



# VALORACIÓN DE LAS MEDIDAS DE ERRADICACIÓN DE ***RALSTONIA SOLANACEARUM*** EN LA ISLA DE TENERIFE

Moisés Botella Guillén • Tomás Suárez Encinosa  
Ana Alfaro Fernández • Felipe Siverio de la Rosa



Se autoriza la reproducción, sin fines comerciales, de este trabajo, citándolo como:

Botella Guillén, M.; Suárez Encinoso, T.; Alfaro Fernández, A. y Siverio de la Rosa, F. 2022. Valoración de las medidas de erradicación de *Ralstonia solanacearum* en la isla de Tenerife. Informe técnico nº 2. GMR Canarias. 36 p.

Este trabajo ha sido desarrollado dentro del proyecto MAC CUARENTAGRI “Investigación, identificación, análisis de riesgo, formación y sensibilización sobre potenciales plagas de cuarentena y plagas reguladas no de cuarentena en los principales cultivos de las regiones de estudio” (MAC2/1.1a/231), Programa de Cooperación INTERREG V-A MAC 2014-2020.

### **COLECCIÓN INFORME TÉCNICO N° 2**

Autores: Moisés Botella Guillén, Tomás Suárez Encinoso, Ana Alfaro Fernández y Felipe Siverio de la Rosa

Edita: GMR Canarias SAU. S/C de Tenerife

© del texto: Los autores

© de las imágenes: Autores de la publicación y autores citados

Depósito Legal: TF 558-2022

ISSN: 2792-4521

Julio 2022

# VALORACIÓN DE LAS MEDIDAS DE ERRADICACIÓN DE ***RALSTONIA SOLANACEARUM*** EN LA ISLA DE TENERIFE

Moisés Botella Guillén<sup>1</sup>, Tomás Suárez Encinoso<sup>2</sup>, Ana Alfaro Fernández<sup>3</sup>, Felipe Siverio de la Rosa<sup>1,4</sup>.

<sup>1</sup> Sección de Laboratorio de Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca del Gobierno de Canarias, San Cristóbal de La Laguna, Tenerife.

<sup>2</sup> Servicio Técnico de Agricultura y Desarrollo Rural del Cabildo Insular de Tenerife, Santa Cruz de Tenerife, Tenerife.

<sup>3</sup> Instituto Agroforestal del Mediterráneo. Universitat Politècnica de València (UPV), Valencia.

<sup>4</sup> Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA), San Cristóbal de La Laguna, Tenerife.

## RESUMEN

La bacteria *Ralstonia solanacearum*, causante de la podredumbre parda de la papa, se detectó en el noroeste de la isla de Tenerife en 2003. Se estableció un programa para determinar su distribución, impedir su propagación y llevar a cabo su erradicación durante cinco años. Para valorar el resultado de dichas medidas a largo plazo, los objetivos de este trabajo fueron: la inspección visual de las parcelas afectadas, la toma de muestras de tubérculos de papa y su análisis mediante técnicas moleculares. Además, se caracterizaron cinco aislados de la bacteria obtenidos en focos iniciales de la enfermedad en Canarias. Se localizaron las nueve parcelas agrícolas afectadas y se recogieron muestras de tubérculos de papa en siete de ellas y en dos no se encontraron solanáceas. Las muestras se procesaron siguiendo los protocolos establecidos para *R. solanacearum*, y se analizaron mediante PCR



convencional y PCR en tiempo real. No se detectaron síntomas de enfermedad ni de bacteria en los tubérculos analizados. Dos de los cinco aislados crioconservados de la bacteria crecieron en medio de cultivo, mientras que los restantes no eran viables. Tres de los extractos permitieron la obtención de positivos mediante PCR convencional y cinco mediante PCR en tiempo real. Se obtuvieron también productos de amplificación mediante PCR con cebadores universales para 16S, que se secuenciaron. Las secuencias obtenidas presentaron 100% de identidad con cepas de referencia de *R. solanacearum*. Los resultados indican que las medidas que se aplicaron en su momento consiguieron erradicar la bacteria de las parcelas afectadas.





***Ralstonia solanacearum***  
Pobredumbre parda de la papa

## ÍNDICE

<b>1.INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>6</b>
1.1 <i>Ralstonia solanacearum</i>	
1.1.1 Morfología y ecología	
1.1.2 Taxonomía y filogenia	
1.1.3 Síntomas y daños	
1.1.4 Control de la enfermedad	
1.2 Antecedentes de <i>R. solanacearum</i> en la isla de Tenerife	
<b>2.JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>3.MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
3.1 Muestreo en campo	
3.2 Siembra en medio de cultivo	
3.3 Extracción de ADN	
3.4 PCR convencional	
3.5 PCR en tiempo real	
3.6 Secuenciación	
<b>4.RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
4.1 Muestreo en campo	
4.2 Crecimiento en medio de cultivo	
4.3 Detección mediante PCR convencional	
4.4 Detección mediante PCR en tiempo real	
4.5 Identificación de los aislados mediante secuenciación	
<b>5.CONCLUSIONES .....</b>	<b>29</b>
<b>6.APÉNDICES .....</b>	<b>31</b>
<b>7.REFERENCIAS .....</b>	<b>33</b>





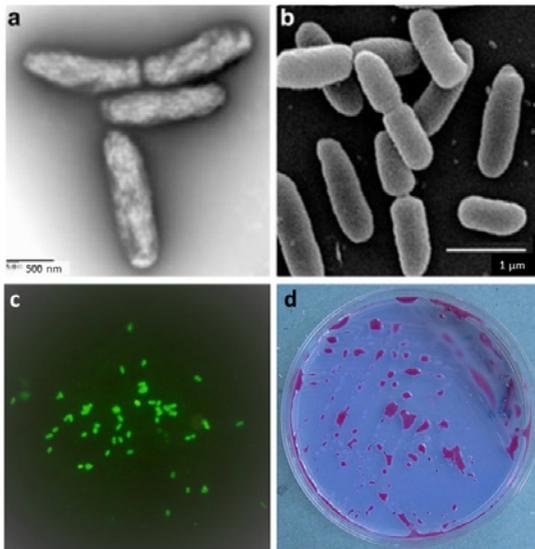
# Valoración de las medidas de erradicación de *Ralstonia solanacearum* en la isla de Tenerife

## 1.- INTRODUCCIÓN

### 1.1 *Ralstonia solanacearum*

#### 1.1.1 MORFOLOGÍA Y ECOLOGÍA

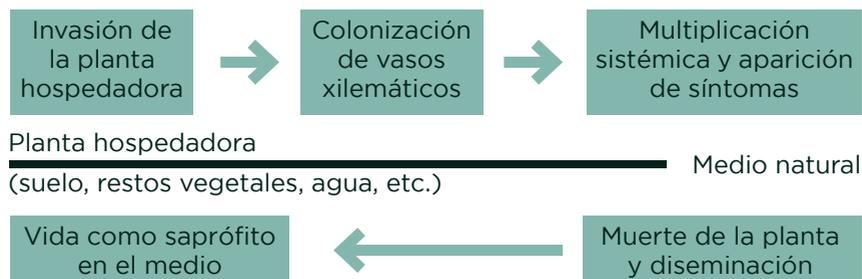
La bacteria *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* es un bacilo aerobio Gram-negativo que tiene una longitud de entre 0,5  $\mu\text{m}$  y 1,5  $\mu\text{m}$  (Figura 1). Posee de uno a cuatro flagelos polares, lo que le proporciona movilidad (Buchanan y Gibbons, 1974) y su temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 28 y 30  $^{\circ}\text{C}$  (de Armas, 2017). En cuanto a su bioquímica, es oxidasa y arginina dihidrolasa negativa, no hidroliza el almidón, pero sí reduce el nitrato y puede oxidar determinados alcoholes. Su capacidad metabólica respecto a los azúcares y alcoholes permitió a Hayward en 1964 clasificar a las cepas de esta especie en un sistema de seis biovares.



