008); aunque no se reporta el lugar de origen de estos aislamientos.

En el Valle de Culiacán, durante la década pasada, la marchitez bacteriana de las solanáceas no se consideraba de importancia económica (Ramírez y Sainz, 2006), pero si fue en el cultivo de papa en el norte de Sinaloa. En los últimos cinco años, *R. solanacearum* ha sido causante de pérdidas económicas importantes en diferentes campos agrícolas. Existe poca información en la región sobre este patógeno y no se ha documentado la clasificación taxonómica de las cepas presentes en los cultivos del Valle de Culiacán y de otras regiones productoras de tomate. Debido a que la identificación del patógeno es el primer paso para diseñar estrategias en el manejo de la enfermedad, el objetivo de este estudio fue caracterizar e identificar biológica y genéticamente a nivel de raza y biovar las cepas de *R.*

the Bv2T strains (Hayward, 1994; Denny, 2006).

The R3Bv2 of *R. solanacearum* is a quarantined bacterium from North America and the European Union (Lambert, 2002). Its main hosts are potato and tomato, but it can also affect eggplant, ornamental plants and weeds (Allen *et al.*, 2001; Janse *et al.*, 2004; Swanson *et al.*, 2005). The R3Bv2 strains can be biologically identified by physiological tests, such as the tests used for Biovar and host range determination, unlike several R1 strains. Moreover, these strains do not induce hypersensitivity reaction in tobacco (Robertson *et al.*, 2004; Ji *et al.*, 2007).

The techniques of *R. solanacearum* identification and molecular characterization are useful for understanding the evolutionary aspects of this pathogen (Seal and Elphinstone, 1994; Cook and Sequeira, 1994; Villa *et al.*, 2005; Fegan and Prior, 2005). The identification of *R. solanacearum* species can be achieved by the polymerase chain reaction (PCR) technique using a pair of universal primers (759 and 760) that amplify part of the *IpxC* gene (Opina *et al.*, 1997). The PCR for Race 3 is based on prophage amplification present in all the tested R3Bv2 strains (Fegan *et al.*, 1998).

Although *R. solanacearum* is distributed in several parts of the world, and all America, the R2Bv1 presence has been reported in Mexico in tomato plants from Guerrero (Dr. Fucikovsky, personal communication). However, the R3Bv2 presence affecting tomato crops has not been officially reported. The first *R. solanacearum* R1Bv1 and R3Bv2 isolates (reported in tobacco and potato, respectively), were registered in the 70's (Ji *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2008); though the origin of these isolates has not yet been reported.

Over the last decade, the solanaceae bacterial wilt was not considered of economic importance in the Valley of Culiacan (Ramírez and Sainz, 2006), though it was for the potato crop in Northern Sinaloa. The *R. solanacearum* bacteria have been causing some serious losses in different agricultural fields. There is little information in the region on this pathogen and the strains taxonomic classification, present in the crops from the Valley of Culiacan and some other tomato producing regions, has not been documented, yet. The present study is aimed to characterize and identify both biologically and genetically the *R. solanacearum* strains isolated from tomato plants harvested in different agricultural fields from the Valley of Culiacan, San Quintin, B.C. and Autlan, Jalisco, by means of immunological, biochemical, molecular and physiological tests, due to the fact that the pathogen identification is the first step in designing strategies for disease management.

## MATERIALS AND METHODS

**Isolation of *R. solanacearum* strains.** The *R. solanacearum* strains used in the study hereby (Table 1), were isolated from tomato plant samples with the typical solanaceae bacterial wilt symptoms. The collected diseased plants were tested for a rapid identification: The first was the bacterial flow, which consisted on cutting a piece of stem and had it submerged into a beaker with distilled water the bacterial flow precipitation was observed after a few

*solanacearum* aisladas de plantas de tomate cultivadas en diferentes campos agrícolas del Valle de Culiacán, San Quintín, B.C. y Autlán, Jalisco, mediante pruebas inmunológicas, bioquímicas, moleculares y fisiológicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Aislamiento de cepas de *R. solanacearum*.** Las cepas de *R. solanacearum* que se utilizaron en esta investigación (Cuadro 1), fueron aisladas a partir de muestras de plantas de tomate con síntomas típicos de la marchitez bacteriana de las solanáceas. Las plantas enfermas colectadas se sometieron a pruebas rápidas de identificación; la primera fue la de flujo bacteriano, la cual consistió en cortar un trozo de tallo y sumergirlo en un vaso de precipitado con agua destilada, después de unos segundos se observó la precipitación del flujo bacteriano en forma de un hilo continuo de color blanco (Denny, 2006); y la segunda técnica consistió en el uso de inmunitiras (Agdia Inc.), específicas para *R. solanacearum*, como lo recomienda el fabricante (Ji *et al.*, 2007). Las muestras positivas se colocaron en una bolsa de plástico estéril y se transportaron al Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.).

**Aislamiento y preservación de *R. solanacearum*.** El aislamiento de la bacteria se realizó a partir de tejido vascular necrosado de la base del tallo de plantas enfermas. Para ello se seleccionaron trozos de tejido infectado y se depositaron en un tubo que contenía 2 mL de agua destilada estéril y se mantuvieron en reposo por 5 min. La suspensión se sembró con un asa bacteriológica esterilizada con fuego, sobre placas de medio de cultivo agar cloruro de tetrazolium (TZC) (Kelman, 1954) y en medio semiselectivo Sur de África modificado por Elphinstone *et al.* (1996) (SMSA), el cual contiene cristal violeta (violeta de genciana), sulfato B de polimixina, bacitracina, cloromicetina y ciclohexamida, todos ellos al 1%, además de bencilpenicilina al 0.1%. Las cajas sembradas se incubaron a 28°C por un período de tres a cuatro días.

Para preservar las cepas, se seleccionaron las colonias con morfología típica de *R. solanacearum* (mucoide y con una coloración rosa en el centro), se incrementaron entubos con 5 mL de medio de cultivo líquido de ácido casamino peptona glucosa (CPG) con

seconds as a white continuous thread (Denny, 2006); and the second technique involved the use of immune-strings (Agdia Inc.), specific for *R. solanacearum*, as recommended by the manufacturer (Ji *et al.*, 2007). Positive samples were placed in a sterile bag and transported to the Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.).

