



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Variabilidad genética de la bacteria *Ralstonia solanacearum* de cepas aisladas de plátano en México

Tesis que presenta

José Abraham Obrador Sánchez

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

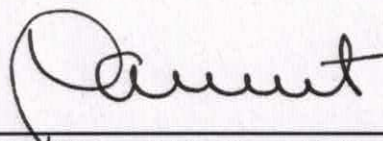
2016

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **José Abraham Obrador Sánchez**, titulado “Variabilidad genética de la bacteria *Ralstonia solanacearum* de cepas aisladas de plátano en México”, fue realizado en el laboratorio de Biotecnología molecular de plátano de la Unidad de Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., en la línea de Agrobiotecnología, bajo la dirección de la Dra. Blondy Beatriz Canto Canché y el Dr. Inocencio Higuera Ciapara, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:



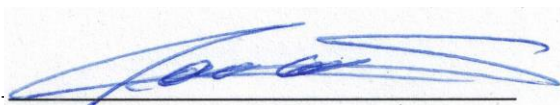
Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 25 de Abril de 2017

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'José Abraham Obrador Sánchez', written over a horizontal line.

Nombre: José Abraham Obrador Sánchez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado "Iniciativa nacional para la sustentabilidad alimentaria de México (INSAM)", clave 60246 en el que se participó bajo la dirección de la Dra. Blondy Beatriz Canto Canché y el Dr. Inocencio Higuera Ciapara.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con autorización de la DGSV (Dirección General de Sanidad Vegetal), SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria), México. Reconocemos todo el apoyo a este proyecto al Dr. Javier Trujillo-Arriaga, Director de la DGSV. Al M.C. José Abel López-Buenfil, Biol. Bárbara Hernández-Macías y M.C. Oscar Morales-Galván para la formación técnica en CNRF (Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria) del alumno José Abraham Obrador Sánchez. Gracias a los comités locales de sanidad vegetal CESAVE (Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Chiapas), CESVETAB (Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Tabasco) y CESAVERNAY (Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Nayarit), para el muestreo de tejidos de plantas de banano con síntomas de Moko y PROVEF (Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria) para la entrega de muestras al laboratorio.

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca con No. 344769, brindada para mi manutención para realizar mi trabajo de doctorado y la beca de Movilidad Mixta brindada para realizar mi estancia en la CNRF localizado en la ciudad de México. Este trabajo fue apoyado por el proyecto "Iniciativa nacional para la sustentabilidad alimentaria de México (INSAM)", clave 60246. Así como el uso de equipo de cómputo otorgado por el CONACYT, Grant 269833, y por el proyecto FOMIX 247355.

A CICY (Centro de Investigación Científica de Yucatán) por el uso de sus instalaciones y equipo. Una institución que me preparó mentalmente para desempeñar cualquier trabajo y dar una buena cara a las adversidades. Al posgrado en ciencias biológicas y la unidad de biotecnología por la enseñanza y apoyo brindado durante el desarrollo de mi doctorado.

Al M. en C. Miguel Alonso Tzec Simá quien participo en la realización de este trabajo al ayudar a realizar la toma de fotos, recolección de muestras, ayuda en el procesamiento de muestras, etc. Gracias por tu gran ayuda y por la gran compañía que eres.

Al M. en C. Andrés Quijano Tamayo por asesoramiento técnico para la realización del presente trabajo y formación técnica del alumno José Abraham Obrador Sánchez.

Al M. en C. Bartolomé Humberto Chi Manzanero quien participo en la realización de este trabajo al ayudar a realizar recolección de muestras, ayuda en el procesamiento de

muestras, realización de pruebas de patogenicidad, etc.

Al Ph. D. Andrew Christopher James Kay y la Q.F.B. Rosa Grijalva Arango por proporcionar las plantas de plátano cultivar enano gigante utilizadas durante la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Blondy Beatriz Canto Canché por la realización, asesoramiento y revisión del presente trabajo.

Al Dr. Inocencio Higuera Ciapara gracias a sus aportaciones y apoyo en el presente trabajo.

A la Dra. Daisy de la Caridad Pérez Brito por la asesoría brindada para la realización del presente trabajo.

Al Dr. José Alberto Narváez Zapata por la asesoría brindada para la realización del presente trabajo.

Al Comité revisor integrado por el Dr. Inocencio Higuera Ciapara, la Dra. Blondy Beatriz Canto Canché, la Dra. Daisy de la Caridad Pérez Brito, el Dr. José Alberto Narváez Zapata, el Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores, la Dra. Ingrid Aileen O'Connor Sánchez y el Dr. Felipe Sánchez Teyer, gracias por sus valiosas observaciones y comentarios.

A mis súper amigas Inés Arana Guevara, Nuvia Kantun y Yamily Burgos quienes me apoyaron en todo momento durante la maestría, que a pesar de pelearnos a cada rato seguimos juntos. Mis queridas amigas quienes me enseñaron vivir al máximo.

A mis compañeros de grupo y amigos durante el desarrollo de mi doctorado. Gracias a todas aquellas personas que en algún momento de mi estancia en CICY estuvieron presentes.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a mi Familia.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1. El plátano y el banano.	3
1.1.1. Cultivo de plátano.....	4
1.1.2. Enfermedades y plagas del plátano.	5
1.2. <i>Ralstonia solanacearum</i>.....	6
1.2.1. Moko.	8
1.2.2. Moko en México.	12
1.2.3. Métodos contra el Moko.	13
1.3. Variabilidad genética de <i>R. solanacearum</i>.....	15
1.3.1 Análisis filogenéticos en cepas de <i>R. solanacearum</i> causantes de Moko.	19
HIPÓTESIS.	22

OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
JUSTIFICACIÓN	22
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	23
CAPÍTULO II	25
MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1. Muestreo de tejidos vegetales	25
2.2. Muestreo de suelo	26
2.3. Medición de pH de suelo	26
2. 4. Detección de <i>R. solanacearum</i> por pruebas serológica	27
2.5. Extracción de ADN	27
2.6. Amplificación del 16S	28
2.7. Detección de <i>R. solanacearum</i> por PCR	28
2.8. Aislamiento de <i>R. solanacearum</i> a partir de tejido vegetal infectado	29
2.9. Pruebas bioquímicas	30
2.10. Identificación de <i>R. solanacearum</i>	31
2.11. Resguardo de las cepas	31
2.13. Pruebas de patogenicidad	32
2.12. Ensayos de hipersensibilidad en tabaco	32
2.14. Caracterización por filotipo	33

2.15. Caracterización de la raza 2	34
2.16. Caracterización por secuevar	34
2.17. Análisis filogenético basado en los genes <i>egl</i> , <i>hrpB</i> y <i>pga</i>	34
2.18 Análisis de secuencias.....	36
CAPÍTULO III	37
RESULTADOS.....	37
3.1. Análisis del número de brotes de Moko.....	37
3.2. Muestreo de suelo y medición de pH de suelo de sitios de colecta de material infectado con Moko	40
3.3. Detección de <i>R. solanacearum</i>	42
3.4. Aislamiento de colonias de <i>R. solanacearum</i>	48
3.5. Pruebas de patogenicidad en plátano.....	50
3.6. Caracterización de las cepas MC01 y MC02	51
3.7. Ensayos de hipersensibilidad en tabaco	59
3.8. Caracterización por filotipo.....	60
3.9. Caracterización de la raza 2	61
3.10. Caracterización por secuevar	61
3.11. Análisis filogenético con base en los genes <i>egl</i> , <i>hrpB</i> y <i>pga</i>	63
CAPÍTULO IV.....	73

ÍNDICE

DISCUSIÓN GENERAL.	73
CAPÍTULO V	85
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.	85
5.1 Conclusiones	85
5.2 Perspectivas.....	86
BIBLIOGRAFÍA.....	87

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Mapa comparativo de la distribución mundial de <i>Ralstonia solanacearum</i> en los años 1999 y 2015.	7
Figura 1.2 Mapa de la distribución mundial de <i>Ralstonia solanacearum</i> raza 2.).	9
Figura 1. 3 Sintomatología de Moko.....	10
Figura 1.4 Signo de hilo bacterial en agua.	12
Figura 1.5 Mapa de la distribución del Moko del plátano en México.....	13
Figura 1.6 Erradicación de las plantas encontradas en la zona de riesgo fitosanitario. ...	15
Figura 1.7 Solarización de suelo contaminado con Moko.....	15
Figura 1.8 Origen y dispersión de <i>R. solanacearum</i>	16
Figura 1.9 Filotipos, razas y biovares de <i>R. solanacearum</i>	18
Figura 1.10 Distribución de secuevares con base en los filotipos y especies.	19
Figura 2.1 Mapa de los puntos de muestreo de plantas de plátano con síntomas de Moko en los Estados de Chiapas, Nayarit y Tabasco.....	25
Figura 2.2 Método de detección por coordenadas	31
Figura 3.1 Grafica de número de brotes controlados en el estado de Tabasco	37
Figura 3.2 Grafica de número de brotes registrados y controlados en municipios del estado de Tabasco durante mayo 2013 a diciembre 2014.....	38
Figura 3.3 Grafica de número de brotes registrados y controlados en el estado de Chiapas en el período 2009-2015.....	38

Figura 3.4 Grafica de número de brotes controlados por municipio en el período mayo 2013 a diciembre 2014 para el estado de Chiapas	39
Figura 3.5 Grafica de número de brotes controlados período 2012-2015 en el estado de Nayarit.	40
Figura 3.6 Diagnostico de <i>R. solanacearum</i> por inmunología en placa de ELISA	43
Figura 3.7 Uso de inmunotiras en la detección de <i>R. solanacearum</i>	43
Figura 3.8 Gel de agarosa para determinar integridad del ADN	44
Figura 3.9 Electroforesis en gel de agarosa del gen ribosomal 16S.....	44
Figura 3.10 Crecimiento en medio SMSA	48
Figura 3.11 Identificación cualitativa de <i>R. solanacearum</i> y <i>Pseudomonas</i> spp. mediante cultivo sobre medio B de King.....	49
Figura 3.12 Cepa de <i>Ralstonia solanacearum</i> sobre medio TTC	50
Figura 3.13 Planta de plátano inoculada con <i>Raltonia solanacearum</i> raza 2 causante de Moko.....	52
Figura 3.14 Plantas de plátano inoculadas en pseudotallo con las cepas MC01, MC02 y cepa patogénica MT08	54
Figura 3.15 Plantas de plátano inoculadas entre el pseudotallo y el cormo con las cepas MC01, MC02 y cepa patogénica MT08.....	56
Figura 3.16 Cortes transversales cada 3 centímetros del cormo hacia la parte apical del pseudotallo de plantas de plátano inoculadas con las cepas MC01, MC02 y cepa patogénica MT08	58
Figura 3.17 Detección por PCR de <i>Ralstonia solanacearum</i> a partir del ADN extraído de plantas de plátano enano gigante inoculadas con las cepas MC01, MC02 y cepa patogénica MT08	59

Figura 3.18 Pruebas de hipersensibilidad en tabaco	60
Figura 3.19 Gel de agarosa de filotipo usando los cebadores Nmult.....	60
Figura 3.20 Gel de agarosa con productos de la amplificación de los cebadores ISRso19 para identificar la raza 2.....	61
Figura 3.21 Gel de agarosa con productos de amplificación mediante multiplex-PCR usando los cebadores de la serie Mus.....	62
Figura 3.22 Gel de agarosa para identificación del secuevar de <i>R. solanacearum</i> mediante PCR convencional con pareja sencilla de cebadores S128	63
Figura 3.23 Árbol filogenético de <i>R. solanacearum</i> generado por el método de neighbour-joining y basado en secuencias del gen de endoglucanasa (<i>egl</i>).....	67
Figura 3.24 Árbol filogenético generado por el método de neighbour-joining basado en secuencias del gen HrpB (<i>hrpB</i>) de las cepas de <i>Ralstonia solanacearum</i>	69
Figura 3.25 Árbol filogenético generado por el método de neighbour-joining basado en secuencias del gen de precursor de poligalacturonasa (<i>pga</i>) de las cepas de <i>Ralstonia solanacearum</i>	71

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Razas de *Ralstonia Solanacearum*, sus hospederos, biovares y temperatura óptima para el desarrollo de enfermedad..... 17

Cuadro 1.2 Lista de países con reporte de presencia de Moko y los secuevares presentes en estos..... 20

Cuadro 2.1 Criterios de evaluación de un suelo con respecto a su pH..... 26

Cuadro 2.2 Cebadores para detección por PCR de *Ralstonia solanacearum* 29

Cuadro 2.3 Lista de cebadores utilizados para identificación del filotipo. 33

Cuadro 2.4 Lista de cebadores para identificación del secuevar en raza 2..... 34

Cuadro 2.5 Lista de cebadores utilizados para análisis filogenético. 35

Cuadro 3.1 Resultado del análisis de los suelos colectados 41

Cuadro 3.2 Información de las muestras colectadas 45

Cuadro 3.3 Descripción cepas de *Ralstonia solanacearum* aisladas..... 64

ABREVIATURAS

No patogénico a banana

NPB

Complejo de especies de *Ralstonia solanacearum*

Rssc

Ralstonia solanacearum

Rs

RESUMEN

Entre las bacterias causantes de enfermedades en los bananos y plátanos se encuentra *R. solanacearum*, la cual es considerada una “especie complejo” por su variabilidad genética, y se categoriza en genoespecies, filotipos, razas y secuevares. Esta bacteria genera la enfermedad denominada Moko, uno de los problemas fitosanitarios más importantes en las agroindustrias plataneras en países tropicales. En México es un problema continuo y su mayor incidencia se encuentra en los Estados de Tabasco y Chiapas. Este trabajo tuvo como objetivo identificar los filotipos y secuevares de cepas de *R. solanacearum* presentes en México, y se evaluó la variabilidad en los genes *egl*, *hrpB* y *pga* para examinar sus relaciones filogenéticas. Se lograron aislar un total de 47 cepas, todas pertenecientes al filotipo IIA, raza 2 y secuevar 6. En los ensayos de patogenicidad sobre plantas de plátano cultivar “enano gigante” generaron sintomatología de Moko, con excepción de dos cepas (MC01 y MC02). El árbol filogenético generado a partir de *egl* confirmó la genotipificación, ubicando las cepas mexicanas dentro del agrupamiento del secuevar 6. Por su parte, los árboles filogenéticos generados usando los genes *hrpB* y *pga* agruparon a las cepas en el cluster del secuevar 6 pero generaron un clado hermano para las cepas no patogénicas (MC01 y MC02). Esta es la primera descripción en el mundo de cepas raza 2, secuevar 6 no patogénicas en banano y expanden la diversidad fenotípica del filotipo II de *R. solanacearum* en América.

ABSTRACT

Among bacteria causing banana diseases, *R. solanacearum* is considered a "complex species" because large, and it is hierarchically categorized in genospecies, phytotypes, races and sequevars. *R. solanacearum* is the cause of some of the most important phytosanitary problems in banana agroindustry in tropical countries. In Mexico it is a continuous problem, with the highest incidence in Tabasco and Chiapas States. The goal of this work was to characterize Mexican strains of *R. solanacearum* in terms of phylotypes and sequevars, using *egl*, *hrpB* and *pga* gene markers to elucidate their phylogeny. Forty seven strains were isolated, all belonging to phylotype IIA, race 2, Sequevar 6. Pathogenicity test on Grand Nain banana cultivar phenotyped most of them as virulent strains, with exception of two strains (MC01 and MC02). Phylogenetic tree constructed with *egl* gene supported the cluster all Mexican strain together, within the sequevar 6. Phylogenetic trees constructed with *hrpB* and *pga* genes placed apart, in sister clades, the Mexican pathogenic strains and non-pathogenic to banana MC01 and MC02 strains. This is the first description worldwide of *R. solanacearum* strains with phenotype non-pathogenic to banana within sequevar 6, and they expand the phenotypic diversity within the phylotype II of *R. solanacearum* in America.

INTRODUCCIÓN

El plátano es considerado un producto básico y de exportación, constituyendo una importante fuente de nutrición, empleo e ingresos en numerosos países en desarrollo (CVCA, 2010). Con una producción mundial de 114,130,151.00 ton anuales, el plátano es la fruta tropical más cultivada (FAO, 2016).

México ocupa el onceavo lugar de producción a nivel mundial, con un volumen de 2,127,772.29 ton (SIAP, 2014, FAO, 2016). Se cultiva en 17 estados de la República Mexicana, siendo los estados de Chiapas y Tabasco los principales productores, con el 60% de la producción entre ambos (SIAP, 2014, FAO, 2016).

Una de las enfermedades que merma la producción de este cultivo es la causada por la bacteria *R. solanacearum*, denominada con el nombre de Moko. La enfermedad Moko es uno de los problemas fitosanitarios más importantes en las agroindustrias plataneras en países tropicales, siendo la principal enfermedad bacteriana en plátano (Hurtado, 2012). Los síntomas del Moko incluyen hojas amarillas, flácidas que finalmente colapsan, quedando adheridas a la planta. Los frutos son chiclosos, tomando un aspecto oscuro y tendiendo a degradarse. Se observa una necrosis vascular interna debido a una infección sistémica y la presencia de puntos negros. Moko afecta a todos los genotipos de plátano (Eden y Seal, 1993).

En México esta enfermedad es reportada como un problema continuo y su incidencia ha aumentado en los estados de Tabasco y Chiapas (SENASICA, 2015). Uno de los municipios con mayor afectación es Teapa, localizado en el estado de Tabasco (SENASICA, 2012). En general el control de *R. solanacearum* es un desafío; la variación genética le permite superar la resistencia genética de las plantas y generar resistencia a bactericidas (Iriarte *et al.*, 2007).

Muchas cepas de *R. solanacearum* han sido identificadas y caracterizadas en el mundo, revelando una variabilidad significativa dentro de la especie. Por lo tanto *R. solanacearum* es considerada una "especie complejo" (Fegan y Prior, 2005b). Con base en esto, la clasificación jerárquica de este complejo está basada en cuatro niveles: especie, subespecie, grupos infra-subespecíficos y líneas clonales, utilizando los términos filotipo y

secuevar para definir los grupos subespecíficos e infraespecíficos respectivamente (Fegan yPrior, 2005a).

Los análisis de secuencia de los genes 16S-23S rRNA (ITS), los genes de la poligalacturonasa (*pga*), endoglucanasa (*egl*), *hrp*, *hrpB*, análisis genómicos y proteómicos dividieron a *R. solanacearum* en tres especies (*R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* y *R. syzygii*) (Prior *et al.*, 2016) y en 54 secuevares distribuidos en los filotipos I (Asia), II (América), III (África) y IV (Indonesia, Australia y Japón)(Peeters *et al.*, 2013, Fegan y Prior, 2006, Denny, 2006, Woese, 1987).

De los 54 secuevares actualmente reportados, 7 de ellos han sido reportados como causantes de la enfermedad Moko en plátano. Los secuevares 3, 4 y 6 de *R. solanacearum* se encuentran ampliamente distribuidos en el continente americano, y los secuevares 24, 25, 41 y 53 se encuentran hasta ahora reportados solo en Suramérica (Albuquerque *et al.*, 2014). Cada secuevar presenta diferencias en su diversidad genética, causando variabilidad de patogenicidad en rango de hospederos, capacidad de adaptación y agresividad (Xue *et al.*, 2011). Con base en lo anterior, uno de los principales objetivos en los trabajos epidemiológicos sobre *R. solanacearum*, es la correcta identificación de las cepas causantes de patogenicidad (Stevens y Van, 2010), dado que, una alternativa viable para reducir la propagación de enfermedades consiste en la correcta detección y manejo (Alvarez *et al.*, 2007).

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. El plátano y el banano.

La familia de las musáceas comprende 3 géneros (*Musa*, *Musella* y *Ensete*), los cuales agrupan 42 especies. Son plantas herbáceas, perennes, originarias del sureste asiático y que fueron distribuyéndose poco a poco en las zonas tropicales y subtropicales de distintas regiones del mundo. El género *Musa* cuenta con alrededor de 30-40 especies distribuidas entre las latitudes 30°N y 30°S. Este género es de gran importancia económica, industrial, alimenticia y ornamental (Daniells, 2001).

El género se encuentra subdividido en cinco secciones con base en las características morfológicas y el número de cromosomas: *Australimusa* (N=10), *Callimusa* (N=10), *Rhodochlamys* (N=11), *Ingetimusa* (N=7) y *Eumusa* (N=11); dentro de esta última se encuentran las especies *M. acuminata*, *M. balbisiana* y *M. schizocarpa* (Daniells, 2001; Purseglove, 1973; Cheesman, 1947).

La sección *Eumusa* comprende las plantas con un juego cromosómico de N = 11 (de 22, 33 o 44 cromosomas, según número de ploidía). En este grupo se incluyen a las bananas o plátanos originarios de India o Malasia, que para efectos prácticos significa casi todos los bananos y plátanos del mundo (Cheesman, 1947). Incluyendo a los económicamente más importantes en términos de la cantidad de producción y demanda en el mercado (Nwakanma *et al.*, 2003).

Las especies *M. acuminata* Colla (genoma AA), *M. schizocarpa* Simmonds (genoma SS) y *M. balbisiana* Colla (genoma BB) son utilizadas para la formación de híbridos diploides, triploides o tetraploides, divididos en tres grupos, según su dotación genética y la especie de sus progenitoras (Daniells, 2001). A partir de estas se obtienen distintos cultivares, tal es el caso de *M^x sapientium* el cual produce banano y *M^x paradisiaca* el cual produce plátano; ambos pertenecientes al grupo AAB (Robinson y Saúco, 2010).

Plátanos y bananos son diferentes desde los puntos de vista fisiológico y genético; los

plátanos son frutos que tienen alto contenido de almidón rico en amilopectina, profusamente ramificado, por lo que para su consumo se requiere un proceso de cocción. Estos frutos se producen en plantas híbridas cuya constitución genética es AAB o ABB. En contraste, los bananos son frutos que se consumen en fresco debido a que durante su maduración los carbohidratos se hidrolizan a azúcares de fácil ingesta y absorción. Estos frutos son producidos por plantas cuya constitución genética es AAA. Cabe mencionar que en México plátanos y bananos reciben de manera indistinta el nombre de “plátano” (Gracia-Medrano e Islas-Flores, 2012).

Actualmente hay ~1200 variedades o cultivares como resultado de estos cruzamientos. Para designar a los cultivares se usa el nombre del género (*Musa*), seguidas por un código que denota el grupo genómico y el nivel de poliploidía, seguido del nombre del subgrupo (si lo tiene) y el nombre popular del cultivar. Por ejemplo, el cultivar “Valery” se designa como *Musa* AAA (subgrupo Cavendish) “Valery” (Robinson y Saúco, 2010). El cultivar Cavendish es el más importante comercialmente, y representa alrededor del 47% de la producción mundial (Minton, 2016).

Los cultivares que se plantan en las grandes zonas plataneras están adaptados al clima de las mismas, ya que ha sido seleccionados con base en las necesidades de producción. Sin embargo muchos cultivares triploides presentan el inconveniente de ser altamente sensibles a varias enfermedades (Daniells, 2001).

1.1.1. Cultivo de plátano.

El plátano es considerado un producto básico y de exportación, constituyendo una importante fuente de nutrición, empleo e ingresos en numerosos países en desarrollo (CVCA, 2010). Con una producción mundial de 114,130,151.00 ton anuales, el plátano es la fruta tropical más cultivada (FAO, 2016). India es el principal productor, con el 17.28% de la producción mundial (FAO, 2016).

México ocupa el onceavo lugar de producción a nivel mundial, con un volumen de 2,127,772.29 ton. Es el producto agrícola número veintiséis en nuestro país, generando alrededor de \$5,411,964.86 (FAO, 2016; SIAP, 2014).

El plátano es considerado como una fruta básica en la alimentación mexicana, debido a

su bajo precio, rico sabor, disponibilidad en todo el año, múltiples combinaciones de cocina, la sensación de saciedad que produce y su valor nutritivo en potasio, hierro y vitamina k (CVCA, 2010). Se cultiva en 17 estados de la República Mexicana, siendo los estados de Chiapas y Tabasco los principales productores, con el 60% de la producción entre ambos (FAO, 2016; SIAP, 2014).

En México se cultiva una amplia variedad de cultivares, entre las que destacan plátano Tabasco o Roatán, Gros Michel (AAA), Gran enano (AAA), Pequeña enana (AAA), Macho (AAB), Criollo (AAA), Gruesa (AAA), Valery (AAA), Dominicó (AAB), Pera (ABB), Manzano (AAB), Dátil (AA), Lakatan (AAA), Poyo (AAA), FHIA 21(AAAB), Morado (AAA), Zeling (AAA), entre otros (CVCA, 2010; Orozco-Santos *et al.*, 2001). Sin embargo, las principales variedades de plátanos cultivadas en México son: Dwarf Cavendish, Gran Enano, Williams y Valery, que debido a la similitud de características que presentan entre sí, comercialmente se denominan bajo el nombre del subgrupo al que pertenecen: Cavendish (SAGARPA-SE, 2005).

1.1.2. Enfermedades y plagas del plátano.

Los insectos son una de las mayores plagas que enfrentan los cultivos de plátano. Se han registrado alrededor de 470 especies de insectos y ácaros que atacan en mayor o menor medida a los cultivos; 270 se alimentan del follaje, 10 son barrenadores, 70 se alimentan de raíces y rizomas, 130 se alimentan de frutos y flores, 10 más son vectores de enfermedades y 58 especies de hormigas que atacan diversas partes de la planta (Osmark, 1974).

Entre los principales agentes patógenos causantes de enfermedades se enlistan: nematodos, virus, hongos y bacterias. Los nematodos de los géneros *Pratylenchus*, *Helicotylenchus* y *Meloidogyne* poseen estiletes con los cuales atraviesan el tejido de la raíz para succionar los nutrientes de la savia; las hembras se fijan a la raíz, para formar pequeños sacos, e iniciar la producción de huevos (Alvarado y Díaz, 2007).

Los áfidos y cochinillas transmiten virus como el nanavirus, virus del estriado del plátano y virus del mosaico del pepinillo (Alvarado y Díaz, 2007).

Entre las enfermedades causadas por hongos se encuentra la Sigatoka negra, causada

por *Mycosphaerella fijensis*, que es la enfermedad foliar más devastadora de los cultivos de plátano. Otras enfermedades causadas por hongos incluyen a la Sigatoka amarilla (*Mycosphaerella musicola*), el mal de Panamá (*Fusarium oxysporum*), la punta de cigarro (*Stachylidium*, *Fusarium* y *Deightoniella*) y Cordana (*Cordana musae*) (Shirani *et al.*, 2012).

Las enfermedades bacterianas incluyen la enfermedad de la sangre (*Ralstonia syzygii* subsp. *celebensis*), enfermedad vascular javanense (*Ralstonia solanacearum* subsp. *syzygii*), enfermedad de Ensete (*Xanthomonas* spp.), pudrición de la cabeza y ablandamiento de la raíz (*Erwinia* spp.) y Moko (*Ralstonia solanacearum*). Esta última es la más importante de las enfermedades bacterianas por su capacidad infectiva, así como las significativas pérdidas que provoca (Prior *et al.*, 2016; Jones, 2000).

1.2. *Ralstonia solanacearum*.

Ralstonia solanacearum (Smith) es una β -proteobacteria aeróbica, Gram-negativa, que posee una alta diversidad. *R. solanacearum* es un fitopatógeno altamente agresivo, con una amplia distribución mundial (figura 1.1) y un alto número de plantas hospederas, que incluye cientos de plantas de al menos 54 familias botánicas, tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas (Prior *et al.*, 2016).

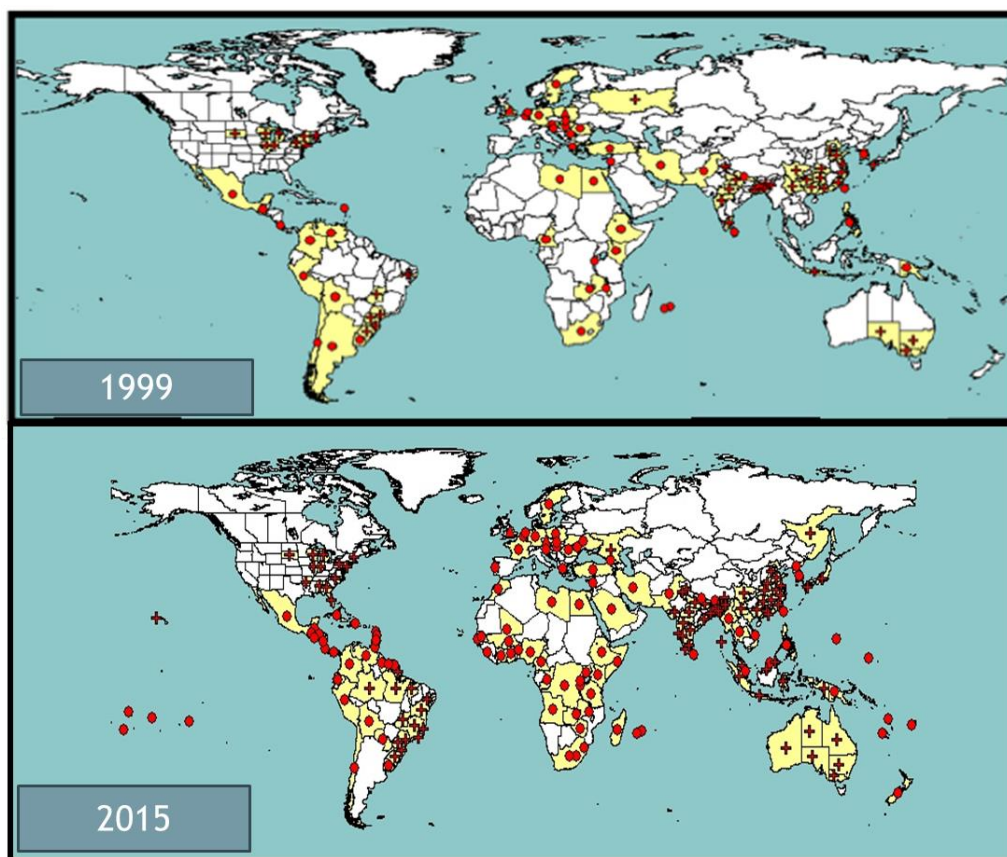


Figura 1.1 Mapa comparativo de la distribución mundial de *Ralstonia solanacearum* en los años 1999 y 2015. Círculos rojos: presente (presente en el país); cruz roja: presente (presente en un Estado o Municipio del país) (EPPO, 2015).