**Figura 1.** Imágenes de *R. solanacearum*: **a**, al microscopio electrónico de transmisión; **b**, al microscopio electrónico de barrido; **c**, células bacterianas en microscopio de epifluorescencia; **d**, crecimiento bacteriano sobre medio sólido selectivo. **a** y **b**, tomado de Guarischi-Sousa *et al.* 2016.



*Ralstonia solanacearum* contrariamente a lo que cabría esperar no es un patógeno estricto y presenta tanto una fase de vida libre saprófita en el suelo o en el agua como una fase patógena en los vegetales (Figura 2). Es de destacar también, que la bacteria puede entrar en una fase de latencia denominada *viable no cultivable* en presencia de condiciones ambientales adversas o falta de nutrientes (Grey y Steck, 2001). En dicha fase la bacteria no se divide activamente, por lo que no podrá detectarse mediante siembra en medio de cultivo. Se ha constatado su capacidad para sobrevivir en ausencia de un cultivo susceptible, por ejemplo, en capas profundas del suelo (van Elsas *et al.*, 2001) y en la rizosfera de la flora arvense (Granada y Sequeira, 1983), así como en diversos restos vegetales y en masas de agua dulce. Además, puede sobrevivir en estado latente a temperaturas muy bajas (<4 °C). Ante un hospedador adecuado, *R. solanacearum* entra en las raíces a través de heridas invadiendo rápidamente el sistema vascular de la planta y multiplicándose activamente en el xilema. A medida que se va dividiendo produce gran cantidad de exopolisacáridos y obstruye los vasos xilemáticos, bloqueando la libre circulación de agua y nutrientes, lo que causa el marchitamiento y la muerte de la planta en infecciones severas (de Armas, 2017).



**Figura 2.** Ciclo infeccioso de *R. solanacearum*.

Este microorganismo se caracteriza por su extremadamente amplio rango de hospedadores de más





de 200 especies de al menos 50 familias distintas. La familia afectada más importante es la de las solanáceas, siendo particularmente devastador en tomate y papa. Además, también afecta a otros cultivos de gran importancia económica, como, las cucurbitáceas, el tabaco y la platanera. Sus síntomas, en este último caso, pueden confundirse con los causados por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. W.C. Snyder y H.N. Hansen (EPPO PM7/21 2018), aunque el filotipo de *Ralstonia solanacearum* que causa la enfermedad conocida como moko del plátano no es el mismo que el que afecta a la papa.

### 1.1.2 TAXONOMÍA Y FILOGENIA

*Ralstonia solanacearum* fue descrita por primera vez como *Bacillus solanacearum* por Edwin F. Smith en 1896 y a partir de ese momento su denominación sufrió varios cambios. En 1914, Smith la renombró como *Pseudomonas solanacearum*. En 1992, pasó a llamarse *Burkholderia solanacearum* (Smith) (Yabuuchi *et al.*, 1992) en base al análisis de su genoma ribosomal y de su composición de ácidos grasos, y en 1995 adquirió su denominación actual en el género *Ralstonia* (Yabuuchi *et al.*, 1995) (Tabla 1).

TABLA 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>R. SOLANACEARUM</i>	
NIVEL TAXONÓMICO	NOMBRE
Domino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Betaproteobacteria
Orden	Burkholderiales
Familia	Burkholderiaceae
Género	<i>Ralstonia</i>
Especie	<i>Ralstonia solanacearum</i>

*Ralstonia solanacearum* se distribuye en un complejo de especies formado originalmente por cinco razas patógenas y cinco biovares (Buddenhagen *et al.*, 1962; Hayward, 1964; Perea Soto *et al.*, 2011). Recientemente este



complejo se ha dividido en cuatro filotipos relacionados con el origen filogenético y geográfico de las cepas mediante el análisis de varios genes, entre ellos el de respuesta a la hipersensibilidad y patogénesis B (hrpB gen) (Fegan y Prior, 2005). Este complejo ha sido dividido en tres especies en base al grado de similitud entre secuencias de ADN del gen 16S (filotipo), pudiéndose diferenciar además su origen geográfico (Tabla 2).

<b>TABLA 2: FILOTIPOS DEL COMPLEJO DE ESPECIES DE <i>R. SOLANACEARUM</i></b>			
<b>FILOTIPO</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>ORIGEN</b>	<b>BIOVARES</b>
I	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Asia y Australia	3, 4 y 5
II	<i>R. solanacearum</i>	América del sur y central	1, 2-A y 2-T
III	<i>R. pseudosolanacearum</i>	África	1 y 2-T
IV	<i>R. syzygii</i>	Indonesia	1, 2-A y 2-T

El genotipo de *R. solanacearum* causante de la “podredumbre parda” y que atañe a este trabajo se encuentra dentro del Filotipo IIB (anteriormente referido como raza 3 biovar 2) y tiene una serie de características que lo convierten en un microorganismo de gran importancia en Sanidad Vegetal. En primer lugar, el biovar 2 es el grupo de cepas más activas metabólicamente hablando y, a su vez, con una mayor cantidad de hospedadores. Además, destaca por su baja temperatura de crecimiento óptimo de aproximadamente 27 °C (un poco más baja que en los demás genotipos), lo que le permite propagarse fácilmente en zonas tropicales y subtropicales de altitud elevada, así como en zonas templadas (de Armas, 2017).

### 1.1.3 SÍNTOMAS Y DAÑOS

Cuando *R. solanacearum* penetra en el vegetal, éste desarrolla la enfermedad conocida como “podredumbre parda”. La entrada del patógeno normalmente se produce a través de heridas o lesiones en raíces y



tallos, que pueden estar producidas, por ejemplo, por nematodos, insectos o simplemente por determinadas prácticas culturales. El contagio de planta a planta suele producirse por el movimiento de las bacterias que están en la rizosfera de una planta infectada mediante el agua de riego. No hay constancia de transmisión aérea o por las hojas. Los primeros síntomas de la enfermedad se inician en las hojas jóvenes de las ramas terminales, que empiezan a marchitarse durante las horas de más calor del día, pero sin caerse ni amarillear, recuperándose cuando llega la noche. Puede ocurrir, que solo se marchiten las hojas de un lado de la rama o que sólo se marchite una rama de la planta, siendo además éste un síntoma característico. Según la enfermedad va avanzando, todo el follaje se marchitará, llegando a morir la planta con el tiempo (Figura 3).

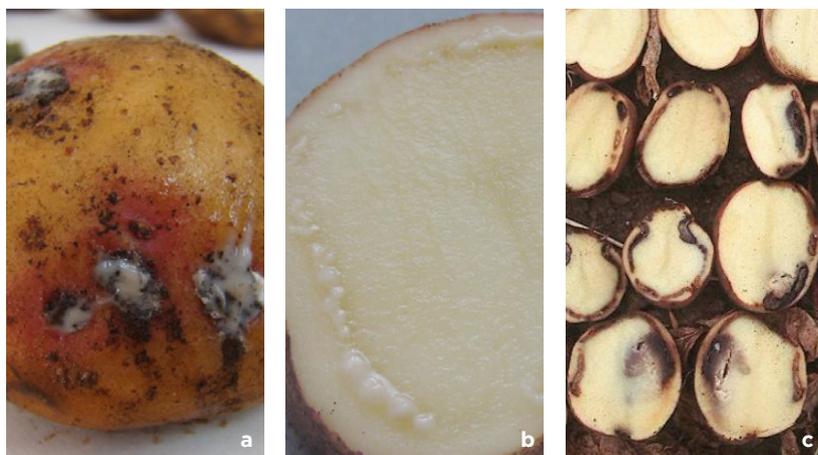


**Figura 3.** Síntomas de *R. solanacearum* en la parte aérea de la planta de papa: a-c, marchitamiento en partes aisladas del vegetal.