**Isolation and preservation of *R. solanacearum*.** The bacteria isolation was made from the stem of diseased plants necrotic vascular tissue. Pieces of infected tissue were selected for this purpose, placed in a tube containing 2 mL of sterile distilled water and kept at rest for 5 min. The suspension was seeded with a sterile bacteriological loop with fire, on tetrazolium chloride (TZC) agar medium culture plates (Kelman, 1954), and on a South African selective medium modified by Elphinstone *et al.* (1996) (SMSA), which contained crystal violet (gentian violet), polymyxin B sulfate, bacitracin, chloromycetin and cyclohexamide, all at 1% and 0.1% of bencil penicillin. The plates were incubated at 28°C for a period of three to four days.

Colonies with *R. solanacearum* (mucoide and with a pink tint in the middle) typical morphology were selected for strain preservation, increased in tubes with 5mL of glucose peptone casamino (GPC) acid liquid culture with shaking at 150 rpm at a 28°C for 24 h (Hendrick and Sequeira, 1984). A bacterial culture aliquot of 600 µL was taken and deposited in an Eppendorf tube, which had 600 µL of glycerol added subsequently to it at a 30% concentration, and stored at -80°C.

**Characteristics of *R. solanacearum* colonies.** Size, shape surface, edges, color and pigment characteristics from each of the detected strains or bacterial colonies were observed on plates with a TZC culture medium (Kelman, 1954; Champoiseau *et al.*, 2009). These plates were incubated at 28°C for 48 h (Figure 1).

**Biochemical tests for *R. solanacearum* identification.** The Gram staining was performed in accordance to that described by Suslow *et al.* (1982). The oxidase test followed the method described by Hildebrand *et al.* (1988). The arginine dihydrolase production was performed using the methodology proposed by Thornley, (1960). The determination of carbohydrates oxidative / fermentative metabolism was performed according to Hugh and Leifson (1953). The reduction from nitrate to nitrite and gas production was performed as noted by Hayward *et al.* (1990). The starch hydrolysis and gelatin liquefaction was performed according to the methodology proposed by Hayward (1964). All of these tests were performed by triplicate.

**Obtaining of DNA.** The DNA extraction was performed in *R. solanacearum* bacterial colonies developed for 24 h at 28°C in a TZC culture medium. It was performed by heat lyses at 80°C for 5 min.

**Polymerase chain reaction (PCR) for species and race confirmation.** Species confirmation in all *R. solanacearum* strains was performed by PCR using the 759/760 (5' GTC GCC GTC AAC TCA CTT TCC 3' and 5' GTC GCC GTC AGC AAT GCG GAA TCG 3') universal

Cuadro 1. Cepas de *R. solanacearum* aisladas de tomate.  
Table 1. *R. solanacearum* strains isolated from tomato.

Cepa	Hospedero	Origen	Fecha
Crs1	Tomate	Valle de Culiacán	Marzo 2009
CRs2	Tomate	Valle de Culiacán	Abril 2009
CRs202	Tomate	Valle de Culiacán	Agosto 2008
Crs203	Tomate	Valle de Culiacán	Septiembre 2008
Crs204	Tomate	Valle de Culiacán	Junio 2008
CRs3C	Tomate	Valle de Culiacán	Marzo 2008
CRs3	Tomate	San Quintín, B.C.	Mayo 2009
CRs4	Tomate	Autlán, Jalisco	Octubre 2009

Crs= Cepa de *Ralstonia solanacearum*. El número corresponde al aislamiento



agitación a 150 rpm y temperatura de 28°C durante 24 h (Hendrick y Sequeira, 1984). De cada una de las cepas, se tomó una alícuota de 600 µL de cultivo bacteriano y se depositaron en un tubo Eppendorf, al que posteriormente se le adicionaron 600 µL de glicerol a una concentración de 30% y se almacenaron a -80°C.

#### Características de colonias de *R. solanacearum*.

Las características de tamaño, forma, superficie, bordes, color y producción de pigmento de cada una de las cepas o colonias bacterianas detectadas, se observaron en placas con medio de cultivo TZC (Kelman, 1954; Champoiseau *et al.*, 2009). Estas placas se incubaron a temperatura de 28°C por 48 h (Figura 1).

**Pruebas bioquímicas para la identificación de *R. solanacearum*.** La tinción de Gram se realizó de acuerdo a lo descrito por Suslow *et al.* (1982). En la prueba de oxidasa se siguió la metodología descrita por Hildebrand *et al.* (1988). La producción de dihidrolasa de arginina se realizó mediante la metodología propuesta por Thornley (1960). La determinación del metabolismo oxidativo/fermentativo de los carbohidratos se realizó de acuerdo a lo señalado por Hugh y Leifson (1953). La reducción de nitratos a nitritos y producción de gas fue realizada como lo señalan Hayward *et al.* (1990). La hidrólisis de almidón y licuefacción de gelatina se realizó de acuerdo a lo propuesto por Hayward (1964). Todas estas pruebas se realizaron por triplicado.

**Obtención de ADN.** La extracción del ADN se realizó de colonias bacterianas de *R. solanacearum* desarrolladas por 24 h a 28°C en medio de cultivo TZC. La extracción se realizó mediante lisis por calor a 80°C por 5 min.

**PCR para confirmación de especie y de raza.** La confirmación de la especie en todas las cepas de *R. solanacearum*, se realizó por PCR mediante la utilización del par de oligonucleótidos universales 759/760 (5' GTC GCC GTC AAC TCA CTT TCC 3' y 5' GTC GCC GTC AGC AAT GCG GAA TCG 3') (Opina *et al.*, 1997). La identificación de todas las cepas R3Bv2 se realizó con la utilización del par de oligonucleótidos 630/631 (5' ATA CAG AAT TCG ACC GGC AC 3' y 5' ATT CAC ATG CAA TTC GCC TAC 3') en la PCR específica para Raza 3 (Fegan *et al.*, 1998).

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler personal, utilizando el sistema de detección PCR core Systems 1 (Promega). El volumen total de la mezcla de reacción fue de 25 µL, para todas las reacciones. El contenido de la mezcla de reacción fue: 30 ng de DNA genómico, 2.5 µL de buffer de PCR 10x, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM de cada dNTP, 20 pmol de cada primer y 2.5 mM de ADN *Taq* polimerasa. La amplificación del ADN se realizó a 94°C por 15 s, seguido por 30°C por 58 s, 72°C por 30 s 30 ciclos, 72°C por 5 min, la reacción se mantuvo a 4°C.