Muchas de las especies vegetales afectadas son fundamentales para los países en desarrollo y son estratégicos como cultivos comerciales o alimentos de subsistencia. Entre estos figuran la papa (*Solanum tuberosum*), el tomate (*S. lycopersicum*), la berenjena (*S. melongena*), el maní (*Arachis hypogea*), el tabaco (*Nicotina tabacum*) y los plátanos (*Musa spp.*). Cabe resaltar que muchas arvenses pueden funcionar como reservorios y fuentes de propagación para la infección de cultivos de importancia agrícola (Cardozo *et al.*, 2010).

Estudios genéticos recientes, han demostrado que las cepas de este patógeno han "evolucionado en lugares muy diferentes y tienen diferentes capacidades de infección sobre la flora nativa y plantas introducidas" (Genin y Denny, 2012). Por lo que existen

diferentes variedades patogénicas (razas), las cuales pueden ser hospedero-específico (razas 4 y 5), presentar un amplio rango de hospederos (ejemplo raza 1), o presentar un amplio grado de variabilidad genética (raza 2). *R. solanacearum* raza 2 es causante de la enfermedad de Moko en plátano.

1.2.1. Moko.

El nombre de Moko se deriva de la variedad de plátano en que fue encontrada por primera vez *R. solanacearum*. La enfermedad Moko es uno de los problemas fitosanitarios más importantes en las agroindustrias plataneras en países tropicales, siendo la principal enfermedad bacteriana en plátano (Hurtado, 2012). En la actualidad se encuentra presente en varios países productores de plátano en América, Asia, África y Oceanía (figura 1.2.), donde causa grandes pérdidas. Se ha calculado que anualmente las pérdidas ascienden a 5.8 millones de dólares (Cardozo *et al.*, 2010; Toomey, 2004). Esta enfermedad tomó su nombre porque las bananas adquieren una consistencia chiclosa (figura 1.3 A). Existen otras enfermedades similares a Moko (enfermedad de la sangre y Bugtok). Sin embargo estas son causadas por la genoespecie *R. syzygii* (anteriormente *R. solanacearum*) perteneciente a un filotipo diferente, la enfermedad de la sangre y Bugtok es causada por el filotipo IV (*R. syzygii*), mientras que la enfermedad Moko es causada por cepas clasificadas en el Filotipo II (*R. solanacearum*) (Prior *et al.*, 2016; Safni *et al.*, 2014).

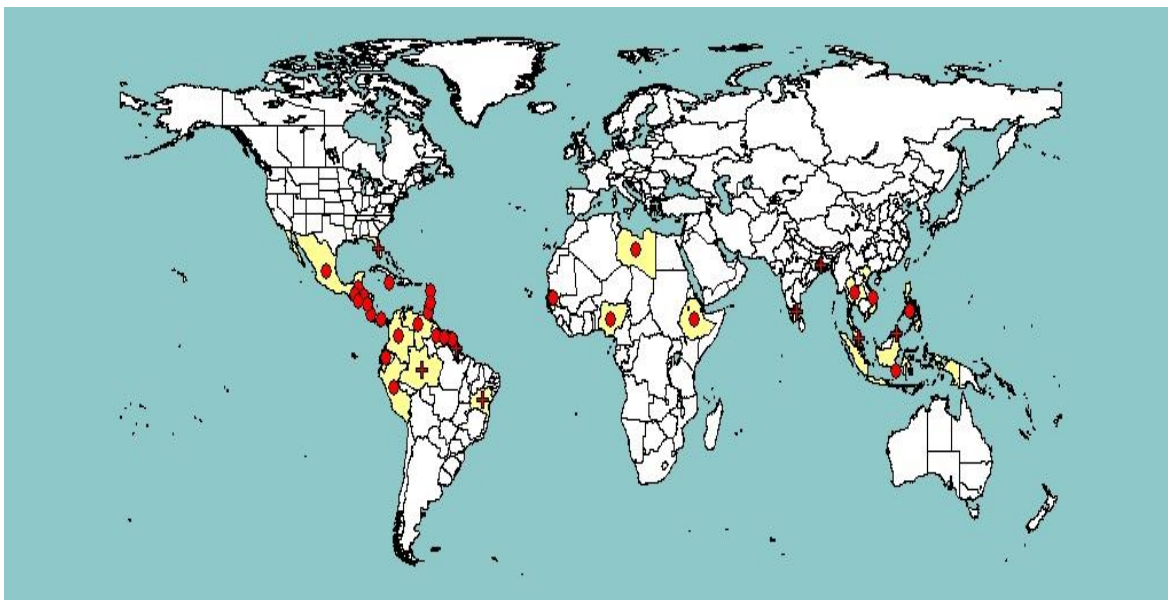


Figura 1.2 Mapa de la distribución mundial de *Ralstonia solanacearum* raza 2. Círculos rojos: presente (presente en el país); cruz roja: presente (presente en un Estado o Municipio del país) (EPPO, 2015).

Los síntomas del Moko incluyen hojas amarillas, flácidas que finalmente colapsan, quedando adheridas a la planta (figura 1.3 B); los frutos son chiclosos, tomando un aspecto oscuro y tendiendo a degradarse (figura 1.3 A). Se observa una necrosis vascular interna debido a una infección sistémica y la presencia de puntos negros (figura 1.3 C y D). Moko es común en el genotipo ABB, pero todos los genotipos de plátano son afectados (Eden y Seal, 1993).

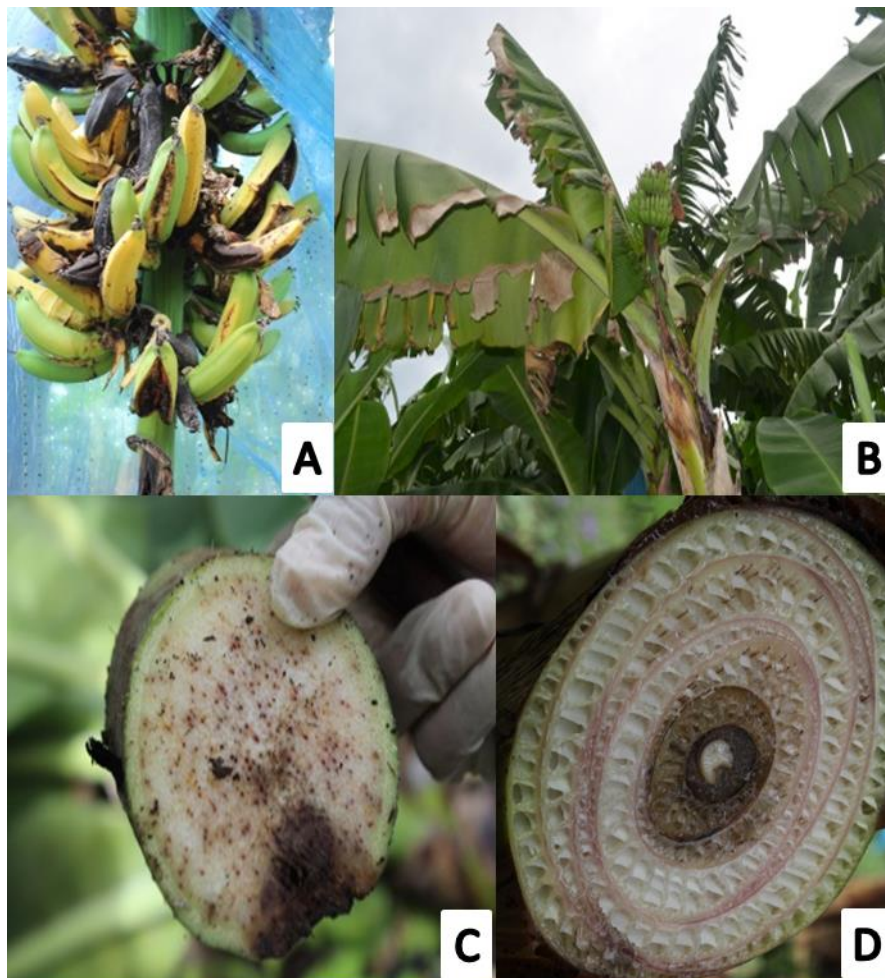


Figura 1. 3 Sintomatología de Moko. (A) Necrosis y quebrantamiento de la piel de los frutos del plátano, con presencia de una película mucilaginosa al interior del fruto siendo una característica típica de esta enfermedad; (B) Síntoma de senescencia en las hojas de plantas de plátano debido a Moko; (C y D) Presencia de puntos cafés y necrosis en los vasos vasculares provocados por aglutinación y degradación por Moko.

R. solanacearum puede diseminarse por acción de algunos insectos (áfidos), animales, movimiento de personas a través de los predios infectados, el paso de maquinaria y herramientas, escorrentías de agua de riego a través de los canales o través de semillas, hijuelos y partes infectadas de la planta (hojas, frutos, pseudotallos y raíces) (Hayward, 1991). Su vía de entrada a las plantas es a través de lesiones en las raíces y heridas en el tallo en áreas cercanas al suelo; a partir de la infección inicial se disemina a toda la planta a través de los vasos del xilema, causando su muerte por obstrucción del tejido vascular. Existe la hipótesis de que la infección sólo se presenta en las plantas cuando éstas presentan heridas en sus tejidos, lo que permite que el patógeno ingrese, se establezca y cause la enfermedad (Hurtado, 2012). Por otra parte, la bacteria puede colonizar hospederos alternativos provocando infecciones latentes y asintomáticas (Genin y Denny, 2012). La capacidad de sobrevivir por largos períodos de tiempo en el suelo agrava el efecto de la enfermedad, pues los lotes infectados quedan inhabilitados para su resiembra por seis meses (Obregón *et al.*, 2011; Fegan y Prior, 2006; Michel y Mew, 1998). En hábitats acuáticos *R. solanacearum* muestra una fuerte sensibilidad a la temperatura, es afectada negativamente por la luz y salinidad, sin embargo, aún en estas condiciones puede ser fuente de inóculo (Stevens y Van, 2010). La gran plasticidad genética de la bacteria, la carencia de genotipos de plátano resistentes a su ataque, el alto número de plantas arvenses hospedantes que presenta y su fácil dispersión dificultan las practicas dirigidas para su control (Cardozo *et al.*, 2010; Alvarado y Diaz, 2007) haciendo que este complejo sea uno de los más importantes en la agricultura (Genin y Boucher, 2002).

La enfermedad del Moko es fácilmente confundida con la enfermedad fúngica causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Una clara distinción entre ellas es que cuando se trata de Moko los frutos cambian a color café, presentan una textura chiclosa y generación de mucus; por su parte *Fusarium oxysporum* genera frutos pequeños. Al realizar un corte vertical del pseudotallo *Fusarium oxysporum* genera líneas continuas de color café-rojizo que corresponden a los haces vasculares infectados, por su parte *R. solanacearum* genera necrosis discontinuas y presencia de puntos (Jones, 2000). Un signo detectable en el Moko es el hilo bacteriano que se precipita al poner una parte de la planta en un vaso con agua (figura 1.6). En las plántulas enfermas las hojas jóvenes presentan una

coloración verde pálido a amarilla y colapsan. El pseudotallo muestra una coloración vascular café (Hayward, 1991).



Figura 1.4 Signo de hilo bacterial en agua (Momon y Olson, 2005).

1.2.2. Moko en México.

Se tienen reportes de que *Ralstonia solanacearum* raza 2 se introdujo a México en 1960 en la zona bananera de Tapachula, Chiapas (SENASICA, 2012a). Ocho años más tarde la enfermedad se extendió a otros municipios de la misma entidad: Acapetahua, Cacahoatán, Frontera Hidalgo, Huehuetán, Huixtla, Mazatán, Metapa de Domínguez, Suchiate, Pichucalco, Tuxtla Chico, Tuzantán y Villa Comaltitlán. En 1991, se presentaron los primeros reportes en la zona bananera de Teapa, Tabasco. Para el año 2009, el Moko del Plátano afectó a los municipios de Cunduacán, Huimanguillo, Centro, Cárdenas y Jalapa de ese estado. De acuerdo a la NIMF n°.08 del mes de Agosto del 2012, el Moko del plátano se encuentra presente en la zona bananera de Pichucalco, Huehuetán, Mazatán, Suchiate y Tapachula en el estado de Chiapas; en los municipios de Centro, Cunduacán, Huimanguillo, Jalapa, Tacotalpa, Teapa y Cárdenas en el estado de Tabasco, y en los municipios de Santiago Ixcuintla y San Blas en el estado de Nayarit. En México esta enfermedad es reportada como un problema continuo y su incidencia ha aumentado en el Estado de Tabasco (figura 1.5) (SENASICA, 2012b; CVCA, 2010; Jones, 2000).

El control biológico está siendo investigado; sin embargo los estudios aún no son conclusivos. Existen reportes de resultados positivos con el uso de bacterias antagonistas como *Bacillus polymyxa*, *B. subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, y *Enterobacter aerogenes*, pero sólo se utilizaron en experimentos de laboratorio sobre *R. solanacearum* infectando papa y tomate (Aino, 2016; Seleim *et al.*, 2011; Aspiras y Cruz, 1985). Los aceites esenciales derivados de plantas como el timol y la palmarosa son biofumigantes efectivos contra *R. solanacearum* en invernaderos con plantas de tomate, pero se necesitan evaluaciones en campo antes de su uso en el manejo de la enfermedad (Pradhanang *et al.*, 2005). Por su parte, el uso de nanopartículas de plata muestra resultados prometedores por su excelente capacidad antibacteriana, su estabilidad bajo condiciones ambientales y capacidad de penetrar al interior en los tejidos vegetales (Chen *et al.*, 2016a). A pesar de lo anterior, el uso de estos métodos en campo es limitada, en gran medida debido a la contaminación ambiental que representan y los posibles riesgos para la salud humana y medio ambiental (Yi *et al.*, 2007).

La enfermedad del Moko puede ser controlada a través de la aplicación de fertilizantes que alcalinizan el pH del suelo, rotación de cultivos cada 7 años con cultivos no hospederos, embolse de la inflorescencia, higienización (eliminación de residuos vegetales) y la limpieza de herramientas y equipo (He *et al.*, 2014; Alvarez, 2008). En América Latina se realiza una campaña permanente contra de la enfermedad del Moko. La estrategia más frecuente es el uso de bioplaguicidas, entre los que destaca el uso del “lixiviado” que resulta de la composta de los desechos del raquis del plátano o bien de la mezcla de *Tagetes patula* y roca fosfórica, generando una doble función, pues también actúa como fertilizante orgánico (Toomey, 2004).

En México, las principales estrategias de control del Moko en plátano consisten en la utilización de material vegetal sano, la detección prematura de las plantas infectadas y la erradicación de todas las plantas infectadas ubicadas en un radio de 10 m a la redonda (zona de amortiguamiento) de la zona infectada (figura 1.6). Posteriormente, se aplica el herbicida glifosato en la zona e amortiguamiento y 20 días después se cortan las plantas (incluyendo cormos, frutos, hojas, rizomas y raíces). Luego se remueve todo el suelo donde se encuentran las plantas enfermas y se aplica un producto bactericida. Se procede a cubrir el área con un plástico negro (solarización) por espacio de 15 a 30 días

(figura 1.7). Al cabo de este período se retira el plástico y las resiembras se autorizan seis meses posteriores a la erradicación. Para los huertos abandonados o semi abandonados se procede a la erradicación de todas las plantas (SENASICA, 2012b).



Figura 1.6 Erradicación de las plantas encontradas en la zona de riesgo fitosanitario (zona de amortiguamiento)(SENASICA, 2012b).



Figura 1.7 Solarización de suelo contaminado con Moko. El suelo es cubierto con plástico negro para que la temperatura incremente y mate al patógeno residual (SENASICA, 2012b).

1.3. Variabilidad genética de *R. solanacearum*.

Muchas cepas de *R. solanacearum* han sido identificadas y caracterizadas en el mundo, revelando una variabilidad significativa dentro de la especie. Por lo tanto *R. solanacearum* es considerada una "especie complejo". Este término es definido como un grupo de aislados relacionados cercanamente, cuyos miembros individuales pueden representar

más de una especie. Estudios de homología ADN-ADN, muestran que la relación entre aislados de esta especie es a menudo menor del 70%, umbral de nivel comúnmente esperado dentro de las especies (Fegan y Prior, 2006; Fegan y Prior, 2005a; Roberts *et al.*, 1990; Palleroni y Doudoroff, 1971). Las evidencias sugieren que *R. solanacearum* es una especie que surgió temprano en la historia geológica, posiblemente como un patógeno de los ancestros de las plantas modernas (Sequeira, 1994). Se sugiere que *R. solanacearum* se originó inicialmente en la región de Oceanía/Indonesia, migró a África y de ahí a Sudamérica (posiblemente antes de la fragmentación de Gondwana) y a Asia (figura 1.10) (Wicker *et al.*, 2012). Sin embargo, se acepta que *R. solanacearum* es polifilética con una alta capacidad de generar nuevos genotipos (Remenant *et al.*, 2011; Castillo and Greenberg, 2007).

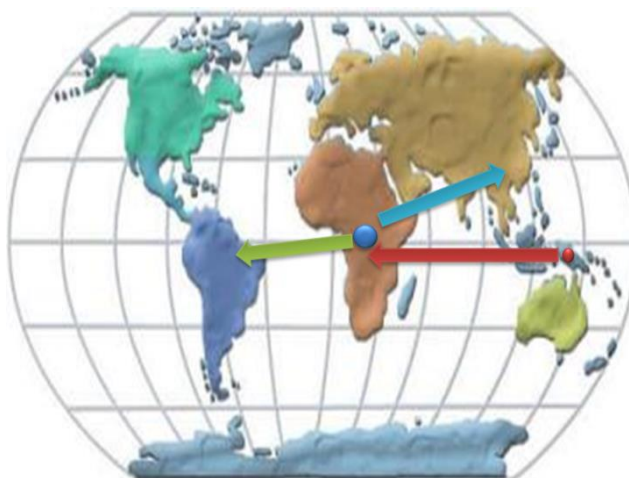


Figura 1.8 Origen y dispersión de *R. solanacearum* (basado en Wicker *et al.*, 2012).

Tradicionalmente *R. solanacearum* fue subdividida en cinco biovars, basado en el metabolismo de carbohidratos, y cinco razas, basado en la variabilidad de la gama de huéspedes (cuadro 1.1) (Fegan y Prior, 2005b; Champoiseau, 2009; Schaad *et al.*, 2001).

Cuadro 1.1 Razas de *Ralstonia Solanacearum*, sus hospederos, biovares y temperatura óptima para el desarrollo de enfermedad.

Raza	Hospederos	Biovares	Temperatura óptima (°C)
1	Tabaco, tomate, papa, berenjenas, bananas diploides, muchas otras solanáceas y arvenses.	1, 3 ó 4	35-37
2*	Bananas, plátanos y heliconias	1	35-37
3*	Papa, tomate y geranio	2, 2A ó 2T (2N)	27- 37
4	Jengibre	4,3	35
5	Mora	5	35
* con presencia en México			
(Champoiseau, 2009)			

Desde el punto de vista genético, la especie se ha segmentado en dos divisiones (I y II) determinadas a partir de un análisis de RFLP's de una colección mundial de aislamientos (Cook *et al.*, 1989). La división I comprende representantes de los biovares 3, 4 y 5 principalmente encontrados en Asia; mientras que la división II contiene los biovares 1, 2 y 2N de origen americano, los que se caracterizan por ser metabólicamente poco versátiles, existiendo un subgrupo dentro de la división II de *R. solanacearum* obtenidas de Indonesia; estas agrupaciones se realizaron a través del análisis del 16S (Taghavi *et al.*,

1996). Por otra parte, mediante el análisis de PCR-RFLP del gen *hrp*, la secuenciación de la región 16S del ADNr y el análisis AFLP se ha demostrado la existencia de subgrupos de aislamientos de origen Indonesio y africano dentro de los biovares 1 y 2 (Poussier *et al.*, 2000). En varios de los trabajos publicados postulan que las cepas del biovar 2 son genéticamente clonales (figura 1.11) (Stevens y Van, 2010; Timms *et al.*, 2001; Prior *et al.*, 1998; Hayward, 1991).

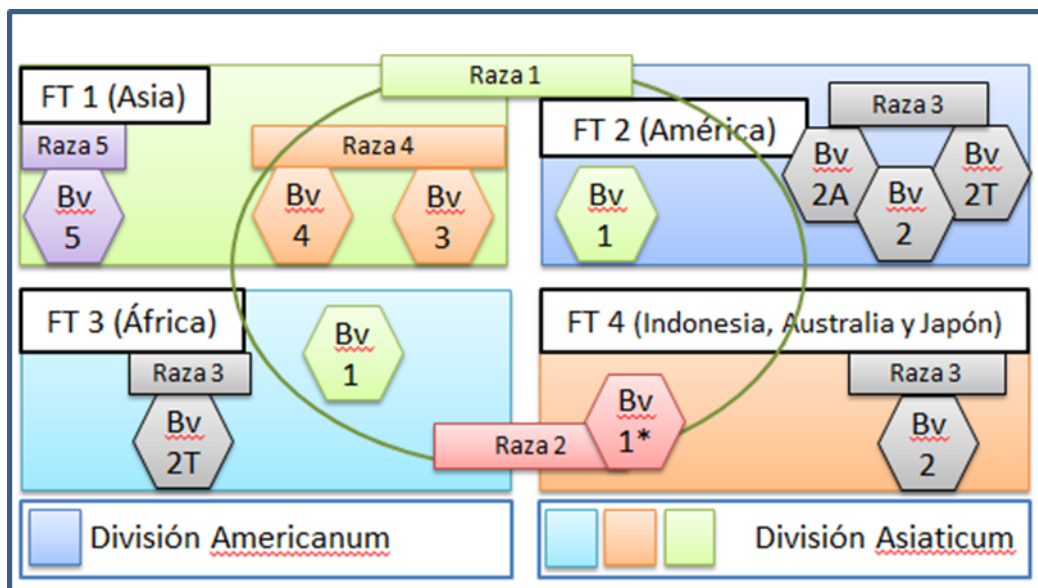


Figura 1.9 Filotipos, razas y biovares de *R. solanacearum*. 1* perteneciente a enfermedad de la Sangre (basado en Álvarez *et al.*, 2010).

Actualmente se propone una clasificación jerárquica de este complejo basada en cuatro niveles: especie, subespecie, grupos infra-subespecíficos y líneas clonales, utilizando los términos filotipo y secuevar para definir los grupos subespecíficos e infraespecíficos respectivamente (Fegan y Prior, 2005a). Los análisis de secuencia de los genes 16S-23S rRNA (ITS), los genes de la poligalacturonasa (*pga*), endoglucanasa (*egl*), *hrp*, *hrpB*, sus genomas y proteomas dividieron a *R. solanacearum* en tres especies (*R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* y *R. syzygii*) (Prior *et al.*, 2016) y en 54 secuevares distribuidos en los filotipos I (Asia), II (América), III (África) y IV (Indonesia, Australia y Japón) (figura 1.10), esto debido a su elevado contenido informacional, su naturaleza conservativa, su distribución en distintos organismos y accesibilidad de las secuencias en bancos de genes (Peeters *et al.*, 2013; Fegan y Prior, 2006; Denny, 2006; Woese, 1987).

1	6	11	16	21	26	31	36	41	46	51	filotipo IIA	<i>Ralstonia solanacearum</i>
2	7	12	17	22	27	32	37	42	47	52	filotipo IIB	
3	8	13	18	23	28	33	38	43	48	53	filotipo I	<i>Ralstonia Pseudosolanacearum</i>
4	9	14	19	24	29	34	39	44	49	54	filotipo III	
5	10	15	20	25	30	35	40	45	50		filotipo IV	<i>Ralstonia syzygii</i>

Figura 1.10 Distribución de secuevares (números) con base en los filotipos y especies (basado en Li *et al.*, 2016; Prior *et al.*, 2016; Safni *et al.*, 2014). El número de secuevar esta sombreado del color del filotipo al que pertenecen. A *R. solanacearum* pertenecen los filotipos IIA y IIB (Americano), a especie *R. pseudosolanacearum* pertenecen los filotipos I (Asiático) y III (Africano) y a *R. syzygii* pertenece el filotipo IV.

A pesar de las distancias genéticas relativamente altas (calculada a partir del promedio de la identidad de nucleótidos) y muchos reordenamientos genómicos, más de 55-65% de los genes del megaplásmido (~2 Mb) y 70-80% de los genes en el cromosoma (~3.8 Mb) son sinténicos (Remenant *et al.*, 2010). Sin embargo, debido a que ambos replicones llevan genes esenciales y relacionados con la patogénesis, los análisis indican que han coevolucionado (Guidot *et al.*, 2007; Coenye y Vandamme, 2003), que comprenden un genoma bipartito. Se ha considerado que los genes implicados en la virulencia parecen evolucionar a un ritmo más rápido que el genoma en su conjunto (Remenant *et al.*, 2010).

1.3.1 Análisis filogenéticos en cepas de *R. solanacearum* causantes de Moko.

Las cepas de *R. solanacearum* causantes del Moko en plátano, comúnmente son denominadas Raza 2, distribuyéndose desde Estados Unidos hasta Brasil (figura 1.11). Uno de los primeros análisis genéticos en cepas de América, fue el realizado por Cook *et*

al. (1989), quienes mediante la utilización de la técnica RFLP encontraron la existencia de tres genotipos, definidos como MLG 24 (Centroamérica), MLG 25 (Colombia y Perú) y MLG 28 (Venezuela). Posteriormente, con el desarrollo de los conceptos de filotipos y secuevares, se determinó que la raza 2 de *R. solanacearum* pertenece al filotipo II y que las cepas MGL 24, 25 y 28 correspondían a los secuevares 3, 4 y 6, respectivamente (Fegan y Prior, 2005b). Actualmente se ha reportado que los secuevares 24, 41, 53 y 25 de *R. solanacearum* poseen capacidad de causar enfermedad en plátano (Albuquerque *et al.*, 2014). Por otra parte, un estudio realizado durante un período de 14 años en la isla de Martinica, con aislamientos de *R. solanacearum* colectados de diferentes hospedantes (anturio, cucurbitáceas, tomate y musáceas, entre otras) mostró que una gran cantidad de cepas correspondieron al secuevar 4, pero no fueron patogénicas a las musáceas evaluadas en el estudio (plátano Cavendish AAA y *Musa* spp. AAB), razón por la cual fueron denominadas cepas II/4NPB (no pathogenic to banana) (Wicker *et al.*, 2007). En Estados Unidos se tienen reportes de la presencia del secuevar 6 (Hawái) y el secuevar 4 (Florida); y de este último los autores obtuvieron un aislamiento de una cepa emergente (Hong *et al.*, 2012). El cuadro 1.2 presenta un resumen de la distribución de secuevares en los países con presencia de Moko. Uno de los principales objetivos en los estudios epidemiológicos de enfermedades causadas por *R. solanacearum*, es la correcta identificación de las cepas causantes de la enfermedad (Stevens y Van, 2010), dado que, una alternativa viable para reducir la propagación de enfermedades consiste en la detección temprana de las plantas infectadas y el manejo (Alvarez *et al.*, 2007).

Cuadro 1.2 Lista de los secuevares reportados en los países con presencia de Moko.

País	Secuevares	Reporte
Panamá	NR	EPPO, 2017
Granada	6	(Cellier <i>et al.</i> , 2015)
Brasil	24, 25, 4, 4 NPB, 41, 53 y 6	(Albuquerque <i>et al.</i> , 2014)
Colombia	4 y 6	(Cardozo, Rodríguez, Cotesy Marín, 2010)

Perú	4	(Prior <i>et al.</i> , 2016)
Filipinas	3	(Prior <i>et al.</i> , 2016)
Costa Rica	3 y 4	(Cellier <i>et al.</i> , 2015)
Venezuela	6	(Hernández, 2010)
Estados Unidos	6 y 4	(Hong, Norman, Reed, Momol y Jones, 2012)
Martiniqués	4 NPB	(Wicker <i>et al.</i> , 2007)
Honduras	3 y 6	(Hong <i>et al.</i> , 2012)
Guatemala	6	(Sanchez-Perez, Mejia, Fegan y Allen, 2008)
Belice	NR	EPPO, 2017
El Salvador	NR	EPPO, 2017
Guadalupe	NR	EPPO, 2017
Jamaica	NR	EPPO, 2017
Nicaragua	NR	EPPO, 2017
San Vicente	NR	EPPO, 2017
Trinidad	NR	EPPO, 2017
Ecuador	NR	EPPO, 2017
Guayana	NR	EPPO, 2017
Surinam	NR	EPPO, 2017
Guayana Francesa	6, 4 y 4NPB	(Cellier <i>et al.</i> , 2015; Deberdt <i>et al.</i> , 2013)
México	6 y 6 NPB	En el presente estudio
EPPO = European and Mediterranean Plant Protection Organization		
NR = No Reportados		
NPB = No patogénico a banana		

A pesar del continuo esfuerzo de agencias gubernamentales y agricultores, la enfermedad de Moko se distribuye actualmente en las principales áreas productoras de plátano de Tabasco y Chiapas, y miles de plantas enfermas son erradicadas cada año (SENASICA, 2015). Los informes sobre la epidemiología de Moko, los síntomas y la distribución local se han publicado en la literatura científica local y también en las comunicaciones oficiales. El objetivo de este estudio fue caracterizar cepas de Moko recolectadas en plantaciones de plátano en México con respecto al filotipo y secuevares. Este es el primer informe genético sobre cepas de Moko en México.

HIPÓTESIS.

Los secuevares 3, 4 y 6 de *R. solanacearum* se encuentran ampliamente distribuidos en el continente americano, por su parte los secuevares 24, 25, 41 y 53 se encuentran hasta ahora reportados en Suramérica. Todos los secuevares anteriormente mencionados, son causantes de enfermedad en plátano. Con lo cual se propone que las cepas de *R. solanacearum* aisladas de plátano en las plantaciones mexicanas pertenecen a alguno de los secuevares.

OBJETIVO GENERAL.

Identificar los filotipos y secuevares de cepas de *Ralstonia solanacearum* presentes en regiones bananeras de México y evaluar su grado de variabilidad en los genes *pga*, *egl* y *hrpB* para conocer su posible relación filogenética.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Aislar cepas de *Ralstonia solanacearum* de plantas con síntomas de Moko y del suelo cercano a éstas.

Determinar los filotipos y secuevares de las cepas de *R. solanacearum*.