En el interior de los tallos se puede observar una coloración parda de los haces vasculares y un característico exudado lechoso. Este exudado indica la presencia de una densa masa de células bacterianas en el xilema pudiendo en



algunos casos salir dicho exudado al exterior del tallo. En el caso de la papa, un corte de los tubérculos infectados puede mostrar el anillo vascular también pardeado y en ocasiones necrosado, así mismo suele aparecer el típico exudado, que puede salir al exterior por las yemas u ojos del tubérculo, lo que ha dado a la enfermedad el nombre de “papas lloronas” en Canarias (Figura 4). Todo esto unido favorece la entrada de microorganismos saprófitos, que acaban produciendo la pudrición del tubérculo (Thurston, 1963).



**Figura 4.** Síntomas de *R. solanacearum* en tubérculo de papa: **a**, exudado saliendo a través de los ojos del tubérculo; **b**, exudado bacteriano en el interior del tubérculo; **c**, podredumbre parda a lo largo de los haces vasculares.

Diversos estudios han demostrado que *R. solanacearum* puede transmitirse por semillas de plantas de tomate, berenjena y manises (Machmud y Middleton, 1991; Singh, 1994). Además, la bacteria puede producir infecciones latentes asintomáticas, lo que le proporciona una gran capacidad de diseminación, especialmente, a través del movimiento de tubérculos contaminados. Estos tubérculos dan plantas que rápidamente se marchitan y mueren al ser sembrados, pudiendo trasladar la enfermedad a cualquier parte del mundo por medio del comercio de tubérculos para siembra.





Según avanza la infección y la consecuente necrosis de la planta afectada, cada vez más células bacterianas empiezan a entrar en un estado de latencia o dormancia al tiempo que van retornando al suelo, donde permanecen en dicho estado hasta que se acaban activando de nuevo debido a algún estímulo, como el contacto con un nuevo hospedador (Grey y Steck, 2001).

#### 1.1.4 CONTROL DE LA ENFERMEDAD

Debido a características de *R. solanacearum* como su supervivencia en el suelo, restos vegetales, maleza y en agua, a su propagación por tubérculos, esquejes y material vegetal, en general, se hace difícil su control efectivo. Además, afecta a especies de gran importancia económica mundial que están sometidas a un gran movimiento comercial (tomates, papas, geranios, etc.). En un contexto como en el que está la agricultura actual de Gestión Integrada de Plagas se deben combinar diferentes métodos de control. En primer lugar, se debe recordar que *R. solanacearum* está considerado organismo de cuarentena en la Unión Europea por lo que se deben establecer planes de actuación apropiados para los estados miembros, mientras que en EEUU es un agente biológico vivo sujeto a protección y cuarentena por su Departamento de Agricultura (USDA) y considerado como un potencial organismo bioterrorista.

Según la Normativa Fitosanitaria de la Patata, publicada en el 2019 por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), y que toma como base la Directiva 98/57/CE del Consejo Europeo de 20 de julio de 1998, sobre el control de *Ralstonia solanacearum* (Smith) *Yabuuchi et al*, tanto las papas destinadas a siembra como las dedicadas a consumo deben analizarse en busca de esta bacteria. Dichos análisis comprenderán tanto inspecciones visuales como las pruebas de



laboratorio recogidas en el protocolo de diagnóstico de la EPPO PM 7/21 (2).

Las medidas para erradicar la enfermedad deben ser ante todo culturales y físico-mecánicas, pues no se dispone de variedades de plantas resistentes, ni enemigos naturales adecuados. Los tratamientos químicos, bactericidas y antibióticos han demostrado escasa efectividad al tiempo que pueden causar un daño ambiental elevado. Pese a ello, se debe destacar que aplicaciones de *Bacillus subtilis* Ehrenberg e hidróxido de cobre han dado prometedores resultados en investigaciones llevadas a cabo en Colombia (Torres-González *et al.* 2013).

En caso de detectar la enfermedad se debe inmediatamente eliminar todo el material vegetal afectado, lo que incluye el arranque del cultivo de procedencia. Posteriormente, las parcelas afectadas deberán permanecer en barbecho o se deberá sembrar otro cultivo no susceptible a la enfermedad. Dichas medidas fueron aplicadas estrictamente en la isla de Tenerife y de La Palma durante el pasado brote de *Ralstonia* entre los años 2002 y 2010.

## 1.2 Antecedentes de *R. solanacearum* en la isla de Tenerife

A finales de los años noventa del siglo pasado se detectó *R. solanacearum* en la isla de La Palma. La enfermedad afectó principalmente al municipio de San Andrés y Sauces, reduciendo su incidencia en los municipios de Puntallana en el sur y de Barlovento en el norte. También se pudieron encontrar focos aislados de la enfermedad en otros municipios de la isla como Garafía, Puntagorda, Santa Cruz de La Palma, Breña Alta y Breña Baja. La enfermedad causó importantes pérdidas económicas al pudrir los tubérculos de papa y marchitar la parte aérea





de la planta, afectando también puntualmente a otras solanáceas como el tomate. Mediante el Real Decreto 1644/1999 (BOE núm. 265, de 5 de noviembre de 1999) se incorporó al ordenamiento interno la Directiva 98/57/CE, del Consejo, de 20 de julio, sobre el control del organismo nocivo denominado *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al*, teniendo en cuenta, además, que se habían producido algunas intercepciones en Castilla y León y Galicia, y que dicha bacteria estaba presente con una distribución localizada en la isla de La Palma. En Canarias, se estableció un programa de erradicación y control de dicho microorganismo basado en tres acciones: determinar su distribución, impedir su propagación y, por último, llevar a cabo su erradicación.

Usando como base este decreto, las diversas comunidades autónomas establecieron programas de detección y erradicación, en el caso de Canarias a través de la disposición 1641 publicada en el Boletín Oficial de Canarias (BOC) el 18 de noviembre de 2002. Al mismo tiempo, agricultores y distribuidores afectados recibieron indemnizaciones por las pérdidas ocasionadas por dichas medidas de contención y erradicación que supusieron la inmovilización y destrucción de los tubérculos ya recogidos y almacenados. En las parcelas declaradas como contaminadas se hizo obligatoria la eliminación de las plantas de papa y tomate, al igual que cualquier otra planta capaz de actuar como hospedante de la bacteria, incluidas las malas hierbas. Por último, se prohibió cultivar papa y tomate durante los siguientes 4 años desde el momento en que las parcelas se declararon afectadas, así como de cualquier otra planta hospedante del microorganismo. Una vez concluido este periodo, solo se permitió exclusivamente la plantación de papas certificadas para la producción de papas de consumo. El 7 de agosto de 2003, se declaró oficialmente la



enfermedad en la isla de Tenerife en dos focos localizados en los remotos caseríos de Los Carrizales y Masca, situados en el municipio de Buenavista del Norte en el extremo noroeste de la isla. Por lo tanto, también en Tenerife se aplicaron las medidas de detección, control y erradicación que se estaban empezando a aplicar en La Palma.

Con el paso de los años dichas medidas fueron dando resultado y la enfermedad se fue controlando poco a poco, quedando reducida a unos casos aislados en la segunda década del siglo, y se terminó con el pago de las indemnizaciones en el año 2009. Durante todo este tiempo de lucha contra la enfermedad, el Servicio de Sanidad Vegetal del Gobierno de Canarias, mediante el Laboratorio de Sanidad Vegetal ubicado en Valle de Guerra (Tenerife) y un laboratorio instalado al efecto en San Andrés y Sauces (La Palma) se hizo cargo del análisis de muestras, así como de la detección de la bacteria.

