

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Caracterización patogénica y molecular
de *Ralstonia solanacearum* raza 2
agente causal del Moko en plantaciones
de plátano y banano (*Musa* spp.) en el
Norte del Valle del Cauca**

María José Truke Arango

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería y Administración
Palmira, Colombia
2018

Caracterización patogénica y molecular de *Ralstonia solanacearum* raza 2 agente causal del Moko en plantaciones de plátano y banano (*Musa* spp.) en el Norte del Valle del Cauca

María José Truke Arango

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Biológicas

Directores:

Ph.D. Elizabeth Álvarez Cabrera

Ph.D. Jaime Eduardo Muñoz Floréz

Línea de Investigación:

Biotecnología Vegetal

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería y Administración
Palmira, Colombia

2018



(Dedicatoria)

*A mis padres Martha Lucía y Carlos Ariel
quienes son mi motor para luchar cada día y
a toda mi familia por sentirse orgullosa por
cada meta lograda.*

Los amo con todo mi corazón

Agradecimientos

A Dios por todas las bendiciones recibidas y por darme la fuerza, la disciplina y la voluntad para haber desarrollado este trabajo.

Al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y su programa de Fitopatología de Yuca por haber financiado en su totalidad esta investigación con el apoyo del Sistema General de Regalías y la Gobernación del Valle del Cauca.

A la Doctora Elizabeth Álvarez Cabrera ex directora del programa de Patología de Yuca del CIAT por su apoyo incondicional, su infinita paciencia, por todo el conocimiento compartido y por haberme dado la oportunidad de trabajar para su grupo durante 5 años en los cuales logré mi formación desde pasante hasta magíster.

A cada uno de los integrantes del grupo de trabajo de Patología de Yuca y plátano quienes de una u otra forma apoyaron la realización de esta investigación.

Un agradecimiento muy especial al ingeniero Juan Camilo Montoya por su enorme apoyo en la fase experimental de este trabajo.

Al Doctor Jorge Duitama por su colaboración en los análisis bioinformáticos y su apoyo en capacitación para mi formación profesional

Al profe Jaime Eduardo Muñoz Flórez actual Vicerrector de la Universidad Nacional de Colombia- Sede Palmira por su apoyo, asesoría, conciliación permanente y amistad y por no permitir que desfalleciera durante este proceso, el cual no fue nada fácil por diferentes razones.

A la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira por haberme dado la formación y las bases científicas y metodológicas para lograr ser hoy por hoy una profesional integral y especializada.

Resumen

El moko o marchitamiento bacteriano es una de las enfermedades más limitantes del cultivo del plátano y banano en Colombia. Esta enfermedad se presentó en el norte del Departamento del Valle del Cauca entre los años 2015 y 2016 en los municipios de Caicedonia, Alcalá y Ulloa afectando cultivares de plátano y banano. Los síntomas característicos de la enfermedad son amarillamiento foliar y colapso de las hojas más jóvenes, así como necrosis de la hoja bandera, taponamiento y necrosis de los haces vasculares en la zona central del pseudotallo así como amarillamiento y pudrición seca del fruto. El agente causal del moko es la bacteria *Ralstonia solanacearum* raza 2 quien tiene una alta variabilidad filogenética, lo cual ha llevado al uso del término de complejo de especies de *Ralstonia solanacearum* (RSSC) clasificándola en filotipos, razas y biovars, dificultando así su caracterización específica a través de métodos moleculares.

En este estudio se colectaron 93 muestras de tejido vegetal con síntomas de la enfermedad en fincas de agricultores y se obtuvieron 75 aislamientos de *R. solanacearum* en Medio Semiselectivo South África (SMSA). Posteriormente se evaluó la patogenicidad de estos sobre plantas de plátano de la variedad Dominico Hartón bajo condiciones de invernadero observándose diferencias altamente significativas entre la patogenicidad de los aislamientos, clasificándose esta en 3 grupos, alta, media y baja.

El ADN de los aislamientos fue amplificado por PCR dúplex empleando los cebadores 93F/93R y 5F/5R donde todos los aislamientos presentaron un fragmento de 477 pb correspondiente al gen de la proteína Kfra, el cual permitió identificar todos los aislamientos de moko patogénicos Filotipo II, secuevar IIB-4. Los productos amplificados fueron secuenciados y sus secuencias depositadas en el GenBank. Mediante PCR en tiempo real empleando la sonda TaqMan® Mus 20P todos los aislamientos fueron detectados confirmándose la identidad del patógeno como *Ralstonia solanacearum* y se determinó una correlación altamente significativa entre la patogenicidad y el ciclo de amplificación por PCR en tiempo real (Ct).

Palabras clave: Moko, aislamiento, *Ralstonia solanacearum*, qPCR, PCR dúplex, patogenicidad.

Abstract

Moko disease or bacterial wilt is one of the major limiting diseases in plantain and banana crops in Colombia. This disease was first observed in the Department of Valle del Cauca in 2015 and 2016 in the municipalities of Caicedonia, Alcalá, and Ulloa, affecting both plantain and banana cultivars. The characteristic symptoms of the disease include yellowing of the leaves and dropping of younger leaves, necrosis of the flag leaf, blockage and necrosis of vascular bundles in the central region of the pseudostem, and dry rot and yellowing of the fruit. The causal agent of Moko disease is a bacterium, *Ralstonia solanacearum* race 2. This microorganism shows a high phylogenetic variability, which has led to the use of the term *Ralstonia solanacearum* Species Complex (RSSC); its classification into phylotypes, races, and biovars complicates its specific detection through molecular methods.

In this study, 93 samples of plant tissue with disease symptoms were collected in farmers' fields, and 75 isolates of *R. solanacearum* were obtained on semi-selective medium South Africa (SMSA). In addition, the pathogenicity of the isolates was tested on 40-day-old plants of cv. Dominico Harton under greenhouse conditions observed significant differences in the pathogenicity of the isolates, classified into 3 groups, high, medium and low.

The DNA from these isolates was extracted and amplified by real-time PCR with the TaqMan® probe Mus 20P and duplex PCR using primers 93F/93R and 5F/5R, resulting in fragments of approximately 477 bp. Corresponding to the Kfra protein gene, which allowed to identify all isolates of pathogenic moko Filotype II, secuevar IIB-4. The amplified product of each isolate was sequenced and the microorganism was identified and their sequences deposited in the GenBank. Using real-time PCR using the TaqMan® Mus 20P probe, all isolates were detected, confirming the identity of the pathogen as *Ralstonia solanacearum* and a highly significant correlation was determined between the pathogenicity and the amplification cycle by real-time PCR (Ct).

Keywords: Moko, Isolation, *Ralstonia solanacearum*, qPCR, Duplex PCR, Pathogenicity

Contenido

	Pág.
Resumen.....	IX
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas	XV
Introducción	1
Objetivo general.....	2
Objetivos específicos	2
1. Marco teórico	3
1.1 El cultivo de plátano en Colombia	3
1.2 La enfermedad del Moko.....	4
1.3 Metodologías para la detección de <i>Ralstonia solanacearum</i>	6
1.4 Estudios sobre la enfermedad del moko en Colombia.....	10
2. Materiales y métodos.....	11
2.1 Muestreo y colecta de material vegetal	11
2.2 Aislamiento y purificación de aislamientos bacterianos	12
2.3 Prueba de patogenicidad.....	12
2.4 Extracción de ADN y amplificación por PCR dúplex.....	13
2.5 Secuenciación.....	14
2.6 Identificación de aislamientos por PCR en tiempo real (qPCR)	14
3. Resultados y discusión	17
3.1 Muestreo y colecta de material vegetal	17
3.2 Aislamiento de <i>Ralstonia solanacearum</i>	18
3.3 Pruebas de patogenicidad.....	18
3.4 Extracción de ADN y amplificación PCR dúplex.....	24
3.5 Secuenciación de los productos de PCR y análisis de secuencias.....	26
3.6 Identificación de los aislamientos por PCR en tiempo real (qPCR).....	30

4. Conclusión y perspectivas futuras.....	35
4.1 Conclusiones	35
4.2 Perspectivas futuras	36
A. Anexo: Análisis de varianza para la agresividad de los 75 aislamientos de <i>R. solanacearum</i> aislados de tejido de plátano y banano en plantaciones del norte del Valle del Cauca	37
B. Anexo: Análisis de efectos de las variables origen y tejido sobre la variable patogenicidad (ABCPE).....	41
C. Anexo: Análisis de correlación entre las variables patogenicidad ABCPE y ciclo de amplificación por qPCR (Ct).....	43
Bibliografía.....	45

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Zonas correspondientes a los sitios de toma de muestras de plátano y banano en los municipios de Caicedonia, Alcalá y Ulloa en el Departamento del Valle del Cauca	11
Figura 2. Muestras recolectadas en campo con síntomas de moko.....	17
Figura 3. Colonias fluídas y mucoides (círculo rojo) de <i>Ralstonia solanacearum</i> crecidas en medio SMSA durante 72 horas.....	18
Figura 4. Evolución de los síntomas observados en plantas de plátano Dominico Hartón inoculadas con aislamientos de <i>Ralstonia solanacearum</i> . (A) 5 días después de la inoculación: marchitamiento y flacidez inicial principalmente de la hoja bandera. (B) 8 días después de la inoculación: marchitamiento y muerte de entre 2 y 4 hojas de la planta. (C) 12 días después de la inoculación: muerte total de la planta	19
Figura 5. Amplificación por PCR dúplex de ADN de aislamientos de <i>R. solanacearum</i> . M. marcador de peso molecular Hyper Ladder II. (+) Control positivo (ADN aislamiento CIAT 078). (-) Control negativo (mix de PCR sin ADN). RT. ADN <i>R. solanacearum</i> aislada de tomate RM. ADN <i>R. solanacearum</i> aislada de tabaco. Cada número corresponde a un código de aislamiento (Ver Tabla 1).	25
Figura 6. Alineamiento múltiple de secuencias de <i>Ralstonia solanacearum</i> obtenidas en este estudio y secuencias homólogas reportadas en NCBI	28
Figura 7. Árbol filogenético construido por el método de máxima parsimonia analizado mediante el algoritmo Near-full-length con las secuencias de los aislamientos de <i>R. solanacearum</i> de este estudio y otras secuencias homólogas reportadas en el NCBI....	29
Figura 8. Amplificación por PCR en tiempo real (qPCR) de 12 aislamientos de <i>Ralstonia solanacearum</i> (moko) amplificados con la sonda TaqMan Mus 20P y cebadores Mus 20F/Mus 20RP	31