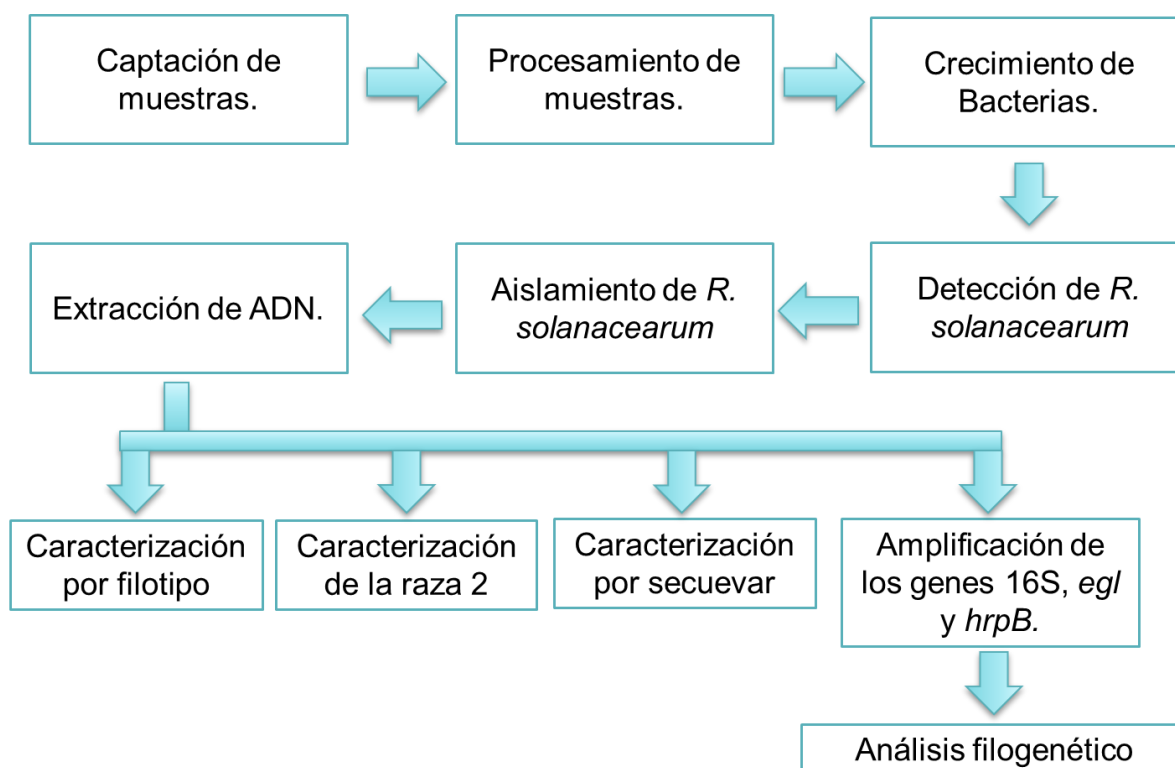
Determinar la filogenia de las cepas de *R. solanacearum* y sus posibles sitios de origen.

JUSTIFICACIÓN.

El Moko en plátano causado por *R. solanacearum* es una de las enfermedades más

limitantes en la producción de este cultivo en el mundo. En México no se tienen reportes sobre qué filotipos y secuevares, causantes de Moko, están presentes. Se ignoran también las relaciones filogenéticas entre las cepas de los distintos Estados. Con base en ello en el presente trabajo se aislaron cepas encontradas en plantaciones de plátano para su clasificación, esto con el propósito de determinar las relaciones filogénicas entre ellas. Esto permite proponer el posible origen y ruta de distribución que siguieron, riesgos que representan los secuevares presentes en al país y el peligro de la llegada de otros secuevares, así como opciones de manejo.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.



CAPÍTULO II**MATERIALES Y MÉTODOS****2.1. Muestreo de tejidos vegetales**

Se realizó un análisis del número de brotes de Moko por Estados y municipios productores de plátano en México, de acuerdo a los reportes oficiales publicados por SENASICA. Las colectas en Tabasco se realizaron con ayuda del personal de la Junta Local de Sanidad Vegetal, para la ubicación, diagnóstico visual preliminar y colecta de material de acuerdo a instrucciones del SENASICA. Los sitios donde se colectaron materiales se ubicaron con GPS. Se colectaron pseudotallos, hojas, frutos y cormos. Las muestras se depositaron en bolsas tipo Ziploc y se etiquetaron con la información del tejido colectado, fecha y sitio de muestreo. Las muestras fueron colocadas en neveras de hielo y enviadas al CICY, donde se procesaron de inmediato. Las muestras de plantas con sospecha de Moko, procedentes de otros municipios de Tabasco, así como de Chiapas y de Nayarit (figura 2.1) fueron enviadas al laboratorio por la SENASICA.

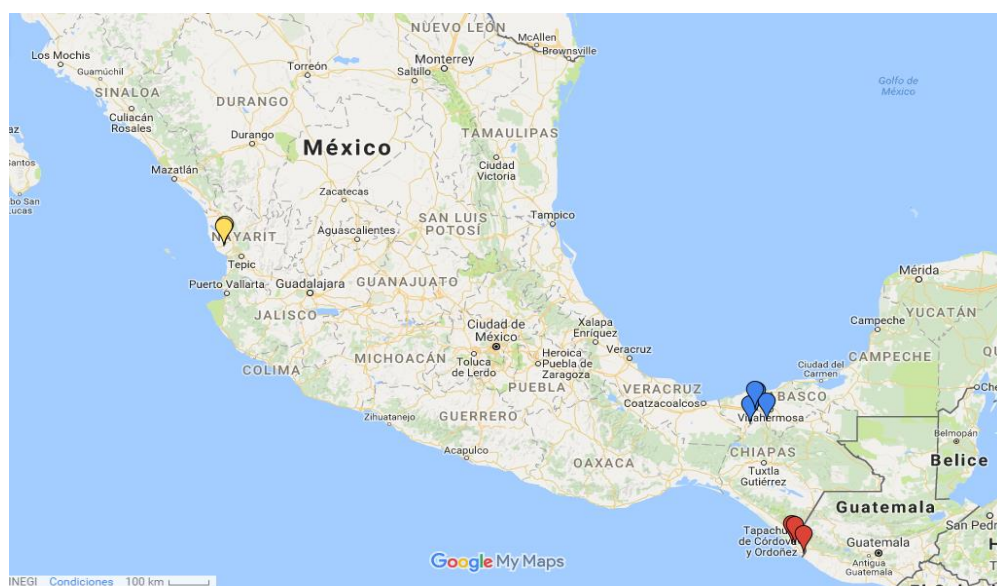


Figura 2.1 Mapa de los puntos de muestreo de plantas de plátano con síntomas de Moko en los Estados de Chiapas, Nayarit y Tabasco. Muestro realizado por personal de la SENASICA y enviadas al CICY para su análisis (GoogleMaps, 2016)

2.2. Muestreo de suelo

Se colectaron también muestras del suelo, alrededor de las plantas de plátano con síntomas de Moko. Para ello se eliminaron 5 cm de la capa superficial del suelo y se tomó una muestra de 10 g, la cual se colocó en bolsas de plástico tipo Ziploc; se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su análisis en el laboratorio. El tipo de suelo se determinó usando las coordenadas de los puntos de muestreo e identificando en la base de datos del INEGI (gaia.inegi.org.mx).

2.3. Medición de pH de suelo

El pH del suelo se midió realizando una dilución de 10 g de suelo en 25 mL de agua estéril, se agitó en vortex por 20 s y posteriormente se removió por agitación cada minuto hasta completar un lapso de 10 min; posteriormente, en la fracción acuosa se determinó el pH mediante un potenciómetro. Para obtener la concentración de iones ácidos fijados en el complejo adsorbente, más la concentración de protones, se realizó una disolución de 10 g de suelo en 25 mL de KCl 0.1 N, se agitó en vortex por 20 segundos y posteriormente se agitó cada 10 minutos, hasta completar 1 hora; se tomó la lectura del pH con el potenciómetro (Carter, 1993). Ambos resultados fueron sumados y divididos entre 2. Los resultados obtenidos se compararon con los criterios de evaluación del cuadro 2.1.

Cuadro 3.1 Criterios de evaluación de un suelo con respecto a su pH (NOM-021-REC-NAT-2000)

CATEGORÍA	Valor de pH
Fuertemente ácido	< 5.0
Moderadamente ácido	5.1 - 6.5
Neutro	6.6 - 7.3
Medianamente alcalino	7.4 - 8.5
Fuertemente alcalino	8.5

El análisis de la presencia de *R. solanacearum*, se realizó adicionando 3 g de suelo en 30 mL de amortiguador TE pH 7.6 estéril y, se mezcló en vortex. Se tomaron 100 µL y se vaciaron en un tubo de ensayo conteniendo 5 mL medio líquido SMSA y LB (Álvarez *et*

al., 2008); los tubos se colocaron a 28°C a 120 rpm por un periodo de 24 h (Cardozo *et al.*, 2010). De cada tubo se tomó una alícuota de 1 mL y se centrifugaron 5 minutos a 20,817 g. Los ADNs fueron extraídos a partir de la pastilla bacteriana obtenida.

2. 4. Detección de *R. solanacearum* por pruebas serológica

Para la detección se utilizó el kit Agdia (N.C. SRP33900) para realizar ELISA (por sus siglas en inglés, “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”), realizando el procedimiento de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La prueba inmunológica se realizó en placa de 96 pozos teniendo dos blancos (A1 y B1), dos negativos (C1 y D1, usando sólo amortiguador), dos positivos (E1 y F1) y dos negativos usando tejido vegetal sano (G1 y H1); los controles positivos y muestras de plantas infectadas con *Ralstonia solanacearum* dan una coloración azul; los controles negativos y muestras de plantas sanas dan un resultado incoloro. Para la evaluación de resultados, se midió la absorbancia espectrofotométrica a 655 nm (Bio-Rad Modelo 680XR). Se examinó visualmente la placa para evitar falsos positivos por posibles contaminaciones o suciedad en la placa. Para considerar la prueba correcta, el promedio de las absorbancias de los controles negativos debían ser menores o iguales a 0.050. Por su parte, el promedio de las absorbancias de los controles positivos debía ser mayor 1. Una muestra se consideraba positiva siempre que fuera mayor o igual a la diferencia entre el promedio de las absorbancias de los controles positivos y negativos (~0.950).

También se utilizaron inmunotiras, las instrucciones del fabricante (N.C. STX33900, Agdia, Inc., Elkhart, IN).

2.5. Extracción de ADN

Una parte del tejido vegetal se colocó en medio SMSA líquido durante 24 h a 180 rpm para su enriquecimiento con *Ralstonia solanacearum* (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008); se usó una alícuota de 1.5 mL de este cultivo y se centrifugó a 5,200 g por 5 min para obtener la pastilla bacteriana. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 mL de amortiguador CTAB, agitando con vortex durante 30 seg. Posteriormente los tubos se congelaron a – 20°C por 10 min y luego se incubaron a 65°C en baño María por 20 min. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugaron a 20,871 x g. Se

recuperó el sobrenadante y se vertió en tubo Eppendorf, adicionando 500 μL de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), agitando por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron 5 minutos a 20,817 g. Se colectó la fase acuosa y se le agregó un volumen de etanol absoluto frío (-20°C). Se mezcló con vortex por 5 segundos y se colocó en incubación a -20°C durante 1 h. Se centrifugó 10 min a 20,817 x g, se decantó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 500 μL de etanol al 70% y se centrifugó a 20,871 x g por 1 min y se realizó el lavado 2 veces. Posteriormente se decantó el etanol y la pastilla de ADN se dejó secar 30 min en campana de flujo laminar; al final se resuspendió en 20 μL de agua destilada ultrapura. La pureza del ADN se determinó por espectrofotometría a 260nm/280nm y la integridad se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa (Cardozo *et al.*, 2010; Sambrook y Russell, 2001).

2.6. Amplificación del 16S

Para comprobar que los ADNs son útiles para reacciones de amplificación por PCR se amplificó el gen ribosomal 16S. Los cebadores usados fueron 16S1-F (5' TGA GAA TGG ATA AGA GGC TC 3') y 16S2-R (5' TGT TGT TCC CCT CCC AAG GG 3'), los cuales amplifican una región de aproximadamente 880 pb.

Para las reacciones de PCR se utilizó 1 μL de la suspensión de ADN (20 ng), 0.1 μM de cada cebador, 1 U de GoTaq® (Promega), 200 μM de cada dNTP, 1X de amortiguador de enzima y 1.5 mM MgCl_2 ; la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μL . Se utilizó un programa de un ciclo de desnaturalización durante 2 min a 96°C , seguido de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 53°C por 45 segundos, 72°C por 1min y un ciclo final de extensión de 72°C por 5 min. Los productos (10 μL de cada reacción PCR) se analizaron por electroforesis en gel de agarosa usando amortiguador TAE 1X suplementado con 3 μL de bromuro de etidio (10mg/mL). La visualización de las bandas se realizó sobre un transiluminador con luz UV.

2.7. Detección de *R. solanacearum* por PCR.

La identificación taxonómica se realizó mediante la ampliación de regiones genómicas con los cebadores descritos en el cuadro 2.2.

Cuadro 2.2 Cebadores utilizados para la detección por PCR de *Ralstonia solanacearum* (Lee y Wang, 2000; Opina *et al.*, 1997; Gillings *et al.*, 1993; Seal *et al.*, 1992).

Nombre	Secuencia	Tamaño de banda
759/760	759: 5'-GTC GCC GTC AAC TCA CTT TCC- 3'	281 pb
	760: 5'- GTC GCC GTC AGC AAT GCG GAA TCG- 3'	
PS96-H/ PS96-I	PS96-H: 5'- TCA CCG AAG CCG AAT CCG CGT CCA TCA C- 3'	148 pb
	PS96-I: 5'- AAG GTG TCG TCC AGC TCG AAC CCG CC- 3'	
pehA	pehA#3-F 5'- CAG CAG AAC CCG CGC CTG ATC CAG- 3'	532pb
	pehA#6-R 5'- ATC GGA CTT GAT GCG CAG GCC GTT- 3'	

La mezcla de reacción se preparó como se describió previamente. Los programas en el termociclador tuvieron un ciclo de desnaturalización por 2 min a 96°C, seguido de 40 ciclos de 94°C por 45 segundos, 70° C (pehA) por 45 segundos ó 64°C (759/760 ó PS96-H/ PS96-I) por 20 segundos, 72°C por 1min (en todos los casos), un ciclo final de extensión de 72°C por 5 min. El análisis electroforético fue como se describió anteriormente.

2.8. Aislamiento de *R. solanacearum* a partir de tejido vegetal infectado

De las muestras con resultados inmunológicos positivos en los ensayos de ELISA e inmuntiras, se procedió a realizó el aislamiento de bacterias a partir de pequeñas porciones del tejido vegetal (cormo, pseudotallo, hoja o fruto). Los tejidos se cortaron en pequeños trozos con una cuchilla estéril y posteriormente se desinfectaron mediante dos lavados con: agua estéril, hipoclorito de sodio al 0.6% durante 1 min, agua estéril, etanol por 30 s, agua estéril y finalmente un lavado con amortiguador (TE) por 1 h, con agitación suave. Se tomó una asada de la preparación del amortiguador TE conteniendo la muestra vegetal y se sembró por el método de estría cruzada en medio semiselectivo SMSA

modificado (peptona 10 g/L, glicerol 5 mL/L, casaminoácidos 1g/L, agar 18 g/L, adicionando los antibióticos polimixin β sulfato 100mg/L (600.000U), Bacitracin 25 mg/L, penicilina 0.5 mg/L (82,5U), cloranfenicol 5 mg/L, 2,3,5-trifenil-2h-tetrazolio cloruro 50 mg/L y cristal violeta 5 mg/L) y se incubó a 28°C durante 72 h. Los antibióticos, el cloruro de 2,3,5-trifenil-2h-tetrazolio y el cristal violeta se esterilizaron mediante filtración utilizando filtros Millipore con tamaño de poro de 0.22 μ m. Una vez filtrados, bajo condiciones asépticas, estos componentes se adicionaron al medio SMSA el cual se encontraba a menos de 50°C (Cardozo *et al.*, 2010; Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008; Kelman, 1954). Posteriormente las colonias resultantes fueron sembradas por estría cruzada sobre medio TTC y por picadura con palillo sobre medio B de King, en cajas de Petri divididas en 50 cuadrantes (figura 2.3), e incubando en ambos casos a 28°C por 48 h. El medio B de King permite distinguir a las bacterias *Pseudomonas* spp. (King *et al.*, 1954), las cuales pueden crecer en los medios de aislamiento de *R. solanacearum*. Las bacterias *Pseudomonas* spp., presentan fluorescencia sobre el medio de King cuando se exponen a luz UV a 360 nm. Por su parte el medio TTC permite distinguir morfológicamente entre cepas virulentas y avirulentas de *R. solanacearum*. Las cepas virulentas presentan morfología circular ameboidea, de elevación convexa y borde ondulado a lobulado debido a la fluidez de la colonia, color blanco con centro rosado, mientras que las cepas avirulentas tienen forma circular no fluida, elevación convexa, borde redondo y coloración rojo vino.

2.9. Pruebas bioquímicas

A las colonias con morfología de *R. solanacearum*, es decir colonias blancas de consistencia mucosa y bordes ondulados, se les realizó el ensayo de catalasa con peróxido de hidrógeno (H_2O_2), prueba de hidróxido de potasio (KOH) al 3% para observar la formación o no de fluido mucilaginoso, debido a la degradación de la pared celular en Gram negativas. Posteriormente a las colonias formadoras de hilo bacteriano, se les realizó tinción de Gram, con el fin de distinguir sus características microscópicas, tales como forma, tamaño y confirmar ausencia de contaminación por otras bacterias. Se realizó la prueba oxidasa, para lo cual las cepas fueron sembradas en medio NGA durante 24 h y se tomó una porción con un hisopo estéril, empapado con N,N-Dimetil-p-fenilendiamina para observar el cambio de color de ámbar a azul cuando la prueba es

positiva para *R. solanacearum* (SENASICA, 2012b).

2.10. Identificación de *R. solanacearum*

Se extrajeron los ADN genómicos de las bacterias que en todas las pruebas previas dieron positivo para *R. solanacearum*. Se realizó el diagnóstico por PCR empleando los parámetros descritos en 2.5. y 2.7 y como templado las bacterias en “pool” por cada hilera (figura 2.2). En la figura 2.2 se pone como ejemplo la coordenada 6C cuando las hileras vertical 6 y horizontal C dieron positivo. Mediante la comparación de resultados de hileras verticales y horizontales se pudo determinar las coordenadas donde se encontraban aislados de *R. solanacearum*.

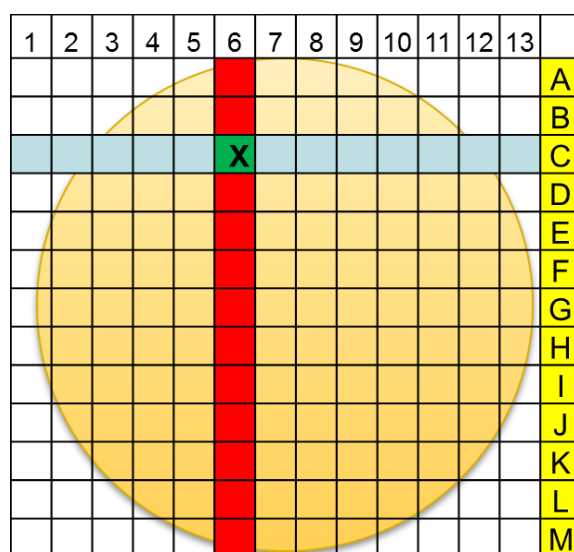


Figura 2.2 Método de detección por coordenadas, mediante el análisis de PCR de “pools” de bacterias de las hileras verticales y horizontales.

2.11. Resguardo de las cepas

Las colonias positivas se sembraron en 5 mL de medio LB con 1% de NaCl, y se incubaron a 28°C durante 24 h. Posteriormente se tomaron alícuotas de 1.5 mL del cultivo y se depositaron en tubos Eppendorf de 2 mL. Se centrifugaron a 5,200 g por 5 min y se descartó el medio. Luego se les añadió medio LB adicionado con 15% v/v de dimetil sulfóxido (Me₂SO) y se resuspendió la pastilla con agitación en vortex por 30 s; se mantuvo a 28°C en oscuridad durante 30 min para que se equilibre el crioprotectante. Los

tubos se sellaron con parafilm y se les aplicó la siguiente serie de tratamientos: 1 h a 4°C, 3 h a -10°C, 3 h a -20°C, 3 h a -40°C, posteriormente se colocaron en un ultracongelador a -80°C, cada cepa fue guardada por duplicado. Para su descongelación se siguió el siguiente protocolo: se pusieron los tubos a -40°C por 4 h, -20°C por 4 h, -10°C por 4 h, 4°C por 4 h y 30 min a temperatura ambiente para atemperar; después se sembraron para generar el cultivo de trabajo (Schaad *et al.*, 2001).

2.13. Pruebas de patogenicidad

Se utilizaron plantas de plátano de 3 meses de edad del cultivar enano gigante (AAA), obtenidas a partir de cultivos *in vitro*. Para la prueba, las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento Conviron (Binder) a 60% de humedad, con un ciclo de luz/oscuridad 12:12 h y riego con 500 mL de agua cada tercer día. La patogenicidad de cada uno de los aislamientos fue evaluada mediante su inoculación con jeringa de 3mL (1×10^8 células/mL) en la base del pseudotallo. Las plantas inoculadas fueron examinadas semanalmente. La patogenicidad se clasificó cuatro semanas después de la inoculación en la siguiente escala: escala: 1, asintomática; 2, distorsión o dorado de las hojas inoculadas; 3, una o dos hojas marchitas; 4, marchitez de la mitad del número total de hojas; Y 5, marchitez completo (Zulperi *et al.*, 2016). La cepa se consideró no patogénica si a los 45 días postinoculación la planta no mostraba síntomas. Las pruebas se realizaron por triplicado y como control negativo las plantas fueron inoculadas con agua estéril (Hurtado, 2012).

2.12. Ensayos de hipersensibilidad en tabaco

Las cepas de *R. solanacearum* fueron cultivadas en cajas con medio KB a 28°C por 48 h. A partir de estos cultivos, se preparó una suspensión bacteriana en un tubo de ensayo con agua destilada estéril, en condiciones asépticas, ajustando la concentración a 1×10^8 UFC/mL (He *et al.*, 1983).

Se cultivaron plantas de tabaco (*N. tabacum*) en una cámara de crecimiento Conviron (Binder), en condiciones de 28°C de temperatura, 60% de humedad, ciclos de 12:12 h luz/oscuridad y riego cada tercer día. Con jeringas insulínicas sin agujas se infiltró por presión en el envés de las hojas de tabaco 200 μ L de la suspensión bacteriana (Lozano y

Sequeira, 1969). Se inocularon plantas independientes por cada cepa aislada. Como control negativo se infiltró agua estéril. Las hojas inoculadas fueron observadas periódicamente a las 24, 48 y 72 h. La prueba se consideró positiva si la zona infiltrada presentaba pérdida de turgencia o necrosis, en un período máximo de 72 horas postinoculación (SENASICA, 2012b).

2.14. Caracterización por filotipo

Esta prueba se aplicó a las cepas confirmadas de *R. solanacearum* y ya puras. El filotipo se determinó por PCR empleando los cebadores diseñados por Fegan y Prior (2005a) de la serie Nmult (Cuadro 2.3) y usando como templates los ADN genómicos.

Cuadro 2.3 Lista de cebadores utilizados para la identificación del filotipo de las cepas mexicanas causantes del Moko en plátano.

Primer	Secuencia (5' a 3')	Especificidad	Tamaño de los fragmentos generados
Nmult21:1 F	CGTTGATGAGGCGCGCAATTT	Filotipo 1	144 pb
Nmult21:2 F	AAGTTATGGACGGTGGAAAGTC	Filotipo 2	372 pb
Nmult22:A F	ATTCGAGAGCAATCGAAAGATT	Filotipo 3	91 pb
Nmult23:In F	ATTGCCAAGACGAGAGAAGTA	Filotipo 4	213 pb
Nmult22:R R	TCGCTTGACCCTATAACGAGTA	todos los filotipos	No aplica
Fuente: Fegan y Prior 2005			

Se realizó PCR en multiplex, para lo cual se utilizó 1 µl (20 ng/ µl) del ADN de cada cepa, 2 U de Taq ADN polimerasa recombinante, 200 µM de cada dNTP, 1X de amortiguador de enzima, 1.5 mM MgCl₂ y 6 pmoles de cada cebador; la reacción total se llevó en 25µl. Las condiciones de PCR fueron similares a las ya descritas, usando temperatura de alineamiento de 59° C. En cada caso se analizó 15 µL del producto de la reacción mediante electroforesis en gel de agarosa, en amortiguador TAE adicionado con 3 µL de bromuro de etidio (10mg/mL). La visualización de las bandas de ADN se realizó sobre un transiluminador con luz UV.

2.15. Caracterización de la raza 2

Para la identificación de la raza 2 se utilizó el juego de cebadores ISRso19 (ISRso19-F: 5' TGG GAG AGG ATG GCG GCT TT 3'; ISRso19-R: 5' TGA CCC GCC TTT CGG TGT TT 3') (Lee y Chin, 2003). Para las amplificaciones por PCR se utilizó 1 µl (20 ng/µl) del ADN de cada cepa, 0.5 µM de cada cebador, 1 U de Taq ADN polimerasa recombinante, 200 µM de cada dNTP, 1X de amortiguador de enzima y 2 mM MgCl₂, la reacción total se llevó a 25 µl. La reacción se inició con un ciclo de desnaturalización por 1 min a 94°C, seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55° C por 30 segundos, 72°C por 1.5 min y un ciclo final de extensión a 72°C por 5 min (Lee y Chin, 2003).

2.16. Caracterización por secuevar

Para la caracterización de los secuevars pertenecientes a la raza 2 se utilizaron los cebadores de la serie Mus, los cuales se presentan en el cuadro 2.4.

Cuadro 2.4 Lista de cebadores utilizados para la identificación del secuevar en raza 2.

Primer	Secuencia (5' a 3')	Especificidad	Tamaño
Mus20-F	CGGGTCGCTGAGACGAATATC	Secuevar 4	351 pb
Mus20-R	GCCTTGTCAGAAATCCGAATG		
Mus35-F	GCAGTAAAGAAACCCGGTGTT	Secuevar 3	400 pb
Mus35-R	TCTGGCGAAAGACGGGATGG		
Mus06-F	GCTGGCATTGCTCCCGCTCAC	Secuevar 4 SFR	167 pb
Mus06-R	TCGCTTCCGCCAAGACGC		
S128-F	CGTTCTCCTTGTCAGCGATGG	Secuevar 6	221 pb
S128-R	CCCGTGTGACCCCGATAGC		

Fuente: Fegan y Prior 2005b

Para la amplificación con los cebadores Mus se utilizaron las mismas condiciones usadas con los cebadores de la serie Nmult (descritas en el apartado 2.14).

2.17. Análisis filogenético basado en los genes *egl*, *hrpB* y *pga*

Se amplificaron fragmentos de los genes *egl*, *hrpB* y *pga*. La región del gen *egl* se amplificó con los cebadores Endo-F/Endo-R, el gen *pga* con los cebadores pehA#3-F/pehA#6-R, el gen *hrpB* con los cebadores RShrpBf-F/RShrpBr-R y en este estudio se diseñaron los cebadores HrpBnest para anidar la amplificación de *hrpB*. Las secuencias de los cebadores y el tamaño esperado de los productos de PCR se muestran en el cuadro 2.5.

Cuadro 2.5 Lista de cebadores utilizados para realizar el análisis filogenético de las cepas de *R. solanacearum*.

Nombre	Secuencia	Referencia	tamaño de producto	Tm
pehA#3-F	5' CAGCAGAACCCGCGCCTGATCCAG 3'	Gillings <i>et al.</i> , 1993	532 pb	70°C
pehA#6-R	5' ATCGGACTTGATGCGCAGGCCGTT 3'			
Endo-F	5' ATGCATGCCGCTGGTCGCCGC 3'	Fegan y Prior, 2006	850 pb	70°C
Endo-R	5' GCGTTGCCCGGCACGAACACC 3'			
RShrpBf-F	5' TGCCATGCTGGGAAACATCT 3'	Poussier <i>et al.</i> , 2000	1417 pb	64°C
RShrpBf-R	5' GGGGGCTTCGTTGAACTGC 3'			
HrpBnest-F	5' AATACGCAAATGCGGTTTTTC 3'	Diseñados en este estudio	1100 pb	64°C
HrpBnest-R	5' GCTCGATCTTCTCGATGATGG 3'			

Para las amplificaciones por PCR se utilizó 1 µl del ADN, 0.25 µM de los cebadores respectivos (Endo, RShrpB y pehA), 1 U de Platinum® Taq ADN Polymerase High Fidelity (Invitrogen), 200 µM de cada dNTP, 1X de amortiguador de enzima y 1.5 mM MgCl₂; la reacción total se llevó a cabo en 25µL. La reacción de PCR se realizó como se ha descrito previamente pero usando para cada pareja de cebadores las temperaturas de alineamiento presentadas en el cuadro 2.5 (1 min). Para el marcador *hrpB* se hizo una PCR anidada con los cebadores HrpBnest, con las mismas condiciones antes descritas. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa (0.65 %) con 0.5X TAE estéril, conteniendo bromuro de etidio (1 µg/mL) para la visualización de los amplicones. Los amplicones fueron purificados del gel, ajustados a 25ng/µl y enviados para secuenciación a la empresa Macrogen (Seúl, Corea) y a LANBAMA (San Luis Potosí, México).

2.18 Análisis de secuencias

Las secuencias fueron editadas mediante el programa UGENE (Okonechnikov *et al.*, 2012). Las secuencias se depositaron en el GenBank del NCBI (Sayers *et al.*, 2009). Paralelamente, se buscaron accesiones del GenBank correspondientes a fragmentos de los genes *egl*, *pga* y *hrpB* de cepas de *R. solanacearum* para cada accesión se tomaron los datos del filotipo, secuevar, país de colecta y el hospedero de donde fueron aisladas. El análisis filogenético se llevó a cabo con el programa Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013), con el cual se efectuaron los alineamientos de las secuencias empleando el algoritmo CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Los alineamientos se usaron para construir los árboles filogenéticos, usando el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) y un número de repeticiones (Boostrap) de 5000 (Felsenstein, 1985). Se revisó manualmente la topología de los árboles obtenidos, para verificar que coincidiera la distribución de las accesiones reportadas en otros trabajos.