## 2.-JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta que *R. solanacearum* puede vivir en el suelo y en el agua de manera saprófita e incluso entrar en fase de latencia por largos periodos de tiempo cuando las condiciones le son desfavorables, es fundamental evaluar si ha podido persistir en el medio agrícola tras años de ausencia de cultivos hospedantes. Es necesario estudiar esta capacidad de supervivencia de la bacteria para conocer la efectividad de los planes de erradicación pasados y, si fuera preciso, poder modificar los futuros. Debemos saber con absoluta seguridad si terrenos agrícolas, antaño contaminados por esta bacteria, y sobre los que se aplicaron medidas de erradicación tan severas como la total destrucción de las plantas y la prohibición de la siembra de especies





hospedantes durante varios años, permanecen a día de hoy libres de ella. Y más aun teniendo en cuenta que en la actualidad muchos de estas parcelas vuelven a acoger especies vegetales sensibles al patógeno.

Por tanto, los objetivos de este trabajo fueron: i, la toma de muestras de tubérculos de papa en parcelas que en el pasado estuvieron infectadas con *R. solanacearum* en el norte de la isla de Tenerife; ii, el análisis de la muestras mediante técnicas moleculares para la detección de *R. solanacearum* y, en el caso de que se detectara la bacteria, proceder a su caracterización; iii, la caracterización mediante técnicas moleculares de aislados de *R. solanacearum* obtenidos en los focos iniciales de la enfermedad, crioconservados en la Sección de Laboratorio de Sanidad Vegetal del Gobierno de Canarias.

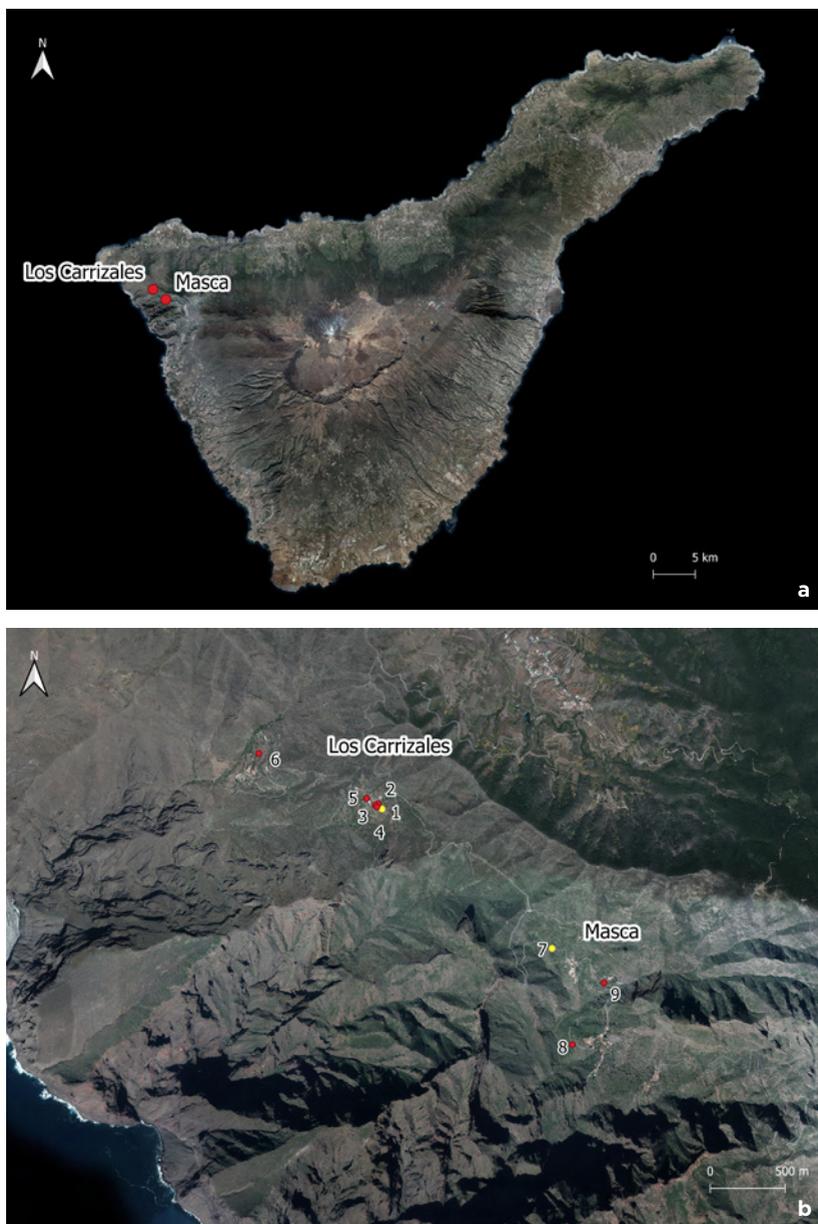
En definitiva, con este trabajo se espera añadir un poco más de luz sobre este destructor patógeno que causó importantes pérdidas económicas en Tenerife y La Palma para poder prever futuras epidemias.

### **3.-MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Muestreo en campo**

Con el apoyo de técnicos del Cabildo de Tenerife, se procedió a realizar un muestreo en las dos zonas de la isla de Tenerife que en el pasado tuvieron fincas afectadas por *R. solanacearum*: los caseríos de Los Carrizales y Masca (Figuras 5, 6 y 7). Se trata de dos pequeñas poblaciones dedicadas casi en exclusiva a la agricultura y enclavadas en un paraje montañoso agreste en el macizo de Teno.





**Figura 5.** Localización de: **a**, Los Carrizales y Masca en la isla de Tenerife; **b**, parcelas en las que se realizó la inspección en 2021 y en las que se pudieron recoger (rojo) o no (amarillo) muestras.





**Figura 6.** Imágenes de Los Carrizales: **a**, parcela sin cultivo solo con papas de risa; **b**, parcela con cultivo de papas.



**Figura 7.** Imágenes de Masca: **a**, Vista general del barranco de Masca en cuyas laderas se aprecian las terrazas de cultivo; **a**, Pie de planta con marchitez de la que se procede a recoger una muestra de tubérculos; **b**, Elaboración propia.

Se localizaron las nueve parcelas agrícolas en las que se detectó *R. solanacearum* situadas entre las que se llevó a cabo el programa de erradicación hace más de 10 años con la consecuente compensación a sus dueños, todas ellas de superficies de menos de 1000 m<sup>2</sup> (ver figura 5). Las visitas se realizaron en el mes de mayo, cuando más se desarrolla la bacteria en el cultivo en Canarias, y es más fácil encontrar síntomas de la enfermedad. En cuatro parcelas se encontraron plantaciones de papas de las cuales se tomaron varias muestras. En tres no había cultivo de papa, pero sí quedaban tubérculos de la cosecha anterior, denominados localmente “papas de risa”, que fueron muestreados. Por último, dos parcelas



se encontraban abandonadas sin cultivo ni plantas solanáceas, por lo que no se pudo muestrear.

En el caso de las parcelas con plantas de papa en cultivo, se seleccionaron aquellas plantas que presentaban algún tipo de signo visible compatible con la enfermedad como marchitamiento y clorosis, excavando con la azada en su base y recogiendo los tubérculos que allí se encontraran. El muestreo en el caso de las parcelas sin cultivo y con “papas de risa” consistió en la recogida de tubérculos que emergían de la tierra procurando tomar muestras representativas de toda la parcela.

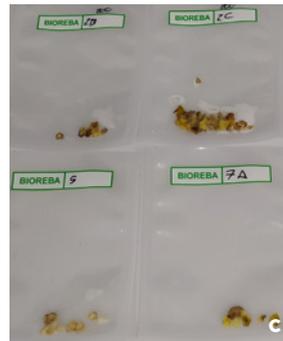
En total, se prospectaron siete parcelas diferentes en algunas de las cuales se muestrearon varios canteros identificándose la variedad de papa recogida, así como su geolocalización. En total se recogieron nueve muestras compuestas por un número variable de tubérculos (Tabla 3).