Figura 9. Amplificación por PCR en tiempo real (qPCR) de 63 aislamientos de <i>Ralstonia solanacearum</i> (moko) amplificados con la sonda TaqMan Mus 20P y cebadores Mus 20F/Mus 20RP	32
---	----

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Patogenicidad de 75 aislamientos de <i>Ralstonia solanacearum</i> obtenidos de plátano y banano, inoculados en plantas de plátano del cultivar Dominico Hartón	22
Tabla 2. Identidad entre secuencias de ADN de aislamientos de <i>Ralstonia solanacearum</i> en este estudio y secuencias reportadas previamente en el NCBI	27
Tabla 3. Valores de amplificación (Ct) por qPCR de aislamientos de <i>Ralstonia solanacearum</i> con la sonda TaqMan® Mus 20P y cebadores específicos Mus 20F/Mus 20PR	33

Introducción

“La industria del plátano y el banano es de gran importancia económica para la mayoría de los países productores de América Latina y el Caribe (ALC), en la generación de divisas y por su aporte a la seguridad alimentaria de la población” (Álvarez et al.2013).

En Colombia durante el año 2014 y el 2017 se incrementó el área sembrada de plátano a 486.724 ha, su producción a 4.964.588 toneladas (Ton) y su rendimiento a 10.2 (Ton/ ha) a nivel nacional según lo reportado por MINAGRICULTURA 2017. La cadena productiva de plátano genera alrededor de 3.975.608 empleos directos y 1.216.810 empleos indirectos constituyéndose en uno de los productos de mayor importancia para los agricultores y productores.

El departamento del Valle del Cauca cuenta con 32.195 hectáreas (ha) sembradas en plátano y una producción de 282.693 toneladas correspondiente a un rendimiento de 8,7% (Ton/ha), sin embargo, los problemas fitosanitarios han generado un impacto negativo sobre el cultivo con 12.500 productores afectados por enfermedades en plátano y banano debido a la falta de controles fitosanitarios por parte de los agricultores (Instituto Colombiano Agropecuario [ICA], 2013). Una de las enfermedades más limitantes que afectan este cultivo es el moko, marchitez vascular ó maduraviche. El moko es limitante en cultivos de plátano y banano causando pérdidas en producción superiores al 75 % (Álvarez, 2017) y es causado por la bacteria *Ralstonia solanacearum* raza 2, fitopatógeno importante que afecta también otros cultivos en un área geográfica amplia en especial en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Rivas, 2003).

Diversos métodos de diagnóstico han sido desarrollados para la identificación de *Ralstonia solanacearum* tales como técnicas serológicas basadas en el uso de anticuerpos para la detección de componentes bacterianos y técnicas moleculares como la PCR (Lenarcic et al., 2014). Sin embargo, las técnicas desarrolladas hasta ahora no

son lo suficientemente sensibles y no han mostrado especificidad para *R. solanacearum* raza 2 (Gómez, Álvarez & Llano, 2006) además no permiten diferenciar muchas veces aislamientos patogénicos de no patogénicos. En la actualidad en el Departamento del Valle del Cauca y especialmente en la zona norte, donde se considera existe una alta incidencia de la enfermedad, no se han hecho estudios de este tipo específicos del microorganismo basados en su caracterización molecular y patogénica. Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue evaluar la diversidad patogénica y molecular de las poblaciones de *Ralstonia solanacearum* raza 2 causantes del moko en el norte del Departamento del Valle del Cauca.

Objetivo general

Evaluar la diversidad patogénica y molecular de *Ralstonia solanacearum* raza 2 agente causal del “moko” en plátano y banano en la zona norte del Departamento del Valle del Cauca.

Objetivos específicos

- Evaluar la variabilidad patogénica de aislamientos de *Ralstonia solanacearum* raza 2 causantes de «moko» en los municipios de Caicedonia, Alcalá y Ulloa.

- Evaluar molecularmente aislamientos de *Ralstonia solanacearum* raza 2 causantes de «moko» en los municipios de Caicedonia, Alcalá y Ulloa.

1. Marco teórico

1.1 El cultivo de plátano en Colombia

En Colombia, el plátano y el banano son de importancia estratégica dentro del sector rural, por ser cultivos permanentes con mayor presencia en los sistemas de economía campesina (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural [MINAGRICULTURA], 2017). Para el cierre del año 2016 según la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura (FAO, 2016), Colombia reportó una producción a nivel mundial de 3.539.252 y 2.043.668 toneladas de plátano y banano respectivamente (FAOSTAT, 2016).

Hacia mediados del año 2017 nuestro país se ubicó como el cuarto productor de plátano a nivel mundial con una producción total de 4.728.179 por debajo de Uganda, Camerún y Ghana respectivamente (FAOSTAT, 2017). Así mismo para el cierre de ese mismo año en cuanto a exportación de banano, Colombia ocupó el cuarto lugar en Latinoamérica con una producción de 1.989.300 toneladas después de Ecuador, Costa Rica y Guatemala respectivamente (FAO, 2018), lo cual muestra la gran importancia comercial y económica de estos cultivos en nuestro país en la actualidad.

La cadena productiva del plátano en Colombia la componen productores, comercializadores, transformadores, industrializadores y proveedores de insumos y está compuesta por cuatro núcleos productivos priorizados que aglutinan a los siguientes departamentos: Zona de Urabá y Noreste de Antioquia (Antioquia, Córdoba y Chocó), Zona Sur del Cauca (Cauca y Valle del Cauca), Zona Centro (Caldas, Quindío, Risaralda y Tolima) y Zona de los Llanos Orientales (Arauca, Meta y Casanare). El principal productor de plátano es el Departamento de Antioquia seguido en su orden de los departamentos de Arauca, Valle del Cauca y Quindío (MINAGRICULTURA, 2017).

4 Caracterización patogénica y molecular de *Ralstonia solanacearum* raza 2 agente causal del Moko en plantaciones de plátano y banano (*Musa* spp.) en el Norte del Valle del Cauca

El departamento del Valle del Cauca cuenta con 32.195 hectáreas (ha) sembradas en plátano y una producción de 282.693 toneladas. Se destacan cultivares como Dominico Hartón, Hartón, Cachaco, Guineo y bananos como el Gros Michel distribuidos en monocultivo intercalado con otros cultivos. (MINAGRICULTURA, 2017).

1.2 La enfermedad del Moko

El Moko es endémico de América Central y América del Sur, con registros oficiales en Bélice, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Granada, Guatemala, Guyana, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Perú, Surinam, Trinidad y Venezuela. (Eyres, Hammond & Mackie, 2005). La enfermedad está reportada en 32 países de Asia, África, América del Norte, Central y Sur (EPPO, 2010).

En Colombia la enfermedad del Moko se observó por primera vez en el año 1954, en el departamento del Tolima (Toomey, 2004), para 1962 se dispersó al Magdalena y entre 1968 y 1970 a la zona bananera de Urabá y el eje cafetero, respectivamente (Granada, 2003).

El moko genera pérdidas en producción, altos costos de erradicación y cuarentenas vegetales por lo que se constituye en uno de los problemas fitosanitarios más limitantes en América Latina y el Caribe, después de la Sigatoka negra.

En Colombia esta enfermedad ha reducido las áreas de cultivo en diferentes regiones, como es el caso del departamento del Caquetá donde se perdieron 20.000 ha a causa de esta enfermedad, así mismo se ha reportado la diseminación a lo largo de los principales ríos en los departamentos del Tolima, Valle del Cauca, Huila, Caquetá, Amazonas, Putumayo y Costa Atlántica (Belalcázar, Rosales, Pocasangre, 2003).

En la actualidad los departamentos más afectados por Moko son Quindío, Magdalena, Meta y Valle del Cauca. Para los años 2012 y 2013 el ICA erradicó 745.000 y 250.000 plantas afectadas por Moko respectivamente en los departamentos de Magdalena, Córdoba, Antioquia, Santander, Arauca, Cundinamarca, Tolima, Quindío, Risaralda, Valle, Cauca, Nariño, Meta, Caquetá, Putumayo y Caldas (ICA, 2013).

Entre el año 2017 y lo que va corrido de 2018 el ICA ha erradicado un total de 1 ha en el norte del Departamento del Valle en los municipios de Alcalá, Ulloa, Caicedonia y Sevilla (Comunicación personal Lilian Coral- ICA, 2018).

Los síntomas que manifiesta esta enfermedad son variables, y pueden tardar varias semanas para desarrollarse y se requiere personal capacitado para detectarlo en las primeras etapas. El Moko induce un marchitamiento que inicia con el amarillamiento y el colapso de las hojas más jóvenes, así como necrosis de la hoja bandera (conocida también como hoja tabaco ó cigarro). Estos síntomas progresan hacia las hojas más viejas e internamente los tejidos vasculares se tornan necróticos, especialmente aquellos localizados en la zona central del pseudotallo. (Vásquez, 2008).

Los frutos inmaduros de las plantas infectadas muestran color amarillo y pudrición seca de la pulpa, formando una cavidad. Al hacer cortes transversales en tejido como pseudotallo o ráquis, el daño interno causado por el patógeno se observa en forma de lesiones de color pardo rojizo (Vásquez, 2008).