Una alícuota de 10 µL de los productos de PCR, se analizaron en geles de agarosa al 1.5%, se tiñeron con 1 µL de bromuro de etidio (10 mg L<sup>-1</sup>). La electroforesis se realizó por 40 min a 70 V cm<sup>-1</sup>. El gel se visualizó bajo luz UV. La información fue registrada con una cámara digital

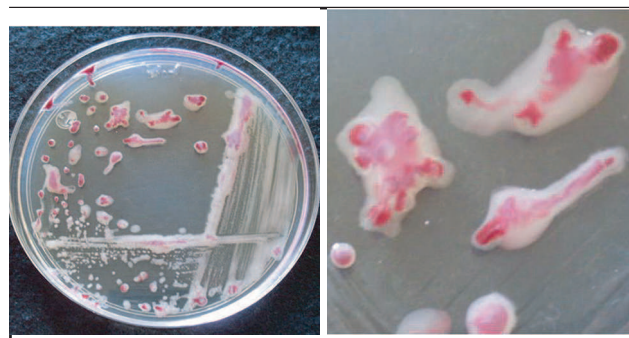


Figura 1. A) Colonias de *Ralstonia solanacearum* en medio de cultivo TZC; B) Nótese el color rojo característico de la colonia rodeado de una zona blanca.

Figure 1. A) *Ralstonia solanacearum* colonies in the TZC culture medium; B) Note the characteristic red color of the colony surrounded by a white area.

oligonucleotides (Opina *et al.*, 1997). All of the R3Bv2 strains identification was performed by using the 630/631 (5' ATA CAG AAT TCG ACC GGC AC 3' and 5' ATT CAC ATG CAA TTC GCC TAC 3') oligonucleotides in the PCR specific for Race 3 (Fegan *et al.*, 1998).

The PCR reactions were performed in a personal Eppendorf Master-cycler thermo-cycler using the PCR core Systems 1 detection system (Promega). The reaction total volume was 25µL for all of the reactions. The content of the reaction mixture was: 30 ng of genomic DNA, 2.5 µL of PCR buffer 10x, 2.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM from each dNTP, 20 pmol from each primer and 2.5 mM of *Taq* polymerase DNA. The DNA amplification was performed at 94°C for 15 s, followed by 30°C for 58 s, 72°C for 30 s 30 cycles, 72°C for 5 min; the reaction was kept at 4°C.

An aliquot of 10 µl from the PCR products was analyzed in agarose gel at 1.5%, stained with 1 µl of ethidium bromide (10 mg mL<sup>-1</sup>). The electrophoresis was performed for 40 min at 70Vcm<sup>-1</sup>. The gel was visualized under UV light. The information was recorded with a digital camera (Olympus). The positive response was defined as the presence of a visible band of the expected size (280 bp) for species confirmation, and 304 bp for Race 3 identification; a negative response was defined as the absence of the expected fragment. A 100 bp marker was used in electrophoresis as the standard molecular weight.

**Biovars determination.** The strains classification into Biovars was performed according to the physiological test developed by Hayward (1964; 1991). It is based on the strain ability to oxidize three disaccharides (cellobiose, lactose and maltose); three hexose alcohols (mannitol, dulcitol and sorbitol), and the ability to utilize trehalose, myo-inositol and D-ribose. The "Hayward" medium base (Hayward, 1964), was sterilized by autoclaving at 121°C at 20 lb pressure for 20 min, then distributed in 90 mL aliquots and added a 1% concentration of each carbohydrate, as the medium temperature decreased to approximately 55°C. The carbohydrates were sterilized by filtration by means of Millipore® filters with a 0.22 mm pore size. Aliquots of 2 mL medium were distributed afterwards in 10 cm tubes. A

(Olympus). La respuesta positiva se definió como la presencia de una banda visible del tamaño esperado (280 pb) para la confirmación de la especie y de 304 pb, para la identificación de la Raza 3, mientras que una respuesta negativa se definió como la ausencia del fragmento esperado. En la electroforesis se usó un marcador de 100 pb como estándar de peso molecular.

**Determinación de biovares.** La clasificación de las cepas en biovares se realizó de acuerdo a la prueba fisiológica desarrollada por Hayward (1964; 1991). Ésta se basa en la capacidad de la cepa para oxidar tres disacáridos (celobiosa, lactosa y maltosa), tres alcoholes hexosa (manitol, dulcitol y sorbitol) y la capacidad para utilizar trehalosa, mio-inositol y D-ribosa. El medio base "Hayward" (Hayward, 1964) se esterilizó en autoclave a 121°C a 20 lb de presión por 20 min, se distribuyó en alícuotas de 90 mL y se adicionó una concentración de 1% de cada carbohidrato cuando la temperatura del medio descendió aproximadamente a 55°C. Los carbohidratos se esterilizaron por filtración con filtros Millipore® con poro de 0.22 µm. Se distribuyeron alícuotas de 2 mL de medio en tubos de 10 cm. Se preparó una suspensión bacteriana en agua deionizada estéril, a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> a partir de cultivo bacteriano desarrollado en caldo CPG y con agitación por toda la noche (He *et al.*, 1983). Cada tubo se inoculó con una alícuota de 3 mL de la suspensión bacteriana, cada prueba se realizó tres veces con un control sin inocular. Los tubos se incubaron a 28°C por tres semanas. Se observaron las reacciones después de 1, 3, 7, 14 y 28 días de incubación a 28°C. Se evaluó el cambio de color de verde olivo a amarillo, evidenciando la producción de ácido a partir de los disacáridos y oxidación de los alcoholes hexosa (Denny y Hayward, 2001).

**Prueba de hipersensibilidad en tabaco.** Se preparó una suspensión bacteriana con cada una de las cepas aisladas de *R. solanacearum* obtenidas, la cual se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> en agua destilada esterilizada y se infiltró entre las nervaduras en hojas gruesas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. 'Burley') con la ayuda de una aguja hipodérmica de acuerdo con la metodología propuesta por Lozano y Sequeira (1970). Como control negativo, se infiltró solamente agua destilada esterilizada. Las plantas se mantuvieron a 28°C bajo condiciones de invernadero y se evaluó, tejido muerto, tejido colapsado y amarillamiento después de 24 h de la inoculación.