<b>TABLA 3. LOCALIZACIÓN DE LAS PARCELAS Y MUESTRAS</b>				
<b>PARCELA</b>	<b>MUESTRA</b>	<b>LOCALIZACIÓN</b>	<b>VARIEDAD DE PAPA</b>	<b>Nº DE TUBÉRCULOS</b>
1	-	Carrizal Alto	-	-
2	2.1	Carrizal Alto	Negra	6
3	3.1	Carrizal Alto	Papa de risa	7
4	4.1	Carrizal Alto	Roster	42
5	5.1	Carrizal Alto	Papa de risa	50
6	6.1	Carrizal Bajo	Roster	13
	6.2	Carrizal Bajo	Up to date	13
7	-	Masca	-	-
8	8.1	Masca	Cara	9
	8.2	Masca	Negra oro	30
9	9.1	Masca	Papa de risa	12





Una vez en el laboratorio y tras su preceptivo registro, los tubérculos fueron lavados para eliminar la tierra que traían adherida, y a continuación, se dejaron secar y fueron contados y pesados. A cada papa se le extrajo una pequeña porción de la zona donde se une con la planta madre (omblico) usando un bisturí esterilizado tal y como establece el protocolo oficial (Real Decreto 1644/1999). Dichos ombligos fueron almacenados en bolsas de homogeneización para la posterior extracción del material genético. Para concluir, cada papa fue cortada longitudinalmente para observar posibles síntomas de la enfermedad en su anillo vascular (Figura 8).



**Figura 8.** Procesado de tubérculos en el laboratorio: **a**, tubérculos contados y lavados; **b**, tubérculos cortados para comprobar sus haces vasculares; **c**, ombligos después de ser extraídos de los tubérculos e introducidos en bolsas de homogeneización.



### 3.2 Siembra en medio de cultivo

Se seleccionaron cinco suspensiones bacterianas procedentes de cultivos purificados de *R. solanacearum* que habían sido aislados de tubérculos de papa infectadas en el año 2005, tanto en la isla de Tenerife como en la de La Palma. Dichas muestras habían permanecido conservadas en glicerol congeladas a -75 °C (Tabla 4).

TABLA 4. CULTIVOS DE <i>R. SOLANACEARUM</i>		
IDENTIFICADOR	AÑO	LOCALIZACIÓN
310.1.1.A	2005	La Palma
310.1.1.B	2005	La Palma
1097.7.1	2005	Tenerife
1119 A.1.1	2005	Tenerife
442 A.1	2005	Tenerife

Con el fin de comprobar la viabilidad de dichas bacterias, se procedió a realizar la siembra en el medio general NA (Apéndice 1), recomendado para el crecimiento de *R. solanacearum* (EPPO PM7/21 2018). Se tomaron 50 µl de la suspensión y se distribuyeron por la placa usando la técnica de siembra por estrías. A continuación, las placas se incubaron en una estufa a 25 °C. A los tres días se procedió a comprobar el crecimiento.

### 3.3 Extracción de ADN

Los fragmentos de papa fueron homogenizados dentro de las bolsas de extracción con la ayuda de una maza para posteriormente ser resuspendidos en 5 ml de agua ultrapura de grado PCR. Esta suspensión fue filtrada usando la propia malla de la bolsa y trasvasada a microtubo Eppendorf de 1,5 ml. Se transfirieron 200 µl de la suspensión con una pipeta hasta un microtubo para, a





continuación, proceder a la extracción del ADN utilizando el método CTAB (Doyle y Doyle, 1987) (Apéndice 2) modificado. El material genético así obtenido fue guardado a -75 °C hasta su uso posterior.

Por otro lado, se extrajeron directamente 200 µl de las suspensiones de cultivo bacteriano crioconservadas con las que se procedió a hacer la extracción de ADN con el mismo método CTAB después de retirar el glicerol mediante centrifugación y lavados en agua destilada estéril. Se llevaron a cabo extracciones de cinco aislados (310.1.1A, 310.1.1B, 1097.7.1, 1119A.1.1, y 442A.1) hubieran crecido o no en medio de cultivo.

El producto de la extracción del ADN, tanto de las muestras de campo como de los cultivos, se analizó mediante PCR convencional y PCR en tiempo real. El extracto vegetal se conservó refrigerado hasta obtener los resultados de estas pruebas, por si era necesario sembrarlos en medio de cultivo para el aislamiento de la bacteria.

### **3.4 PCR convencional**

Las muestras fueron analizadas mediante la técnica de PCR convencional usando el par de cebadores OLI-1 (5´-GGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3´) e Y2 (5´-CCCAC TGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3´) desarrollados por Seal *et al.* (1993) según las indicaciones del Real Decreto 1644/1999 con las siguientes condiciones: 96 °C 2 min, 35 ciclos de 94 °C durante 20 s, 68 °C durante 20 s, 72 °C durante 30 s y un paso de extensión final de 72 °C durante 10 min. El tamaño esperado de amplicón era de 288 pb. Para esta prueba se utilizó el kit Invitrogen Platinum Green Hot Start PCR (Apéndice 3) y un termociclador SimpliAmp de Applied Biosystems. Los productos de amplificación fueron sometidos a una electroforesis en



gel de agarosa al 1,3% en tampón TAE usando como colorante SYBR Safe DNA Gel Stain de Invitrogen, un transiluminador UV 2000 de Biorad y un sistema de procesamiento de imágenes Gel Logic 100 de Kodak.

En esta PCR se utilizó un control positivo de amplificación (PAC) consistente en un extracto de ADN procedente de una muestra infectada con *R. solanacearum*. Como controles negativos se usaron un control negativo de extracción (NEC) procedente de una planta sana de tomate, y un control negativo de amplificación (NAC), donde no se añadió ADN.

### 3.5 PCR en tiempo real

Las muestras fueron también analizadas mediante la técnica de PCR en tiempo real con sonda TaqMan debido a la mayor sensibilidad de esta técnica para así descartar que se hubieren obtenido falsos negativos en la PCR convencional. Los cebadores empleados fueron los indicados por Weller *et al.* (2000) RS-I-F (5'-GCATGCCTTACACATGCAAGTC-3'), RS-II-R (5'-GGCACGTTCCGATGTATTACTCA-3') y la sonda RS-P (5'-[FAM]-AGCTTGCTACCTGCCGGCGAGTG-[TAMRA]-3') según las indicaciones del protocolo oficial de la EPPO (EPPO PM7/21). En este caso se utilizó el kit PrimeGene Expression Master Mix (Apéndice 4) en un termociclador StepOnePlus de Applied Biosystems siendo las condiciones de PCR: 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min.

En esta PCR se utilizó un control positivo de amplificación (PAC) idéntico al utilizado en la PCR convencional del cual se realizó una dilución 1:10, que también se analizó. Como controles negativos se usaron, al igual que en la PCR convencional, un control negativo de extracción (NEC) y un control negativo de amplificación (NAC).





### 3.6 Secuenciación

Las muestras procedentes de cultivos bacterianos fueron secuenciadas, para lo cual se hizo una PCR convencional con cebadores universales de bacterias que amplifican para una región del ARN ribosomal 16S, con los cebadores 005F (5´- **TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´**) y 531R (5´-**TACCGCGGCTGCTGGCAC-3´**) (Hall *et al.*, 2003). En la PCR se emplearon las siguientes condiciones: 95 °C durante 5 min, 40 ciclos de 95 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, 72 °C durante 45 s y un paso de extensión final de 72 °C durante 10 min. El tamaño esperado de amplicón era de 500 pb. Para esta prueba se volvió a utilizar el kit Invitrogen Platinum Green Hot Start PCR (Apéndice 5) y un termociclador SimpliAmp de Applied Biosystems. Los productos de amplificación fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 1,3% en tampón TAE usando como colorante SYBR Safe DNA Gel Stain de Invitrogen, un transiluminador UV 2000 de Biorad y un sistema de procesamiento de imágenes Gel Logic 100 de Kodak. Por último, se purificaron y secuenciaron los amplificados obtenidos en el Servicio de Genómica de Servicio General de Apoyo a la Investigación de la Universidad de La Laguna (SG-SEGAI). Las secuencias obtenidas se editaron utilizando el programa MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets (Kumar *et al.*, 2016 )) y se buscaron similitudes para ellas con la aplicación BLAST (Basic Local Alignment Search Tool: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) en la base de datos de la NCBI (National Center for Biotechnology Information: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## 4- RESULTADOS