Por ser una enfermedad sistémica, es decir que se trasloca en la planta por los haces vasculares, la sintomatología puede aparecer en cualquier estado fenológico del cultivo. En plántulas recién sembradas, aparece un amarillamiento generalizado y posterior necrosis y, al hacer cortes transversales en el pseudotallo aparecen unos puntos rojizos o líneas de color café, los cuales corresponden a los haces vasculares donde la bacteria patógena degradó los tejidos y cuando el ataque es tardío aparecen coloraciones rojizas o negras en los puntos afectados y, al hacer un corte transversal en el ráquis del racimo, aparecen puntos correspondientes a los haces vasculares afectados por donde la bacteria se ha desplazado al interior de la planta. (Álvarez et al., 2013).

El maduraviche ó ereke del plátano y banano, como también es conocida la enfermedad del moko, es causado por la bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum* raza 2 (Smith) (Yabuuchi et al., 1995), y es una de las enfermedades vasculares más importantes de estos cultivos. *Ralstonia solanacearum* presenta alta diversidad genética, lo cual condujo

al concepto de complejo de especies de *R. solanacearum* (RSSC) (Genin & Denny, 2012). De acuerdo a Fegan y Prior (2005), el RSSC se divide en cuatro filotipos correspondientes a cuatro grupos genéticos identificados de acuerdo con el análisis de secuencias.

Los aislamientos pertenecientes al RSSC se clasifican en biovares y razas (Denny, 2006; Denny & Hayward, 2001). Los biovares se clasifican de acuerdo a la producción de ácido a partir de los disacáridos (celobiosa, lactosa y maltosa) y la oxidación de los alcoholes hexosa (sorbitol, dulcitol y manitol) en medio base (Hayward, 1964), mientras que la clasificación por razas se da por el rango de hospedantes que afectan distribución geográfica, patogenicidad, relaciones epidemiológicas y propiedades fisiológicas (Álvarez, 2005). La raza 2 (biovares 1, 3 ó 4) afecta específicamente plátano, banano y heliconias (Hayward, 1991).

La bacteria es transmitida a través de herramientas infestadas, insectos vectores, residuos vegetales infectados, suelo contaminado y contacto de las raíces de plantas enfermas con las plantas sanas, además tiene la capacidad de diseminarse a través del agua de escorrentía por ríos y quebradas y por medio de semilla de plantaciones contaminadas, la cual es distribuida entre agricultores de manera indiscriminada siendo ésta una de las formas más importantes de diseminación de este patógeno. (Álvarez et al., 2013).

1.3 Metodologías para la detección de *Ralstonia solanacearum*

Para la detección y caracterización del complejo de *Ralstonia solanacearum* (RSSC) se han desarrollado diferentes metodologías como medios de cultivo para el aislamiento, caracterización morfológica y pruebas bioquímicas hasta métodos moleculares más avanzados. El aislamiento en Medio Semiselectivo South África SMSA (Denny & Hayward, 2001; Englebrecht, 1994; Martins, 2000) es uno de los primeros métodos desarrollados para el estudio de *Ralstonia solanacearum* y el cual es de gran utilidad, ya que en la actualidad aún es usado para el aislamiento de colonias de esta bacteria, las cuales pueden ser identificadas con base en una morfología típica. Otra herramienta empleada para la caracterización morfológica de este patógeno es la técnica de

determinación de biovares, la cual se hace a través de pruebas bioquímicas basadas en la producción de ácidos a partir de los disacáridos celobiosa, lactosa y maltosa y la oxidación de los alcoholes hexosa (sorbitol, dulcitol y manitol) en medio base (Hayward, 1964; Denny & Hayward, 2001). Por otro lado, para la clasificación genética de *R. solanacearum* se desarrolló la clasificación de filotipos propuesta por Fegan y Prior (2005), para quienes un filotipo es un clúster monofilético de aislamientos que muestra el análisis filogenético con base a las secuencias de los genes de las regiones ITS, endoglucanasa y hrpB.

De acuerdo con esta clasificación, los cuatro filotipos son el Filotipo I: equivalente a la división 1, definida por Cook y Sequeira (1994). Todos los aislamientos de este filotipo se encuentran en los biovares 3, 4 y 5, y son obtenidos principalmente en Asia. El Filotipo II: equivalente a la división 2 y los aislamientos incluidos corresponden a los biovares 1, 2 y 2T; y son aislados principalmente de América. También se incluye *R. solanacearum* raza 3 patogénica en papa, la cual se distribuye en todo el mundo, y la raza 2 patogénica en banano y plátano, el Filotipo III el cual comprende aislamientos agrupados en los biovares 1 y 2T y son obtenidos principalmente de África e islas cercanas y el Filotipo IV cuyos aislamientos son obtenidos principalmente de Indonesia y agrupados en los biovares 1, 2 y 2T. Estos aislamientos también se encuentran en Australia y Japón. Este filotipo incluye también dos grupos relativos de *R. solanacearum*, *Pseudomonas syzygii* y el BDB (Blood disease bacterium) (Álvarez et al., 2013).

Una de las primeras metodologías implementadas y más usadas en la actualidad para la detección de especies de *Ralstonia solanacearum* mediante biología molecular es la amplificación por PCR con los cebadores 759/760 (Opina et al. 1997). Esta técnica permite determinar la presencia ó ausencia de *R. solanacearum* a nivel de especie sin ningún tipo de clasificación adicional, es decir sin discriminar razas ni filotipos y con la limitante de que *Pseudomonas syzygii* y el Blood Disease Bacterium amplifican también el mismo fragmento generado por estos cebadores, lo cual puede llevar a detecciones de baja especificidad y en el caso de muestras asintomáticas podría detectarse falsos positivos de acuerdo al hospedero evaluado. En otros trabajos posteriores se desarrolló la metodología de PCR múltiple, la cual está basada en el empleo de múltiples pares de cebadores denominados Nmult, un par para cada filotipo y los cebadores 759/760 simultáneamente, en donde se observa un fragmento de 280 pb correspondiente a los

cebadores 759/760 ,el cual se encuentra presente en todas las especies correspondientes al RSSC y otro fragmento adicional de tamaño determinado, el cual difiere de acuerdo al filotipo y el cual permite la diferenciación entre los cuatro filotipos reportados (Fegan & Prior, 2005). Los cebadores OLI 1/Y2 en conjunto con otros cebadores diseñados con base al espacio entre las regiones 16S-23S, empleados en una misma reacción para la determinación de diferentes biovars dentro de un mismo filotipo, han sido empleados por Seals et al. (1993).

Otra herramienta utilizada para el estudio de este patógeno es la secuenciación de genes, siendo el más relevante el gen de la endoglucanasa, cuya secuenciación en diferentes aislamientos ha permitido determinar y distribuir la clasificación de secuevars entre los diferentes filotipos. Un secuevar está definido como un grupo de aislamientos con una secuencia de un gen altamente conservada dentro de un área secuenciada (Fegan & Prior 2006). Este concepto ha sido definido con base a la secuenciación del gen de la endoglucanasa (Genin & Denny, 2012), proteína involucrada en procesos de hipersensibilidad y patogenicidad. Las secuencias de este gen así como las de otros genes como el de la región ITS han demostrado que pese a ser buenos marcadores moleculares para la identificación de *R. solanacearum*, son genes muy conservados dentro de todas las especies pertenecientes al RSSC, ya que a través de estos por ejemplo se logró determinar que los aislamientos causantes del moko tienen un origen parafilético con algunos genotipos muy relacionados con aislamientos de *R. solanacearum* patogénicos a tomate y papa, lo cual a nivel de diagnóstico no permite discriminar muchas veces de forma específica genotipos ni filotipos dentro de este complejo, además de que son genes compartidos con otras familias de bacterias cercanas, lo cual hace que las metodologías moleculares diseñadas con base a este gen no sean muy específicas, ya que pueden generar detecciones de falsos positivos o aislamientos no patogénicos.

Con respecto a metodologías de PCR en tiempo real (qPCR) solo se han publicado trabajos de detección de *Ralstonia solanacearum* biovar 2A en papa, mediante el empleo de sondas TaqMan, en una reacción de PCR multiplex en tiempo real (Weller et al. 2000).

En Colombia existen algunos trabajos realizados con diferentes métodos moleculares. Dentro de estos se encuentra el trabajo realizado por Álvarez et. al 2010 del programa de Patología de Yuca del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) quienes diseñaron una sonda TaqMan® para la detección de *Ralstonia solanacearum* como agente causal del moko en Colombia y el trabajo del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) que desarrolló y estandarizó el método para la detección de *Ralstonia solanacearum* raza 3 biovar 2 en tubérculos de papa por el método de PCR en tiempo real (método interno- dato no publicado). Existen otras técnicas para la detección rápida de *R. solanacearum* basadas en el método LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification), el cual consiste en usar entre 4 y 6 pares de cebadores específicos en una reacción de amplificación isotérmica, la cual permite determinar la presencia ó ausencia del patógeno de forma más rápida que otros métodos moleculares a nivel de laboratorio ó bajo condiciones de campo. Dentro de estos trabajos se destacan los realizados por Kubota et al., 2008 y Lenarcic et al, 2014 quienes estandarizaron protocolos de la técnica LAMP para la detección de especies de *Ralstonia solanacearum* y Huang et al. 2017 estandarizaron también un protocolo de tipo LAMP para la detección de *R. solanacearum* filotipo I patogénicas de mora. Entre los años 2017 y 2018 se ha desarrollado y estandarizado una metodología rápida tipo LAMP para la detección específica de *Ralstonia solanacearum* raza 2 patogénica en plátano y banano (López et al. 2017). La mayoría de éstas metodologías han sido desarrolladas con base a los genes ITS, hrp y endoglucanasa, sin embargo en la actualidad se han propuesto otras metodologías desarrolladas a partir de otros marcadores moleculares como es el caso de la PCR dúplex reportada por Cellier et al. 2015, la cual permite detectar y diferenciar claramente cepas patogénicas de *R. solanacearum* (secuevar IIB-4) de cepas no patogénicas (secuevar IIB-4NPB) pertenecientes al Filotipo II en musáceas, a través del empleo de cuatro cebadores específicos, 93F/93R quienes generan un amplicón de 477 pb correspondiente a la proteína putativa funcional Kfra, la cual es relativa a proteínas de unión al ADN y otros moduladores transcripcionales, presente en genomas de cepas patogénicas y no patogénicas y los cebadores 5F/5R los cuales amplifican un fragmento de 661 pb correspondiente al amplicón de un gen que codifica para una proteína de quimiotaxis encontrada en genomas de cepas no patogénicas. El desarrollo de todas estas técnicas es relevante debido a que a nivel de diagnóstico facilitarían realizar un diagnóstico acertado y específico en el menor tiempo posible determinando si un aislamiento es o no patogénico y a nivel de investigación permitirían tener una mayor

idea de la capacidad que tiene este patógeno de evolucionar y cambiar su dinámica para infectar y causar daños fitopatológicos de importancia económica.