**Pruebas de Patogenicidad.** La patogenicidad de las cepas identificadas se evaluó en plantas de papa ('Alfa'), tomate ('Imperial'), berenjena ('ES4013'), pimiento ('Roble') y tabaco ('Burley'). Para realizar la inoculación, se incrementó el cultivo bacteriano en placas con medio de cultivo CPG agar a 28°C por 48 h, se lavó con agua deionizada estéril y ajustó a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> (absorbancia fue de 0.3 con una longitud de onda de 600 nm) (He *et al.*, 1983). De la suspensión bacteriana preparada de cada una de las cepas, se tomó una alícuota de 5 mL para cada planta y se vertió en la cavidad de trasplante a cinco plantas por cultivo con cada una de las cepas. Tres días después, las plantas se trasplantaron en macetas de 15

A bacterial suspension was prepared in sterile deionized water at a  $1 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> concentration from a bacterial culture developed in a CPG broth with an overnight agitation (He *et al.*, 1983). Each tube was inoculated with 3 mL aliquot of the bacterial suspension; each test was performed three times with an un-inoculated control. The tubes were incubated for three weeks at 28°C. The reactions were observed after 1, 3, 7, 14 and 28 days of incubation at 28°C. The change in color from olive green to yellow was evaluated, having the acid production revealed from the disaccharides and hexose alcohols oxidation (Denny and Hayward, 2001).

**Hypersensitivity test in tobacco.** A bacterial suspension was prepared with each of the *R. solanacearum* isolated strains obtained, which was adjusted to a  $1 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> concentration in distilled sterilized water, having it infiltrated among the ribbing of thick leaves of tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. 'Burley'), with the help of an hypodermic needle, in accordance to the methodology proposed by Lozano and Sequeira (1970). Only sterilized distilled water was infiltrated as a negative control. The plants were kept at 28°C under greenhouse conditions, having dead tissue, tissue and yellowing collapsed evaluated after 24 h of inoculation.

**Pathogenicity tests.** The identified strains pathogenicity was evaluated in plants of potato ('Alfa'), tomato ('Imperial'), eggplant ('ES4013'), pepper ('Roble') and tobacco ('Burley'). The bacterial culture was increased, for inoculation, plates with a CPG agar culture medium at 28°C for 48 h; then washed with sterile deionized water and adjusted to a  $1 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> concentration (absorbance was 0.3 with a 600 nm wavelength) (He *et al.*, 1983). A 5 mL aliquot was taken for each plant from the bacterial suspension prepared for each strain. Plants were transplanted three days after into 15 cm high pots, which contained a 1:1 ratio mixture of soil and sterile substrate. The pots were placed in a mesh type greenhouse shadow over bowls, having water deposited in them to maintain high humidity and facilitate infection and wilting development, as a result. The plants were fertilized in accordance to the principles of the Steiner solution at intervals of 10 days, and kept under 23-28°C greenhouse conditions. The inoculated plants were distributed in accordance to a two factors experimental design (strains and time), with the nested plants (five replicates) in strains; measures were repeated in time with complete randomized blocks (crops). The experiment was repeated twice. Wilting in plants was evaluated on a weekly basis for four weeks, after inoculation.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Identification by biochemical tests.** A total of eight isolated strains isolated in TZC and SMSA culture medium were obtained from diseased tomato plants; which were selected through the tests of bacterial flow and immune-strips. Typical mucoid colonies, shiny surface, irregular borders and a white color with pink in the center in the TZC culture medium (Figure 1) were produced by all the strains; a brownish color around the colonies was revealed by all the

cm de alto, las cuales contenían una mezcla en relación 1:1 de suelo y sustrato estéril. Las macetas se colocaron en un invernadero tipo malla-sombra sobre platos hondos y a éstos se les depositó agua para mantener alta humedad y facilitar la infección y desarrollo de la marchitez. Las plantas se fertilizaron de acuerdo a los principios de la solución de Steiner, por intervalos de 10 días y se mantuvieron bajo condiciones de invernadero de 23-28°C. Las plantas inoculadas se distribuyeron de acuerdo a un diseño experimental de dos factores (cepas y tiempo), con las plantas anidadas (cinco réplicas) en cepas y medidas repetidas en el tiempo con bloques (cultivos) aleatorizados completos. El experimento se repitió dos veces. La marchitez en las plantas se evaluó semanalmente por cuatro semanas después de la inoculación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Identificación mediante pruebas bioquímicas.** De las plantas enfermas de tomate, se obtuvieron un total de ocho cepas aisladas en medio de cultivo TZC y SMSA, las que fueron seleccionadas por las pruebas de flujo bacteriano e inmunotiras. Todas las cepas produjeron colonias típicas mucoides, superficie brillante, borde irregular y color blanco con rosa en el centro en el medio TZC (Figura 1). Después de 72 h, todas las cepas presentaron un color café alrededor de las colonias. Sólo la cepa CRs2 mostró una pigmentación menos marcada que el resto de las cepas. Lo anterior sugiere la obtención de colonias virulentas de acuerdo con lo reportado por Kelman (1954) y Champoiseau *et al.* (2009), que establecen diferencias entre colonias virulentas con las características anteriores y colonias avirulentas; no mucoides, borde circular y de color opaco.

Las pruebas bioquímicas (Cuadro 2) mostraron resultados similares para todas las cepas, semejante a lo reportado en estudios de identificación de cepas de *R. solanacearum* realizados por Hayward (1964; 1994) y por Nouri *et al.* (2009).

**Identificación de *R. solanacearum* por PCR.** Todas las cepas identificadas como *R. solanacearum* mediante pruebas bioquímicas e inmunológicas, amplificaron por PCR con el par de oligonucleótidos

strains after 72 h. A less marked pigmentation than the rest of the strains was revealed only by the CRs2 strain. This suggests the obtaining of virulent colonies in accordance with those reported by Kelman (1954) and Champoiseau *et al.* (2009), which establish the differences among virulent colonies with the characteristics previously mentioned, and those of avirulent colonies; not mucoid, of circular edge and opaque.

Comparable results were revealed by all the strains throughout the biochemical tests (Table 2), similar to those reported in identification studies of *R. solanacearum* strains made by Hayward (1964; 1994) and Nouri *et al.* (2009).

**Identification of *R. solanacearum* by PCR.** All the strains identified as *R. solanacearum* by means of immunological and biochemical tests were PCR amplified with the pair of universal oligonucleotides 759/760 (Opina *et al.*, 1997). The reaction amplified the fragment to the 280 bp expected size, being then identified as *R. solanacearum* (Figure 2).