CAPÍTULO III

RESULTADOS.

3.1. Análisis del número de brotes de Moko

Tabasco es el estado más afectado por la presencia de Moko, presentando el mayor número de brotes de esta enfermedad desde el 2009, año en que iniciaron los registros documentados de la misma. Los brotes de Moko han tenido un comportamiento errático, siendo el mes de junio del 2010 cuando se presentó el mayor registro de número de brotes (1175 casos) y julio 2011 se registró el menor número de brotes, sólo 7 (figura 3.1).

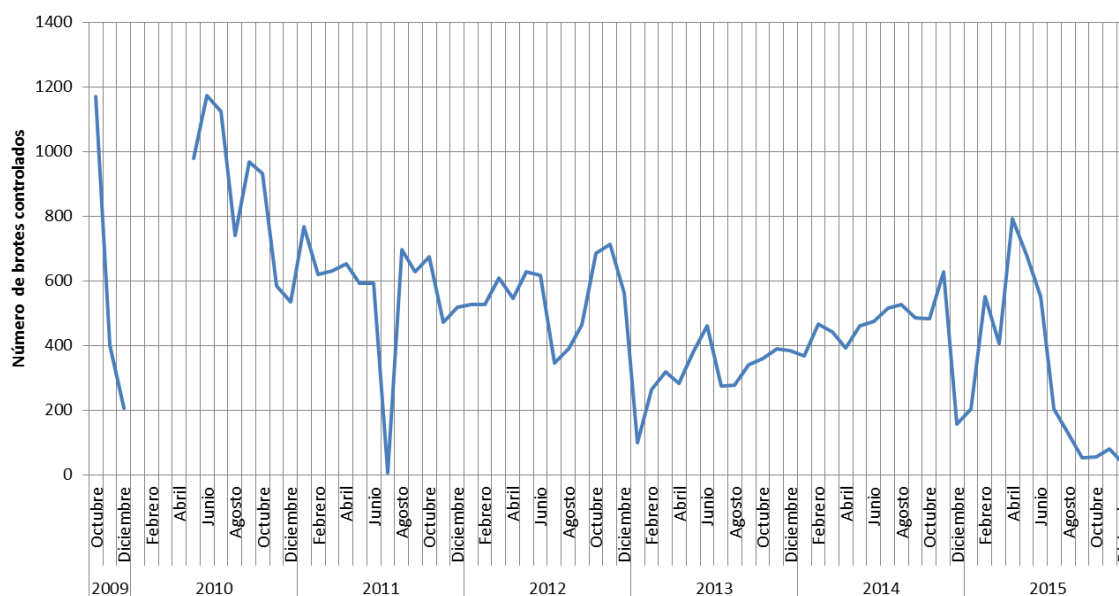


Figura 3.1 Grafica de número de brotes controlados en el estado de Tabasco registrados en el período 2009-2015.

Tabasco presenta el mayor número de municipios afectados por Moko. La figura 3.2 presenta el número de brotes por municipio para esta entidad para el período de Mayo 2013 a diciembre 2014, de acuerdo a los reportes oficiales. El municipio de Teapa es donde se concentra el mayor número de brotes de Moko (figura 3.2).

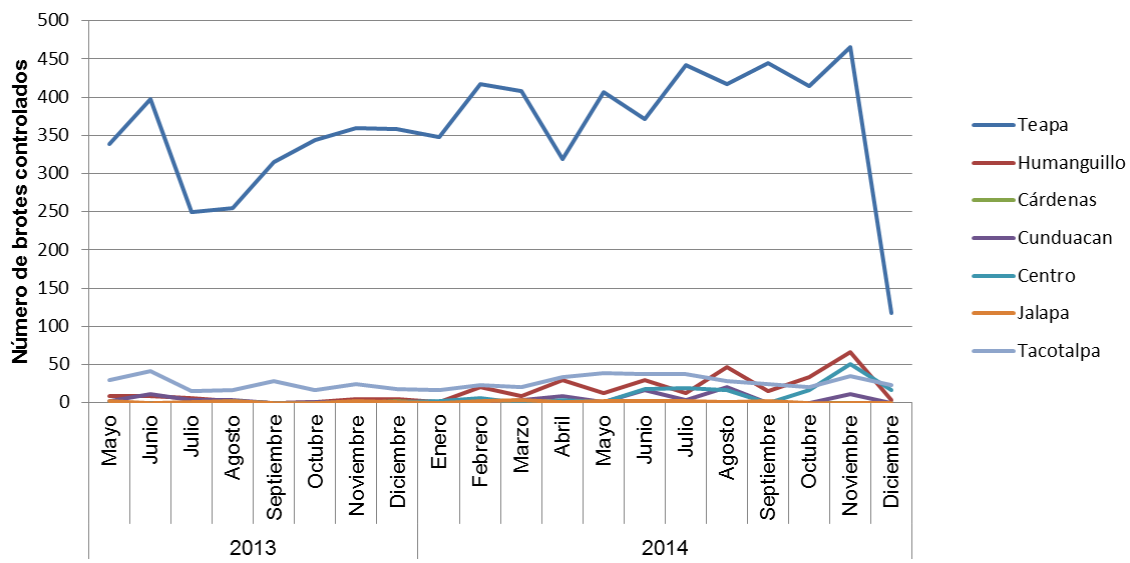


Figura 3.2 Grafica de número de brotes registrados y controlados en municipios del estado de Tabasco durante mayo 2013 a diciembre 2014.

Chiapas es el segundo estado en incidencia de Moko. Al igual que lo observado en Tabasco, la incidencia muestra un patrón errático. El mayor número de brotes se reportó en febrero 2014 con 164, y el menor número en enero y febrero de 2015, meses en que no hubo brotes registrados.

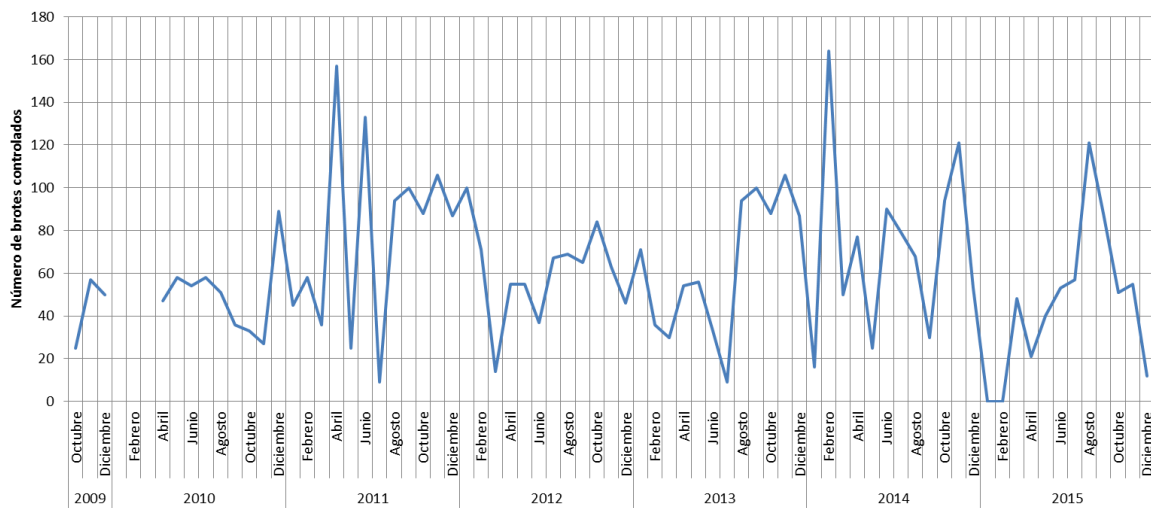


Figura 3.3 Grafica de número de brotes registrados y controlados en el estado de Chiapas en el período 2009-2015.

Los brotes de Moko por municipios en Chiapas se registraron de Mayo 2013 a Diciembre

2014. Durante este período el municipio de Pichucalco presentó el mayor número de brotes (718), seguido de los municipios de Suchiate (419), Tapachula (32) y Mazatán (20) (figura 3.4).

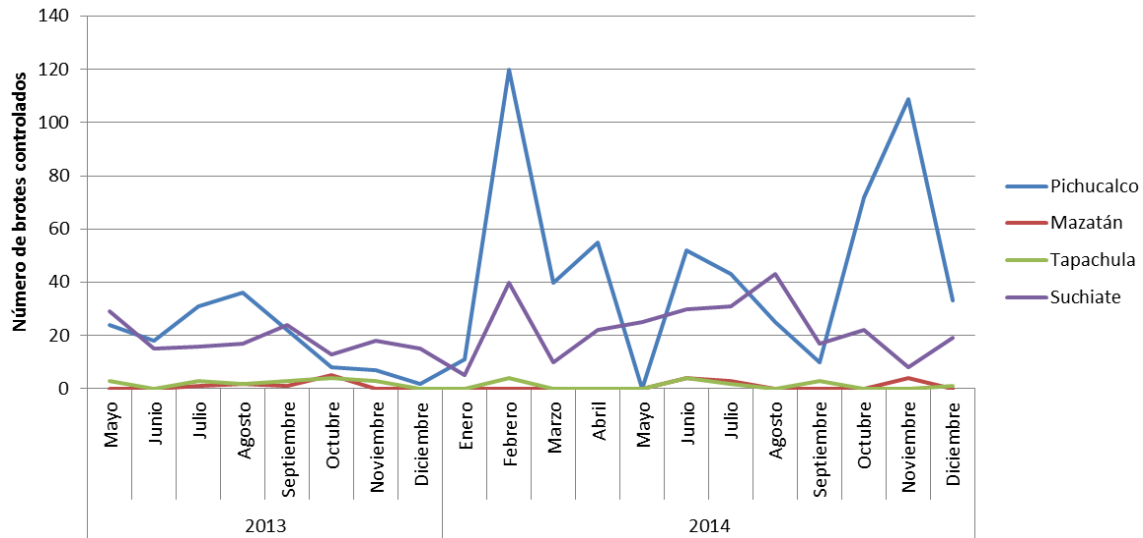


Figura 3.4 Grafica de número de brotes controlados por municipio en el período mayo 2013 a diciembre 2014 para el estado de Chiapas.

El estado de Nayarit tuvo su primer reporte de Moko en febrero de 2012, en el municipio de Santiago Ixcuintla. En marzo del mismo año, se registraron nueve brotes más en el mismo municipio. En el presente trabajo se incluyeron colectas en ese municipio, así como de los municipios de Compostela y San Blas, que son municipios bananeros que rodean a Santiago Ixcuintla. Cabe resaltar que después del control de la enfermedad, entre abril del 2012 hasta el momento no se han presentado nuevos brotes en esta entidad (figura 3.5)

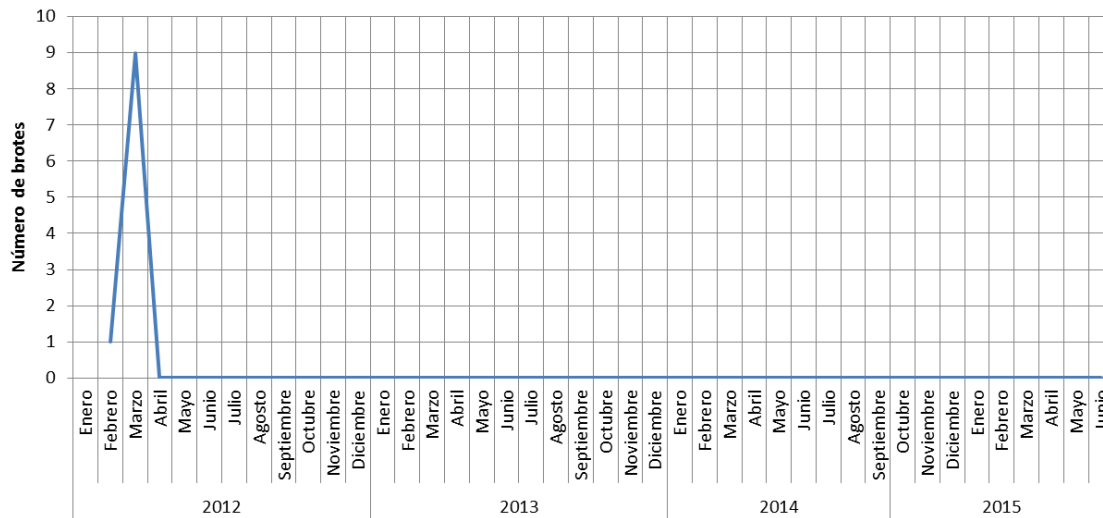


Figura 3.5 Grafica de número de brotes controlados período 2012-2015 en el estado de Nayarit.

3.2. Muestreo de suelo y medición de pH de suelo de sitios de colecta de material infectado con Moko

Se analizaron cuatro muestras de suelo del estado de Nayarit, seis de Chiapas y 53 muestras de Tabasco. Los suelos colectados se agruparon principalmente en tres categorías: cambisol, phaeozem y gleysol (cuadro 3.1); esta información se tomó de la base de datos de INEGI (<http://gaia.inegi.org.mx/>) con base en las coordenadas geográficas de los sitios de muestreo. La mayoría de los suelos muestreados se categorizaron en el tipo de suelo gleysol, debido a la preponderancia de muestras del estado de Tabasco, en el que este tipo de suelo es común. Se detectó la presencia de *Ralstonia solanacearum* en 24 de las 63 de muestras de suelo (39 negativas). Sólo en las muestras de suelo de Tabasco se detectó el patógeno. La mayoría de las muestras presentaron pH moderadamente ácido, 15 presentaron pH neutro, 8 pH moderadamente alcalino y 3 pH fuertemente ácido; no se detectaron suelos fuertemente alcalinos. La bacteria se detectaron en todos los pH analizados, pero su presencia fue mayor en suelos moderadamente ácidos y neutros.

Cuadro 3.1 Resultado del análisis de los suelos colectados en el presente trabajo.

Muestra	Estado	Tipo de suelo	Presencia de Rs	pH en Agua	pH KCl 0.1N	pH suelo	Categoría
MN17	Nayarit	cam	-	6.23	5.46	5.845	Mac
MN18	Nayarit	cam	-	7.02	6.23	6.625	Neu
MN19	Nayarit	pha	-	5.87	5.03	5.45	Mac
MN20	Nayarit	pha	-	6.83	5.54	6.185	Mac
MC09	Chiapas	pha	-	7.38	5.7	6.54	Mac
MC10	Chiapas	pha	-	7.01	6.65	6.83	Neu
MC19	Chiapas	pha	-	7.68	7.19	7.435	Mal
MC20	Chiapas	pha	-	8.93	7.35	8.14	Mal
MC29	Chiapas	pha	-	7.94	7.06	7.5	Mal
MC30	Chiapas	pha	-	7.01	4.5	5.755	Mac
MT03	Tabasco	gle	-	6.26	4.89	5.575	Mac
MT04	Tabasco	gle	+	5.36	3.87	4.615	Fac
MT05	Tabasco	gle	-	8.1	6.89	7.495	Mal
MT06	Tabasco	gle	+	6.2	4.9	5.55	Mac
MT07	Tabasco	gle	+	9.05	6.3	7.675	Mal
MT08	Tabasco	gle	+	8.07	7.26	7.665	Mal
MT09	Tabasco	gle	+	5.6	6.74	6.17	Mac
MT10	Tabasco	gle	-	4.32	3.85	4.085	Fac
MT11	Tabasco	gle	-	6.2	4.9	5.55	Mac
MT12	Tabasco	gle	-	9.05	6.3	7.675	Mal
MT13	Tabasco	gle	+	7.02	6.23	6.625	Neu
MT14	Tabasco	gle	-	5.87	5.03	5.45	Mac
MT15	Tabasco	gle	+	6.83	5.54	6.185	Mac
MT16	Tabasco	gle	-	4.95	4.64	6.54	Neu
MT17	Tabasco	gle	+	7.01	5.65	6.83	Neu
MT18	Tabasco	gle	-	7.625	5.6	6.6125	Neu
MT19	Tabasco	gle	-	8.035	6.265	7.15	Neu
MT20	Tabasco	gle	-	6.445	5.63	6.0375	Mac
MT21	Tabasco	gle	+	6.35	5.285	5.8175	Mac
MT22	Tabasco	gle	-	8.43	7.12	7.775	Mal
MT23	Tabasco	gle	-	5.98	5.145	5.5625	Mac
MT24	Tabasco	gle	+	7.318	5.625	6.4713	Neu
MT25	Tabasco	gle	-	7.83	5.9325	6.8813	Neu
MT26	Tabasco	gle	+	7.24	5.9475	6.5938	Mac

MT27	Tabasco	gle	+	6.398	5.4575	5.9275	Mac
MT28	Tabasco	gle	-	7.39	6.2025	6.7963	Neu
MT29	Tabasco	gle	-	7.205	6.1325	6.6688	Neu
MT30	Tabasco	gle	-	6.649	5.385	6.0169	Mac
MT31	Tabasco	gle	+	7.574	5.7788	6.6763	Neu
MT32	Tabasco	gle	+	7.535	5.94	6.7375	Neu
MT33	Tabasco	gle	-	6.819	5.7025	6.2606	Mac
MT34	Tabasco	gle	+	5.32	4.67	4.995	Fac
MT35	Tabasco	gle	-	7.298	6.1675	6.7325	Neu
MT36	Tabasco	gle	-	6.927	5.7588	6.3428	Mac
MT37	Tabasco	gle	-	7.111	5.5819	6.3466	Mac
MT38	Tabasco	gle	-	7.554	5.8594	6.7069	Neu
MT39	Tabasco	gle	+	7.177	5.8213	6.4991	Mac
MT40	Tabasco	gle	-	6.069	5.1863	5.6278	Mac
MT41	Tabasco	gle	-	6.309	5.4188	5.8638	Mac
MT42	Tabasco	gle	+	7.112	5.9631	6.5377	Mac
MT43	Tabasco	gle	-	7.019	5.6703	6.3447	Mac
MT44	Tabasco	gle	+	7.333	5.7206	6.5267	Mac
MT45	Tabasco	gle	+	7.366	5.8403	6.603	Neu
MT46	Tabasco	gle	+	6.623	5.5038	6.0634	Mac
MT47	Tabasco	gle	-	6.189	5.3025	5.7458	Mac
MT48	Tabasco	gle	+	6.71	5.6909	6.2007	Mac
MT49	Tabasco	gle	-	7.066	5.8167	6.4412	Mac
MT50	Tabasco	gle	+	7.176	5.6955	6.4357	Mac
MT51	Tabasco	gle	+	7.349	5.7805	6.5648	Mac
MT52	Tabasco	gle	-	6.994	5.672	6.3332	Mac
MT53	Tabasco	gle	+	6.406	5.4031	5.9046	Mac
MT54	Tabasco	gle	-	6.45	5.4967	5.9732	Mac
MT55	Tabasco	gle	-	6.888	5.7538	6.3209	Mac
Tipo de suelo: cam (cambisol), pha (phaeozem) y gle (gleysol)							
Rs: pos (positivo) y neg (negativo)							
Categoría: Fac (Fuertemente ácido), Mac (Moderadamente ácido), Neu (Neutro), Mal (moderadamente alcalino) y Fal (Fuertemente alcalino)							

3.3. Detección de *R. solanacearum*

Las pruebas de detección con anticuerpos se realizaron sólo en las muestras de tejido vegetal de plátano con síntomas de Moko del estado de Tabasco. Esta prueba dio muchos positivos que no pudieron confirmarse con el diagnóstico por PCR, así como tampoco fue posible aislar el patógeno de esas muestras, lo que lleva a concluir que la prueba de ELISA produce muchos falsos positivos (figura 3.6).

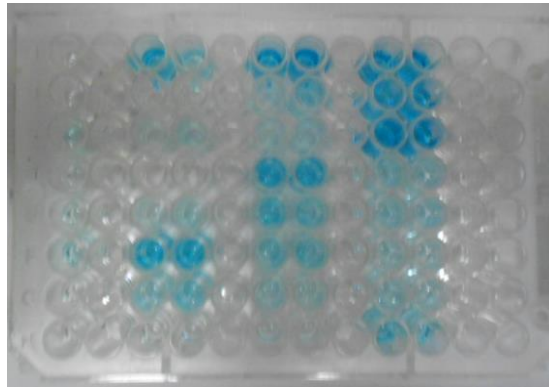


Figura 3.6 Diagnostico de *R. solanacearum* por inmunología en placa de ELISA de 96 pozos. Los pozos azules corresponden a las muestras positivas. Cabe mencionar que al realizar PCR varias de las muestras que dieron azul en ELISA dieron resultados negativos con la PCR.

Las muestras colectadas en Teapa también fueron evaluadas para presencia de *Rs* mediante inmunitiras (N.C. STX 33900, Agdia) (figura 3.7), cuyos resultados fueron congruentes con el diagnóstico por PCR. Por lo tanto en este ensayo no se obtuvieron falsos positivos o falsos negativos.

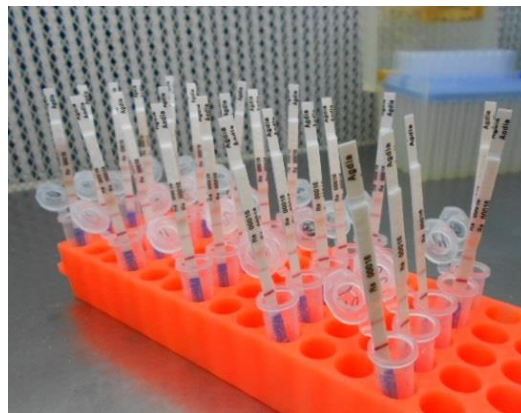


Figura 3.7 Uso de inmunitiras en la detección de *R. solanacearum* en muestras vegetales.

Se extrajeron los ADN de todas las muestras vegetales positivas. La pureza y calidad se determinaron de acuerdo a lo indicado en el apartado 2.5. En todos los casos los valores de absorbancia A_{260}/A_{280} estuvieron cercanos a 2 y los análisis en gel de agarosa

mostraron que los ADNs estuvieron íntegros (figura 3.8).

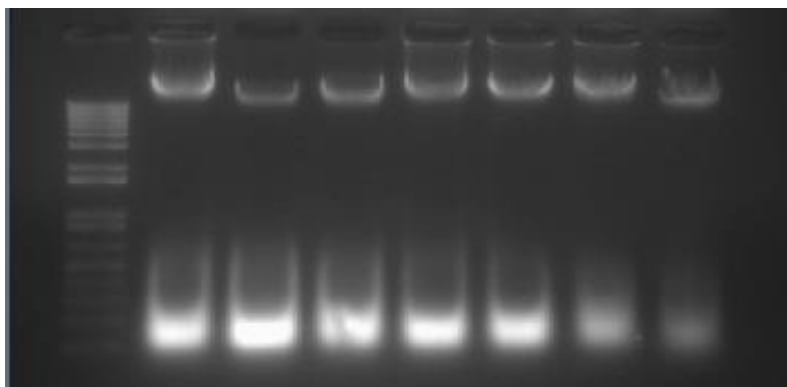


Figura 3.8 Gel de agarosa para determinar integridad del ADN.

Posteriormente se procedió a la amplificación del gen ribosomal 16S (~900 pb), con lo cual se confirmó que la mayoría de los ADNs obtenidos eran útiles para usarse en los diagnósticos por PCR (figura 3.9). Una vez que se logró que todas las muestras de ADN amplificaran con los cebadores para 16S, se realizó la detección por PCR de *R. solanacearum*, como se describe en la sección 2.7. En las muestras recibidas del Estado de Nayarit no se detectó la bacteria.

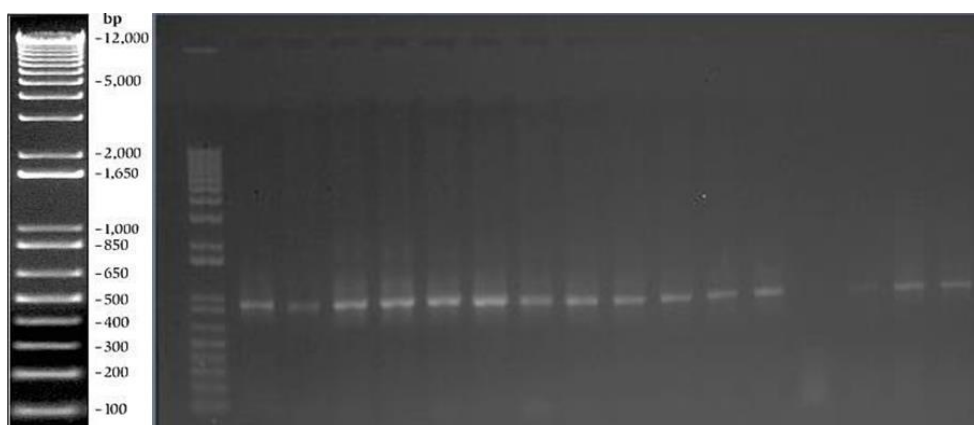


Figura 3.9 Electroforesis en gel de agarosa del gen ribosomal 16S a partir de ADNs obtenidos de las muestras vegetales colectadas como sospechosas para la presencia de *R. solanacearum*.

Trece de las 31 muestras de Chiapas fueron positivas. Tabasco fue el estado con mayor número de positivas, 50 de las 53 muestras analizadas, fueron positivas para *R. solanacearum* (cuadro 3.2).

Cuadro 3.2 Información de las muestras colectadas en el presente estudio y analizadas con presencia de Moko.

Lugar de colecta	Fuente	Presencia de <i>R. solanacearum</i>	Parte Vegetal
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Plátano Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Suelo	Negativo	Suelo
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Suelo	Negativo	Suelo
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Suelo	Negativo	Suelo
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Suelo	Negativo	Suelo
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
Santiago Ixcuintla, Nayarit	Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
San Blas, Nayarit	Manzano	Negativo	Cormo, Pseudotallo, Hoja
Mazatán, Chiapas	Plátano Enano Gigante	Negativo	Tallo
Mazatán, Chiapas	Enano Gigante	Positivo	Cormo

CAPÍTULO III

Mazatán, Chiapas	Enano Gigante	Positivo	Cormo
Mazatán, Chiapas	Enano Gigante	Positivo	Cormo
Mazatán, Chiapas	Enano Gigante	Negativo	Cormo
Mazatán, Chiapas	Enano Gigante	Negativo	Cormo
Mazatán, Chiapas	Enano Gigante	Negativo	Tallo
Mazatán, Chiapas	Enano Gigante	Negativo	Nervadura Central
Mazatán, Chiapas	Suelo	Negativo	Suelo
Mazatán, Chiapas	Suelo	Negativo	Suelo
Tapachula, Chiapas	Enano Gigante	Positivo	Cormo
Tapachula, Chiapas	Enano Gigante	Positivo	Cormo
Tapachula, Chiapas	Enano Gigante	Positivo	Raíz
Tapachula, Chiapas	Enano Gigante	Negativo	Raíz
Tapachula, Chiapas	Enano Gigante	Positivo	Tallo
Tapachula, Chiapas	Enano Gigante	Positivo	Tallo
Tapachula, Chiapas	Enano Gigante	Negativo	Nervadura Central
Tapachula, Chiapas	Enano Gigante	Negativo	Nervadura Central
Tapachula, Chiapas	Suelo	Negativo	Suelo
Tapachula, Chiapas	Suelo	Negativo	Suelo
Suchiate, Chiapas	Enano Gigante	Positivo	Tallo y Fruto
Suchiate, Chiapas	Enano Gigante	Negativo	Tallo
Suchiate, Chiapas	Plátano Macho	Positivo	Tallo
Suchiate, Chiapas	Plátano Macho	Negativo	Tallo
Suchiate, Chiapas	Enano Gigante	Positivo	Tallo, Raquiz y Fruto
Suchiate, Chiapas	Enano Gigante	Positivo	Tallo, Raquiz y Fruto
Suchiate, Chiapas	Enano Gigante	Positivo	Tallo, Cormo y Hoja
Suchiate, Chiapas	Enano Gigante	Negativo	Tallo, Cormo y Hoja
Suchiate, Chiapas	Suelo	Negativo	Suelo
Suchiate, Chiapas	Suelo	Negativo	Suelo
Pichucalco, Chiapas	Enano Gigante	Negativo	Tallo y Hoja
Centro, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Cormo, Pseudotallo, Hoja y Fruto
Centro, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Cormo, Pseudotallo, Hoja y Fruto
Huimanguillo, Tabasco	Plátano Macho	Negativo	Suelo, Cormo, Pseudotallo, Hoja y Fruto
Huimanguillo, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Suelo, Cormo, Pseudotallo, Hoja y Fruto
Tacotalpa, Tabasco	Enano Gigante	Negativo	Suelo, Cormo, Pseudotallo, Hoja y Fruto

Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Suelo, Cormo, Pseudotallo, Hoja y Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Suelo, Cormo, Pseudotallo, Hoja y Fruto
Tacotalpa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Suelo, Cormo, Pseudotallo, Hoja y Fruto
Cardenas, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Suelo, Cormo, Pseudotallo, Hoja y Fruto
Cuanduacan, Tabasco	Enano Gigante	Negativo	Suelo, Cormo, Pseudotallo, Hoja y Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Tacotalpa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Tacotalpa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Tacotalpa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Tacotalpa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Tacotalpa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Tacotalpa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Tacotalpa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Tacotalpa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Tacotalpa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto

Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto
Teapa, Tabasco	Enano Gigante	Positivo	Fruto

3.4. Aislamiento de colonias de *R. solanacearum*

A partir de las muestras vegetales y suelo con diagnóstico positivo de *R. solanacearum*, se aislaron las cepas de *R. solanacearum* en cajas Petri con medio SMSA. Este medio semiselectivo permite el crecimiento de *R. solanacearum* atenuando el crecimiento de otras bacterias como *Pseudomona* spp (figura 3.10). Sobre este medio se logró el aislamiento de 47 colonias bacterianas.