1.4 Estudios sobre la enfermedad del moko en Colombia

En Colombia se han desarrollado trabajos de aislamiento y caracterización de *Ralstonia solanacearum* en varias regiones del país, como es el caso de los trabajos realizados por Restrepo *et al.* 2008, Cardozo *et al.* 2009 y Álvarez *et al.* 2008, quienes caracterizaron *R. solanacearum* en agrosistemas bananeros de la región del Urabá antioqueño, zona principal de producción de plátano y banano en Colombia empleando PCR convencional con los cebadores 759/760, PCR múltiple con los cebadores Nmult para determinar filotipos y los cebadores Mus para la determinación de sequevares de acuerdo a la metodología de Fegan y Prior (2005). Se destaca también el trabajo realizado por Gómez, Álvarez y Llano, 2005 para la identificación y caracterización molecular y patogénica de aislamientos de *R. solanacearum* raza 2 en varios departamentos de Colombia tales como Quindío, Meta, Caquetá, Magdalena, Antioquia (zona del Urabá), Tolima y parte del Valle en los municipios de Palmira y Jamundí específicamente. En el Valle del Cauca, se han realizado algunos estudios sobre este patógeno en otras zonas del departamento empleando otras metodologías moleculares diferentes, sin embargo, a través de este trabajo se buscó caracterizar con mayor profundidad la patogenicidad y agresividad del patógeno empleando metodologías moleculares más específicas y más recientemente reportadas, con el fin de llegar a entender de una forma más clara la dinámica de este patógeno en la zona norte.

2. Materiales y métodos

2.1 Muestreo y colecta de material vegetal

Se colectaron muestras de tejido de pseudotallo, ráquis y pecíolo de plantas con síntomas característicos de la enfermedad de moko (Tabla 1) en fincas ubicadas en los municipios de Caicedonia, Ulloa y Alcalá. Las zonas en las cuales se tomaron las muestras se presentan en la Figura 1. Las muestras de tejido se procesaron en el Laboratorio de Patología de Yuca del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) ubicado en el Municipio de Palmira, Valle del Cauca.



Figura 1. Zonas correspondientes a los sitios de toma de muestras de plátano y banano en los municipios de Caicedonia, Alcalá y Ulloa en el Departamento del Valle del Cauca

2.2 Aislamiento y purificación de aislamientos bacterianos

A partir de tejido afectado de plantas de plátano y banano se tomaron fragmentos de 2 y 4 mm aproximadamente, éstos se lavaron bajo agua corriente durante 10 minutos, posteriormente se desinfectaron con hipoclorito al 1% y alcohol al 70% por un minuto y finalmente se lavaron dos veces con agua destilada estéril. Los fragmentos de tejido obtenidos se maceraron en morteros de porcelana estériles con la ayuda de pistilos y se sembraron con asa por agotamiento en cajas de petri con medio Semiselectivo South África SMSA (Polymixina-B sulfato 600.000U, cristal violeta, Bacitracina 150U, Penicilina 82.5U, Cloranfenicol, 2,3,5 cloro trifeniltetrazolio) (Englebrecht, 1994; Martins, 2000; Denny y Hayward, 2001) y se incubaron a 27-28°C por 72 horas. Se seleccionaron las colonias de color rojizo y mucoides correspondientes a la morfología típica más frecuente en aislamientos patogénicos de *R. solanacearum* comparando con un control positivo (cepa CIAT 078) de la colección del Laboratorio de Patología de Yuca de CIAT. Las colonias obtenidas, se repicaron en agar nutritivo a 27°C por 24 horas para purificar e incrementar el inóculo. Los aislamientos purificados se resuspendieron en glicerol al 50% y se almacenaron a -80°C para su crioconservación.

2.3 Prueba de patogenicidad

Los aislamientos obtenidos, se reactivaron en medio SMSA a 27°C por 48 horas, posteriormente se repicaron en agar nutritivo por 24 horas. Para la preparación del inóculo, en tubos de vidrio con agua destilada estéril se depositaron colonias de cada uno de los aislamientos hasta ajustar una densidad óptica (DO600nm) de 0.1, determinada por espectrofotometría en el equipo NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophometer de Thermo Scientific. Cada aislamiento se inoculó inyectando 0.1 mL de la suspensión bacteriana con jeringa tipo insulina en el pseudotallo de plantas de plátano de la variedad Dominico Hartón de 3 meses de edad. Las plantas inoculadas se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente y humedad relativa (HR) de 95% durante 48 horas bajo condiciones de invernadero. Como control positivo se inoculó el aislamiento 078 de *Ralstonia solanacearum* caracterizado previamente en el programa de Patología de Yuca de CIAT y como control negativo se inocularon plantas de plátano del cultivar Dominico Hartón con agua destilada estéril. Se inocularon tres repeticiones por cada tratamiento y

cada uno de los dos controles control. Cinco días después de la inoculación se inició la evaluación de la severidad de síntomas de moko empleando la escala de evaluación propuesta por He et al. (1983), en donde 0= Ausencia de síntomas, 1= Una hoja marchita, 2= Dos a tres hojas marchitas, 3= Cuatro o más hojas marchitas y 4= planta muerta, haciendo evaluaciones diarias durante 10 días hasta observar la muerte total del control positivo correspondiente a plantas inoculadas con el aislamiento CIAT 078.

A partir de los datos de severidad obtenidos se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) así:

$$ABCPE = \sum_{i=1}^n \frac{(X_i + X_{i+1})}{2} (t_i - t_{i-1})$$

Dónde: X_i : Severidad de la enfermedad en la i -ésima evaluación

t_i : Tiempo en días de i -ésima evaluación

a : Número de evaluaciones

Con los datos obtenidos de ABCPE se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el fin de determinar si existían o no diferencias significativas entre la patogenicidad de los aislamientos. Posteriormente se realizó una comparación de medias mediante la prueba estadística de Tukey- Kramer con una significancia estadística del 5% ($\alpha=0.05$) y una prueba de efectos mediante el ajuste de un modelo.

2.4 Extracción de ADN y amplificación por PCR dúplex

Los aislamientos previamente crioconservados fueron reactivados sembrándolos en medio SMSA y agar nutritivo. A partir de colonias frescas se hizo la extracción de ADN siguiendo el método de Doyle & Doyle 1990.

El ADN extraído se cuantificó y se evaluó su calidad usando el equipo NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer de Thermo Scientific. Las muestras se amplificaron siguiendo el método de PCR dúplex a un volumen final de 25 μ L bajo las siguientes condiciones: 12.5 μ l de GoTaq® Green Master Mix de Promega, 0.2 μ M de cada cebador 93F (5'-CGCTGCGCGGCCGTTTCAC-3')/ 93R (5'-CGGTCGCGGCATGGGCTT GG-3'), los cuales generan un fragmento de 447 pb aproximadamente correspondiente al gen codificante para la proteína hipotética Kfra presente en aislamientos de moko del Filotipo

Il patogénicos (secuevar IIB-4) y no patogénicos (secuevar IIB-4NPB) y 5F(5'-GCGCGCAGGCTGGTGATGT-3') /5R(5'-TGGGTTTCGCAGGCGGACAGC-3') que amplifican un fragmento de 661 pb correspondiente a un gen codificante para una proteína de quimiotaxis presente únicamente en el genoma de aislamientos no patogénicos (secuevar IIB-4NPB) . Para la PCR se incluyó ADN de aislamientos de *Ralstonia solanacearum* obtenidos de tomate y tabaco pertenecientes a otras razas de la bacteria como controles de reacción, y la cepa *R. solanacearum* 078 como control positivo. El ADN se amplificó en un termociclador Eppendorf Mastercycler Nexus empleando el siguiente perfil de amplificación: un ciclo de desnaturalización inicial de 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 98 °C por 20 segundos, una hibridación de 70 °C por 30 segundos y una extensión de 72°C por 15 segundos, finalizando con un ciclo de extensión final de 72°C por un minuto. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.2% y teñidos con SYBR® Safe Invitrogen.

2.5 Secuenciación

Se seleccionaron 15 productos de PCR dúplex con el fragmento de 477 pb generado por los cebadores 93F/93R para la proteína hipotética Kfra, éstos productos correspondieron a los aislamientos que presentaron la patogenicidad más alta en las pruebas, seleccionando aislamientos de los 3 municipios en estudio.

Los productos fueron secuenciados en el Departamento de DNA Facility de la Universidad de Iowa State en los Estados Unidos. Para la edición de las secuencias se utilizó el software Chromas Pro (versión 1.6 beta) (Hren et al., 2007), posteriormente se realizó un alineamiento múltiple de las mismas con el software MEGA y finalmente se determinó su identidad mediante un análisis BLAST en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.