### 4.1 Muestreo en el campo

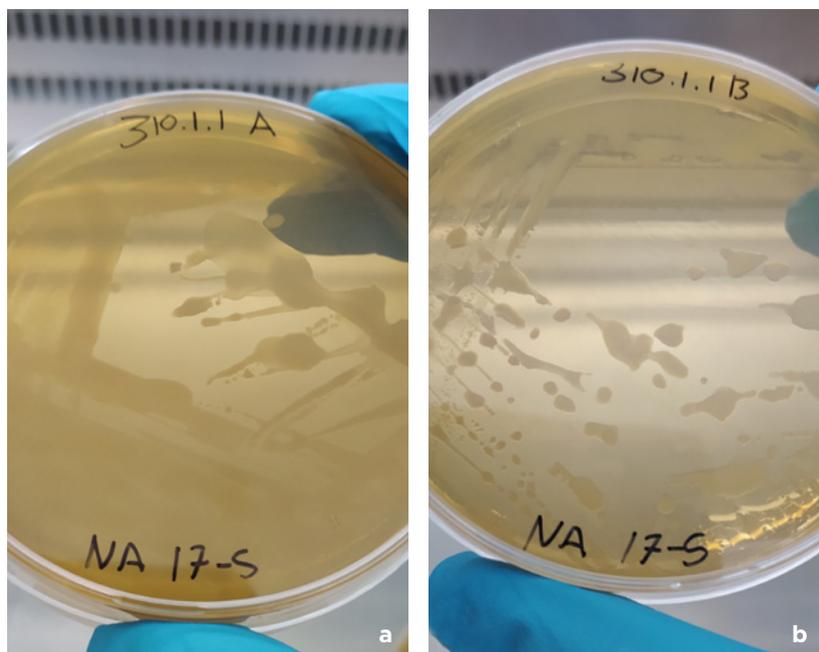
Los tubérculos cortados e inspeccionados visualmente no revelaron ningún tipo de síntoma atribuible a *R.*



*solanacearum*. Su sistema vascular presentaba un aspecto normal sin presencia de pardeamiento ni exudado.

#### 4.2 Crecimiento en medio de cultivo

Solamente dos de las cinco suspensiones bacterianas conservadas en glicerol a  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$  (310.1.1A y la 310.1.1B) presentaron el típico crecimiento de colonias virulentas de *R. solanacearum* en medios nutritivos generales (colonias mucosas, fluidas e irregulares de color crema), además, dicho crecimiento estuvo libre de contaminación. (Figura 9 y 10).



**Figura 9.** Placas de medio de cultivo NA: **a** y **b**, crecimiento típico de *R. solanacearum* tras 3 días de incubación a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

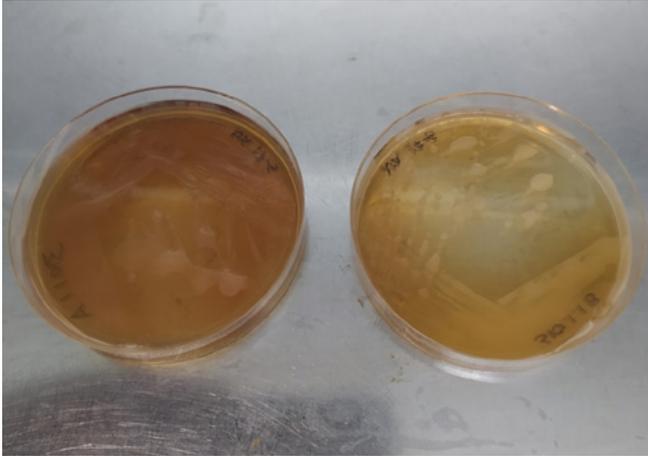
#### 4.3 Detección mediante PCR convencional

Los extractos de ADN procedentes de las muestras de tubérculos recogidos en campo al ser analizados mediante PCR convencional dieron resultados negativos

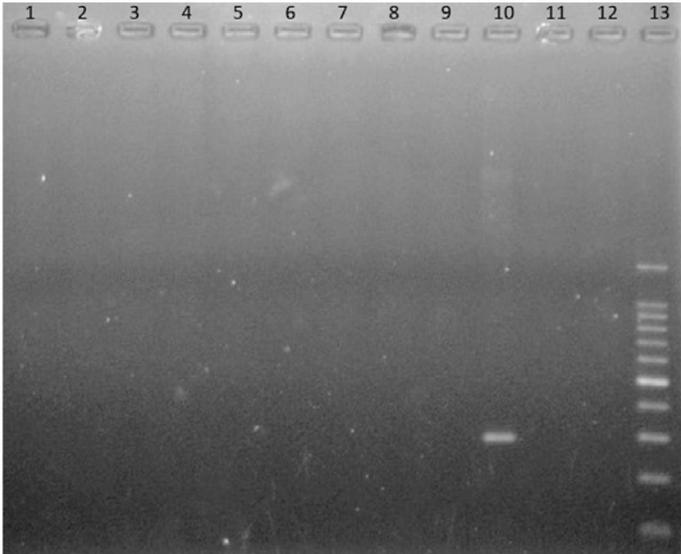




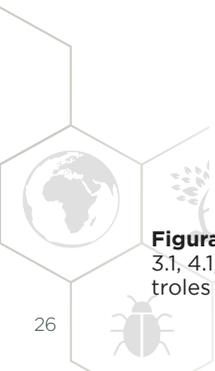
(Figura 11). Por contra, los extractos de las suspensiones bacterianas marcadas como 310.1.1 A, procedente de La Palma y 1097.7.1 y 1119A.1.1 procedentes de Tenerife resultaron positivas (Figura 12).



**Figura 10.** Placas de medio de cultivo NA: colonias virulentas de *R. solanacearum* que producen un pigmento marrón característico que oscurece el medio al crecer.

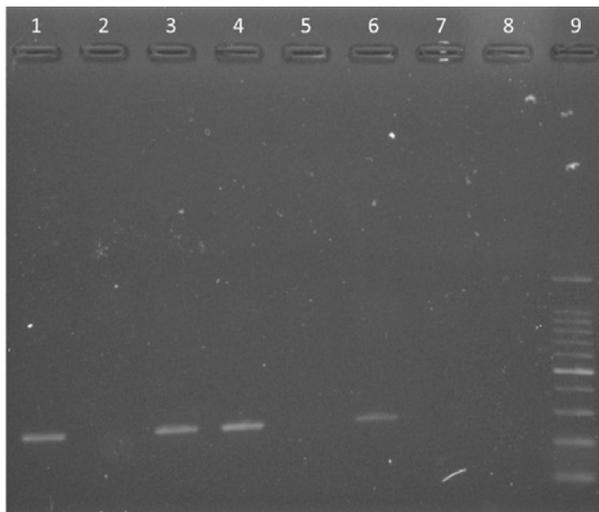


**Figura 11.** Electroforesis de las muestras de campo: líneas 1 a 9, muestras 2.1, 3.1, 4.1, 5.1, 6.1, 6.2, 8.1, 9.1, 8.2; ; línea 10, control positivo PAC; líneas 11 a 12, controles negativos NAC y NIC; línea 13, marcador de pesos moleculares (100 pb).



#### 4.4 Detección mediante PCR en tiempo real

Todas las muestras de campo también dieron negativas por PCR en tiempo real lo que confirmó la ausencia de *R. solanacearum* en ellas (Figura 13).