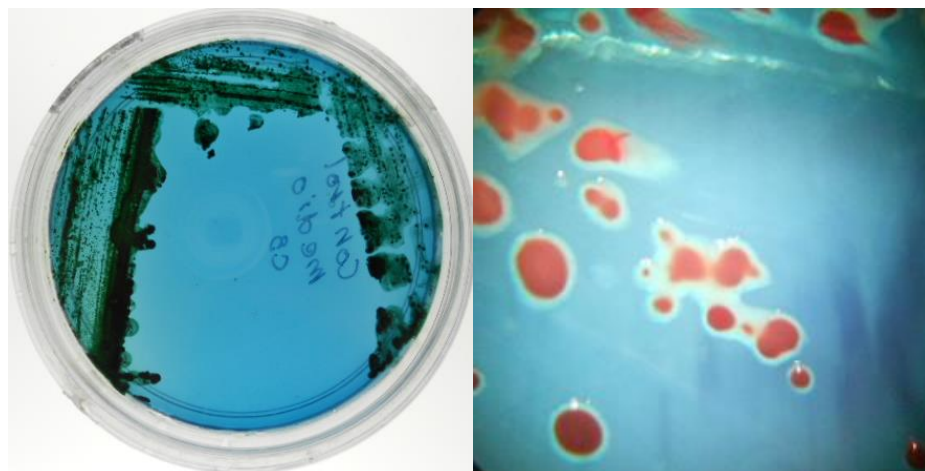


Figura 3.10 Crecimiento en medio SMSA modificado de colonias bacterianas aisladas de plantas de plátano con síntomas de Moko

Posteriormente las colonias fueron transferidas a medio B de King, siguiendo una distribución por cuadrantes sobre la caja de Petri, con el fin de poder ubicarlas e identificarlas; las colonias se dejaron crecer durante 48 h a 28°C y posteriormente se observaron bajo luz UV con longitud de onda de 360nm. Esta prueba permite descartar las *Pseudomonas* spp. que generan fluorescencia al ser expuestas a esta longitud de onda (figura 3.11). Algunas de las *Pseudomonas* spp. aisladas fueron identificadas mediante secuenciación del 16S, y correspondieron a *Pseudomonas fulva*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas citronellolis*.

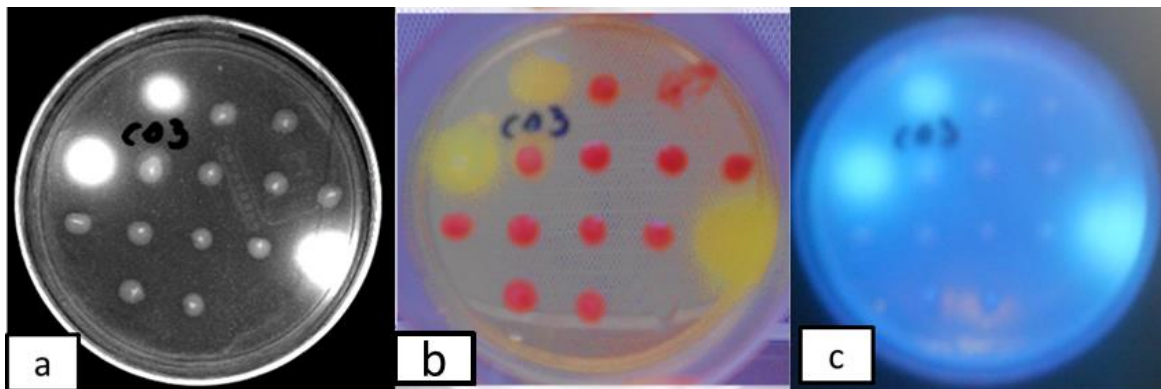


Figura 3.11 Identificación cualitativa de *R. solanacearum* y *Pseudomonas* spp. mediante cultivo sobre medio B de King. La presencia de fluorescencia indica la presencia de bacterias del género *Pseudomonas*. a) observación en blanco y negro, se observa claramente la fluorescencia por parte de las colonias; b) color y forma de las colonias bajo luz blanca; c) fluorescencia de color azul producida por las colonias *Pseudomonas*.

Las cepas que presentaron características similares a *R. solanacearum* se sembraron en medio B de King y fueron analizadas por PCR (759/760, PS96-H/ PS96-I y pehA) para confirmar su identificación. Al final de todo el procedimiento se obtuvieron cepas de *Ralstonia solanacearum* puras, las cuales fueron sembradas por estría cruzada sobre medio TTC para observar morfología y determinar si estas eran virulentas o avirulentas (figura 3.12). A pesar de que 63 muestras resultaron positivas para *R. solanacearum*, sólo pudieron aislarse 47 cepas, todas a partir de tejido vegetal; todas esas cepas presentaron morfología SFR (pequeñas redondas y fluidas) y morfología de virulentas, es decir

presencia de consistencia mucosa (debido a los carbohidratos generados) y color rosado. De las muestras de suelo positivos no fue posible aislar esta bacteria, debido al crecimiento más rápido de otros microorganismos.

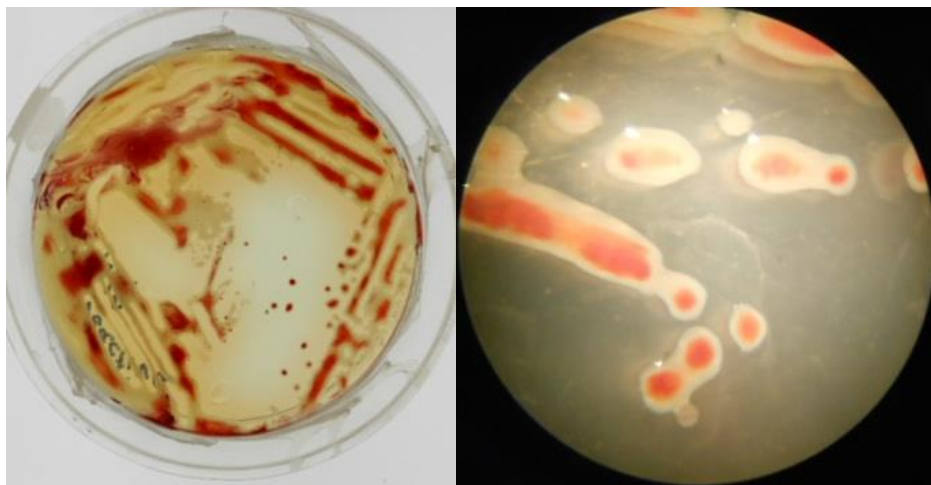


Figura 3.12 Cepa de *Ralstonia solanacearum* con fenotipo de virulenta sobre medio TTC, es decir morfología circular ameboidea, de elevación convexa y borde ondulado a lobulado debido a la fluidez de la colonia, color blanco con centro rosado.

3.5. Pruebas de patogenicidad en plátano

Las plantas de plátano inoculadas con las cepas de *Ralstonia solanacearum* raza 2 mostraron síntomas a partir de la segunda semana de inoculación. Las zonas de inoculación en pseudotallo y cormo, mostraron lesiones necróticas, que se extendían verticalmente hacia la zona apical y radicular de la planta. Las hojas mostraron zonas cloróticas y márgenes naranjas por desecamiento, los cuales se empezaron a extender hacia la nervadura central de la hoja (figura 3.13 A-C); la desecación inició en el ápice de la hoja (figura 3.13 D). Las cepas patogénicas mostraron diversos niveles de virulencia: 16 altamente virulentas (A, 34% de cepas totales), 26 moderadamente virulentas (M, 55,3%) y 3 débilmente virulentas (D, 6,4%) (Cuadro 3.3). Se observaron hojas completamente marchitas (plantas muertas) a los 45 días de la inoculación de las cepas A, 50 dpi para las cepas M y 60 dpi para las cepas D; MC01 y MC02 no mostraron marchitamiento.

Al realizar cortes horizontales a nivel del pseudotallo, las plantas mostraron necrosis y puntos negros en los vasos conductores (figura 3.13 F). Las plantas colapsaron por

desecamiento y pudrición a los 45-60 días (figura 3.13 E). Las plantas control mostraron un crecimiento normal. Dos cepas, MC01 y MC02, no provocaron la sintomatología esperada en las plantas de plátano.

3.6. Caracterización de las cepas MC01 y MC02

Se repitieron las pruebas de patogenicidad para las cepas MC01 (Figura 3.14 A-G) y MC02 (Figura 3.14 H-M). Como control de virulencia se inoculó la cepa MT08 que provocó los síntomas esperados (Figura 3.14 N-T). Las plantas se monitorearon semanalmente durante 6 semanas.

La cepa MC01 no provocó sintomatología en las plantas inoculadas, mostrando un comportamiento similar a los controles negativos durante las 6 semanas de monitoreo (figura 3.14 paneles A-G). Esta cepa generó pequeños puntos café cerca del área de inoculación del pseudotallo (figura 3.15 panel A), a partir de la primera semana de inoculación, que permanecieron durante las 6 semanas de observación. Sin embargo los puntos necróticos no crecieron, ni hubo presencia de nuevos puntos en otras áreas de la planta (figura 3.15 paneles B-F). Se realizaron cortes horizontales cada 3 cm y sólo se observó presencia de pequeñas lesiones en la zona de inoculación (figura 3.16 paneles A-B). La mayor parte del tejido vegetal se mantuvo íntegro y sin presencia de lesiones o necrosis (figura 3.16 paneles C-G). Al realizarse la detección por PCR de *R. solanacearum* a partir de la extracción de ADN de estos cortes, sólo se detectó la presencia de la bacteria en dos secciones de la planta, cercanas al punto de inoculación (figura 3.17 panel A).

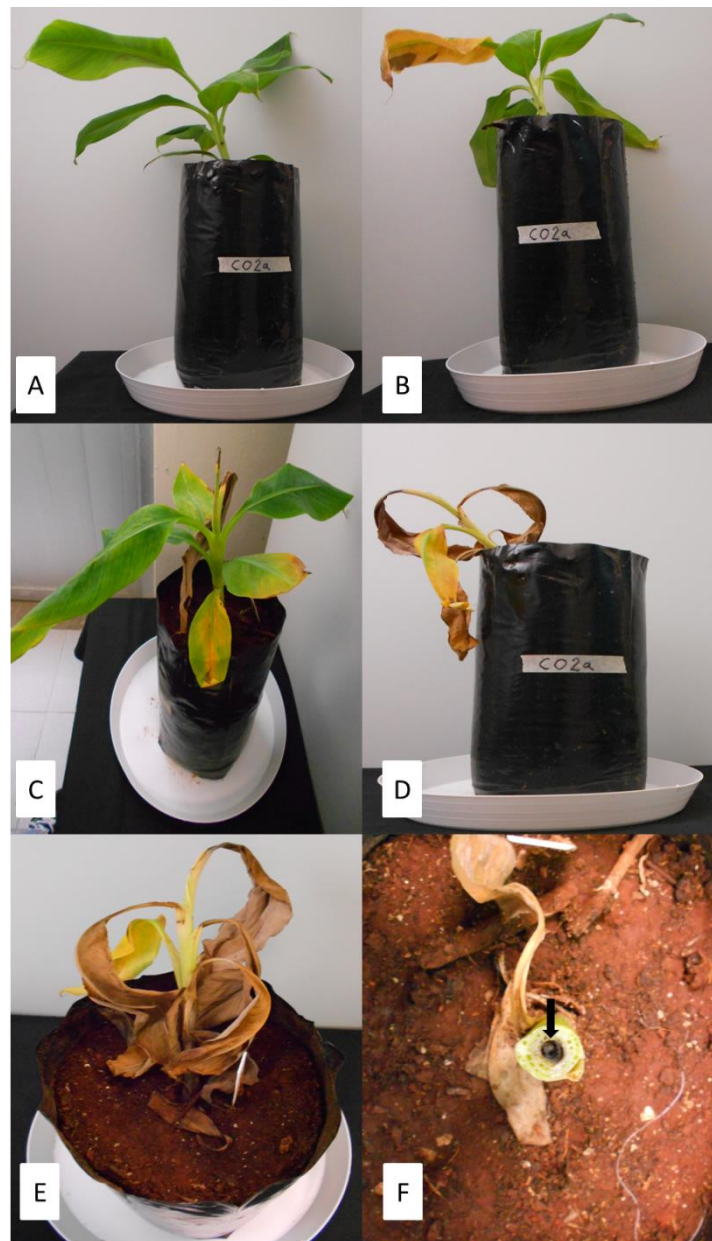


Figura 3.13 Planta de plátano inoculada con *Raltonia solanacearum* raza 2 causante de Moko (cepa MC03, altamente agresiva). A) Planta recién inoculada. B) planta después de dos semanas de inoculación, inicio de la sintomatología con anaranjamiento y desecación de hojas. (C y D) planta después de tres semanas de inoculación, la desecación de la hoja cigarro y irradiación de los síntomas a más hojas. E) planta después de cinco semanas de inoculación, se aprecia el desecamiento de las hojas y el colapso de la planta. F) Corte horizontal en el pseudotallo de la planta colapsada, el centro de pseudotallo muestra un necrosamiento (flecha negra).

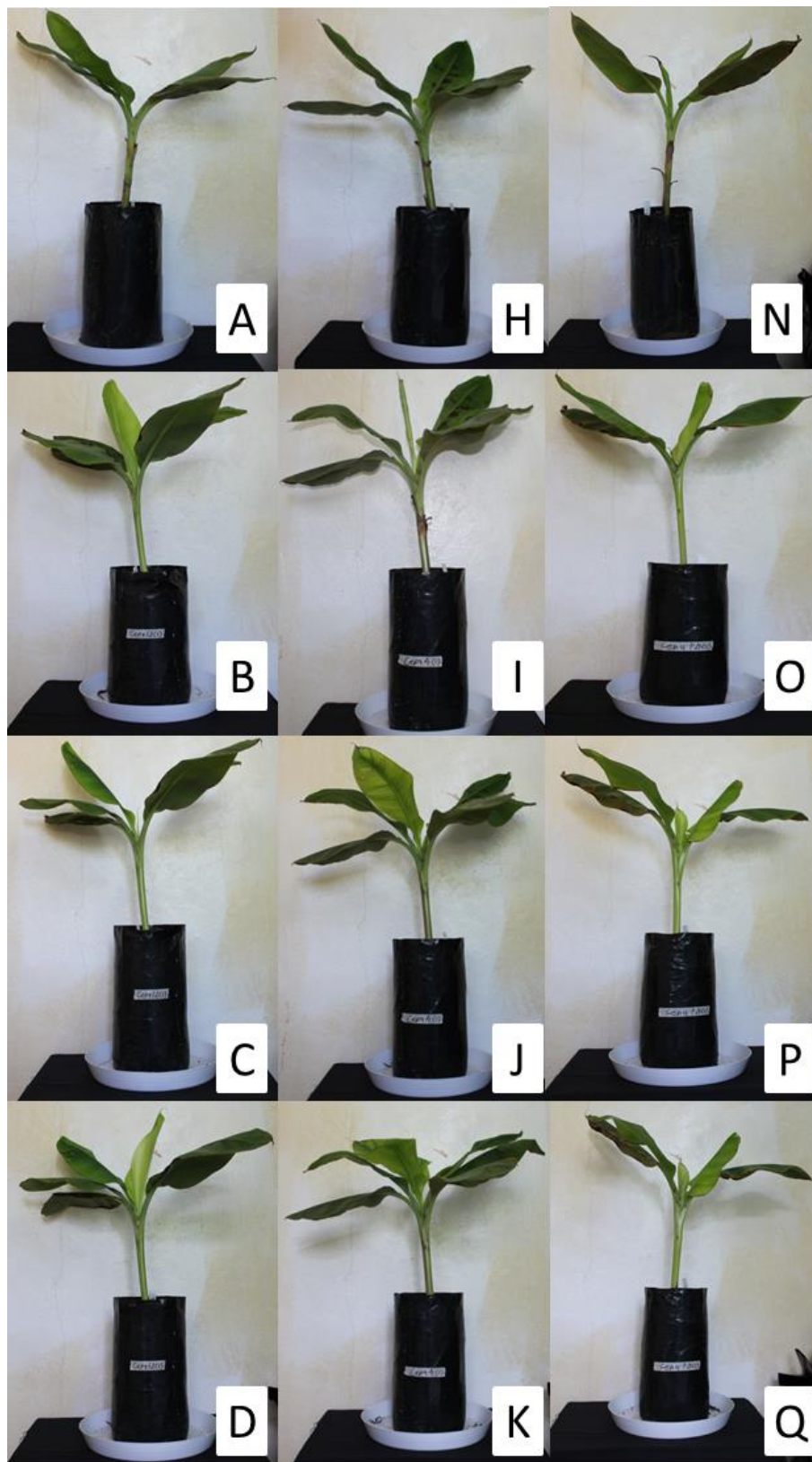




Figura 3.14 Plantas de plátano inoculadas en pseudotallo con las cepas MC01, MC02 y cepa patogénica MT08. (A-G) planta de plátano inoculada con la cepa MC01 del tiempo 0 (A) a la semana 6 (G); (H-M) planta de plátano inoculada con la cepa MC02; (N-T) planta de plátano inoculada con una cepa causante de Moko, MT08.

La cepa MC02 no generó sintomatología de Moko en las plantas inoculadas. Con esta cepa se aceleró la desecación de las hojas senescentes, pero no afectó a las hojas más jóvenes, ni al crecimiento de la planta (figura 3.14 paneles H-M). MC02 generó en el pseudotallo necrosis con bordes cafés a partir del área de inoculación (figura 3.15 panel G), misma que fue expandiéndose verticalmente de la semana 2 a la 5 (figura 3.15 paneles H-K). Se observó desecación de las hojas más viejas; al retirar en la semana 6 las hojas muertas, la necrosis fue menor en las hojas más recientes (figura 3.15 panel L). Al realizarse cortes transversales de las plantas inoculadas con MC02, se observó presencia de lesiones y necrosis (figura 3.16 paneles H-K), siendo mayor en la zona de inoculación; sin embargo, los tejidos más alejados del sitio de inoculación no mostraron necrosis o lesiones (figura 3.16 paneles L-M). Al realizarse la detección por PCR de *R. solanacearum* a partir de la extracción de ADN de estos cortes, se detectó la presencia de la bacteria en las secciones de la planta con presencia de lesiones y necrosis, mientras que de las zonas sin lesiones no se obtuvo producto de PCR (figura 3.17 panel B).

La cepa MT08 mostró sintomatología de Moko en las plantas inoculadas: desecación y decaimiento de las hojas, así como la desecación de la hoja cigarro (figura 3.14 paneles N-T). En el pseudotallo se observaron puntos cafés con presencia de necrosis en la primera semana postinoculación (figura 3.15 panel M), misma que fue expandiéndose verticalmente de la semana 2 a la 6 (figura 3.15 paneles N-R). Al realizarse cortes transversales de las plantas inoculadas con esta cepa, se observó la presencia de lesiones y necrosis en todos los tejidos (figura 3.16 paneles N-T). La detección de *R. solanacearum* por PCR a partir de los ADNs obtenidos de estos cortes confirmaron la presencia de la bacteria en todas las secciones de la planta inoculada con MT08 (figura 3.17 panel C).

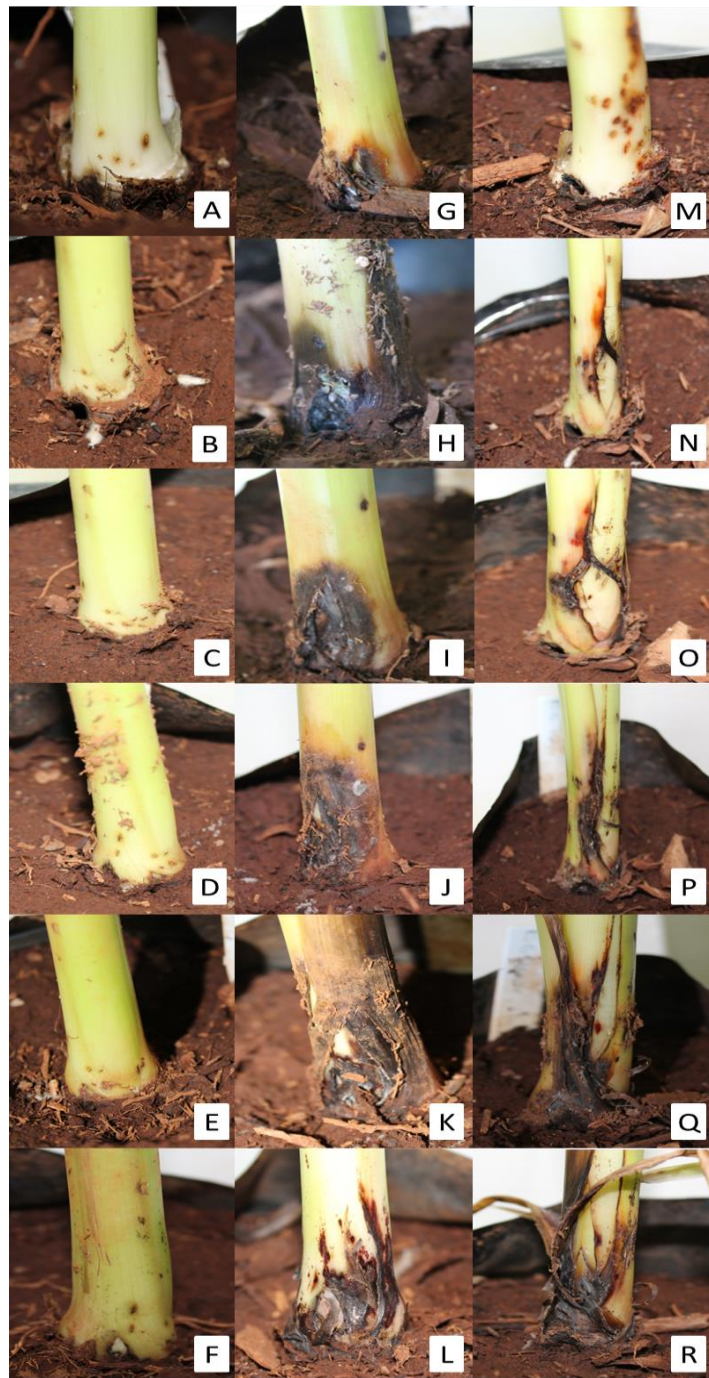
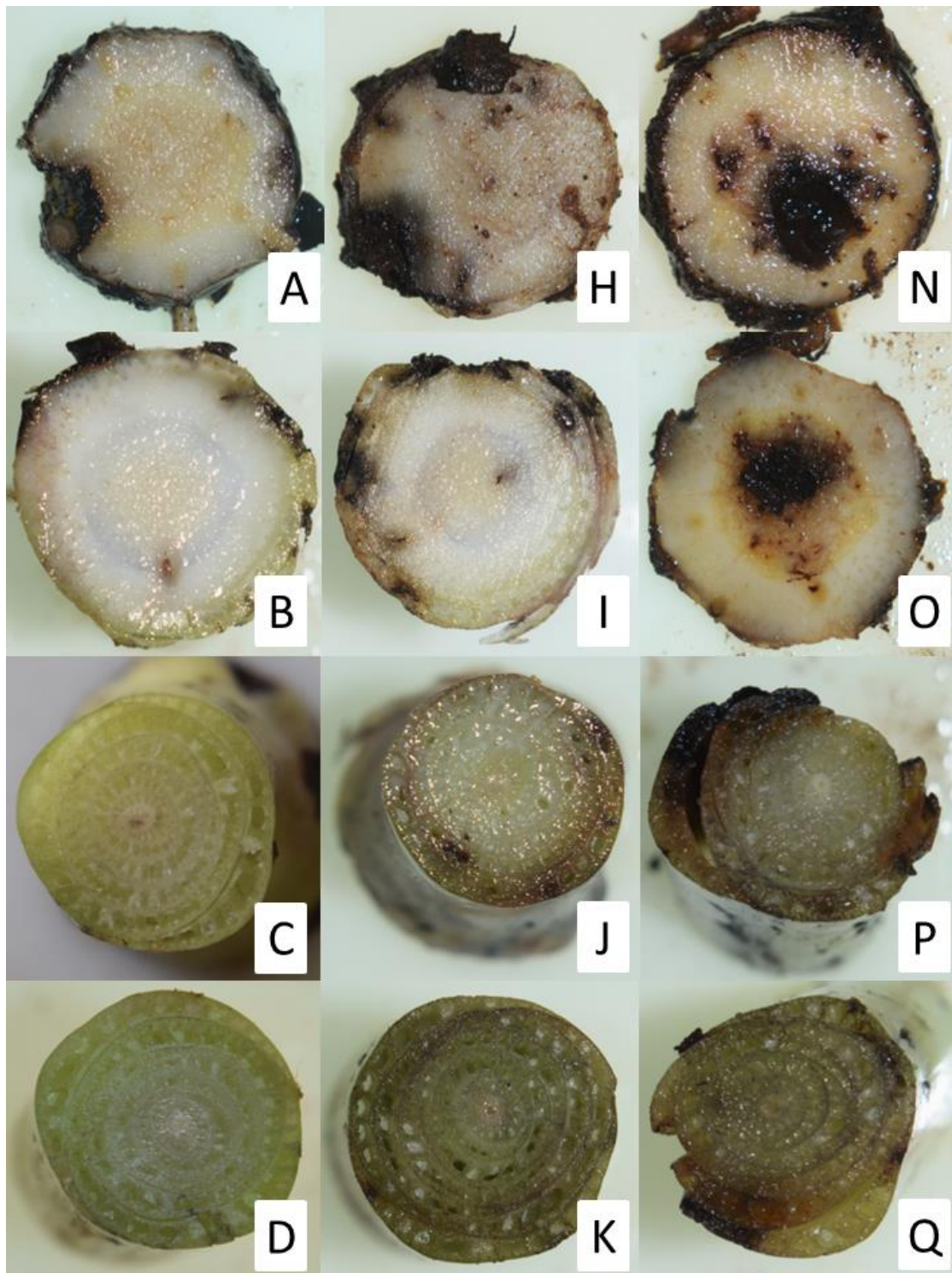


Figura 3.15 Plantas de plátano inoculadas entre el pseudotallo y el cormo con las cepas MC01, MC02 y cepa patogénica MT08. (A-F) planta de plátano inoculada con la cepa MC01 de la semana 1 (A) a la semana 6 (F); (G-L) planta de plátano inoculada con la cepa MC02; (M-R) planta de plátano inoculada con una cepa MT08.



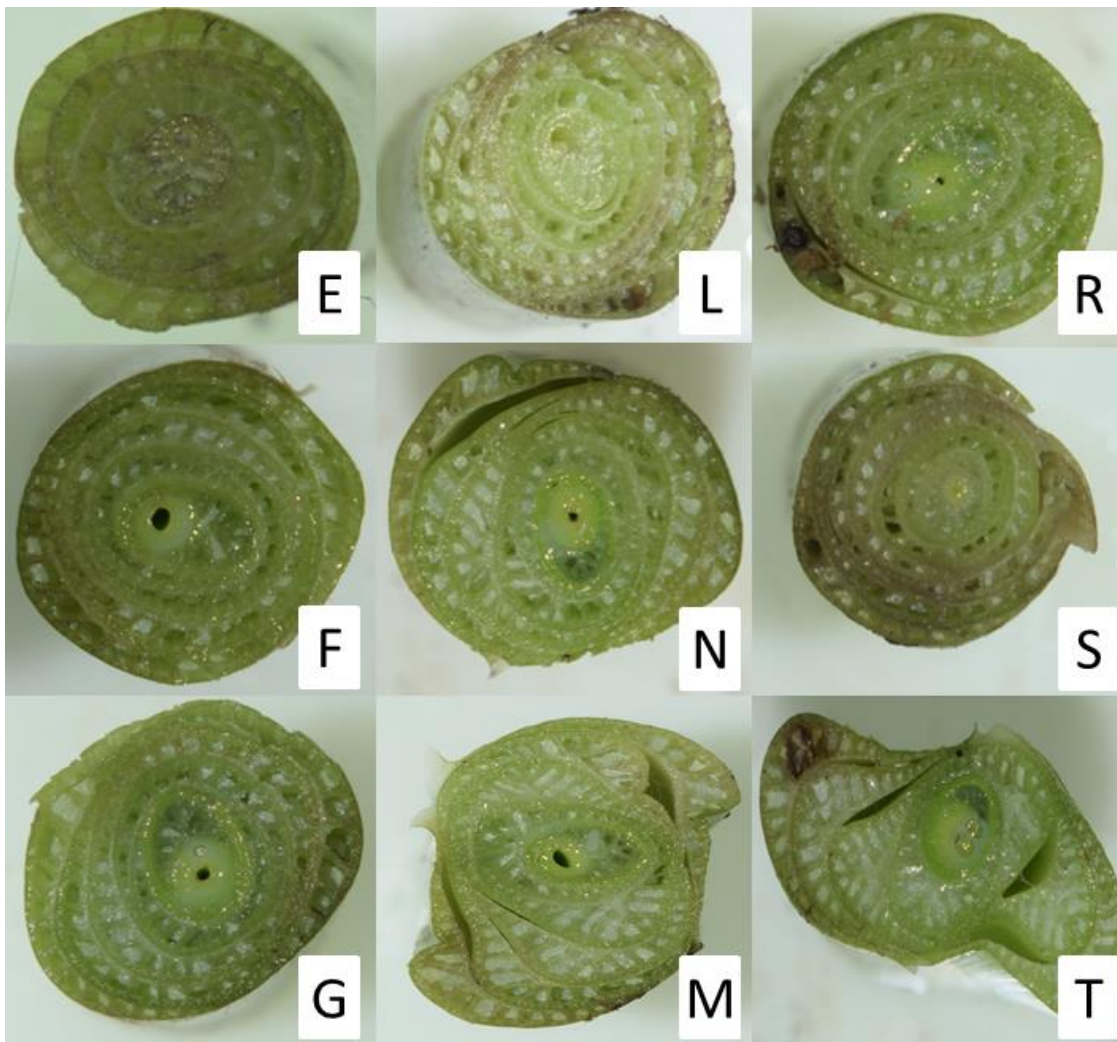


Figura 3.16 Cortes transversales cada 3 centímetros del corno hacia la parte apical del pseudotallo de plantas de plátano inoculadas con las cepas MC01 (A-G), MC02 (H-M) y cepa patogénica MT08 (N-T).