**Biovar determination.** All the isolates in the present study were characterized and identified according to their ability to utilize different carbon sources (Table 3). Physiological tests proposed by Hayward (1964; 1994), for Biovar determination had a similar profile for all the strains. Lactose, maltose, cellobiose and myo-inositol were used by all the strains, but not mannitol, dulcitol, sorbitol nor trehalose; they reduced nitrates to nitrites and had gas produced from nitrates. Consequently, it can be determined that such analyzed strains belong to Bv2, according to the same author.

These results are consistent with previous studies in which *R. solanacearum* isolates in potato, tomato, and geranium were performed, being identified by physiological tests developed by Hayward (1964; 1991), in Biovar 2 (Jeong *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2008; Nouri *et al.*, 2009). It is revealed by the results in the study hereby that all the detected strains are recognized as responsible for causing tomato bacterial wilt in one single *R. solanacearum* group, in the Valley of Culiacan, Baja California and Jalisco.

**Hypersensitivity reaction on tobacco leaves.** A lack of hypersensitivity reaction was revealed after 24 h by

Cuadro 2. Pruebas bioquímicas diferenciales para la identificación de *R. solanacearum*.  
Table 2. Differential biochemical tests for *R. solanacearum* identification.

Pruebas	Cepas en estudio							
	Rs1	Rs2	Rs3	Rs4	CRs202	CRs203	CRs204	CRs3C
Tinción Gram	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+
*Metab. O/F	O	O	O	O	O	O	O	O
Hidrólisis de almidón	-	-	-	-	-	-	-	-
Reducción de nitratos	+	+	+	+	+	+	+	+
Producción de gas de nitratos	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-
Prueba de arginina	-	-	-	-	-	-	-	-

\*Metabolismo oxidativo (O), fermentativo (F) de carbohidratos.

+/- Prueba positiva o negativa, respectivamente.



universal 759/760 (Opina *et al.*, 1997). La reacción amplificó el fragmento de tamaño esperado de 280, lo que permitió identificarlas como *R. solanacearum* (Figura 2).

**Determinación de biovar.** Todos los aislamientos en este estudio fueron caracterizados e identificados de acuerdo con su habilidad para utilizar diferentes fuentes de carbono (Cuadro 3). Las pruebas fisiológicas propuestas por Hayward (1964; 1994), para determinar biovars, mostraron un perfil similar para todas las cepas. Todas las cepas utilizaron lactosa, maltosa, celobiosa y mio-inositol pero no manitol, dulcitol, sorbitol y trehalosa, redujeron nitratos a nitritos y produjeron gas a partir de nitratos. Por lo que se puede determinar, de acuerdo al mismo autor, que estas cepas analizadas pertenecen al Bv2.

Estos resultados coinciden con estudios previos, en los cuales se realizaron aislamientos de *R. solanacearum* en papa, tomate y geranio y fueron identificados mediante las pruebas fisiológicas desarrolladas por Hayward (1964; 1991), en biovar 2 (Jeong *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2008; Nouri *et al.*, 2009). Los resultados en este estudio muestran que todas las cepas detectadas se ubican en un sólo grupo de *R. solanacearum* como responsables de causar la marchitez bacteriana del tomate en el Valle de Culiacán, B.C. y Jalisco.

#### Reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco.

En la prueba de reacción de hipersensibilidad en tabaco, todas las hojas infiltradas con la suspensión de cada una de las cepas de *R. solanacearum*, no mostraron reacción de hipersensibilidad a las 24 h. Después de 36 h, mostraron en el área de la infiltración, una necrosis parcialmente desecada y con un halo de color amarillo alrededor de la lesión.

Estudios de reacción de hipersensibilidad en tabaco, realizados en Florida por Ji *et al.* (2007) con cepas R1Bv1 y

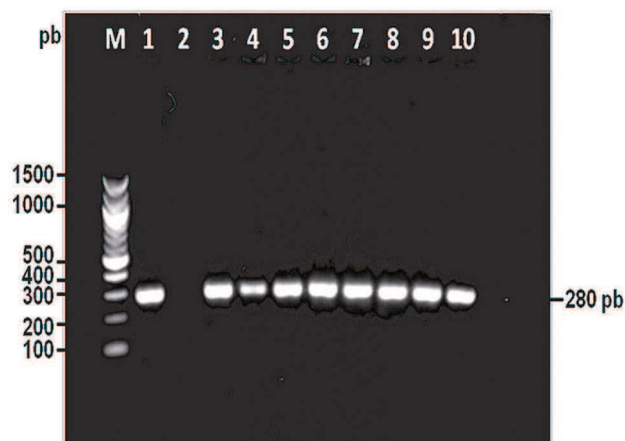


Figura 2. Identificación de *R. solanacearum* con el par de oligonucleótidos universal 759/760. Gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. M, marcador de peso molecular de 100 pb; 1, control positivo CRs 203; 2, control blanco; 3, CRs 1; 4, CRs 2; 5, CRs 3; 6, CRs 4; 7, CRs 202; 8, CRs 203; 9, CRs 204 y 10, CRs 3C. 280 pb, producto de PCR amplificado en el tamaño esperado para la identificación de la especie de *R. solanacearum*.

Figure 2. Identification of *R. solanacearum* with the pair of universal oligonucleotides 759/760. Agarose gel at 1.5 % stained with ethidium bromide. M, molecular weight marker of 100 bp; 1, positive control CRs 203; 2, white control; 3, CRs 1; 4, CRs 2; 5, CRs 3; 6, CRs 4; 7, CRs 202; 8, CRs 203; 9, CRs 204 and 10, CRs 3C. 280 bp, PCR product amplified to the expected weight for *R. solanacearum* species identification.

Cuadro 3. Características bioquímicas de las cepas de *R. solanacearum* analizadas en este estudio.

Table 3. Analyzed biochemical characteristics of *R. solanacearum* strains.