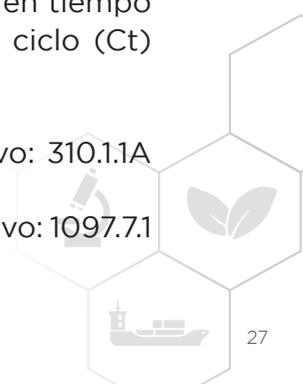


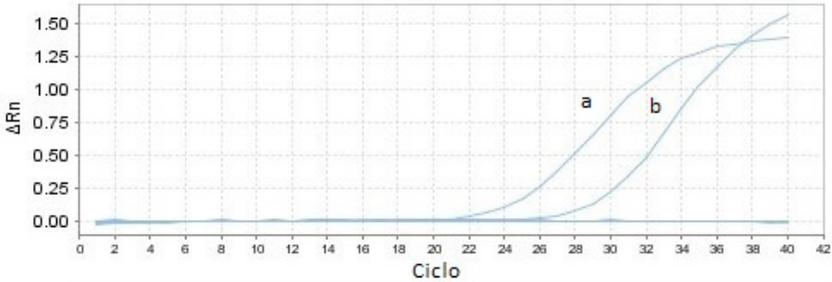
**Figura 12.** Electroforesis de los cultivos bacterianos: líneas 1 a 5, muestras 310.1.1A, 310.1.1B, 1097.7.1, 1119A.1.1, 442A.1; línea 6, control positivo PAC; líneas 7 a 8, controles negativos NAC y NIC; línea 9, marcador de pesos moleculares (100 pb).

No se efectuaron siembras de los extractos obtenidos de las muestras de tubérculos recogidas en las parcelas de Masca y Los Carrizales al no haber dado resultados positivos en los análisis mediante PCR convencional ni PCR en tiempo real.

Respecto a las muestras procedentes de cultivos bacterianos, las cinco amplificaron en la PCR en tiempo real con los siguientes valores de umbral de ciclo (Ct) (Figura 14):

- Aislados que crecieron en medio de cultivo: 310.1.1A Ct=16,59, 310.1.1B Ct=33,02.
- Aislados que no crecieron en medio de cultivo: 1097.7.1 Ct=16,00, 1119A.1.1 Ct=15,05, 442A.1 Ct=21,10.

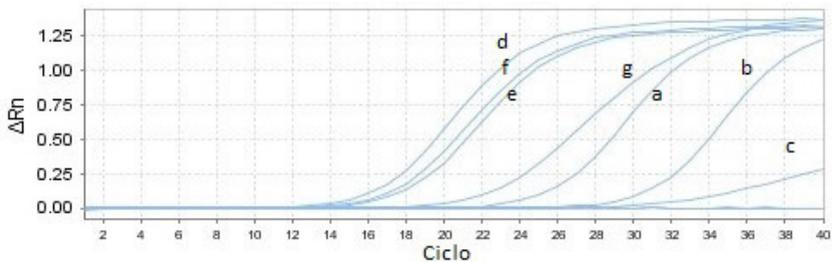




**Figura 13.** Gráfico de amplificación de las muestras de campo: a, control positivo PAC, Ct=25,95; b, Control positivo PAC 1:10, Ct=30,33.

#### 4.5 Identificación de los aislados mediante secuenciación

Los productos de amplificación de la PCR realizada con cebadores universales de bacterias (Figura 15) con las cinco muestras procedentes de cultivos bacterianos, se usaron para la secuenciación del genoma bacteriano. Una vez que se obtuvieron las secuencias se editaron y ensamblaron manualmente con el programa MEGA7 obteniendo las correspondientes secuencias consenso que fueron procesadas mediante el programa informático de alineamiento de secuencias BLAST.

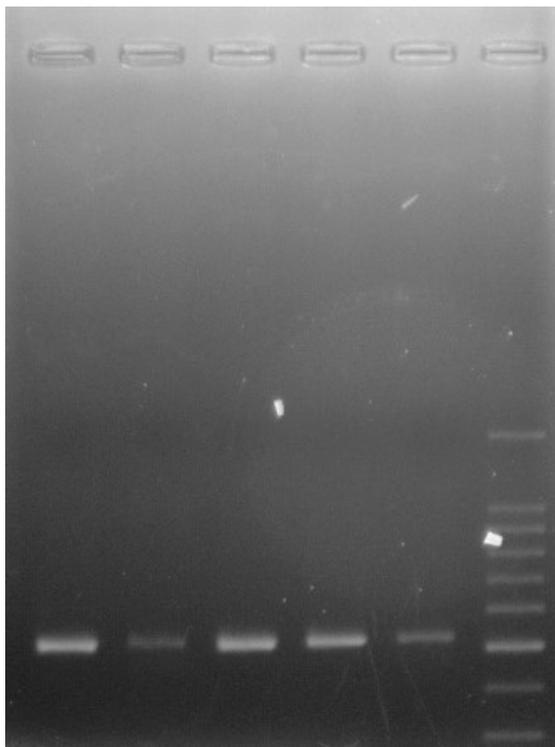


**Figura 14.** Gráfico de amplificación de los cultivos bacterianos: a, control positivo PAC Ct=24,25; b, control positivo PAC 1:10 Ct=29,46; c, 310.1.1B; d, 310.1.1A; e, 1097.7.1; f, 1119A.1.1; g, 442A.1.

Las secuencias consenso obtenidas de los cinco aislados analizados fueron iguales (Apéndice 6) y de 485 pb (Tabla 5). Los resultados del alineamiento de secuencias en el programa BLAST con los de las cepas CFBP 8697 y CFBP 8695 (*Ralstonia solanacearum* strain CFBP 8695



*chromosome, complete genom* CP047138.1 (Guarisch-Sousa *et al.*, 2016) y *Ralstonia solanacearum* strain CFBP 8695 *chromosome, complete genom* CP047136.1 (Sedighian *et al.*, 2020)) indicaron que todas ellas presentan la más alta similitud (100%). Las cepas CFBP 8697 y CFBP 8695 de *R. solanacearum* pertenecen al Filitipo IIB Biovar 2 (Sedighian *et al.*, 2020), pero no es posible diferenciar si es 2A o 2T pues para ello sería necesario un análisis de su actividad bioquímica.



**Figura 15.** Electroforesis de amplificados para la región ribosomal 16S: líneas 1-5, muestras 310.1.1A, 310.1.1B, 1097.7.1, 1119A.1.1 y 442A.1; línea 6, marcador de pesos moleculares (100 pb).

## 5.- CONCLUSIONES

1. Las muestras analizadas procedentes de parcelas que en el pasado habían estado infectadas por *R. solanacearum* y en las que en la actualidad se ha vuelto a cultivar





con especies susceptibles a dicho patógeno han dado resultados negativos en las pruebas moleculares a las que se las ha sometido. La ausencia de la bacteria indica que ni en las plantas ni en el suelo ni incluso en el agua de riego puede haber persistido este microorganismo. Las medidas de erradicación que se implementaron en su momento parecen haber conseguido eliminar *R. solanacearum*.

2. Los cultivos bacterianos que fueron descongelados tras 15 años de almacenamiento a -75 °C demostraron que, aunque solo en dos de ellos había bacterias vivas, el ADN estaba en todos razonablemente intacto como para poder someterlo favorablemente a análisis mediante PCR y secuenciación.

3. La secuenciación confirmó que nos encontramos con cepas del Filotipo II, tanto en Tenerife como en La Palma, que es el procedente de Sudamérica, tal y como se creía. Sin embargo, mediante dicha secuenciación no se pudo determinar si se trataba del biovar 2A o del 2T.

4. Sin duda este trabajo puede servir de base para un estudio más amplio sobre la presencia de la bacteria en el medio agrícola de las islas. En un futuro deberían realizarse estudios similares en las zonas de la isla de La Palma en las que se detectó *R. solanacearum* en el pasado con el fin de confirmar que la bacteria fue erradicada también en esta isla.