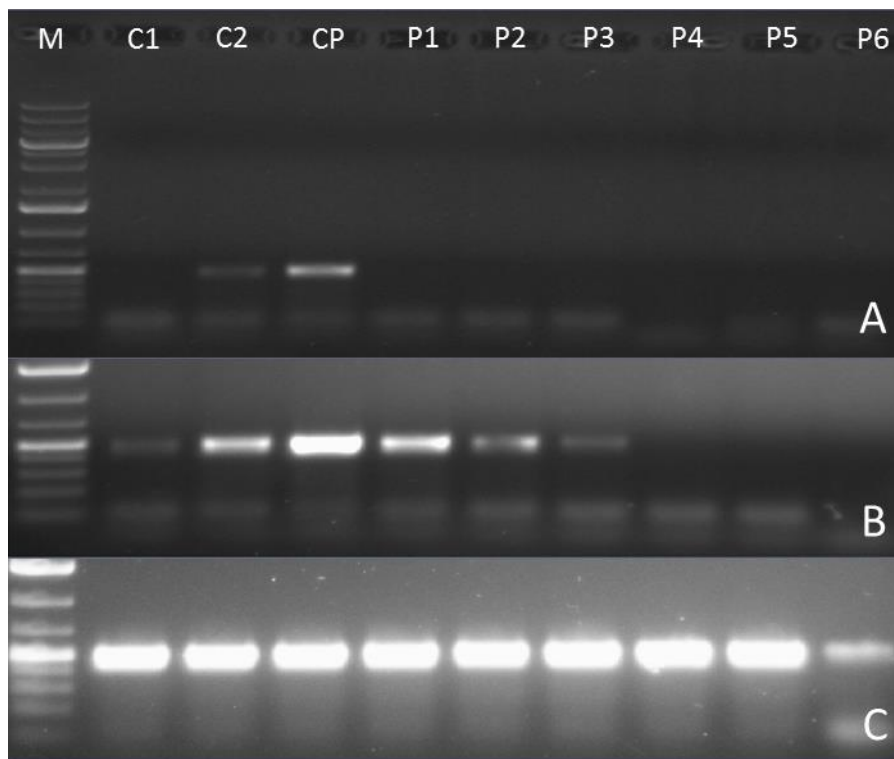


Figura 3.17 Detección por PCR de *Ralstonia solanacearum* a partir del ADN extraído de plantas de plátano enano gigante inoculadas con las cepas MC01 (A), MC02 (B) y cepa patógena MT08 (C). Cada reacción correspondió a una muestra tomada cada 3 cm hacia arriba, a partir del sitio de inoculación, C1-C2) Cormo, CP) región entre cormo-pseudotallo y P1-P6) Pseudotallo. ³⁰

3.7. Ensayos de hipersensibilidad en tabaco

Las pruebas de hipersensibilidad en tabaco (*Nicotiana tabacum*) fueron positivas para todas las cepas de *Ralstonia solanacearum* (incluyendo MC01 y MC02), generando desecamiento en el área de inoculación, con bordes amarillos en la periferia (figura 3.18).



Figura 3.18 Pruebas de hipersensibilidad en tabaco.

3.8. Caracterización por filotipo

Todas las cepas generaron una banda de ~370 pb, la cual es la banda diagnóstica para el Filotipo II, es decir, el filotipo Americano. La figura 3.19 muestra el resultado típico obtenido.

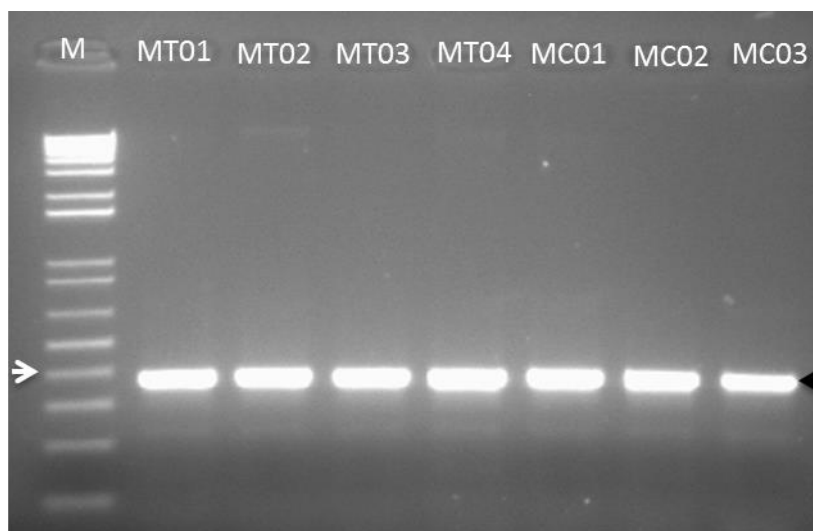


Figura 3.19 Gel de agarosa para determinación del filotipo usando los cebadores Nmult; se obtuvo un amplicon de ~370 pb en todas las cepas. Este mismo resultado se obtuvo con todas las cepas aisladas en el presente trabajo. M) Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen® Carlsbad, CA, USA), flecha blanca: banda de 400 pb, flecha negra: producto amplificado de ~370 pb.

3.9. Caracterización de la raza 2

Todas las cepas aisladas en este estudio amplificaron un producto de 1,884 pb con los cebadores ISRso19, indicando que las cepas pertenecen a la Raza 2 de *Ralstonia solanacearum*, causante de la enfermedad Moko, congruente con lo esperado. La figura 3.20 muestra el resultado típico obtenido.

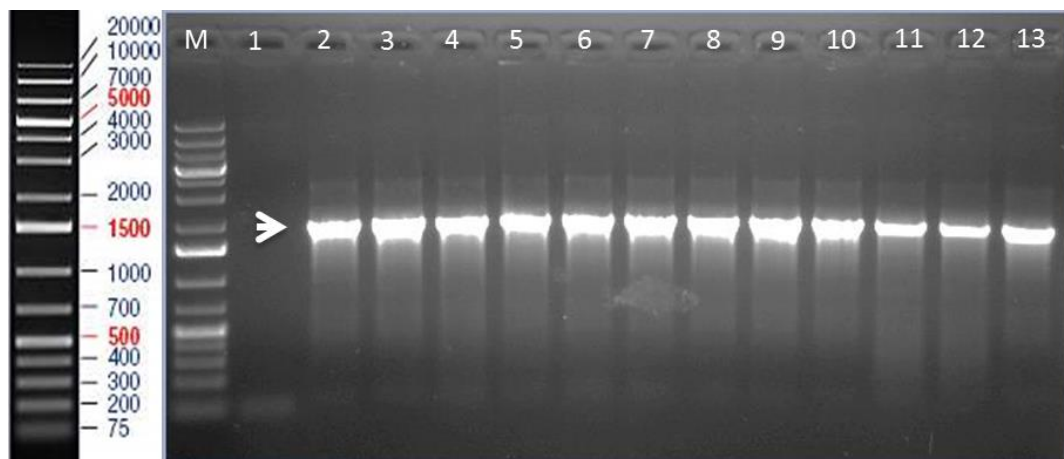


Figura 3.20 Gel de agarosa con productos de la amplificación de los cebadores ISRso19 para identificar la raza 2 en las cepas de *Ralstonia solanacearum* aisladas en el presente trabajo. Se observa un amplicon de 1,884 pb, (flecha blanca) lo que indica que las cepas pertenecen a la raza 2. M) Marcador GeneRuler™ 1 Kb (ThermoFisher scientific™, Lithuania, EU); 1) Control negativo a reacción, 2) MT01, 3) MT02, 4) MT03, 5) MT04, 6) MT05, 7) MT06, 8) MT07, 9) MT08, 10) MC01, 11) MC02, 12) MC03, 13) MC04; flecha blanca: banda de 2000 pb.

3.10. Caracterización por secuevar

Se realizó la amplificación mediante multiplex-PCR usando los cebadores de la serie Mus, de acuerdo a Fegan and Prior (2005b), pero al analizar los resultados de la PCR, el tamaño de los productos no fueron los esperados de acuerdo a lo reportado por estos autores. Se obtuvieron amplificaciones de diversos tamaños (figura 3.21): de ~167 pb tamaño de producto indicado para el secuevar 4 ecotipo SFR (flecha negra), ~220 pb indicado para el secuevar 6 (flecha azul), ~350 pb indicado para el secuevar 4 (flecha roja), ~400 pb indicado para el secuevar 3 (flecha naranja), y tamaño de productos de

~450 pb (flecha verde), ~850 pb (flecha morada) y ~1000pb (flecha amarilla). Posteriormente se realizaron PCRs usando cada vez una pareja de cebadores por secuevar; para todas las cepas se obtuvo un producto de PCR de ~220 pb con la pareja de cebadores para el secuevar 6 (figura 3.22), lo que es congruente con el tamaño esperado usando esos cebadores. Con los cebadores para los secuevares 3, 4 y 4 (SFR) no se obtuvieron amplificación. Estos resultados sugieren que las cepas aisladas en este trabajo pertenecen al secuevar 6. Para la confirmación, los productos deben secuenciarse y analizarse en árbol filogenético.

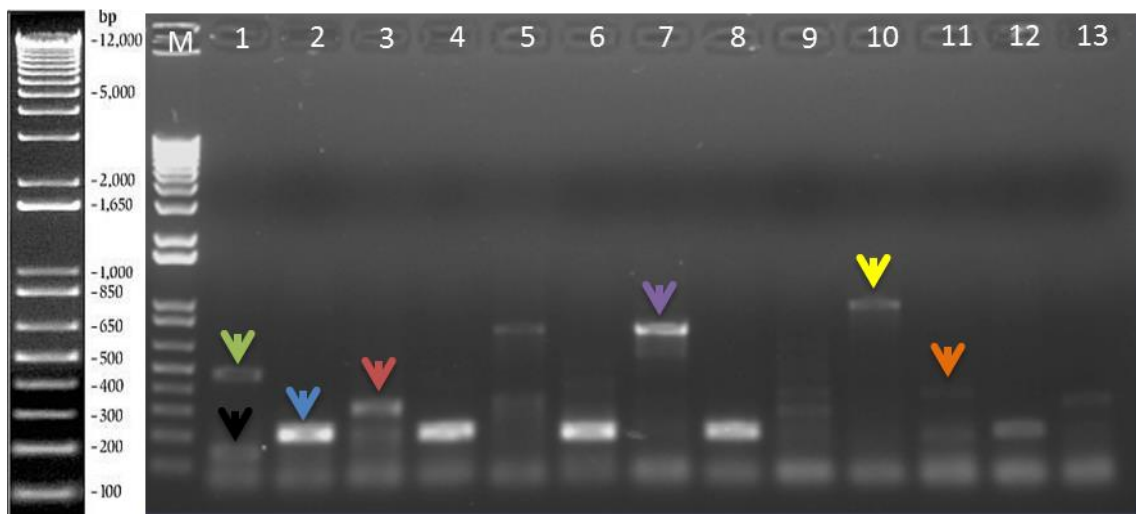


Figura 3.21 Gel de agarosa con productos de amplificación mediante multiplex-PCR usando los cebadores de la serie Mus (descritos en cuadro 2.4) para *R. solanacearum*. Carriles: M) Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen® Carlsbad, CA, USA), 1) MT01, 2) MT03, 3) MT08, 4) MT03, 5) MT04, 6) MT07, 7) MT06, 8) MT17, 9) MT25, 10) MT27, 11) MT18, 12) MT14, 13) MT13. Tamaño de banda: ~167 pb (flecha negra), ~220 pb (flecha azul), ~350 pb (flecha roja), ~400 pb (flecha naranja) y ~450 pb (flecha verde), ~850 pb (flecha morada) y ~1000pb (flecha amarilla).

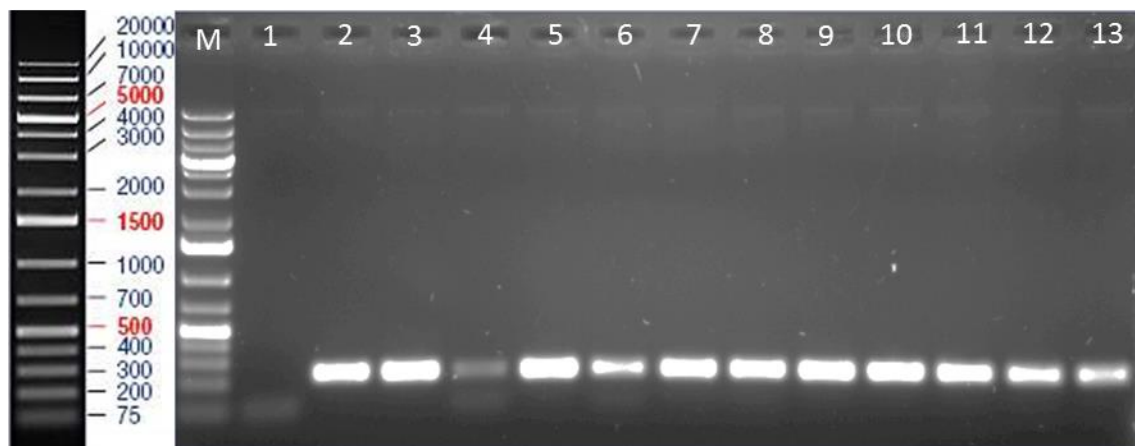


Figura 3.22 Gel de agarosa para identificación del secuevar de *R. solanacearum* mediante PCR convencional con pareja sencilla de cebadores S128. M) Marcador GeneRuler™ 1 Kb (ThermoFisher scientific™, Lithuania, EU), 1) control negativo a reacción, 2) MC01, 3) MC02, 4) MC03, 5) MC04, 6) MC05, 7) MC06, 8) MC07, 9) MT01, 10) MT02, 11) MT03, 12) MT04, 13) MT05. Se observa la amplificación de la banda de ~220 pb que sugiere secuevar 6.

3.11. Análisis filogenético con base en los genes *egl*, *hrpB* y *pga*

Se construyeron árboles filogenéticos basados en las secuencias de los genes *egl*, *hrpB* y *pga*. El árbol basado en *egl* fue generado con un total de 24 secuencias de las cepas aisladas en este estudio; a pesar de muchos intentos en la PCR e incluso reextracción de ADN, la amplificación de *egl* falló en el 50% de las cepas debido a que no haber presencia de bandas en las electroforesis en gel. Para el árbol basado en *hrpB* se usaron 44 secuencias de las cepas mexicanas y para el árbol basado en *pga* se usaron 46 secuencias de las cepas mexicanas (Cuadro 3.3). La topología de los árboles generados fue congruente con la clasificación conocida del complejo RSSC; sin embargo, el número de miembros de referencia en ramas homólogas difirió entre los árboles, debido a las diferencias en la disponibilidad de las secuencias para los distintos genes en el GenBank. Los cuatro filotipos se distinguen claramente entre sí y sus respectivos miembros fueron agrupados en el cluster del secuevar 6 (figura 3.23-3.25). Los tres árboles fueron consistentes entre ellos, pero mostraron diferencias en la distribución de algunos secuevares, por ejemplo los secuevares 14, 44 y 47 en el filotipo I. El filotipo II fue el grupo más numeroso y se dividió en dos subgrupos, IIA y IIB; cada sub-filotipo agrupó los secuevares esperados. El análisis de *egl*, *hrpB* y *pga* colocó a las nuevas cepas

mexicanas de *R. solanacearum* dentro del filotipo IIA, como se mencionó, en el cluster del secuevar 6, congruente con el diagnóstico anterior de PCR. El árbol filogenético basado en las secuencias de *egl* no fue capaz de distinguir entre las cepas patógenas y no patógenas de México, agrupándolas en un mismo “cluster” (figura 3.23). Los árboles filogenéticos contruidos con secuencias de *hrpB* y *pga* separaron a las cepas patógenas y no patógenas. Las cepas patógenas mexicanas se agruparon juntas, con la cepa Granada 91 perteneciente al secuevar 6, patógena en banana. Las cepas NPB MC01 y MC02 se agruparon en un clado hermano (figuras 3.24 y 3.25). Las dos cepas NPB mexicanas son filogenéticamente más cercanas a las cepas patógenas de México, que a las cepas NPB que se han descrito anteriormente en Martinica, sugiriendo que estas cepas mexicanas son nuevos ecotipos que amplían la diversidad fenotípica y posiblemente diversidad genética dentro de RSSC.

Cuadro 3.3 Descripción cepas de *Ralstonia solanacearum* aisladas en el presente trabajo.

Aislado	Lugar	Año de aislamiento	Patogenicidad	HR	Filotipo,Raza, Secuevar PCR	Números de acceso GeneBank		
						<i>egl</i>	<i>pga</i>	<i>hrpB</i>
MT01	Tabasco	2014	PB (M)	+	IIA/2/6	KX390608	KX390582	KX390520
MT02	Tabasco	2014	PB (M)	+	IIA/2/6	KX390609	KX390578	KX390550
MT03	Tabasco	2014	PB (A)	+	IIA/2/6	KX390610	KX390583	KX390525
MT04	Tabasco	2014	PB (M)	+	IIA/2/6	KX390611	KX390579	KX390534
MT05	Tabasco	2014	PB (A)	+	IIA/2/6	KX390612	KX390573	KX390526
MT06	Tabasco	2014	PB (A)	+	IIA/2/6	KX390613	KX390592	KX390532
MT07	Tabasco	2013	PB (A)	+	IIA/2/6	KX390614	KX390566	KX390549
MT08	Tabasco	2014	PB (M)	+	IIA/2/6	KX390615	KX390580	KX390524
MT09	Tabasco	2014	PB (M)	+	IIA/2/6	KX390616	KX390581	KX390527
MT10	Tabasco	2014	PB (A)	+	IIA/2/6	KX390617	KX390594	KX390551
MT11	Tabasco	2014	PB (M)	+	IIA/2/6	KX390618	KX390596	KX390535
MT12	Tabasco	2014	PB (A)	+	IIA/2/6	KX390619	KX390595	KX390543
MT13	Tabasco	2013	PB (D)	+	IIA/2/6	KX390620	KX390587	KX390545
MT14	Tabasco	2014	PB (A)	+	IIA/2/6	KX390621	KX390588	KX390553
MT15	Tabasco	2014	PB (M)	+	IIA/2/6	KX390622	KX390602	KX390536
MT16	Tabasco	2014	PB (M)	+	IIA/2/6	KX390623	KX390603	KX390538
MT17	Tabasco	2014	PB (M)	+	IIA/2/6	KX390624	KX390572	KX390528
MT18	Tabasco	2014	PB (M)	+	IIA/2/6	KX390625	KX390571	KX390529
MT19	Tabasco	2014	PB (M)	+	IIA/2/6	KX390626	KX390584	KX390555
MT20	Tabasco	2014	PB (A)	+	IIA/2/6	ND	KX390604	KX390537

MT21	Tabasco	2014	PB (M)	+	IIA/2/6	ND	KX390605	KX390562
MT22	Tabasco	2014	PB (M)	+	IIA/2/6	ND	KX390600	KX390560
MT23	Tabasco	2014	PB (A)	+	IIA/2/6	ND	KX390585	KX390559
MT24	Tabasco	2014	PB (D)	+	IIA/2/6	ND	KX390589	KX390558
MT25	Tabasco	2014	PB (M)	+	IIA/2/6	ND	KX390586	KX390557
MT26	Tabasco	2014	PB (M)	+	IIA/2/6	ND	KX390601	KX390556
MT27	Tabasco	2014	PB (M)	+	IIA/2/6	ND	KX390570	KX390533
MT28	Tabasco	2014	PB (A)	+	IIA/2/6	ND	KX390569	KX390539
MT29	Tabasco	2014	PB (A)	+	IIA/2/6	ND	KX390606	KX390540
MT30	Tabasco	2014	PB (M)	+	IIA/2/6	ND	KX390597	KX390542
MT31	Tabasco	2014	PB (M)	+	IIA/2/6	ND	KX390590	KX390544
MT32	Tabasco	2014	PB (M)	+	IIA/2/6	ND	ND	KX390546
MT33	Tabasco	2014	PB (M)	+	IIA/2/6	ND	ND	KX390547
MT34	Tabasco	2014	PB (A)	+	IIA/2/6	ND	KX390575	KX390548
MT35	Tabasco	2014	PB (M)	+	IIA/2/6	ND	ND	KX390521
MT36	Tabasco	2014	PB (A)	+	IIA/2/6	ND	KX390574	KX390518
MT37	Tabasco	2014	PB (M)	+	IIA/2/6	ND	KX390567	KX390519
MT38	Tabasco	2014	PB (M)	+	IIA/2/6	ND	KX390577	KX390522
MT39	Tabasco	2014	PB (A)	+	IIA/2/6	ND	KX390568	KX390523
MT40	Tabasco	2014	PB (A)	+	IIA/2/6	ND	KX390593	ND
MC01	Chiapas	2013	NPB (O)	+	IIA/2/6	KX390627	KX390564	KX390530
MC02	Chiapas	2013	NPB (O)	+	IIA/2/6	KX390628	KX390565	KX390531
MC03	Chiapas	2013	PB (A)	+	IIA/2/6	KX390629	KX390598	KX390561
MC04	Chiapas	2013	PB (M)	+	IIA/2/6	KX390630	KX390591	KX390541
MC05	Chiapas	2013	PB (M)	+	IIA/2/6	KX390631	KX390599	KX390552
MC06	Chiapas	2013	PB (D)	+	IIA/2/6	ND	KX390607	KX390563
MC07	Chiapas	2013	PB (M)	+	IIA/2/6	ND	KX390576	KX390554

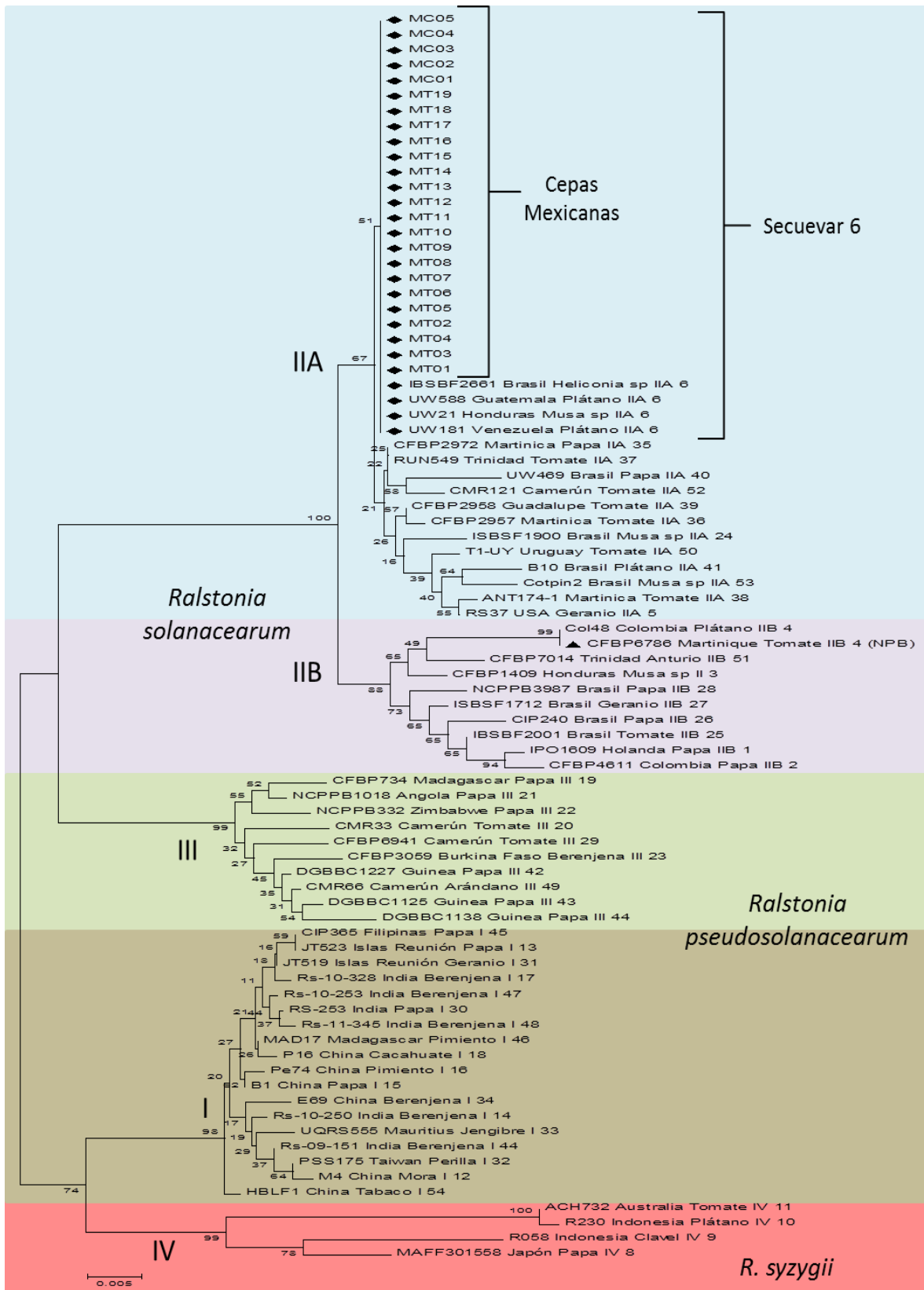


Figura 3.23 Árbol filogenético de *R. solanacearum* generado por el método de neighbour-joining y basado en secuencias del gen de endoglucanasa (*egl*). Los diamantes cerrados son cepas de México. Los triángulos cerrados son cepas 4NPB. Los colores indican filotipos. Azul: filotipo IIA, púrpura: filotipo IIB, ambos que comprenden genospecie de *R. solanacearum*; Café: filotipo I, verde: filotipo III, ambos que comprenden genospecie de *R. pseudosolanacearum*; Rojo: filotipo IV, el cual es la genoespecie de *R. syzygii*. Se incluyen secuencias de referencias de los filotipos y secuevares conocidos y las secuencias de las cepas causantes de la enfermedad de Moko en México. Árbol generado con el software MEGA-6 usando el algoritmo de Jukes y Cantor (1969) con generación de 5,000 árboles bootstrap. Barra de escala denota la sustitución de nucleótidos por sitio (página anterior).

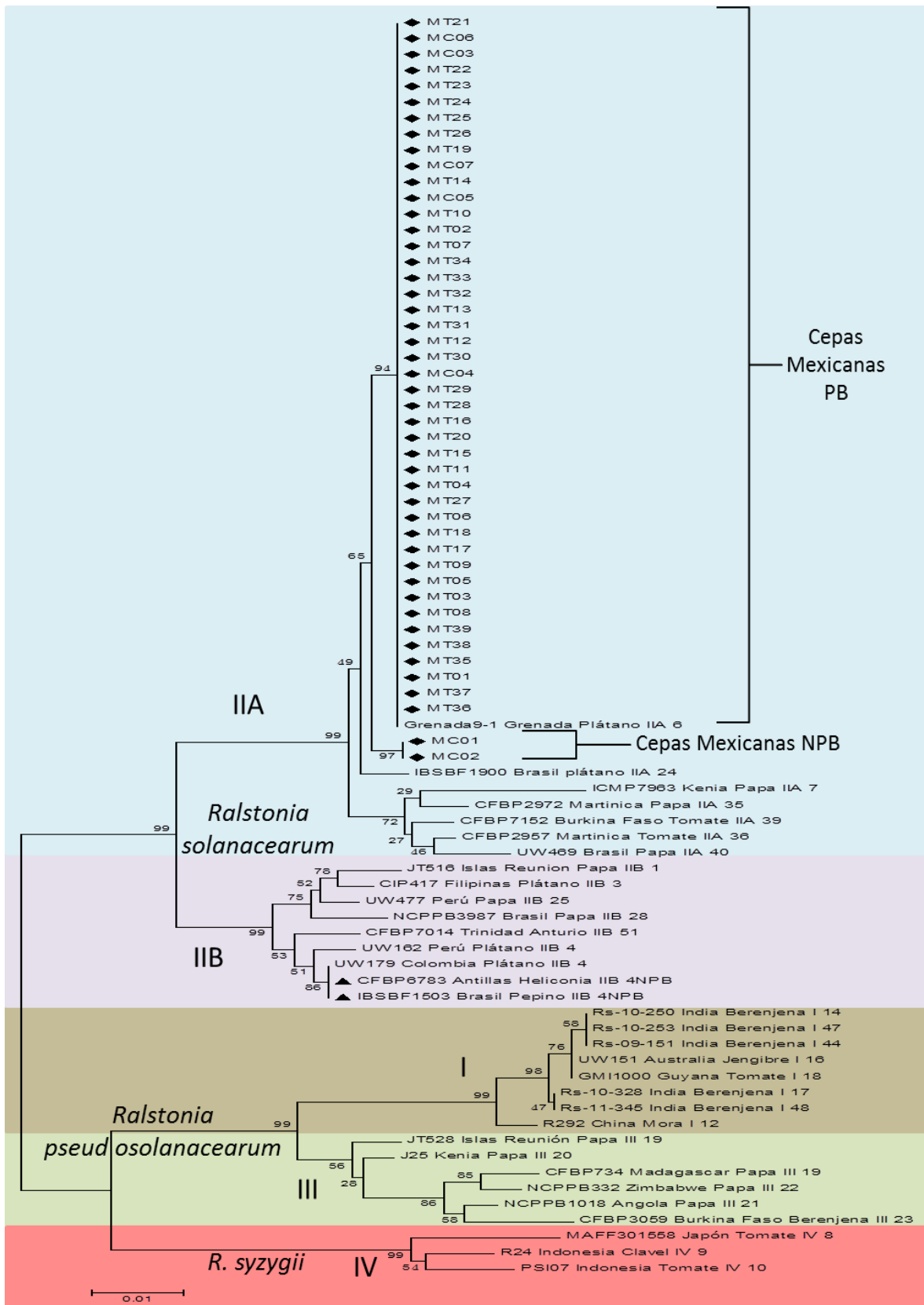


Figura 3.24 Árbol filogenético generado por el método de neighbour-joining basado en secuencias del gen HrpB (*hrpB*) de las cepas de *Ralstonia solanacearum* causantes de la enfermedad de Moko en México. Los diamantes cerrados son cepas de México. Los triángulos cerrados son cepas 4NPB. Los colores indican filotipos. Azul: filotipo IIA, púrpura: filotipo IIB, ambos que comprenden genoespecie de *R. solanacearum*; Café: filotipo I, verde: filotipo III, ambos que comprenden genoespecie de *R. pseudosolanacearum*; Rojo: filotipo IV, el cual es la genoespecie de *R. syzygii*. El árbol fue generado con el software MEGA-6 usando el algoritmo de Jukes y Cantor (1969) con generación de 5,000 árboles bootstrap. La barra de escala denota la sustitución de nucleótidos por sitio (página anterior).