2.6 Identificación de aislamientos por PCR en tiempo real (qPCR)

Las colonias puras obtenidas en agar nutritivo fueron amplificadas por qPCR empleando un volumen final de 21 µL, 300 µM de los cebadores Mus 20F, Mus 20RP y 500 µM de la

sonda TaqMan Mus 20P (Álvarez et al. 2010). La reacción se realizó en el equipo CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) con el siguiente perfil de amplificación: un ciclo de desnaturalización inicial de 95°C por 4 minutos, una desnaturalización por ciclo de 95°C por 30s y un anillamiento de 60°C por 1 minuto durante 40 ciclos. Como control positivo, se empleó ADN del aislamiento 078 y como control negativo se empleó mezcla de reacción para PCR sin ADN. Los aislamientos positivos se sembraron masivamente sobre agar nutritivo bajo las mismas condiciones, se depositaron en 1mL de glicerol al 50% en tubos eppendorf de 1.5 mL y se almacenaron a -80°C para su crioconservación.

3.Resultados y discusión

3.1 Muestreo y colecta de material vegetal

Un total de 93 muestras con síntomas típicos de moko tal como se observa en la Figura 2 fueron tomadas y procesadas para obtener los aislamientos de la bacteria.



Figura 2. Muestras recolectadas en campo con síntomas de moko

3.2 Aislamiento de *Ralstonia solanacearum*

Se obtuvieron un total de 75 aislamientos a partir de colonias puras crecidas en medio SMSA, de forma irregular, lisas, fluídas y mucoides debido a la producción de polisacárido extracelular (EPS, por sus siglas en inglés) como morfología típica de *Ralstonia solanacearum*, como se observa en la Figura 3.



Figura 3. Colonias fluídas y mucoides (círculo rojo) de *Ralstonia solanacearum* crecidas en medio SMSA durante 72 horas

3.3 Pruebas de patogenicidad

Todos los aislamientos a excepción del aislamiento 3 (A3) causaron enfermedad sobre las plantas de plátano sanas inoculadas y evaluadas en invernadero, las cuales reprodujeron los mismos síntomas observados en campo iniciando con un marchitamiento progresivo desde la hoja bandera ó cigarro, seguido de amarillamiento y flacidez de las demás hojas el cual finaliza con la muerte total de la planta como se presenta en la Figura 4.

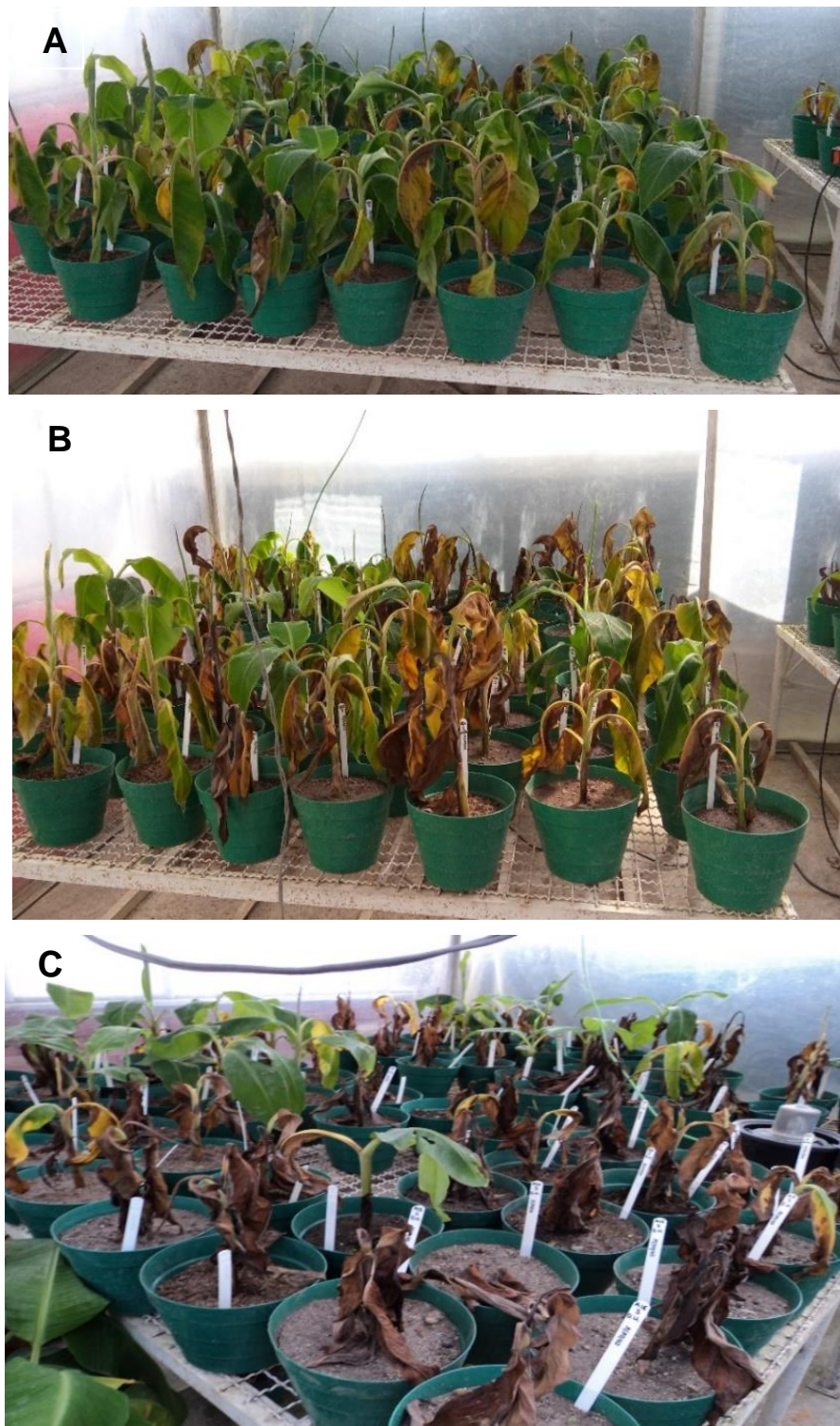


Figura 4. Evolución de los síntomas observados en plantas de plátano Dominico Hartón inoculadas con aislamientos de *Ralstonia solanacearum*. (A) 5 días después de la inoculación: marchitamiento y flacidez inicial principalmente de la hoja bandera. (B) 8 días después de la inoculación: marchitamiento y muerte de entre 2 y 4 hojas de la planta. (C) 12 días después de la inoculación: muerte total de la planta

Los resultados de ABCPE obtenidos para los 75 aislamientos son reportados en la Tabla 1, el análisis de varianza determinó diferencias altamente significativas ($p < 0.0001$) entre la patogenicidad de los aislamientos obtenidos (Anexo 1) lo que permite afirmar que algunos de los aislamientos fueron más agresivos que otros al momento de colonizar y causar síntomas de la enfermedad. A partir de los datos obtenidos se establecieron intervalos, los cuales fueron calculados como la media $\bar{x} - 0.5DMS$ para el extremo inferior y media $\bar{x} + 0.5DMS$ para el extremo superior, determinándose como patogenicidad baja (Grupo 1) valores inferiores o iguales a 37.46, patogenicidad media (Grupo 2) valores mayores a 37.46 hasta 56.76 y como patogenicidad alta valores superiores a 56.76. Teniendo en cuenta estos intervalos los aislamientos fueron clasificados dentro de estos 3 grupos como se observa en la Tabla 1.

En el Grupo 1 se ubicaron 11 aislamientos provenientes del municipio de Alcalá destacándose allí los más patogénicos (A48, A49, A50 y A51), 5 de Ulloa y 5 de Caicedonia, en el Grupo 2 de patogenicidad media se agruparon 3 aislamientos de Caicedonia, 3 de Ulloa y 6 de Alcalá siendo el A31 el más agresivo de este grupo con un valor de ABCPE de 55,5 y finalmente dentro del Grupo 3 siendo este el más amplio se ubicaron 21 aislamientos de Caicedonia, 19 de Alcalá y 2 de Ulloa.

Así mismo al analizar el efecto de las variables origen y tejido sobre la patogenicidad se observó que el origen tuvo un efecto significativo ($p = 0.0188$) observándose diferencias significativas entre los aislamientos provenientes de Ulloa y los de Caicedonia, por su parte la variable tejido fuente no tuvo un efecto alguno sobre la patogenicidad ($p = 0.2114$) (Anexo2). Esta diferencia en el origen puede verse reflejada en el comportamiento de los aislamientos de estos dos municipios, ya que para el caso de Ulloa, 5 de un total de 10 aislamientos se ubicaron en el grupo 1, es decir que presentaron una patogenicidad alta mientras que para el caso de Caicedonia de un total de 29 aislamientos provenientes de este municipios tan solo 5 se ubicaron en el grupo 1 y los restantes se ubicaron en los grupos 2 y 3 reafirmando entonces que en proporción fueron más agresivos los aislamientos de Ulloa que los aislamientos de Caicedonia.

Estos resultados sugieren que esta bacteria tiene la capacidad de adaptar sus comportamientos de patogenicidad de acuerdo a su procedencia u origen, es decir que posiblemente se adapta a ciertas condiciones de nicho ecológico y condiciones ambientales frente a las cuales expresa ciertos genes de patogenicidad. Esto demuestra la gran velocidad con la que está evolucionando este patógeno para adaptarse a diferentes hábitats. Con respecto al tejido fuente del cual fueron obtenidos los aislamientos, éste no tuvo relación con la agresividad de los mismos, lo cual puede deberse a que el patógeno ha desarrollado diversos mecanismos de infección y proliferación dentro de los diferentes tejidos de la planta, así como mecanismos de resistencia ante los sistemas de resistencia que activa la planta como respuesta ante un ataque.

Algunos autores como Ailloud et al. 2016 han descrito que esta capacidad de adaptación radica más en diferencias de expresión de genes (transcriptómica) entre diferentes cepas durante procesos de patogenicidad que en una adaptación específica a un determinado hospedero, es decir que diferentes cepas tienen la capacidad de reorganizar diferentes perfiles de expresión para optimizar su compatibilidad con diferentes hospederos, por lo cual posiblemente le es fácil infectar diferentes tejidos de la planta (pseudotallo, raquis, pecíolo) para inducir procesos de infección causando enfermedad.