Pruebas	Biovar		
	2	2-T	CRs1, Crs2, CRs3, CRs4, CRs202, CRs203, CRs204 y CRs3C
Acidificación de medio:			
Lactosa	+	+	+
Maltosa	+	+	+
Celobiosa	+	+	+
Manitol	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Dulcitol	-	-	-
Mio-Inositol	+	+	+
D-Ribosa	-	+	-
Trehalosa	-	+	-
Reducción de nitratos	+	+	+
Producción de gas de nitratos	-	-	-

+ - Prueba positiva o negativa, respectivamente.

all the leaves infiltrated in the hypersensitivity reaction test, with the suspension of each of the *R. solanacearum* strains. A partially dried necrosis with a yellow halo around the lesion was revealed in the infiltration area, after 36 h.

Studies of hypersensitivity reaction in tobacco, made in Florida by Ji *et al.* (2007), with R1Bv1 strains and with one R3Bv2, had a variability response of the hypersensitivity reaction revealed among R1Bv1 strains, since some of them showed a reaction after 24 h, while others were negative to this test, same as the R3Bv2 strain (Table 4).

This shows the existing variability among R1Bv1 strains; nevertheless, the R3Bv2 strains do not have such variability. Therefore, it has been suggested by some researchers that the hypersensitivity reaction test does not present any successful features in Bv1 strains differentiation (Ji *et al.*, 2007). This does not include the R3Bv2 strains group, since according to the results derived from the study hereby, the isolated strains in the Valley of Culiacan, as well as those from the Valley of San Quintin, B.C. and those from Jalisco, present similar characteristics to biochemical and physiological tests.

**Pathogenicity tests.** All the strains used in the present study were avirulent and highly virulent in tomato. The Crs2 strain affected tomato and potato. The CRs202 strain affected tomato, potato and bell pepper. The CRs204

con una cepa R3Bv2, mostraron variabilidad en la respuesta de la reacción de hipersensibilidad entre cepas R1Bv1, ya que algunas cepas R1Bv1 mostraron reacción a las 24 h, mientras que otras fueron negativas a esta prueba al igual que la cepa R3Bv2 (Cuadro 4). Lo anterior demuestra la variabilidad existente entre cepas R1Bv1 ante esta prueba; sin embargo, las cepas R3Bv2 no presentan dicha variabilidad. Por lo anterior, algunos investigadores sugieren que la prueba de reacción de hipersensibilidad, no presenta rasgos exitosos en la diferenciación de cepas Bv1 (Ji *et al.*, 2007). Lo anterior no incluye al grupo de cepas R3Bv2, ya que de acuerdo con los resultados en este estudio, las cepas aisladas en el Valle de Culiacán, como las cepas originarias del Valle de San Quintín, B.C. y de Jalisco, presentan características similares ante pruebas bioquímicas y fisiológicas.

**Pruebas de patogenicidad.** Todas las cepas utilizadas en esta investigación fueron avirulentas en tabaco y altamente virulentas en tomate. La cepa CRs2 afectó tomate y papa. La cepa CRs202 afectó tomate, papa y chile pimiento. La cepa CRs204 afectó tomate y chile pimiento y la cepa CRs3C únicamente tomate. Las cepas capaces de

Cuadro 4. Reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco (cv. 'Burley') de las diferentes cepas.

Table 4. Hypersensitivity reaction in tobacco leaves (cv. 'Burley') from the different strains.

Cepas	HR en tabaco		Referencias
	12 h	24 h	
Raza 1	-	+	Ji <i>et al.</i> (2007)
Raza 3	-	-	Ji <i>et al.</i> (2007)
CRs1, CRs2, CRs3, CRs4, CRs202, CRs203, CRs204 y CRs3C	-	-	Este estudio

+ - Prueba positiva o negativa, respectivamente.

CRs= Cepa de *Ralstonia solanacearum*. El número corresponde al aislamiento.

afectar un rango más amplio de hospedantes fueron la cepa CRs3 y CRs203, las cuales afectaron principalmente tomate, además de papa, berenjena y chile pimiento; lo cual coincide con las características típicas de rango de hospedantes reportadas para las cepas R3Bv2 (Pradhanang *et al.*, 2000; Janse *et al.*, 2004; Norman *et al.*, 2009; Champoiseau *et al.*, 2009).

Dentro del grupo de cepas que comúnmente afectan tabaco se han identificado a la raza 1 Bv1, Bv3 y Bv4 aisladas de plantas de tabaco infectadas naturalmente. Por otro lado, cepas Bv1 aisladas de tomate y geranio y cepas Bv3 aisladas de pimiento han mostrado capacidad para afectar tabaco (Ji *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2009); sin embargo, algunas cepas R1Bv1 aisladas en Florida, Estados Unidos, han mostrado ser avirulentas en tabaco, dicha característica

strain affected tomato and bell pepper, and the CRs3C strain affected tomato, only. The strains capable of affecting a wider hosts range were the CRs3 and CRs203 strains, which mainly affected tomato, besides potato, eggplant and bell pepper; which is consistent with the host range typical characteristics reported for the R3Bv2 strains (Pradhanang *et al.*, 2000; Janse *et al.*, 2004; Norman *et al.*, 2009; Champoiseau *et al.*, 2009).

The Race 1 Bv1, Bv3 and Bv4 strains isolated from tobacco plants naturally infected have been identified within the group of strains that commonly affects tobacco. Furthermore, Bv1 strains isolated from tomato and geranium, as well as Bv3 strains isolated from pepper, have revealed the capacity to affect tobacco (Ji *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2009); however, some R1Bv1 strains isolated in Florida, USA, have shown to be avirulent in tobacco; such feature has been attributed to the presence of the functional gene *avrA* (positive HR induction factor in tobacco) (Robertson *et al.*, 2004; Ji *et al.*, 2007).

**Molecular identification of *R. solanacearum* R3Bv2 strains.** The group of strains *R. solanacearum* R3Bv2 has been reported in different agricultural regions around the world (Swanson *et al.*, 2005; Elphinstone, 2005; Sánchez *et al.*, 2008). The PCR specific for R3Bv2 strains with the oligonucleotides 630/631, in the *R. solanacearum* race-level identification, amplified a 304 bp fragment in all the strains utilized (Figure 3).

These results are similar to those reported by Sánchez *et al.* (2008), in the R3Bv2 strains identification isolated from potato, geranium and tomato in a *R. solanacearum* diversity and distribution study in Guatemala, where a 304 bp fragment was obtained. Nouri *et al.* (2009) identified R3Bv2 strains isolated from potato; the specific PCR for Race 3 was used, and three strains, out of 40, were different because they did not amplify the 304 bp expected fragment. Such strains were identified by physiological tests as Bv2-T. This confirms the primer 630/631 capacity to differentiate Bv2 and Bv2-T strains (biovar strains 2T are more physiologically active) in the R3Bv2 strains identification, which was used in the study hereby.