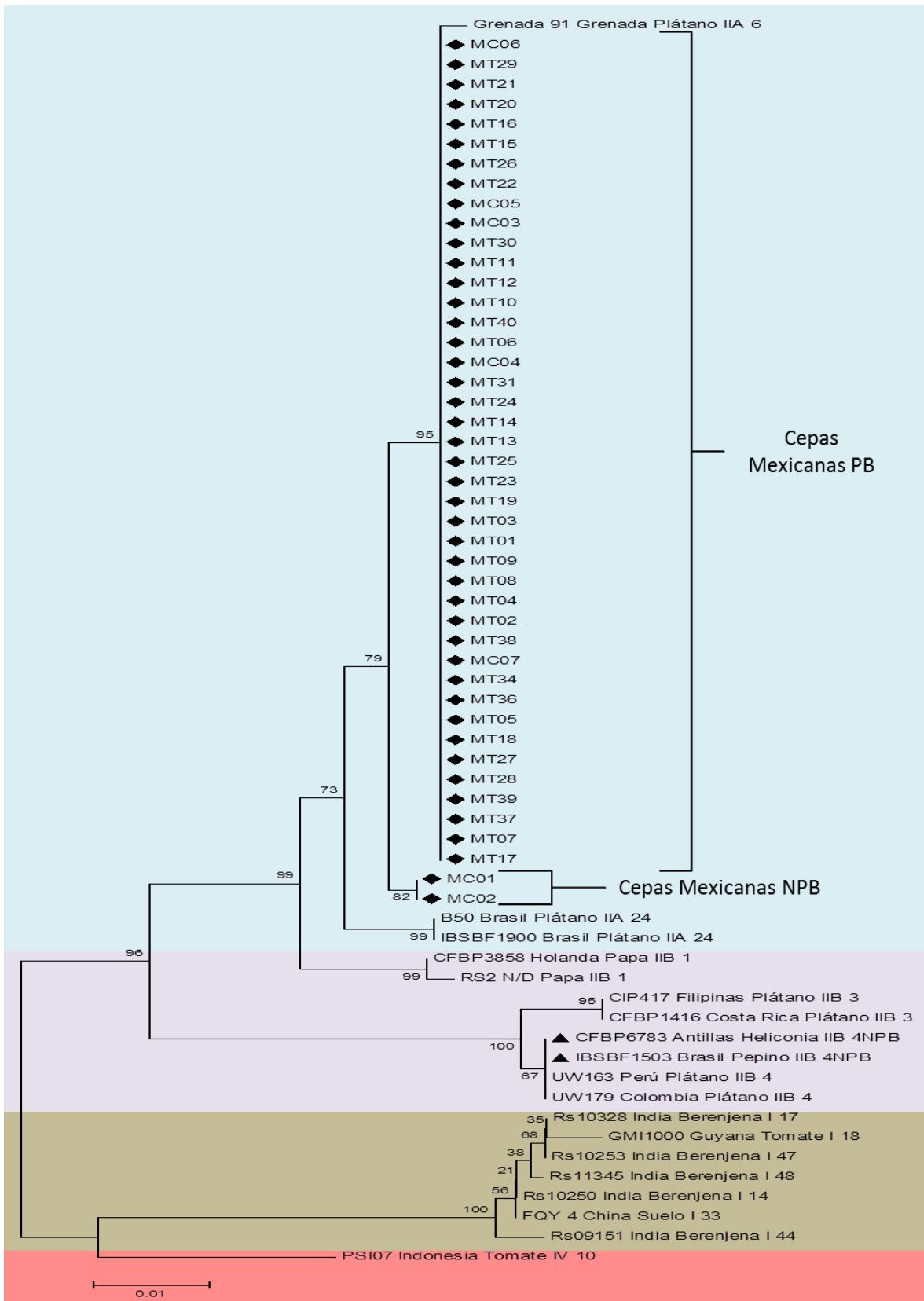


Figura 3.25 Árbol filogenético generado por el método de neighbour-joining basado en secuencias del gen de precursor de poligalacturonasa (*pga*) de las cepas de *Ralstonia solanacearum* causantes de la enfermedad de Moko en México. Los diamantes cerrados son cepas de México. Los triángulos cerrados son cepas 4NPB. Los colores indican filotipos. Azul: filotipo IIA, púrpura: filotipo IIB, ambos que comprenden genespecie de *R. solanacearum*; Café: filotipo I, genespecie de *R. pseudosolanacearum*; Rojo: filotipo IV, el cual es la genespecie de *R. syzygii*. El árbol fue generado con el software MEGA-6 usando el algoritmo de Jukes y Cantor (1969) con generación de 5,000 árboles bootstrap. La barra de escala denota la sustitución de nucleótidos por sitio (página anterior).

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN GENERAL.

Los estados de Chiapas y Tabasco son los más afectados por la presencia de Moko en México. De acuerdo con los reportes oficiales, la presencia de Moko inició en el Estado de Chiapas, introduciéndose posteriormente a Tabasco (SENASICA, 2012a). En los últimos años Chiapas presentó una mayor producción de plátano (723,627 ton), y el estado de Tabasco ocupa el segundo lugar (526,968 ton) (SIAP, 2014), por lo que la enfermedad de Moko es importante, al amenazar al cultivo de plátano en los dos principales estados productores. En términos de la enfermedad de Moko, Tabasco presenta el mayor número de brotes. En los períodos documentados (2009-2015) ambos estados presentaron un comportamiento errático en el número de brotes; en julio del 2011 se reportaron las menores incidencias, con sólo 7 brotes en Tabasco y 9 en Chiapas, pero la enfermedad aumentó considerablemente en agosto del mismo año, con 699 brotes en Tabasco y 94 brotes en Chiapas. Este comportamiento errático ha sido reportado para la zona de Uraba, Antioquia, en Colombia, donde para el período 1992-1993 se presentaron un total de 80,000 brotes, siendo esta etapa el pico máximo de brotes reportados en la historia de la zona platanera en ese país, mientras que para el año 2000 sólo se presentaron 110 brotes de Moko, resultado de un buen manejo, buen control y persistente supervisión (Castañeda y Espinosa, 2005). Para los años subsiguientes el número de brotes se ha mantenido estable: en el 2008 hubo 4 brotes a inicios de año y 400 al finales del mismo (Hurtado, 2012; Villegas, 2011). En Nayarit, en febrero y marzo del 2012 hubo reportes de Moko, pero posteriormente no se han registrado brotes. La aparente erradicación de la enfermedad en ese estado puede deberse a la aplicación temprana de medidas de sanidad y/o a que no se presentaron las condiciones epidemiológicas necesarias para el establecimiento y propagación de la enfermedad.

El suelo juega un papel determinante en la propagación de *R. solanacearum* (Elsas *et al.*, 2000), y es determinante en la salud, crecimiento, productividad y resistencia de las plantas (FAO, 2000). Michel y Mew (1998) observaron que la sobrevivencia de *R. solanacearum* resulta fuertemente influenciada por el tipo de suelo. En este estudio se utilizaron suelos tipo vertisol, fluventico y ultisol, siendo este último el que favoreció la

sobrevivencia de la bacteria. Cabe destacar que el suelo ultisol posee un pH ácido y es poco permeable. Asimismo, Messiha *et al.* (2009) analizaron la sobrevivencia de *R. solanacearum* en suelos arenosos y arcillosos, observando que sobrevive mejor en los últimos. *Ralstonia solanacearum* suele propagarse a través de las escurrientías y sobrevivir en estancamientos de agua (Hurtado, 2012; Álvarez *et al.*, 2008; Elsas *et al.*, 2000). Los estudios señalan que *R. solanacearum* sobrevive mayoritariamente en pH ácido a neutro, mientras que su sobrevivencia se ve mermada en pH alcalinos (Michel y Mew, 1998). Tapiero *et al.* (2007) y Obregón *et al.* (2011) reportaron presencia de *R. solanacearum* raza 2 en suelos con tendencia a la acidificación (pH 4.4- 5.2) en platanales de Colombia. He *et al.* (2014) señalan que *R. solanacearum* tiene un rango pH idóneo entre 6 y 7, con un pH óptimo de ~6.5.

Todos los suelos muestreados en el estado de Tabasco resultaron ser de tipo gleysol; de acuerdo a registros oficiales, estos suelos presentan mal drenaje, por lo que se encuentran en zonas de acumulación y estancamiento de agua. Este tipo de suelos presentan un rango de pH de 5.7-6.2 y contenido de materia orgánica intermedia (INEGI, 2004; Larios y Hernández, 1990). Esta información coincide con el rango de pH moderadamente ácido encontrado en la mayoría de las muestras de suelo de Tabasco de acuerdo a lo presentado en el cuadro 3.1. Los suelos del estado de Chiapas se categorizaron en phaeozem, luvisol y solonchak. El suelo phaeozem es el cuarto tipo de suelo más abundante en el país; se caracteriza por tener una capa superficial oscura, suave, rica en materia orgánica y en nutrientes, lo que genera una extraordinaria actividad biológica; presenta un rango de pH de 5 a 7 (INEGI, 2004). El suelo solonchak se presenta en zonas donde se acumula el salitre, tales como lagunas costeras y lechos de lagos; son ricos en sales, con pH en el rango de fuertemente alcalino (carbonatos) o fuertemente ácidos (sulfatos) (INEGI, 2004). El suelo luvisol se caracteriza por tener enriquecimiento de arcilla, con tendencia a formar floculaciones en presencia de agua y con un rango de pH de 5.5-7 (INEGI, 2004). Como se ha mencionado, el suelo de la mayor parte de los platanales de Tabasco es de tipo gleysol, el cual es predominante arcilloso, y al presentar mal drenaje permitiría la subsistencia y diseminación de la enfermedad, en comparación con los otros tipos de suelo de Chiapas que sí favorecen la filtración del agua. La mayoría de suelos muestreados de Chiapas y Tabasco fueron moderadamente ácidos (pH 5.1-6.5) y neutros (pH 6.6-7.3). Las características de los

suelos tipo gleysol del estado de Tabasco son propicias para *R. solanacearum* y sugieren que el suelo de Tabasco desempeña un papel importante en la diseminación de la enfermedad, explicando la mayor presencia de brotes de Moko en este estado, en comparación con Chiapas. Sin embargo, cabe destacar que el índice de brotes de esta enfermedad es multifactorial debido a que *R. solanacearum* se ve afectada por condiciones como temperatura, lluvias, manejo, la presencia de hospederos alternativos, entre otros (Bocsanczy *et al.*, 2012; Álvarez *et al.*, 2008).

Diferentes razas de *R. solanacearum* difieren en su comportamiento en suelo. Por ejemplo, Graham y Lloyd (1979) reportan que *R. solanacearum* raza 3 biovar 2 tiende a dirigirse a suelos más profundos (55-65 cm). Estos autores infieren que esto le permitiría sobrevivir por un período más largo de tiempo, hasta que las condiciones sean favorables para su desarrollo. Sin embargo Obregón *et al.* (2011) reportan que la mayor detección de población de *R. solanacearum* raza 2 en Colombia, es a un metro de distancia de la planta infectada y en la capa superficial del suelo (0-10 cm), mientras a mayor profundidad (30 cm) disminuye sustancialmente, hasta desaparecer a 50 cm. Cabe destacar que Colombia presenta mayoritariamente *R. solanacearum* raza 2 del secuevar 4 (Gomez *et al.*, 2004). Aunque especulativo, es posible que así como las razas se comporten diferente en el suelo, también lo hagan los diferentes secuevares y por ello las cepas de secuevar 6 descritas en el presente trabajo se distribuyan en el suelo diferente de las del secuevar 4 reportadas en otros trabajos.

La detección del patógeno con la técnica de ELISA presentó falsos positivos, por lo que no se recomienda para pre-escrutinio. Por el contrario, el resultado de las inmuntiras fue congruente con la detección posterior por PCR, por lo que resulta adecuada para hacer pre-escrutinio rápido de muchas muestras. Resultados similares fueron obtenidos por Álvarez *et al.* (2008) al analizar suelos y tejido vegetal contaminado con *R. solanacearum* raza 2. Eriksson y Aspan (2007) al evaluar muestras fecales de cerdo para detección de Salmonela por PCR y ELISA señalan discrepancia entre los resultados de ambas técnicas, y lo atribuyen a la falta de especificidad de los anticuerpos utilizados, lo que deja ver que la problemática del inmunodiagnóstico, que no es exclusivo de *R. solanacearum*. Sin embargo, la combinación de inmuntiras y PCR permitió avanzar exitosamente en el presente trabajo.

El medio SMSA es frecuentemente utilizado para el aislamiento de *R. solanacearum*, siendo de gran utilidad, porque evita el crecimiento de muchos otros microorganismos (Cardozo *et al.*, 2010; Álvarez *et al.*, 2008; Kelman, 1954). Sin embargo, se ha reportado el crecimiento de otros microorganismos saprófitos en este medio (Kalpage y De Costa, 2015; Champoiseau *et al.*, 2010) de los géneros *Klebsiella* y *Pseudomonas* como bacterias contaminantes comunes (Nasim, 2011). Las bacterias gram-negativas de los géneros *Klebsiella*, *Erwinia* y *Pseudomonas* son endófitas mayoritarias en plátano; así como otras especies del género *Ralstonia*, como es el caso de *Ralstonia mannitolilytica* (Souza *et al.*, 2013; Ganen *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2008). Esto coincide con resultados obtenidos en el presente trabajo, donde en los primeros ensayos se recuperaban colonias de *Pseudomonas* y ninguna *R. solanacearum*. Ramesh *et al.* (2009) señalan que las bacterias del género *Pseudomonas* se presentan como organismos endofíticos, antagonistas u oportunistas de *R. solanacearum* durante la colonización del hospedero. Es por ello que el uso del medio B de King es una herramienta útil para discernir entre *R. solanacearum* (no fluorescentes) y *Pseudomonas* spp. (fluorescentes). Las tres especies de *Pseudomonas* identificadas en el presente trabajo han sido reportadas por su uso como agentes de bioremediación (*Pseudomonas citronellolis*) o biocontrol (*Pseudomonas fulva* y *Pseudomonas aeruginosa*) (Izzeddin y Medina, 2011; Mafia *et al.*, 2009; Bhattacharya *et al.*, 2003).

El multiplex para identificar entre los secuevares 3, 4 y 6 dentro de la raza 2 (*i.e.* cepas causantes de Moko en plátano) fue generado por Fegan y Prior (2005), y ha sido usado para clasificar cepas en Martinica (Wicker *et al.*, 2009; Wicker *et al.*, 2007), Colombia (Álvarez *et al.*, 2008), Estados Unidos (Hong *et al.*, 2012), La Guayana francesa (Deberdt *et al.*, 2013), Brasil (Albuquerque *et al.*, 2014), entre otros. En los reportes que muestran los resultados electroforéticos de los análisis de los productos de PCR, se puede observar en algunos carriles bandas inespecíficas adicionales a la banda diagnóstica (Albuquerque *et al.*, 2014; Hong *et al.*, 2012; Álvarez *et al.*, 2008), como lo observado en el presente trabajo de México. Incluso el análisis de un mismo secuevar muestra discrepancias entre los diferentes grupos de investigación. El secuevar 4 amplifica 2 bandas en el Multiplex de Moko, pero los tamaños de las bandas se aprecian diferentes en el reporte de Álvarez *et al.*, (2008) y el de Albuquerque *et al.*, (2014), a pesar de que en ambos trabajos utilizaron los mismos cebadores y geles de agarosa de la misma concentración (1.5%p/v). Aunque

las razones de las inconsistencias no son del todo claras, algunas de las diferencias se han convertido en herramientas de diagnóstico. Por ejemplo, muchas cepas del secuevar 4 producen la banda de 351 pb con los cebadores Mus06, pero adicionalmente amplifican una banda de 167pb (Álvarez *et al.*, 2008), mientras que algunas cepas del secuevar 4, aisladas en Florida en 2008, no producen la banda diagnóstica de 351pb, sino únicamente la banda inespecífica de 167pb, con lo que los autores proponen que las cepas de Florida que amplifican la banda de 167pb son cepas emergentes (Hong *et al.*, 2012).

En el presente trabajo el diagnóstico por Multiplex fue ambiguo. En el caso de las cepas que amplificaron la banda de 221pb (secuevar 6), fue una banda única (figura 3.21, carriles 2, 4, 6, 8,12), contrario al resultado de Albuquerque *et al.*, (2014) que obtuvieron 2 bandas para la cepa IBSBF2661 (secuevar 6), pero similar a lo obtenido por Hong *et al.*, (2012), quienes también obtuvieron una sola banda para la cepa 527 (secuevar 6) en la Multiplex de Moko. Con algunas cepas mexicanas se observó amplificación de la banda de diagnóstico esperada para el secuevar 3 (400pb, carril 11) y secuevar 4 (351pb, 167pb, carriles 1 y 3), pero otras bandas observadas también en esos mismos carriles no coinciden con los resultados de ninguno de los trabajos previamente reportados para el Multiplex de cepas de Moko (figura 3.21, carriles 5, 7, 10), es decir son bandas nuevas. La banda nueva de ~850 pb amplifica en diferentes cepas (figura 3.21, carriles 5 y 7), lo que sugiere que tienen una base genética, y refleja la diversidad en las poblaciones de *R. solanacearum*. Es difícil interpretar con más detalle estos resultados porque los cebadores de diagnóstico amplifican bandas marcadoras, pero es desconocida la función de esas regiones genómicas en el microorganismo (Deberdt *et al.*, 2014).

La presencia de productos de PCR nuevos y reproducibles en diferentes cepas pudiera interpretarse como emergencia de nuevas cepas de *R. solanacearum* en Tabasco y Chiapas, como fue propuesto para las cepas de Florida, que presentaron resultados atípicos en este diagnóstico Multiplex (Hong *et al.*, 2012). Sin embargo, debido a la ambigüedad de resultados, se realizó la PCR individual para cada secuevar; en este caso no se obtuvo amplificación de ninguna cepa para los secuevares 3 y 4 (datos no mostrados). Todas las cepas aisladas en Tabasco y Chiapas pertenecen al secuevar 6 (figura 3. 22). Una recomendación obvia que surge del presente trabajo es no basarse en resultados del Multiplex de Moko para proponer emergencia de nuevas cepas de *R.*

solanacearum.

Las plantas de plátano cv enano gigante al ser inoculadas con las cepas aisladas presentaron un decaimiento a partir de la segunda semana, hasta llegar a la desecación 45-60 días postinoculación, concordando con lo descrito por varios autores (Zulperi *et al.*, 2016; Hurtado, 2012; EPP/EPPO, 2004). Sin embargo, las cepas MC01 y MC02 no generaron sintomatología en las plantas inoculadas. En Martinica, Wicker *et al.* (2007) reportaron el aislamiento de cepas de diferentes hospederos, incluyendo el plátano (plátano de cocimiento), que eran no-patógenas para el plátano (IIB / 4NPB). Esas cepas no pudieron causar la enfermedad de Moko en plátano Cavendish (AAA) ni en plátano (AAB). Ellos observaron que de las plantas inoculadas de plátano, fue posible recobrar aislados de pseudotallo, corno y raíces; sin embargo, en el cultivar Cavendish inoculado sólo fue posible recuperar del pseudotallo. Nuestros resultados en cultivar gran enano (Cavendish) fueron similares, en las plantas inoculadas la cepa MC01 sólo se detectó cerca de la zona de inoculación, y la cepa MC02 se detectó en corno y pseudotallo, pero se detectó en menos área que las cepas patógenas; y no generó síntomas de marchitamiento en las plantas. Esto coincide con lo reportado por Zhu *et al.* (2004) quienes señalan que las cepas avirulentas tienden a desarrollarse más rápido durante las primeras 24 h, en comparación con las cepas virulentas, y posteriormente su colonización disminuye significativamente, mientras que la población de bacterias virulentas tiende a aumentar.

Las cepas NPB de Martinica son altamente infecciosas y generan marchitamiento en pimiento y tomate. Se cree que IIB-4NPB surgió de IIB-4 cuando las plantas musáceas y cucurbitáceas se cultivaron en sucesión (Wicker *et al.*, 2009). Esta hipótesis se apoya también en el estudio comparativo del genoma de distintos ecotipos de *R. solanacearum* (Ailloud *et al.*, 2015). Durante la adaptación a un nuevo huésped, las cepas deben superar sus defensas químicas y producir toxinas dirigidas a objetivos blancos del hospedero. La adaptación a un nuevo huésped implica la ganancia y la pérdida de las vías metabólicas necesarias. Por ejemplo, el genoma de las cepas 4NPB ha perdido el gen *ripAA*, que codifica *avrA*, una proteína efectora con función de ubiquitinación en el hospedero y se encuentra altamente conservada en RSSC (Perrett *et al.*, 2011, Poueymiro *et al.*, 2009). Esta proteína es reconocida por las plantas de tabaco y desencadena respuestas

hipersensibles (Poueymiro *et al.*, 2009). Las cepas que tienen *avrA* no son patógenas para el anturio (Ailloud *et al.*, 2015) lo que sugiere que esta planta tiene la proteína cognado de resistencia (R) para *avrA*. La pérdida de *avrA* sería crucial para cambiar la patogenicidad de plátano para anturio. Por otra parte, la ganancia de material genético en *R. solanacearum* es frecuente, debido a que la bacteria se convierte en competente durante el proceso de infección y puede intercambiar por transferencia horizontal grandes cantidades de material genético (fragmentos de ADN de 30 a 90 kb). Esto es tan frecuente, que el 16% del contenido del genoma podría haber sido adquirido horizontalmente (Coupat *et al.*, 2008; Bertolla *et al.*, 1999). Por lo tanto, la adquisición de nuevos rasgos patógenos puede ser favorecida por la interacción con un nuevo huésped, y la convivencia con microorganismos actualmente virulentos para ese hospedero. Los cultivos previos, la rotación y hábitats naturales circundantes son factores clave en la aparición de nuevas cepas. En el caso del filotipo IIA la aparición de nuevos ecotipos se ve favorecida por la interacción de las cepas con las plantas en los bosques (Deberdt *et al.*, 2013). Chiapas tiene una gran selva densa y tropical, con una alta diversidad de plantas que incluyen *Heliconia* sp. por lo tanto, las condiciones ecológicas son favorables para la aparición de nuevas cepas de *R. solanacearum* IIA como 6NPB. Esta hipótesis deberá ser evaluada en futuras colectas en la selva y en zonas productivas de Chiapas.

Las pruebas de hipersensibilidad en tabaco revelan incompatibilidad de todas las cepas patogénicas secuestradas 6 aisladas en este estudio, como se esperaba para la raza 2 (Granada y Sequeira, 1975; Lozano y Sequeira, 1969). MC01 y MC02, que no fueron patógenos para las plantas de plátano, desencadenaron la respuesta hipersensible cuando se inocularon en las hojas de tabaco, lo que sugiere presencia del gen *avrA* y que la adaptación a un nuevo huésped no se produce en plantas solanáceas. De igual forma, ambas cepas generaron un amplicon con el juego de cebadores ISRso19 diseñados para identificación de raza 2 patogénica (Lee y Chin, 2003), con lo cual se puede inferir que las cepas MC01 y MC02 se encuentran en un estado de cambio temprano en el que algunas regiones génicas han variado, como es el caso de *pga* y *hrpB*. En el mismo estudio de Lee y Chin se describe que dichos cebadores detectan cepas patogénicas, abriendo la posibilidad de que dichas cepas posean otro hospedero. Es importante extender la investigación a las arvenses y *Heliconia* spp en Chiapas, así como realizar las pruebas de patogenicidad del IIA / 6NBP en otros hospederos, para prevenir nuevos brotes

epidémicos debido a cepas emergentes.

La caracterización del secuevar por PCR concordó con el árbol generado con base en el gen *egl*. Las cepas de Moko mexicanas se ubicaron en el agrupamiento del Filotipo IIA secuevar 6, UW588 de Guatemala, UW181 de Venezuela y UW21 de Honduras, descritas como SFR, cepas transmitidas por insectos (Sanchez *et al.*, 2008; Prior y Fegan, 2005b) y con la cepa IBSBF2661 de Brasil, las cepas RUN393 y GMI8044 de Granada y A3909 de los EE.UU. Todas estas cepas se han genotipificado dentro del secuevar 6. El secuevar 6 SFR transmitido por insectos (equivalente a MLG 28 por Cook *et al.* (1989) se desarrolló en Venezuela (Fegan y Prior, 2005b) y luego se introdujo accidentalmente en Honduras en 1961 por una empresa transnacional, causando una de las epidemias más devastadoras de la historia del cultivo de plátano en América Central. Desde Honduras, esta cepa de Moko se trasladó rápidamente al norte y el sur, a México y Panamá (Sequeira, 1998). Por lo tanto, es congruente que las cepas identificadas en México sean del secuevar 6 y con morfología SFR. Este secuevar también está presente en Hawaii (Fegan y Prior, 2005a) y Florida (Hong *et al.*, 2012) en América del Norte, y en Brasil y Colombia en América del Sur (Albuquerque *et al.*, 2014; Cardozo *et al.*, 2010), pero no se ha informado en Martinica (donde existe el secuevar 4).

Honduras, país desde donde la enfermedad de Moko se propagó a México, tiene por lo menos tres de los secuevares de cepas causantes de Moko. Fegan and Prior (2005b) genotipificaron las cepas CFBP1409 (también llamado JS775) y UW21 (o R371) dentro de los secuevares 3 y 6, respectivamente, y más tarde, Cellier y Prior (2010) encontraron el secuevar 4 (cepa CFBP1184); por lo tanto, las cepas de Moko en Honduras pertenecen a ambos sub-filotipos, IIA y IIB. En otros países también se encuentran múltiples genotipos de las cepas Moko. Por ejemplo en Costa Rica existen los secuevares 3, 4 (Fegan y Prior, 2005a) y 6 (Raymundo *et al.*, 1998); en Brasil, las cepas que causan Moko pertenecen a los secuevares 6, 24, 25, 41 y el nuevo secuevar 53 (Albuquerque *et al.*, 2014). En México ninguna de las cepas del filotipo IIA aisladas en este estudio pertenecen a los secuevares 24, 41 y 51 o al filotipo IIB secuevares 3, 4 y 25. Todas las cepas aisladas en este estudio pertenecen al secuevar 6, lo que sugiere que éste es actualmente el único secuevar causante de Moko en las plantaciones de plátano en México, o al menos el prevalente.

Antes de este estudio, la cepa mexicana *Ralstonia solanacearum* de referencia en muchos trabajos fue Po82. Esta cepa fue aislada a partir de papa y recientemente fue secuenciada por Xu *et al.* (2011). Estos autores filotipificaron esta cepa como IIB-4 y con patogenicidad para plantas solanáceas y plátano. Aunque las cepas IIB secuevar 4 son cepas de Moko, curiosamente, ninguna cepa aislada en México durante 2013-2015 a partir de plátano pertenece al secuevar 4. El área específica de aislamiento de la cepa Po82 no se informa en los artículos, pero la papa se cultiva en el norte de México, en áreas con un rango de temperatura de 12-18°C (Sonora y Sinaloa) (SIAP, 2014), mientras que Chiapas y Tabasco son regiones tropicales ubicadas en el sureste. Es probable, por tanto, que las diferencias en el clima y las montañas de más de 2.400 metros sobre el nivel del mar en Chiapas, evitaran la dispersión del secuevar 4 desde el norte hasta el sur de México. Recientemente Liu *et al.*, (2016) publicaron que la orografía en China ha estructurado la distribución de secuevares de *R. solanacearum*, lo cual apoya nuestra hipótesis para explicar la ausencia de secuevar 4 en el Sureste.

Los eventos de recombinación se producen dentro y fuera de los mismos filotipos ó secuevares (Wicker *et al.*, 2012), lo que podría hacer que el control de Moko sea más complicado en los países en los que hay múltiples secuevares. En México la enfermedad Moko está presente en los dos Estados de mayor producción de plátano, Tabasco y Chiapas, mientras que la mayoría de los otros estados productores de plátano se encuentran libres de esta enfermedad. Es esencial mantener la vigilancia y evitar la entrada de nuevas cepas de Moko, ya que la historia ha mostrado los devastadores efectos causados por la llegada de cepas nuevas (Sequeira, 1998), lo que haría el control de Moko aún más difícil en México.

Todas las cepas aisladas en el presente trabajo tienen alta identidad en la secuencia de *egl*. Similarmente, Sánchez *et al.*, (2008) informaron homogeneidad en todas las cepas de Moko aisladas en plantaciones de plátano en las zonas costeras de Guatemala; estas también fueron secuevar 6. Basados en ese resultado, esos autores sugieren que Guatemala tiene una línea clonal de las cepas causantes de Moko. En el caso de las cepas mexicanas de Moko, el árbol de *egl* fue incapaz de separar las cepas patógena-en-banana (IIA / 6) de las cepas no patógenas (IIA / 6NPB). Resultados similares fueron obtenidos por Wicker *et al.* (2007) en la genotipificación de las cepas IIB secuevar 4,

mediante la secuenciación de *egl*; donde las cepas NPB y PB quedaron englobadas en el mismo clúster. Recientemente Cellier *et al.*, (2012), mediante comparación de los genomas por hibridación sobre microarreglos del pangenoma del complejo de *R. solanacearum*, fueron capaces de separar en clados hermanos las cepas IIB 4 PB y 4NPB. Desafortunadamente, el alto costo del análisis y el requisito de instalaciones especiales, impiden que este tipo de técnicas ómicas se conviertan en rutina en los estudios filogenéticos de RSSC.

Las cepas de *R. solanacearum* mexicanas se genotipificaron también mediante el análisis de *hrpB* y *pga*. El gen *hrpB* pertenece al genoma nuclear (“core”) de *R. solanacearum*, comportándose como un gen de mantenimiento (“housekeeping”), y es por lo general un marcador neutro (sin cambios en su secuencia en algunos grupos) (Castillo y Greenberg, 2007). El gen *egl* es aceptado como un marcador robusto, y universalmente se le utiliza para estudiar la filogenia de cepas del complejo de *R. solanacearum*. Sin embargo, mientras el análisis de *egl* sugiere una población clonal de las cepas de Moko mexicanas, similar a la propuesta de Sánchez *et al.*, (2008) para las cepas de Guatemala, los árboles basados en las secuencias de *hrpB* y *pga* generaron dos subpoblaciones en las cepas mexicanas de *R. solanacearum* secuevar 6, separando en subclados hermanos a IIA-6NPB y II A-6 PB. Es decir, en nuestro estudio de cepas mexicanas de *R. solanacearum* aisladas de plátano, *egl* se comportó como un marcador neutral y *hrpB* y *pga* fueron informativos. Los resultados de *hrpB* y *pga* contradicen la posibilidad de que estas cepas conformen un linaje clonal, sino que sugieren que las cepas mexicanas de Moko están bajo divergencia. Esto es congruente con las conclusiones de Wicker *et al.* (2012), quienes reportaron que el sub-filotipo IIA es recombinogénico, muy diverso y que se encuentra expandiéndose activamente. En consecuencia, no se recomiendan los estudios filogenéticos basados en un sólo gen, ya que el resultado refleja la evolución del gen y no la historia de la especie (Hong *et al.*, 2012).