## 6.- APÉNDICES

### APÉNDICE 1. MEDIO DE CULTIVO NUTRIENT AGAR (NA) (LELLIOTT Y STEAD, 1987)

PRODUCTO	CANTIDAD
Peptona	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
NaCl	0,5 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 L
El pH debe ser ajustado a 7,2	

### APÉNDICE 2. TAMPÓN DE EXTRACCIÓN CTAB (DOYLE Y DOYLE, 1987)

PRODUCTO	Cantidad para 100 ml
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) 10% en H <sub>2</sub> O	30 ml
5M NaCl	28 ml
0,5M EDTA (pH 8,0)	4 ml
1M Tris-HCl (pH 8,0)	10 ml
Polivinilpirrolidona (PVP) (MW 40 kDa)	3 g
$\beta$ -Mercaptoetanol	0,2 ml
H <sub>2</sub> O	24,8 ml

### APÉNDICE 3. MEZCLA DE REACCIÓN PARA PCR CONVENCIONAL

REACTIVO	CONCENTRACIÓN DE TRABAJO	VOLUMEN POR REACCIÓN ( $\mu$ L)	CONCENTRACIÓN FINAL
ADN		2	
Platinum Green hot Start PCR Master Mix	2X	12,5	1X
Cebador OLI-1	10 $\mu$ M	0,5	0,2 $\mu$ M
Cebador Y-2	10 $\mu$ M	0,5	0,2 $\mu$ M
Agua libre de nucleasas		9,5	
Total		25	



**APÉNDICE 4. MEZCLA DE REACCIÓN PARA PCR EN TIEMPO REAL**

REACTIVO	CONCENTRACIÓN DE TRABAJO	VOLUMEN POR REACCIÓN (µL)	CONCENTRACIÓN FINAL
ADN		2	
PrimeGene Expression Master Mix	2X	10	1X
Cebador RS-I-F	10 µM	0,6	0,3 µM
Cebador Y-2	10 µM	0,6	0,3 µM
Sonda RS-P	10 µM	0,4	0,2 µM
Agua libre de nucleasas		6,4	
Total		20	

**APÉNDICE 5. MEZCLA DE REACCIÓN PARA PCR CONVENCIONAL**

REACTIVO	CONCENTRACIÓN DE TRABAJO	VOLUMEN POR REACCIÓN (µL)	CONCENTRACIÓN FINAL
ADN		2	
Platinum Green hot Start PCR Master Mix	2X	12,5	1X
Cebador 531F	10 µM	0,5	0,2 µM
Cebador 531R	10 µM	0,5	0,2 µM
Agua libre de nucleasas		9,5	
Total		25	

**APÉNDICE 6. SECUENCIA CONSENSO DE LOS CINCO AISLADOS ESTUDIADOS DE *RALSTONIA SOLANACEARUM* (SECUENCIA PARCIAL DEL ARN RIBOSÓMICO 16S)**

ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCGGGGTA  
GCTTGCTACCTGCCGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCC  
CTGTAGTGGGGGATAACTAGTCGAAAGACTAGCTAATACCGCATAACGACCTGAG  
GGTCAAAGTGGGGGACCGCAAGGCCTCATGCTATAGGAGCGGCCGATGTCTGAT  
TAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGA  
GAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG  
CAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCG  
TGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATCGCT  
TCGGTTAATACCTGGAGTGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGGACCGGCTAACT  
AC



## 7.-REFERENCIAS

Buchanan R.E., Gibbons N.E., editors, 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8Th de. Baltimore, Md: The Williams & Wilkins Co.

Buddenhagen I.W., Sequeira L., Kelman A., 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology, vol.52, 726.

de Armas S., 2017. Desarrollo de ensayos *in vitro* para evaluar resistencia a *Ralstonia solanacearum* en germoplasma de papa. Universidad de la República, Uruguay. Tesina.

Doyle J.J., Doyle J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical bulletin, vol. 19, n.º 1, 11-15.

EPPO PM 7/21 (2), 2018. *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* and *R. syzygii* (*Ralstonia solanacearum* species complex). Boletín EPPO 48. 32-63.

Fegan M., Prior P., 2005. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex. APS press, 449-461.

Granada G.A., Sequeira L., 1983. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil, rhizosphere, and plant roots. Canadian Journal of Microbiology, vol. 29, 433 - 440.

Grey B.E., Steck T.R., 2001. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. Applied and Environmental Microbiology, vol. 67, n.º 9, 3866-3872.

Guarisch-Sousa R., Puigvert M., Coll N.S., Siri M.I., Píanzola M.J., Valls M., Setubal J.C., 2016. Complete genome sequence of the potato pathogen *Ralstonia solanacearum* UY031. Standards in Genomic Sciences, vol. 11, n.º 7.

Hall L., Doerr K.A., Wohlfiel S.H., Roberts G.D., 2003. Evaluation of the MicroSeq System for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology labo-





ratory. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, n.º 4, 1447-1453.

Hayward A.C., 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 27, n.º 2, 265-267.

Kumar S., Stecher G., Tamura K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 33, n.º 7, 1870-1874.

Lelliott R.A., Stead, D.E., 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Machmud M., Middleton K.J., 1991. Transmission of *Pseudomonas solanacearum* through groundnut seeds. *Bacterial Wilt Newsletter*, n.º 7, 4-5.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019. *Manual de Procedimiento para la Aplicación de la Normativa Fitosanitaria de la Patata*.

Perea Soto J.M., García Estrada R.S., Allende Molar R., Carrillo Fasio J.A., León Félix J., Valdez Torres B., López Soto F.S.M., 2011. Identificación de razas y biovarias de *Ralstonia solanacearum* aisladas de plantas de tomate. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 29, n.º 2, 98-108.

Real Decreto 1644/1999, de 22 de octubre, sobre el control del organismo nocivo denominado *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, 1999. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, BOE-A-1999-21483.

Seal S. E., Jackson L. A., Young J. P. W., y Daniels M.J., 1993. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *P. syzygii*, *P. picketti* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction», *Journal of General Microbiology*, vol. 139, 1587-1594.

Sedighian N., Krijger M., Taparia T., Taghavi S.M., Wicker E., van der Wolf J.M., Osdaghi E., 2020. Genome resource



of two potato strains of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 (phylotype IIB sequevar 1) and biovar 2T (phylotype IIB sequevar 25) isolated from lowlands in Iran. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 33, n.º 7, 872-875.

Singh R., 1994. Seed transmission studies with *Pseudomonas solanacearum* in tomato and eggplant. *Bacterial Wilt Newsletter*, n.º 11, 12-13.

Thurston H.D., 1963. Bacterial wilt of potatoes in Colombia. *American Potato Journal*, vol. 40, 381-390.

Torres-González C., Casas M, Díaz Ortiz J.E., 2013. Manejo de *Ralstonia solanacearum* raza 2 a través de productos químicos y biológicos. *Revista Iteckne*, vol. 10, n.º 2.

van Elsas J.D., Kastelein P., van Bekkum P., van der Wolf J.M., de Vries P.M., van Overbeek L.S., 2001. Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and microcosm soils in temperate climates. *Phytopathology*, vol. 90, 1358-1366.

Weller S. A., Elphinstone J. G., Smith N. C., Boonham N., & Stead D. E. (2000). Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, vol. 7, 2853-2858.

Yabuuchi E., Kosako Y., Oyaizu H., Yano I., Hotta H., Hashimoto Y., Ezaki T., Arakawa M., 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. Nov. *Microbiology and Immunology*, vol. 36, n.º 12, 1251-1275.

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 Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. *Microbiology and Immunology*, vol. 39, n.º 11, 897-904.





# VALORACIÓN DE LAS MEDIDAS DE ERRADICACIÓN DE ***RALSTONIA SOLANACEARUM*** EN LA ISLA DE TENERIFE

Moisés Botella Guillén • Tomás Suárez Encinosa  
Ana Alfaro Fernández • Felipe Siverio de la Rosa