Even though the R3Bv2 strains group has been reported to affect crops in temperate regions (Swanson *et al.*, 2005), the presence of the R3Bv2 strains group in tropical, subtropical and temperate climatic regions has been revealed by studies on *R. solanacearum* geographical distribution in different agricultural regions (Sánchez *et al.*, 2008).

The detection of *R. solanacearum* strains Races 1 and 3 is important due to its different aggressiveness in susceptible crops (Ji *et al.*, 2007). The presence of *R. solanacearum* R2BV1 in tomato plants has been reported in Mexico (Dr. Fucikovskiy, personal communication); nevertheless, in relation to the presence of R3V2, there are no reports concerning the identification and characterization of this pathogen in tomato crops.

## CONCLUSIONS

It is indicated by the morphological, biochemical,



se le ha atribuido a la presencia del gen funcional *avrA* (factor de inducción de HR positiva en tabaco) (Robertson *et al.*, 2004; Ji *et al.*, 2007).

**Identificación molecular de cepas de *R. solanacearum* R3Bv2.** El grupo de cepas de *R. solanacearum* R3Bv2 ha sido reportado en diferentes regiones agrícolas del mundo (Swanson *et al.*, 2005; Elphinstone, 2005; Sánchez *et al.*, 2008). En la identificación a nivel de raza de *R. solanacearum*, la PCR específica para cepas R3Bv2 con los oligonucleótidos 630/631 (Fegan *et al.*, 1998) amplificó un fragmento de 304 pb en todas las cepas utilizadas (Figura 3).

Estos resultados son similares a los obtenidos por Sánchez *et al.* (2008) en la identificación de cepas R3Bv2 aisladas de papa, geranio y tomate en un estudio de diversidad y distribución de *R. solanacearum* en Guatemala, donde obtuvo un fragmento de 304 pb. Nouri *et al.* (2009) identificaron cepas R3Bv2 aisladas de papa, ellos utilizaron la PCR específica para raza 3 y encontraron a tres cepas de un total de 40 diferentes ya que no amplificaron el fragmento esperado de 304 pb. Dichas cepas mediante pruebas fisiológicas fueron identificadas como Bv2-T. Lo anterior confirma la capacidad del par de primer 630/631 para diferenciar cepas Bv2 y cepas Bv2-T (cepas biovar 2T son fisiológicamente más activas) en la identificación de cepas R3Bv2 el cual fue utilizado en nuestro estudio.

Aunque se ha reportado que el grupo de cepas R3Bv2 afecta cultivos en regiones templadas (Swanson *et al.*, 2005), estudios de distribución geográfica de *R. solanacearum* en diferentes regiones agrícolas muestran la presencia del grupo de cepas R3Bv2 en climas tropicales, subtropicales y templados (Sánchez *et al.*, 2008).

La detección de las cepas de *R. solanacearum* raza 1 y 3, es importante por su diferente agresividad en los cultivos susceptibles (Ji *et al.*, 2007). En México se reportó la presencia de la R2BV1 de *R. solanacearum* en plantas de tomate (Dr. Fucikovsky, comunicación personal), sin embargo en relación a la presencia de la R3BV2, no existen informes sobre la identificación y caracterización de este patógeno en cultivos de tomate.

## CONCLUSIONES

Las pruebas morfológicas, bioquímicas, fisiológicas, inmunotiras y PCR, indican que todas las cepas de *Ralstonia solanacearum* aisladas corresponden a la Raza 3 (R3). De acuerdo a la utilización de diferentes fuentes de carbono, todas las cepas estudiadas pertenecen al Biovar 2 (Bv2). Todas las cepas de *R. solanacearum* fueron altamente patógenas en tomate. Ninguna de las cepas estudiadas fue patógena en plantas de tabaco. En Sinaloa, este es el primer trabajo de identificación y caracterización de cepas de *R. solanacearum* en tomate.

## LITERATURA CITADA

Allen C, Kelman A and French ER. 2001. Brown rot of potatoes. Pp:11-13. In: Stevenson WR, Loria R, Franc GD and Weingartner DP (eds.). Compendium of Potato Diseases, 2nd ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 125p.

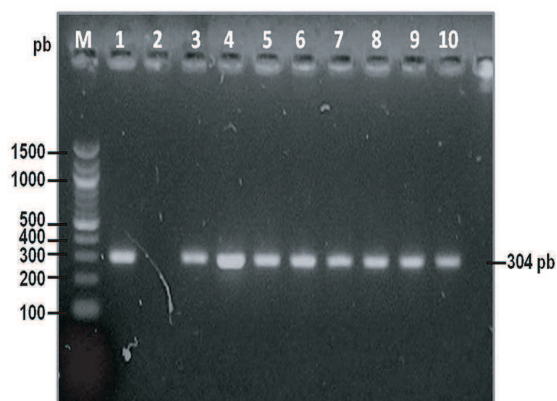


Figura 3. Identificación de cepas de *R. solanacearum* Raza 3 mediante el par de oligonucleótidos 630/631. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. M, marcador de peso molecular de 100 pb; 1, control positivo CRs203; 2, control blanco; 3, CRs1; 4, CRs2; 5, CRs3; 6, CRs4; 7, CRs202; 8, CRs203; 9, CRs204 y 10, CRs3C. Producto de PCR de 304 pb de tamaño esperado.

Figure 3. Identification of *R. solanacearum* strains Race 3 by the pair of oligonucleotides 630/631. Agarose gel at 1.5% stained with ethidium bromide. M, molecular weight marker of 100 bp; 1, positive control CRs 203; 2, white control; 3, CRs 1; 4, CRs 2; 5, CRs 3; 6, CRs 4; 7, CRs 202; 8, CRs 203; 9, CRs 204 and 10, CRs 3C PCR product of 304 bp expected weight.

physiological, immunostrips and PCR tests that all of the *Ralstonia solanacearum* isolated strains corresponded to Race 3 (R3). According to the use of different carbon sources, all of the studied strains belong to Biovar 2 (Bv2). All of the *R. solanacearum* strains were highly pathogen on tomato. None of the studied strains was pathogenic in tobacco plants. This is the first study of identification and characterization of *R. solanacearum* strains for tomato in Sinaloa.