En nuestro estudio, para facilitar la amplificación del marcador *hrpB* fue importante la realización de la PCR anidada con el juego de cebadores HrpBnest, debido a que la amplificación de *hrpB* con cebadores RShrpBf-F / RShrpBf-R era pobre; el rendimiento de la PCR fue mejor mediante la realización de PCR anidada. Para ese fin, en este estudio se diseñó un nuevo par de cebadores; para disminuir la pérdida de información, cada

cebador anidado fue diseñado cerca del extremo respectivo en la primera amplificación. Esta estrategia permitió evitar la clonación antes de la secuenciación, ahorrar tiempo y disminuir el costo del análisis. Recientemente, Stulberg y Huang (2016) reportaron una estrategia similar para el gen *egl* y el árbol filogenético fue congruente con la topología conocida, apoyando que la PCR anidada es una opción técnica adecuada en estudios genéticos de RSSC.

Cellier *et al.*, (2015), compararon genomas de 111 cepas relacionadas con Moko, con representatividad de toda la diversidad conocida en ese momento, incluyendo las cepas brasileñas de los secuevares 24, 25, 41 y 53. Desarrollaron un ensayo PCR Duplex capaz de identificar las cepas NPB y las PB en el secuevar 4. Las cepas IIA / 6NBP de México dieron resultados negativos en ese ensayo de PCR dúplex, lo cual se explica porque las cepas son de otro secuevar. Aunque los análisis de los genes *hrpB* y *pga* fueron útiles en la clasificación de las cepas mexicanas de *R. solanacearum* raza 2, la divergencia entre las secuencias de los fenotipos patogénicos y no patogénicos fue muy baja. Sólo se identificaron SNPs, y en consecuencia, no fue posible diseñar cebadores para diagnosticar las cepas IIA-6NPB. Es importante continuar con el estudio de las cepas de *R. solanacearum* de México y generar una herramienta de diagnóstico para IIA / 6NBP, que permita analizar plantas silvestres en pruebas rápidas de campo.

Las cepas del Filotipo II secuevar 4NPB fueron descritas por primera vez en Martinica (Wicker *et al.*, 2007), y posteriormente en Brasil y la Guayana francesa (Deberdt *et al.*, 2013). Las cepas NPB mexicanas se encontraron en un clúster diferente (IIA-6) del reportado previamente para las cepas NBP (II B-4). Es decir, en el presente trabajo se identificaron por primera vez cepas no patógenas para plátano en el grupo IIB-6, indicando que las cepas MC01 y MC02 son nuevas y amplían la diversidad fenotípica y genética en América en el filotipo II de *R. solanacearum*. Junto con IIA-4NPB, las cepas mexicana IIA-6NBP forman un modelo para abordar cuestiones relativas a la especificidad del hospedero, la aparición de nuevas cepas y la divergencia genómica, así como la ganancia y la pérdida de genes de patogenicidad. Las herramientas genómicas y post genómicas ayudarán a desentrañar en un futuro estas importantes cuestiones relacionadas con el complejo de *R. solanacearum*.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

5.1 Conclusiones

La detección con ELISA mostró una alta frecuencia de falsos positivos, pero no generó falsos negativos, por lo que se aconseja como herramienta inicial para diagnóstico de muestras con síntomas de enfermedades causadas por *R. solanacearum*. De igual forma, el uso de inmunitiras es adecuado para realizar diagnóstico rápido de *R. solanacearum*, pudiéndose utilizar en campo como una forma rápida y fácil de detección.

Todas las cepas aisladas en el presente trabajo pertenecen al Filotipo IIA, secuevar 6. Es posible que este secuevar sea el único responsable de Moko en México, o al menos es el prevalente.

El secuevar 6 presente en México tiene relación con las cepas de Venezuela (UW181), Guatemala (UW588) y Honduras (UW21), Siendo este último país el posible lugar de procedencia de las cepas mexicanas.

La región analizada del gen marcador *egl* fue idéntica entre las cepas de *R. solanacearum* mexicanas, mientras que los genes *pga* y *hrpB* presentaron polimorfismo tipo SNPs entre las cepas 6PB y 6NPB.

La identificación en México de cepas IIA-6NPB sugiere que las cepas de Moko se encuentran actualmente en divergencia fenotípica y/o genética en este país, posiblemente transitando a adaptarse a nuevos hospederos, como se ha reportado para las cepas IIB-4NPB en otros países.

5.2 Perspectivas

El tipo de suelo predominante en las plantaciones de plátano de Tabasco es determinante en la sobrevivencia y diseminación de la enfermedad. Es por ello que las prácticas culturales tales como eliminación de arvenses y residuos, desinfección de herramientas y calzado, manejo adecuado de nutrientes y pH, sistemas eficientes de riego y desagüe son de vital importancia para la eliminación de *Ralstonia solanacearum*. Estas medidas se deben de priorizar en el estado de Tabasco debido a la edafología del mismo. De igual forma es necesaria la eliminación de las inflorescencias o su embolse, y control de insectos, para prevenir la transmisión de la enfermedad por insectos vectores.

En este trabajo se encontró únicamente el secuevar 6, por lo que es importante implementar medidas que eviten la entrada de otros secuevares, presentes en otros países de Centro y Suramérica. Históricamente se ha visto que la entrada de nuevos secuevares a un país le causa pérdidas masivas de hectáreas de plátano.

Es importante continuar la caracterización de las cepas mexicanas de *R. solanacearum* raza 2 para lograr diseñar herramientas de diagnóstico temprano que permitan disminuir el riesgo en la evaluación de tratamientos en campo para el control de Moko. Esto permitirá encontrar alternativas efectivas para el manejo de Moko. Es importante también realizar estudios epidemiológicos de las cepas no patógenicas en banano; identificar si está ocurriendo un cambio de hospedero, con el fin de prevenir brotes epidémicos en otros cultivos de importancia agrícola.

BIBLIOGRAFÍA

- Ailloud, F., Lowe, T., Cellier, G., Roche, D., Allen, C. y Prior, P. (2015). Comparative genomic analysis of *Ralstonia solanacearum* reveals candidate genes for host specificity. *BMC Genomics*, 16, 1-11.
- Aino, M. (2016). Studies on biological control of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* using endophytic bacteria. *Journal of General Plant Pathology*, 82, 323-325.
- Albuquerque, G. M. R., Santos, L. A., Felix, K. C. S., Rollemberg, C. L., Silva, A. M. F., Souza, E. B., Cellier, G., Prior, P. y Mariano, R. L. R. (2014). Moko disease-causing strains of *Ralstonia solanacearum* from Brazil extend known diversity in paraphyletic phylotype II. *Phytopathology*, 104, 1175-1182.
- Alvarado-Ortiz, A. y Diaz, M. (2007). Guía practica de plagas y enfermedades en plátano y guineo. Colegio de Ciencias Agrícolas, 1-39.
- Álvarez-Restrepo, J., Rodríguez-Gaviria, P. y Marín-Montoya, M. (2008). Detección molecular de *Ralstonia solanacearum* en agrosistemas bananeros de Colombia. *Tropical Plant Pathology*, 33, 197-203.
- Álvarez, B., Biosca, E. G. y López, M. M. (2010). On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. *Current Research, Technology and Educational Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 267-279.
- Álvarez, B., López, M. M. y Biosca, E. G. (2008). Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms. *Microbiology*, 154, 3590-3598.
- Alvarez, E. (2008). Fortalecimiento de cadenas de valor de plátano: innovaciones tecnológicas para reducir agroquímicos. *Fontagro*, 1-22.
- Alvarez, E., Llano R, G. A., Loke, J. B. y González, A. (2007). Nuevas alternativas para el manejo del moko de plátano. *Asiava*, 78, 12–15.

BIBLIOGRAFÍA

- Aspiras, R. B. y Cruz, A. R. D. L. (1985). Potential biological control of bacterial wilt in tomato and potato with *Bacillus polymyxa* FU6 and *Pseudomonas fluorescens*. Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Los Banos, Filipinas: Persley.
- Bertolla, F., Frostegård, Å., Brito, B., Nesme, X. y Simonet, P. (1999). During infection of its host, the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* naturally develops a state of competence and exchanges genetic material. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12, 467-472.
- Bhattacharya, D., Sarma, P. M., Krishnan, S., Mishra, S. y Lal, B. (2003). Evaluation of genetic diversity among *Pseudomonas citronellolis* strains isolated from oily sludge-contaminated sites. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1435-1441.
- Bocsanczy, A. M., Achenbach, U. C., Mangravita-Novo, A., Yuen, J. M. y Norman, D. J. (2012). Comparative effect of low temperature on virulence and twitching motility of *Ralstonia solanacearum* strains present in Florida. *Phytopathology*, 102, 185-94.
- Cardozo, C., Rodríguez, P., Cotes, J. M. y Marín, M. (2010). Variabilidad genética de la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Burkholderiales: Burholderiaceae) en la zona bananera de Urabá (Colombia). Genetic variability of the bacterium *Ralstonia solanacearum* (Burkholderiales: Burholderiaceae) in the banana-growing region of Uraba (Colombia). *Revista de Biología Tropical*, 58, 31-44.
- Carter, R. (1993). *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Taylor y Francis, second edition. pp.198.
- Castañeda Sánchez, D. A. y Espinosa Orrego, J. A. (2005). Comportamiento e impacto de la enfermedad de moko en la zona de urabá (Colombia), en las últimas tres décadas y media y propuesta de un índice de riesgo de la enfermedad. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 58, 2587-2599.
- Castillo, J. A. y Greenberg, J. T. (2007). Evolutionary dynamics of *Ralstonia solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1225-1238.
- Cellier, G. y Prior, P. (2010). Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum*

- strains pathogenic to potato. *Phytopathology*, 100, 1250-61.
- Coenye, T. y Vandamme, P. (2003). Simple sequence repeats and compositional bias in the bipartite *Ralstonia solanacearum* GMI1000 genome. *BMC Genomics*, 4, 10.
- Cook, D., Barlow, E. y Sequeira, L. (1989). Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment polymorphism with DNA probes that specify virulence and hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2, 113-121.
- Coupat, B., Chaumeille-Dole, F., Fall, S., Prior, P., Simonet, P., Nesme, X. y Bertolla, F. (2008). Natural transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and size of DNA that can be transferred. *FEMS Microbiology Ecology*, 66, 14-24.
- CVCA 2010. Monografía del plátano. Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria, 1-23.
- Champoiseau, P. (2009). *Ralstonia solanacearum* raza 3 biovar 2. University of Florida, AFAS Extension, 1-15.
- Champoiseau, P., Jones, J., Momol, T., Pingsheng, J., Allen, C., Norman, D., Harmon, C., Miller, S., Schubert, T. y Bell, D. (2010). *Ralstonia solanacearum* Race 3 biovar 2 causing brown rot of potato, bacterial wilt of tomato and southern wilt of geranium. Madison: American Phytopathological Society. Disponible en http://plantpath.ifas.ufl.edu/rsol/NRI_Project/Projectsummary.html (acceso 25 junio 2010).
- Cheesman, E. E. (1947). Classification of the Bananas: The Genus *Musa* L. *Kew Bulletin*, 2, 106-117.
- Chen, J., Li, S., Luo, J., Wang, R. y Ding, W. (2016a). Enhancement of the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles against Phytopathogenic Bacterium *Ralstonia solanacearum* by Stabilization. *Journal of Nanomaterials*, 2016, 15.
- Chen, J., Yu, Y., Li, S. y Ding, W. (2016b). Resveratrol and Coumarin: Novel Agricultural Antibacterial Agent against *Ralstonia solanacearum* *In Vitro* and *In Vivo*.

- Molecules, 21, 1501.
- Daniells, J. W. (2001). Musalogue, a Catalogue of Musa Germplasm: Diversity in the Genus Musa, INIBAP. pp. 207.
- Deberdt, P., Guyot, J., Coranson-Beaudu, R., Launay, J., Noreskal, M., Riviere, P., Vigne, F., Laplace, D., Lebreton, L. y Wicker, E. (2013). Diversity of *Ralstonia solanacearum* in French Guiana expands knowledge of the "emerging ecotype". *Phytopathology*, 104, 586-96.
- Denny, T. (2006). Plant pathogenic *Ralstonia* species plant-associated bacteria. En: GNANAMANICKAM, S. (ed.). Springer Netherlands. pp. 56.
- Eden-Green, S. J. y Seal, S. E. (1993). Bacterial diseases of banana and plantain in Southeast Asia. *International Symposium on Genetic Improvement of Bananas for Resistance to Diseases and Pests*. Montpellier (France): CIRAD-FLHOR. 115-121.
- EPPO. (2015). PQR - EPPO database on quarantine pests (disponible online). <http://www.eppo.int>.
- Eriksson, E. y Aspan, A. (2007). Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for salmonella detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. *BMC Veterinary Research*, 3, 1-19.
- FAO. (2000). Manual de prácticas integradas de manejo y conservación de suelos, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- FAO. (2016). *FAOSTAT* database collections [Online]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. [Acceso 4 julio 2016].
- Farag, N. S., Fawzi, F. G., El-Said, S. I. A. y Mikhail, M. S. (1986). Streptomycin in relation to potato brown rot control. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 21, 115-122.
- Farag, N. S., Lashin, S. M., Abdel-All, R. S., Shatta, H. M. y Seif-Elyazal, A. M. (1982). Antibiotics and control of potato black leg and brown rot diseases. *Agricultural*

Research Review, 60, 149-166.

Fegan, M. y Prior, P. (2005a). How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”. En: Allen, C., Prior, P. y Hayward, A. C. (eds.) *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. St Paul, MN: APS Press.

Fegan, M. y Prior, P. (2005b). Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana. *Australasian Plant Pathology*, 35, 93-101.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 783-791.

Ganen, S. T. S., Nietsche, S., Pereira, M. C. T., Reis, S. T., Xavier, A. A., Santos, T. M. y Fernandes, T. P. (2009). Microbial contamination in explants of banana cultivars 'galil 18' and 'tropical'. *International Society for Horticultural Science (ISHS)*, Leuven, Belgium, 341-344.

Genin, S. y Boucher, C. (2002). *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. *Molecular Plant Pathology*, 3, 111-118.

Genin, S. y Denny, T. P. (2012). Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. *Annual Review of Phytopathology*, 50, 67-89.

Gomez C., E., Alvarez, E. y Llano, G. (2004). Identificación y caracterización de cepas de *Ralstonia solanacearum* Raza 2, Agente causante del Moko de plátano en Colombia. *Fitopatología Colombiana*, 28, 71-75.

Googlemaps. (2016). Mexico [Online]. United States: Alphabet Inc. [Acceso 5 julio 2016].

Gracia Medrano, R. M. E. e Islas Flores, I. R. (2012). Plátanos y bananos en Yucatán, una perspectiva local acerca de su potencial de cultivo, producción y comercialización, Yucatán, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Graham, J. y Lloyd, A. (1979). Survival of potato strain (race 3) of *Pseudomonas solanacearum* in the deeper soil layers. *Australian Journal of Agricultural Research*, 30, 489-496.

BIBLIOGRAFÍA

- Granada, G. y Sequeira, L. (1975). A hypersensitive reaction induced in tobacco leaves by a compatible (race 1) isolate of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 65, 731-733.
- Guidot, A., Prior, P., Schoenfeld, J., Carrère, S., Genin, S. y Boucher, C. (2007). Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. *Journal of Bacteriology*, 189, 377-387.
- Hayward, A. C. (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas Solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 29, 65-87.
- He, K., Yang, S. Y., Li, H., Wang, H. y Li, Z. L. (2014). Effects of calcium carbonate on the survival of *Ralstonia solanacearum* in soil and control of tobacco bacterial wilt. *European Journal of Plant Pathology*, 140, 665-675.
- He, L. Y., Sequeira, L. y Kelman, A. (1983). Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Disease*, 67, 1357-1361.
- Hernández, J. J. (2010). Análisis de la diversidad genética de *Ralstonia solanacaerum* y su relación con la virulencia en Plátano, Amenaza en Venezuela. *Producción Agropecuaria*, 3, 19-30.
- Hong, J. C., Norman, D. J., Reed, D. L., Momol, M. T. y Jones, J. B. (2012). Diversity among *Ralstonia solanacearum* strains isolated from the southeastern United States. *Phytopathology*, 102, 924-936.
- Hurtado Londoño, R. (2012). Caracterización de síntomas de la enfermedad de Moko en invernadero y campo cuando se simulan labores que causen heridas en plantas de banano y plátano. *CENIBANANO, Boletín Técnico*, 1-13.
- INEGI (2004). Guía para la interpretación de cartografía edafología. *En: INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y GEOGRAFÍA*, M. (ed.).
- Iriarte, F. B., Balogh, B., Momol, M. T., Smith, L. M., Wilson, M. y Jones, J. B. (2007). Factors Affecting Survival of Bacteriophage on Tomato Leaf Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1704-1711.

-
- Izzeddin A, N. y Medina T, L. (2011). Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. *Salus*, 15, 8-12.
- Jones, D. R. (2000). *Diseases of Banana, Abaca and Enset*, CABI.
- Jukes, T. H. y Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. *Mammalian protein metabolism*, 3, 132.
- Kalpage, M. y De Costa, D. (2015). Isolation of bacteriophages and determination of their efficiency in controlling *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt of tomato. *Tropical Agricultural Research*, 26.
- Larios Romero, J. Y Hernández, J. (1990). Zonificación fisiográfica del estado de Tabasco. *Revista de Geografía Agrícola* 20-32.
- Lee, Y.A. y Chin, N.K. (2003). A novel Insertion sequence, ISRso19, isolated from *Ralstonia solanacearum* and its application to race differentiation. *Plant Pathology Bulletin*, 12, 57-64.
- Lozano, J. C. y Sequeira, L. (1969). Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infiltration technique. *Phytopathology*, 60, 833-838.
- Mafia, R. G., Alfenas, A. C., Maffia, L. A., Ferreira, E. M., Binoti, D. H. B. y Mafia, G. M. V. (2009). Plant growth promoting rhizobacteria as agents in the biocontrol of eucalyptus mini-cutting rot. *Tropical Plant Pathology*, 34, 10-17.
- Messiha, N. A. S., Van Bruggen, A. H. C., Franz, E., Janse, J. D., Schoeman-Weerdesteijn, M. E., Termorshuizen, A. J. y Van Diepeningen, A. D. (2009). Effects of soil type, management type and soil amendments on the survival of the potato brown rot bacterium *Ralstonia solanacearum*. *Applied Soil Ecology*, 43, 206-215.
- Michel, V. V. y Mew, T. W. (1998). Effect of a Soil Amendment on the Survival of *Ralstonia solanacearum* in Different Soils. *Phytopathology*, 88, 300-305.
- Minton, L. (2016). Are We Near an Imminent Banana Crisis? Spentmatters.
- Murakoshi, S. y Takahashi, M. (1984). Trials of some control of tomato wilt caused by

BIBLIOGRAFÍA

- Pseudomonas solanacearum*. Bulletin of the Kanagawa Horticultural Experiment Station, 31, 50-56.
- Nasim, B. (2011). Biological Diversity Of *Ralstonia Solanacearum* Strains Causing Bacterial Wilt Of Solanaceous Crops In Pakistan. PMAS-Arid Agriculture University, Rawalpindi.
- Nwakanma, D., Pillay, M., Okoli, B. y Tenkouano, A. (2003). Sectional relationships in the genus *Musa* L. inferred from the PCR-RFLP of organelle DNA sequences. TAG Theoretical and Applied Genetics, 107, 850-856.
- Obregón Barrios, M., Rodríguez Gaviria, P. y Salazar Yepes, M. (2011). Supervivencia de *Ralstonia solanacearum* en suelo y tejido de plantas de banano en Urabá, Colombia. Fitosanidad, 15, 91-97.
- OEPP/EPPO (2004). Diagnostic protocols for regulated pests. OEPP/EPPO Bulletin, 34, 173-178.
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M. y Team, T. U. (2012). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28, 1166-1167.
- Orozco Santos, M., Farías Larios, J., Manzo Sánchez, G. y Guzmán González, S. (2001). La Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en México. Infomusa, 10, 33-40.
- Osmark, E. H. (1974). Economic Insect pest of bananas. Annual Review Entomology, 19, 161-176.
- Palleroni, N. J. y Doudoroff, M. (1971). Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Bacteriology, 107, 690-696.
- Peeters, N., Guidot, A., Vaillieu, F. y Valls, M. (2013). *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. Molecular Plant Pathology, 14, 651-662.

- Perrett, C. A., Lin, D. Y.-W. y Zhou, D. (2011). Interactions of bacterial proteins with host eukaryotic ubiquitin pathways. *Frontiers in Microbiology*, 2, 143.
- Poueymiro, M., Cunnac, S., Barberis, P., Deslandes, L., Peeters, N. y Cazale Noel, A. C. (2009). Two type III secretion system effectors from *Ralstonia solanacearum* GMI1000 determine host-range specificity on tobacco. *Mol Plant Microbe Interact*, 22.
- Poussier, S., Prior, P., Luisetti, J., Hayward, C. y Fegan, M. (2000). Partial Sequencing of the *hrpB* and Endoglucanase Genes Confirms and Expands the Known Diversity within the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. *Systematic and Applied Microbiology*, 23, 479-486.
- Pradhanang, P. M., Ji, P., Momol, M. T., Olson, S. M., Mayfield, J. L. y Jones, J. B. (2005). Application of Acibenzolar-S-Methyl Enhances Host Resistance in Tomato Against *Ralstonia solanacearum*. *Plant Disease*, 89, 989-993.
- Prior, P., Ailloud, F., Dalsing, B. L., Remenant, B., Sanchez, B. y Allen, C. (2016). Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. *BMC Genomics*, 17, 1-11.
- Prior, P., Allen, C. y Elphinstone, J. (1998). *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*, Springer.
- Prior, P. y Fegan, M. (2005). Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. *Acta Horticult*, 695.
- Purseglove, J. W. (1973). *Tropical Crops: Monocotyledons*, John Wiley y Sons Canada, Limited.
- Ramesh, R., Joshi, A. y Ghanekar, M. (2009). Pseudomonads: major antagonistic endophytic bacteria to suppress bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum* in the eggplant (*Solanum melongena* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 47-55.
- Raymundo, A. K., Aves-Ilagan, Y. y Denny, T. P. (1998). Analysis of genetic variation of a

- population of banana infecting strains of *Ralstonia solanacearum*. En: Prior, P., Allen, C. y Elphinstone, J. (eds.) Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Remenant, B., Cambiaire, J. C., Cellier, G., Jacobs, J. M., Mangenot, S. y Barbe, V. (2011). *Ralstonia syzygii*, the Blood Disease Bacterium and some Asian *R. solanacearum* strains form a single genomic species despite divergent lifestyles. PLoS One, 6.
- Remenant, B., Coupat-Goutaland, B., Guidot, A., Cellier, G., Wicker, E., Allen, C., Fegan, M., Pruvost, O., Elbaz, M., Calteau, A., Salvignol, G., Mornico, D., Mangenot, S., Barbe, V., Médigue, C. y Prior, P. (2010). Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. BMC Genomics, 11, 1-16.
- Roberts, S. J., Eden-Green, S. J., Jones, P. Y Ambler, D. J. (1990). *Pseudomonas syzygii*, sp. nov., the cause of sumatra disease of cloves. Systematic and Applied Microbiology, 13, 34-43.
- Robinson, J. C. y Saúco, V. G. (2010). Bananas and Plantains, CABI.
- Safni, I., Cleenwerck, I., De Vos, P., Fegan, M., Sly, L. y Kappler, U. (2014). Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64, 3087-3103.
- SAGARPA-SE (2005). PC-025-2005 pliego de condiciones para el uso de la marca oficial México calidad suprema en banano cavendish. In: SECRETARÍA DE AGRICULTURA, G., DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN - SECRETARÍA DE ECONOMÍA (ed.). México: SAGARPA-SE.

-
- Saitou, N. y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4, 406-425.
- Sanchez-Perez, A., Mejia, L., Fegan, M. y Allen, C. (2008). Diversity and distribution of *Ralstonia solanacearum* strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection. *Plant Pathology*, 57, 320-331.
- Sayers, E. W., Barrett, T., Benson, D. A., Bryant, S. H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D. M., Dicuccio, M., Edgar, R., Federhen, S., Feolo, M., Geer, L. Y., Helmberg, W., Kapustin, Y., Landsman, D., Lipman, D. J., Madden, T. L., Maglott, D. R., Miller, V., Mizrachi, I., Ostell, J., Pruitt, K. D., Schuler, G. D., Sequeira, E., Sherry, S. T., Shumway, M., Sirotkin, K., Souvorov, A., Starchenko, G., Tatusova, T. A., Wagner, L., Yaschenko, E. y Ye, J. (2009). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 37, D5-D15.
- Schaad, N., Jones, J. y Chun, W. (2001). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, APSnet.
- Seleim, M., F. Saeed, H. Abd-El-Moneem y Abo-Elyousr, M. (2011). Biological Control of Bacterial Wilt of Tomato by Plant Growth Promoting Rhizobacteri. *Plant Pathology Journal*, 10, 146-153.
- SENASICA (2012a). Informe mensual No. 08 (Agosto 2012) de la campaña contra el moko de platano. *SENASICA/Dirección General de Sanidad Vegetal*. México, D.F.: SENASICA.
- SENASICA (2012b). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agropecuaria. *Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx>*, Moko del plátano, Acceso Septiembre 2012.
- SENASICA (2015). Informe mensual No. 12 (Diciembre 2015) de la campaña contra el moko de platano. *SENASICA/Dirección General de Sanidad Vegetal*. México, D.F.: SENASICA.
- Sequeira, L. (1994). *The life and times of Pseudomonas solanacearum*, Paris, INRA

Editions.

- Sequeira, L. (1998). Bacterial wilt: the missing element in international banana improvement programs. *Bacterial Wilt Disease*. Springer.
- Shirani-Bidabadi, S., Mahmood, M., Baninasab, B. y Ghobadi, C. (2012). Influence of salicylic acid on morphological and physiological responses of banana (*Musa acuminata* cv. 'Berangan', AAA) shoot tips to in vitro water stress induced by polyethylene glycol. *Plant Omics Journal*, 5, 33-39.
- SIAP. 2014. Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera [Online]. México: SAGARPA. (Acceso 5 Febrero 2016).
- Souza, S. A., Xavier, A. A., Costa, M. R., Cardoso, A. M. S., Pereira, M. C. T. y Nietsche, S. (2013). Endophytic bacterial diversity in banana 'Prata Anã' (*Musa* spp.) roots. *Genetics and Molecular Biology*, 36, 252-264.
- Stevens, P. y Van-Elsas, J. (2010). Genetic and phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 strains obtained from Dutch waterways. *Antonie van Leeuwenhoek*, 97, 171-188.
- Stulberg, M. J. y Huang, Q. (2016). A computer program for fast and easy typing of a partial endoglucanase gene sequence into genospecies and sequevars 1 and 2 of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Journal of Microbiological Methods*, 123, 101-107.
- Taghavi, M., Hayward, C., Sly, L. y Fegan, M. (1996). Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii* and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 10-15.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. y Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*.
- Tapiero, A., Morales, A. y Rodríguez, S. M. (2007). Dispersión de *Ralstonia solanacearum* en suelos cultivados con plátano en el Piedemonte Llanero. *Revista Corpoica* –

Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 8, 52-60.

- Thomas, P., Swarna, G. K., Roy, P. K. y Patil, P. (2008). Identification of culturable and originally non-culturable endophytic bacteria isolated from shoot tip cultures of banana cv. Grand Naine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93, 55-63.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.
- Timms-Wilson, T. M., Bryant, K. y Bailey, M. J. (2001). Strain characterization and 16S-23S probe development for differentiating geographically dispersed isolates of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Environ Microbiol*, 3, 785-97.
- Toomey, G. (2004). Campaña de Colombia para salvar del moko al plátano. Green Ink Publish Services, 1-7.
- Van Elsas, J. D., Kastelein, P., Van Bekkum, P., Van Der Wolf, J. M., De Vries, P. M. y Van Overbeek, L. S. (2000). Survival of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2, the Causative Agent of Potato Brown Rot, in Field and Microcosm Soils in Temperate Climates. *Phytopathology*, 90, 1358-1366.
- Villegas Escobar, V. (2011). Prospectiva de extractos bacterianos para el control biológico de fitopatógenos de banano y plátano. En: EAFIT, U. (ed.) III Congreso Agroindustria Limpia. Bogotá, Colombia: Feria internacional del medio ambiente – FIMA.
- Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., Guilbaud, C., Fegan, M. y Prior, P. (2007). *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6790-6801.
- Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D. y Prior, P. (2009). Epidemiological evidence for the emergence of a new pathogenic variant of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies). *Plant Pathology*, 58,

853-861.

- Wicker, E., Lefeuvre, P., De Cambiaire, J. C., Lemaire, C., Poussier, S. y Prior, P. (2012). Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *Isme J*, 6, 961-74.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev*, 51, 221-71.
- Xu, J., Zheng, H.-J., Liu, L., Pan, Z.-C., Prior, P., Tang, B., Xu, J.-S., Zhang, H., Tian, Q., Zhang, L.-Q. y Feng, J. (2011). Complete Genome Sequence of the Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* Strain Po82. *Journal of Bacteriology*, 193, 4261-4262.
- Xue, Q. Y., Yin, Y. N., Yang, W., Heuer, H., Prior, P., Guo, J. H. y Smalla, K. (2011). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China assessed by PCR-based fingerprints to unravel host plant- and site-dependent distribution patterns. *FEMS Microbiol Ecol*, 75, 507-19.
- Yi, Y., Liu, R., Yin, H., Luo, K., Liu, E. y Liu, X. 2007. Isolation, identification and field control efficacy of an endophytic strain against tobacco bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *The journal of applied ecology*, 18, 554-558.
- Zhu, Y., Zhou, H., Liu, B., Zhang, S., Zhu, H., Zhu, H., Che, J. y Cao, Y. (2004). Study on the Growing Competition Relationship between Virulent and Avirulent strains of *ralstonia solanacearum* isolated from tomato. *Xiamen da xue xue bao. Zi ran ke xue ban* = *Journal of Xiamen University. Natural science*, 43, 97-101.
- Zulperi, D., Sijam, K., Ahmad, Z., Awang, Y., Ismail, S., Asib, N. y Hata, E. (2016). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II sequevar 4 strains associated with Moko disease of banana (*Musa* spp.) in Peninsular Malaysia. *European Journal of Plant Pathology*, 144, 257-270.