Todos estos resultados revelan la importancia de desarrollar estudios en pro de la búsqueda de hospederos no susceptibles debido a la gran capacidad que tiene este organismo de diversificarse, evolucionar y adaptarse a diferentes condiciones.

22 Caracterización patogénica y molecular de *Ralstonia solanacearum* raza 2 agente causal del Moko en plantaciones de plátano y banano (*Musa* spp.) en el Norte del Valle del Cauca

Tabla 1. Patogenicidad de 75 aislamientos de *Ralstonia solanacearum* obtenidos de plátano y banano, inoculados en plantas de plátano del cultivar Dominico Hartón

Código aislamiento	Origen	Cultivo	Fuente	ABCPE ¹	Desviación estándar	Grupo ²
A1	Caicedonia	Plátano	Pseudotallo	33,6667	13,2790562	3
A2	Alcalá	Banano	Pseudotallo	10,6667	15	3
A3	Caicedonia	Plátano	Pseudotallo	0	0	3
A4	Caicedonia	Plátano	Pseudotallo	45,3333	7,3200638	2
A7	Caicedonia	Plátano	Pseudotallo	33,3333	28,8718433	3
A8	Alcalá	Plátano	Pseudotallo	33,1667	6,6017674	3
A9	Alcalá	Banano	Peciolo	45,1667	4,0414519	2
A10	Caicedonia	Plátano	Pseudotallo	36,8333	13,8954429	3
A11	Caicedonia	Plátano	Pseudotallo	35,1667	8,6071676	3
A12	Caicedonia	Plátano	Pseudotallo	32,6667	15,2997821	3
A13	Alcalá	Banano	Raqis	33	7	3
A14	Alcalá	Banano	Raqis	42,8333	1,6072751	2
A15	Alcalá	Banano	Pseudotallo	40,6667	5,9231185	2
A16	Alcalá	Banano	Peciolo	35	27,0138853	3
A17	Alcalá	Banano	Pseudotallo	37,3333	5,3463383	2
A18	Alcalá	Banano	Pseudotallo	39,1667	9,2376043	2
A19	Caicedonia	Plátano	Pseudotallo	27,6667	17,0758114	3
A20	Alcalá	Banano	Peciolo	22	19,1115149	3
A22	Caicedonia	Plátano	Pseudotallo	14,5	25,1147367	3
A23	Caicedonia	Plátano	Pseudotallo	29,3333	25,4230866	3
A24	Caicedonia	Plátano	Pseudotallo	25,8333	16,2352497	3
A25	Caicedonia	Plátano	Pseudotallo	36,8333	8,0208063	3
A26	Caicedonia	Plátano	Pseudotallo	23,4989	27,1354627	3
A27	Alcalá	Banano	Peciolo	6,6667	11,5470054	3
A28	Alcalá	Banano	Pseudotallo	48,5	23,4680634	2
A29	Alcalá	Banano	Peciolo	33,1667	28,732966	3
A30	Ulloa	Banano	Pseudotallo	52,5	1	2
A31	Ulloa	Banano	Pseudotallo	55,5	1	2
A32	Ulloa	Banano	Pseudotallo	58,5	1	1
A33	Ulloa	Banano	Pseudotallo	61,5	1	1
A34	Caicedonia	Plátano	Pseudotallo	64,5	1	1
A35	Alcalá	Banano	Raqis	67,5	1	1
A36	Alcalá	Banano	Peciolo	70,5	1	1
A37	Alcalá	Banano	Pseudotallo	73,5	1	1
A38	Caicedonia	Plátano	Pseudotallo	76,5	1	1
A39	Alcalá	Banano	Peciolo	79,5	1	1
A40	Alcalá	Banano	Peciolo	82,5	1	1
A41	Ulloa	Banano	Pseudotallo	85,5	1	1
A42	Ulloa	Banano	Pseudotallo	88,5	1	1
A43	Caicedonia	Plátano	Pseudotallo	91,5	1	1
A44	Caicedonia	Plátano	Pseudotallo	94,5	1	1
A45	Alcalá	Banano	Pseudotallo	97,5	1	1
A46	Alcalá	Banano	Raqis	100,5	1	1
A47	Caicedonia	Plátano	Pseudotallo	103,5	1	1
A48	Alcalá	Banano	Pseudotallo	106,5	1	1

(Continúa)

Tabla 1. Patogenicidad de 75 aislamientos de *Ralstonia solanacearum* obtenidos de plátano y banano, inoculados en plantas de plátano del cultivar Dominico Hartón (continuación)

Código aislamiento	Origen	Cultivo	Fuente	ABCPE ¹	Desviación estándar	Grupo ²
A49	Alcalá	Banano	Pecíolo	109,5	1	1
A50	Alcalá	Banano	Pseudotallo	112,5	1	1
A51	Alcalá	Banano	Pseudotallo	115,5	1	1
A52	Ulloa	Banano	Pseudotallo	99,5	32,0468407	1
A53	Caicedonia	Banano	Pseudotallo	27,1667	11,5578256	3
A54	Alcalá	Banano	Pseudotallo	35,6667	10,1159939	3
A55	Alcalá	Banano	Pecíolo	15,3333	16,6232769	3
A56	Caicedonia	Heliconia	Heliconia	25,1667	17,6517232	3
A57	Ulloa	Banano	Pseudotallo	41,6667	2,3094011	2
A58	Alcalá	Banano	Pecíolo	25	6,5383484	3
A59	Ulloa	Banano	Pseudotallo	13	13,8112273	3
A60	Ulloa	Banano	Pseudotallo	25,3333	7,3711148	3
A61	Caicedonia	Plátano	Pseudotallo	26,5	17,4355958	3
A62	Alcalá	Banano	Pseudotallo	32,1667	7,8155827	3
A63	Caicedonia	Heliconia	Heliconia	34,1667	4,5092498	3
A64	Caicedonia	Plátano	Pseudotallo	32	8,0467385	3
A65	Alcalá	Banano	Pseudotallo	28	11,4564392	3
A66	Caicedonia	Banano	Pseudotallo	37,3333	7,2341781	2
A67	Alcalá	Banano	Pecíolo	26,5	6,0621778	3
A68	Alcalá	Banano	Pecíolo	26,3333	4,0104031	3
A69	Caicedonia	Plátano	Pseudotallo	33	3,2787193	3
A70	Caicedonia	Plátano	Pseudotallo	29,8333	12,1689496	3
A71	Alcalá	Banano	Pseudotallo	28	16,5755845	3
A72	Alcalá	Banano	Pecíolo	28	6,8738635	3
A73	Alcalá	Banano	Pseudotallo	33,1667	4,0722639	3
A74	Caicedonia	Banano	Pseudotallo	38	6,5	2
A75	Caicedonia	Banano	Pseudotallo	30,8333	9,0046284	3
A76	Alcalá	Banano	Pecíolo	34,6667	8,0052066	3
A77	Alcalá	Banano	Pecíolo	35	0,5	3
A78	Caicedonia	Plátano	Pseudotallo plátano	30,1667	9,81495546	3
79CP	Quindío	Plátano	Pseudotallo plátano	98,7	0,5859465	-
80CN	-	-	-	0	0	-

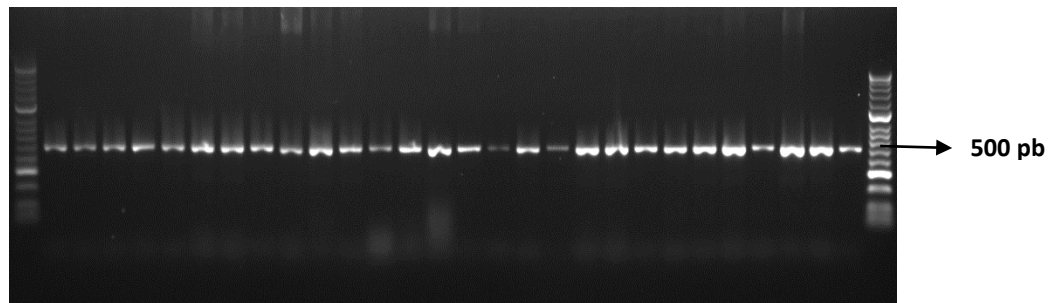
1 ABCPE: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad, 2 Grupo de patogenicidad 1: patogenicidad alta, 2: patogenicidad media, 3: patogenicidad baja. DMS ($\alpha=5\%$) 19.30. CP: Control positivo, CN: Control negativo