Champoiseau PG, Jones JB and Allen C. 2009. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2009-0313-01-RV.

Cook D and Sequeira L. 1994. Strains differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. Pp:77-93. In: Hayward AC and Hartman GL (eds.). Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, United Kingdom. 268p.

Denny TP. 2006. Plant pathogenic *Ralstonia* species. Pp:573-644. In: Gnanamanickam SS (ed.). Plant-Associated Bacteria. Springer. Printed in the Netherlands. 710p.

Denny TP and Hayward AC. 2001. Gram-negative bacteria. Pp:151-173. In: Schaad NW, Jones JB and Chun W (eds.). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. American Phytopathological Society. St Paul, MN, USA. 398p.

- Elphinstone JG. 2005. The current bacterial wilt situation: A global view. Pp:9-28. In: Allen C, Prior P and Hayward AC (eds.). Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 528p.
- Elphinstone JG, Hennessy J, Wilson JK and Stead DE. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. EPPO Bulletin 26:663-678.
- Fegan M and Prior P. 2005. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? Pp:449-461. In: Allen C, Prior P and Hayward AC (eds.). Bacterial Wilt: The Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 528p.
- Fegan M, Holloway G, Hayward AC and Timmis J. 1998. Development of a diagnostic test based on the polymerase chain reaction to identify strains of *Ralstonia solanacearum* exhibiting the biovar 2 genotype. Pp:34-43. In: Prior P, Allen C and Elphinstone J (eds.). Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects. Springer-Verlag, Berlin. 461p.
- Hayward AC. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. Journal Applied Bacteriology 27:265-277.
- Hayward AC, El-Nashaar H M, Nydegger U and De Lindo L. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 69:269-280.
- Hayward AC. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 29:65-87.
- Hayward AC. 1994. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. Pp:123-135. In: Hayward AC and Hartman GL (eds.). Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, United Kingdom. 268p.
- Hayward AC. 2000. *Ralstonia solanacearum*. Pp:32-42. In: Encyclopedia of Microbiology, Vol. 4, 2nd ed. Academic Press, London (GB). 1142p.
- He LY, Sequeira L and Kelman A. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* of China. Plant Disease 67:1357-1361.
- Hendrick CA and Sequeira L. 1984. Lipopolysaccharide-defective mutants of the wilt pathogen *Pseudomonas solanacearum*. Applied and Environmental Microbiology 48:94-101.
- Hildebrand DC, Schroth MN and Sands DC. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Pp:60-81. In: Schaad NW (ed.). *Pseudomonas*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 398p.
- Hugh R and Leifson E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-bacteria. Journal Bacteriology 66:24-26.
- Janse JD, Van Den Beld HE, Elphinstone J, Simpkins S, Tjou-Tam-Sin NNA and Van Vaerenbergh J. 2004. Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. Journal of Plant Pathology 87:147-155.
- Jeong Y, Kim J and Kang Y. 2007. Genetic diversity and distribution of Korean isolates of *Ralstonia solanacearum*. Plant Disease 91:1277-1287.
- Ji P, Allen C, Sánchez-Pérez A, Yao J, Elphinstone JG, Jones JB and Momol MT. 2007. New diversity of *Ralstonia solanacearum* strains associated with vegetable and ornamental crops in Florida. Plant Disease 91:195-203.
- Kelman A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. Phytopathology 44:693-695.
- Lambert CD. 2002. Agricultural bioterrorism protection act of 2002: Possession, and transfer of biological; agents and toxins; interim and final rule (7 CFR Part 331). Federal Register 67:76908-76938.
- Lozano J and Sequeira L. 1970. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infiltration technique. Phytopathology 60:833-838.
- Norman DJ, Zapata M, Gabriel DW, Duan YP, Yuen JMF, Mangravita-Novo A and Donahoo RS. 2009. Genetic diversity and host range variation of *Ralstonia solanacearum* strains entering North America. Phytopathology 99:1070-1077.
- Nouri S, Bahar M and Fegan M. 2009. Diversity of *Ralstonia solanacearum* causing potato bacterial wilt in Iran and the first record of phylotype II/biovar 2T strains outside South America. Plant Pathology 58:243-249.
- Opina N, Tavner F, Holloway G, Wang JF, Li TH, Maghirang R, Fegan M, Hayward AC, Krishnapillai V, Hong WF, Holloway BW and Timmis J. 1997. A novel method for development of species and strain specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). Asia Pacific Journal Molecular Biology and Biotechnology 5:19-30.
- Pradhanang PM, Elphinstone JG and Fox RTV. 2000. Identification of crop and weed hosts of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in the hills of Nepal. Plant Pathology 49:403-413.
- Ramírez VJ y Sainz RRA. 2006. Manejo integrado de las enfermedades del tomate. Pp:25-27. 1ª ed. Once Rios Editores. México. 360p.
- Robertson AE, Wechter WP, Denny TP, Fortnum BA and Kluepfel DA. 2004. Relationship between avirulence gene (*avrA*) diversity in *Ralstonia solanacearum* and bacterial wilt incidence. Molecular Plant-Microbe Interactions 17:1376-1384.
- Sánchez AP, Mejía L, Fegan M and Allen C. 2008. Diversity and distribution of *Ralstonia solanacearum* strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection. Plant Pathology 57:320-331.
- Seal SE and Elphinstone JG. 1994. Advances in identification and detection of *Pseudomonas solanacearum*. Pp:35-57. In: Hayward AC and Hartman GL (eds.). Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB International. Wallingford, United Kingdom. 528p.

- Kingdom. 268p.
- Suslow TV, Schroth MN and Isaka M. 1982. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* 72:917-918.
- Swanson JK, Yao J, Tans-Kersten J and Allen C. 2005. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium. *Phytopathology* 95:136-143.
- Thornley MJ. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *Journal Applied Bacteriology* 23:37-52.
- Villa JE, Tsuchiya K, Horita H, Natural M, Opina N and Hyakumachi M. 2005. Phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* species complex strains from Asia and other continents based on 16S rDNA, endoglucanase, and hrpB gene sequences. *Journal of General Plant Pathology* 71:39-46.
- Xu J, Pan ZC, Prior P, Xu JS, Zhang Z, Zhang H, Zhang LQ, He LY and Feng J. 2009. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. *European Journal Plant Pathology* 125:641-653.