3.4 Extracción de ADN y amplificación PCR dúplex

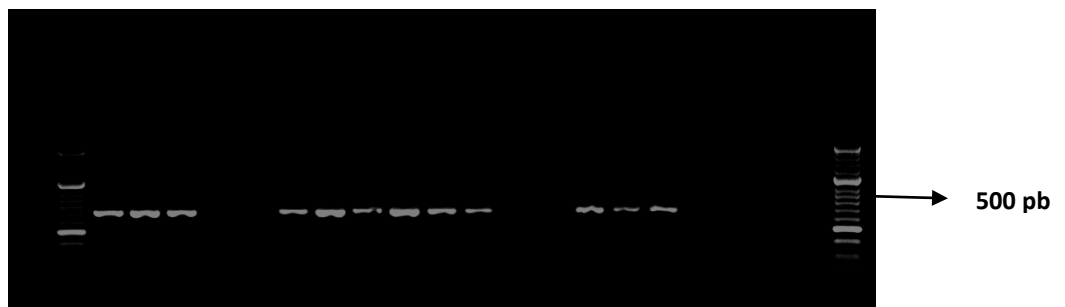
Los aislamientos amplificados por el método de PCR dúplex presentaron un fragmento de 500 pb aproximadamente, correspondiente al amplicón generado por los cebadores 93F/93R, los cuales amplifican el gen que codifica la proteína Kfra. (Figura 4). De acuerdo a estos resultados se confirma que todos los aislamientos de moko evaluados en este estudio son patogénicos y pertenecen al filotipo II del complejo de *Ralstonia solanacearum* (RSSC), estos resultados coinciden con lo reportado por Cellier *et al.* (2015) quienes afirman que los aislamientos patogénicos de moko pertenecientes al filotipo II deben amplificar un solo fragmento de 477 pb, el cual es amplificado por los cebadores 93F/93R mientras que las aislamientos no patogénicos también pertenecientes a este mismo filotipo IIB- 4NPB (Non Pathogenic Banana) y que están emparentados filogenéticamente con aislamientos patogénicos de moko pero epidemiológicamente diferentes debido a que no causan enfermedad en variedades de banano y plátano, presentan amplificaciones de los dos fragmentos, el mismo fragmento de 477 pb amplificado por los cebadores 93F/93R y el fragmento de 661 pb amplificado por los cebadores 5F/5R. Por lo anterior y de acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad realizadas previamente se puede afirmar que todos los aislamientos evaluados son patogénicos debido a que al realizar las pruebas de patogenicidad éstos causaron enfermedad sobre plantas sanas al ser inoculados y porque molecularmente la PCR dúplex generó en todas las muestras de ADN de los aislamientos amplificadas una sola banda de 477 pb aproximadamente, la cual fue generada por los cebadores 93F/93R tal como se observa en la Figura 5.

Estos resultados son aportantes debido a que hasta la actualidad no se han reportado trabajos en Colombia del uso de la metodología de PCR dúplex para la identificación y caracterización de aislamientos patogénicos de *R. solanacearum* causando moko, enfermedad limitante del cultivo de plátano y banano y de gran importancia económica en el país generando un valioso aporte como nueva técnica molecular a ser implementada en la detección de aislamientos patogénicos de esta bacteria en nuestro país (Ceballos *et al.* 2017). Esta técnica está diseñada con base a secuencias de genomas completos, lo cual garantiza ensayos con una alta especificidad para la detección de aislamientos patogénicos de *R. solanacearum* filotipo II dentro del complejo de especies de *Ralstonia* (RSSC) que puedan ser obtenidos de tejido de plátano y banano. (Cellier *et al.*, 2015).

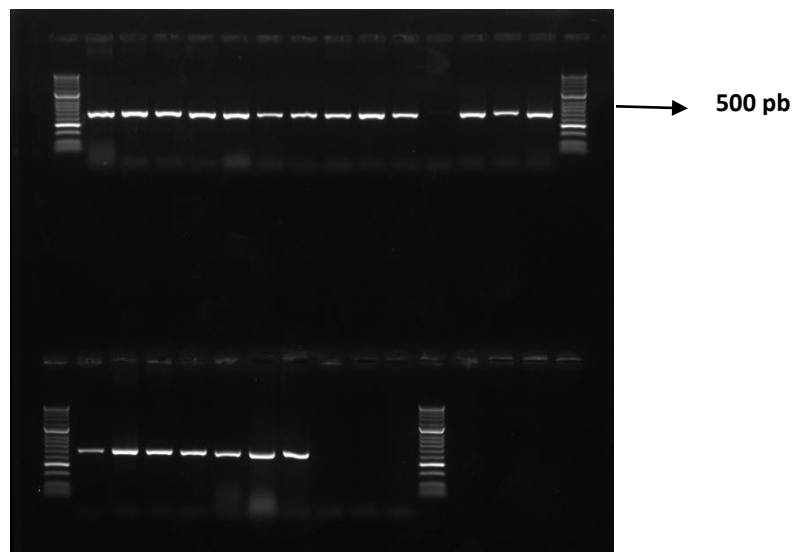
M 19 27 20 30 31133752 16 36 253941 22 7 5 2 46 48 15 17 9 47 75 4 53 61 74 M



M 65 71 73 72 45 60 77 42 59 57 44 34 70 69 68 (+) RT RM (-) (-) M



M 3 1 6 8 20 51 10 1214 43 40 38 32 26 M



M 50 33 61 65 35 18 (+)(-) (-) (-) M

Figura 5. Amplificación por PCR dúplex de ADN de aislamientos de *R. solanacearum*. **M.** marcador de peso molecular Hyper Ladder II. **(+)** Control positivo (ADN aislamiento CIAT 078). **(-)** Control negativo (mix de PCR sin ADN). **RT.** ADN *R. solanacearum* aislada de tomate **RM.** ADN *R. solanacearum* aislada de tabaco. Cada número corresponde a un código de aislamiento (Ver Tabla 1).

3.5 Secuenciación de los productos de PCR y análisis de secuencias

Un total de 15 productos de amplificación por PCR dúplex correspondientes a los aislamientos A51, A43, A40, A38, A50, A33, A52, A41, A46, A48, A47, A72, A42, A44 y A34 fueron secuenciados y analizados por medio de BLAST. Todas las secuencias presentaron un 99 % de identidad con secuencias de *Ralstonia solanacearum* reportadas en la base de datos del NCBI (Tabla 2). Las secuencias obtenidas fueron reportadas y depositadas en el GenBank con los códigos de acceso MF510470, MF543316, MF543316, MF543316, MF543316, MF543316, MF543316, MF543316, MF543317, MF543318, MF543319, MF543320, MF543321, MF543322, MF543323, MF543324, MF543325, MF543326, MF543327, MF543328 y MF543329.

Las identidades obtenidas se dieron en primer lugar con la cepa IBSBF1503 aislada de pepino en Brasil en 1999 y la cual fue clasificada filogenéticamente como filotipo IIB4 pero es perteneciente al patotipo NPB, una variante que es patógena en Cucurbitáceas (Ailloud et al. 2016), en segundo lugar con el aislamiento UW163 obtenido en 1967 de plátano en Perú y el cual es clasificado filogenéticamente como filotipo IIB4 pero a su vez es perteneciente al mismo patotipo de la enfermedad de Moko del banano y en tercer lugar con la cepa Po82 analizada por Xu, J et al. 2011, quienes al caracterizar esta cepa de *R. solanacearum* originalmente aislada de papa en México, encontraron que esta cepa pertenecía al filotipo IIB / secuevar 4, grupo al cual pertenecen también los aislamientos causantes de la enfermedad del Moko en banano cuando normalmente estos aislamientos no son patogénicos para papa. Los aislamientos patogénicos en papa se encuentran clasificadas dentro la raza 3 mientras que los patogénicos a musáceas están clasificados dentro de la raza 2 de acuerdo a los estudios filogenéticos y epidemiológicos, sin embargo, las dos razas pertenecen al filotipo II (Álvarez et al., 2013). Adicionalmente se observó también un 91% de identidad con la secuencia de la proteína putativa Kfra de la cepa UW181 tal como se observa en la Tabla 2. Estos resultados muestran la limitación que presenta la clasificación de secuevares debido a que no logra reflejar la alta variabilidad patogénica y genómica que tiene este patógeno para atacar diferentes hospederos en diversas zonas geográficas para permanecer viable antes de infectar un hospedero específico independientemente del sistema de clasificación por el que ha sido estudiado. Debido a la alta complejidad de este patógeno tanto genética

como fenotípicamente, al hacer estudios de investigación es común lograr encontrar aislamientos de un determinado cultivo que al ser analizados genéticamente por técnicas de secuenciación muestran una similitud con aislamientos reportados en otro hospedero e igualmente cuando se hacen análisis fenotípicos como pruebas de patogenicidad es posible observar que un aislamiento obtenido de un hospedero determinado y clasificado en una raza determinada puede causar síntomas en otro hospedero distinto al ser reinoculado.

Tabla 2. Identidad entre secuencias de ADN de aislamientos de *Ralstonia solanacearum* en este estudio y secuencias reportadas previamente en el NCBI

Apareamiento con accesiones Genbank	Código GenBank ^b	Accesiones este estudio	Bases similares	Identidad (%)
<i>Ralstonia solanacearum</i> strain IBSBF1503 plasmid, complete sequence ^a	CP012944		475/478	99
<i>Ralstonia solanacearum</i> strain UW163 plasmid, complete sequence ^a	CP012940		475/478	99
<i>Ralstonia solanacearum</i> Po82 megaplasmid, complete sequence ^a	CP002820	MF510470, MF543316, MF543317, MF543318, MF543319, MF543320, MF543321, MF543322, MF543323, MF543324, MF543325, MF543326, MF543327, MF543328 MF543329	475/478	99
<i>Ralstonia solanacearum</i> strain UW181 putative KfrA protein (RALUWv1_4260003) gene, complete cds ^a	KM387307		429/474	91

a Número de bases total reportado en GenBank; **b** Código asignado en GenBank; **c** El valor 0 es el esperado para porcentajes altos de similaridad; **d** Número de bases similares en diferentes regiones de la secuencia reportada en GenBank.

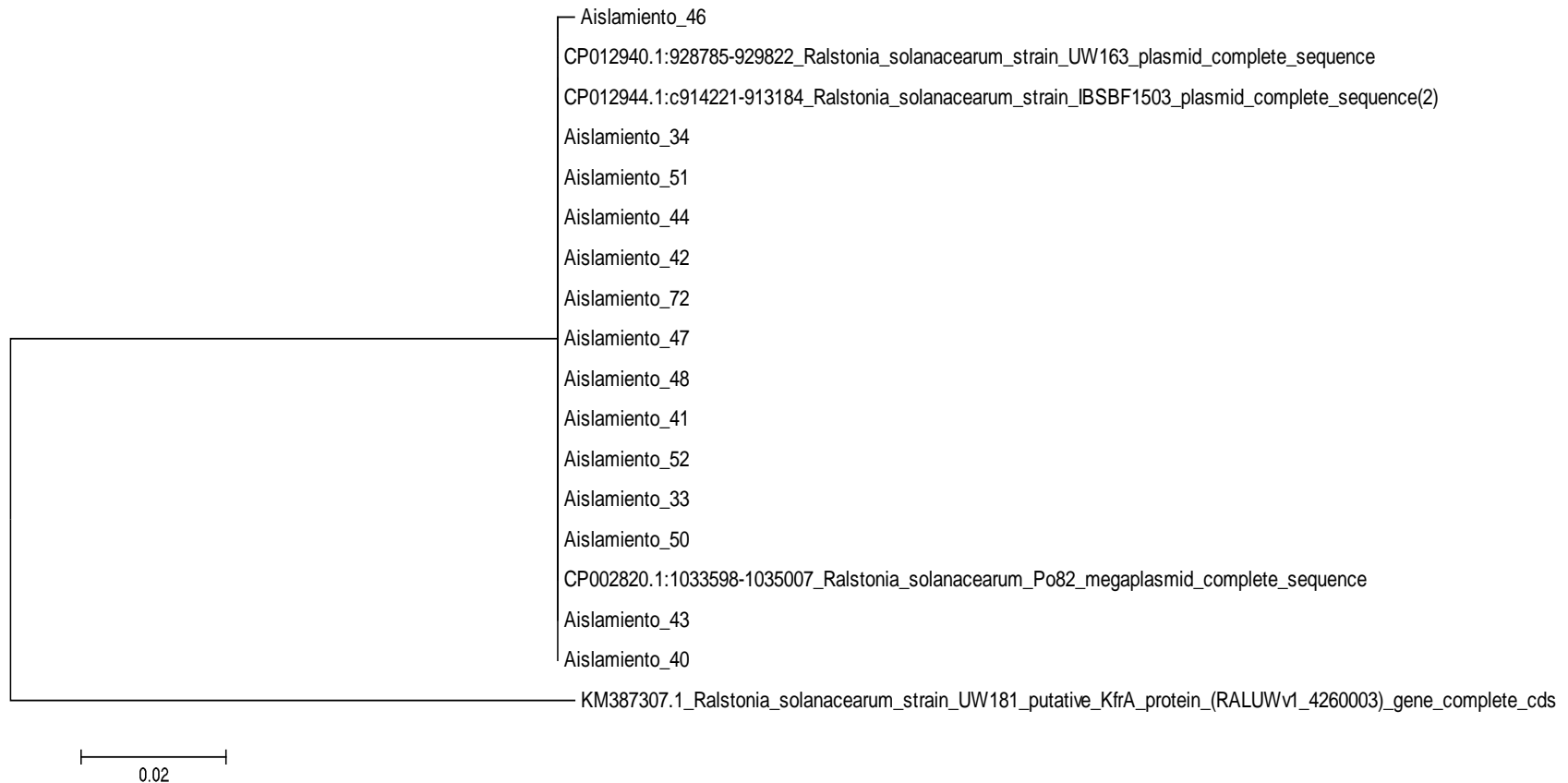


Figura 7. Árbol filogenético construido por el método de máxima parsimonia analizado mediante el algoritmo Near-full-length con las secuencias de los aislamientos de *R. solanacearum* de este estudio y otras secuencias homólogas reportadas en el NCBI

3.6 Identificación de los aislamientos por PCR en tiempo real (qPCR)

El ADN obtenido a partir de colonias puras de cada uno de los aislamientos fue amplificado por qPCR empleando los cebadores y la sonda TaqMan® diseñada específicamente para la detección de aislamientos patogénicos de *Ralstonia solanacearum*. Como se observa en las Figura 8-9 y en la Tabla 3, los 75 aislamientos fueron positivos obteniéndose un 100% de detección con este método, con valores de amplificación (Ct) que oscilaron entre 15.56 (A52) y 33.62 (A59) con un valor promedio cercano a 24. El método está basado en BIO-PCR, el cual consiste en la detección directa a partir de las colonias puras obtenidas de los diferentes aislamientos, lo cual facilita y acelera el proceso de identificación debido a que no se requiere hacer una extracción total de ADN convirtiéndose esta en una metodología de detección rápida y específica.

El análisis de correlación permitió determinar una correlación altamente significativa ($p < 0,0001$) entre la patogenicidad (ABCPE) y el valor de amplificación (Ct) (Anexo 3), lo cual podría estar explicando el hecho de que los aislamientos (A51, A43, A40, A38, A50, A33, A52, A41, A46, A48, A47, A72, A42, A44 y A34) quienes fueron los más patogénicos de acuerdo a los resultados de la prueba de patogenicidad presentarán los valores de amplificación más altos amplificando de forma más rápida durante la reacción de qPCR.

La relación entre estas dos variables podría deberse en primer lugar, al número de copias de los genes que puedan estar expresando los aislamientos al momento de la amplificación, como es el caso del gen de la endoglucanasa (*egl*) que es el gen bajo el cual fué diseñada la metodología de qPCR y otros genes *eps* asociados a la producción de exopolisacárido (EPS), molécula que es producida por los aislamientos a medida que van creciendo sobre el medio de cultivo del cual se toman las colonias para la reacción de BIO-PCR. Estos dos genes están asociados a procesos de virulencia y patogenicidad y son expresados por *R. solanacearum* al momento de colonizar la planta hospedero, para inducir la perforación de su pared vegetal y producir EPS dentro de los vasos xilemáticos respectivamente y podrían entonces estar siendo expresados en mayor proporción por los aislamientos más patogénicos, motivo por el cual la sonda TaqMan®

Mus 20P pudo haberlos detectado de manera más rápida dentro de la reacción, lo cual se ve traducido en un mayor ciclo de amplificación (Ct).

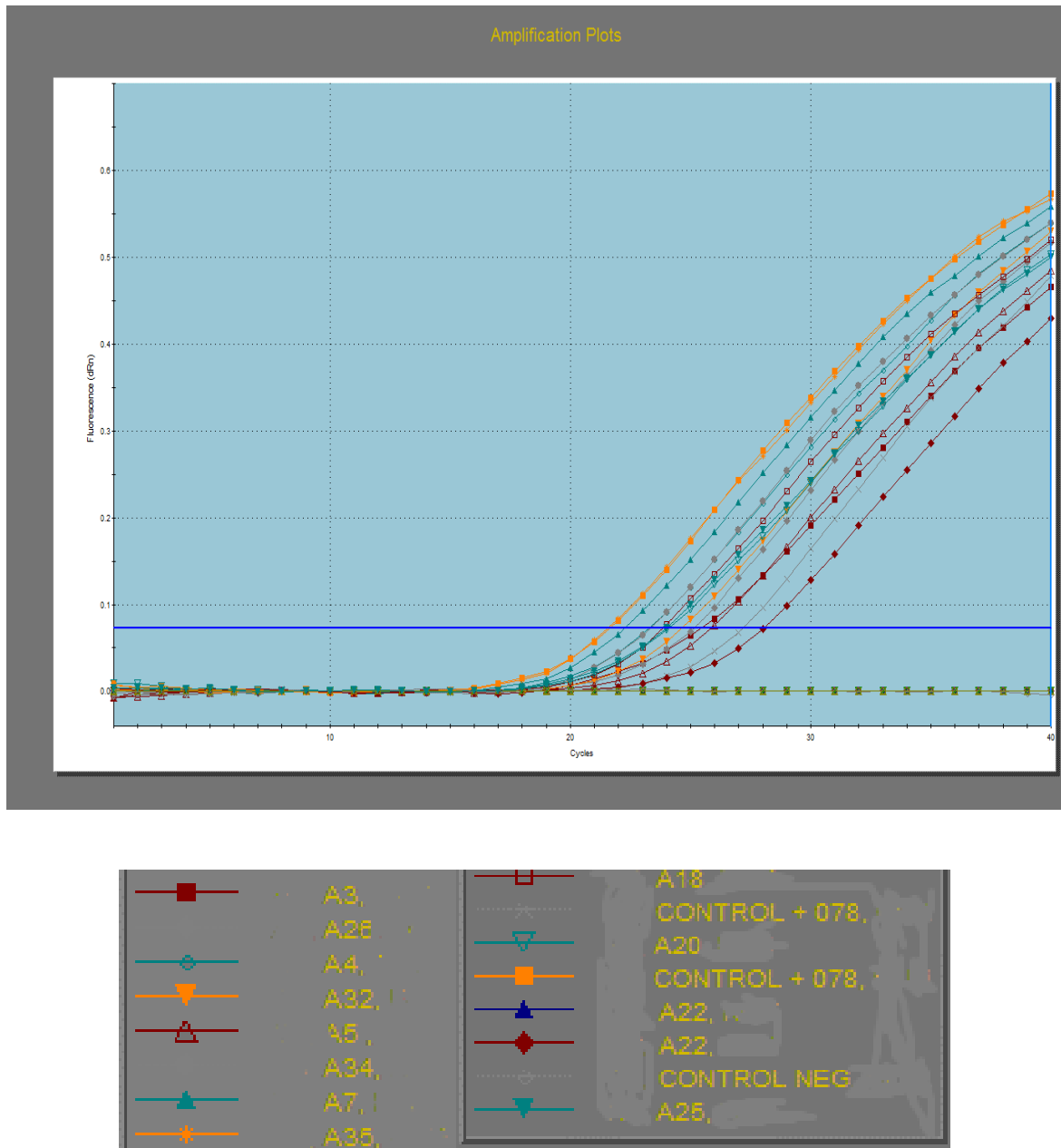


Figura 8. Amplificación por PCR en tiempo real (qPCR) de 12 aislamientos de *Ralstonia solanacearum* (moko) amplificadas con la sonda TaqMan Mus 20P y cebadores Mus 20F/Mus 20RP

32 Caracterización patogénica y molecular de *Ralstonia solanacearum* raza 2 agente causal del Moko en plantaciones de plátano y banano (*Musa* spp.) en el Norte del Valle del Cauca

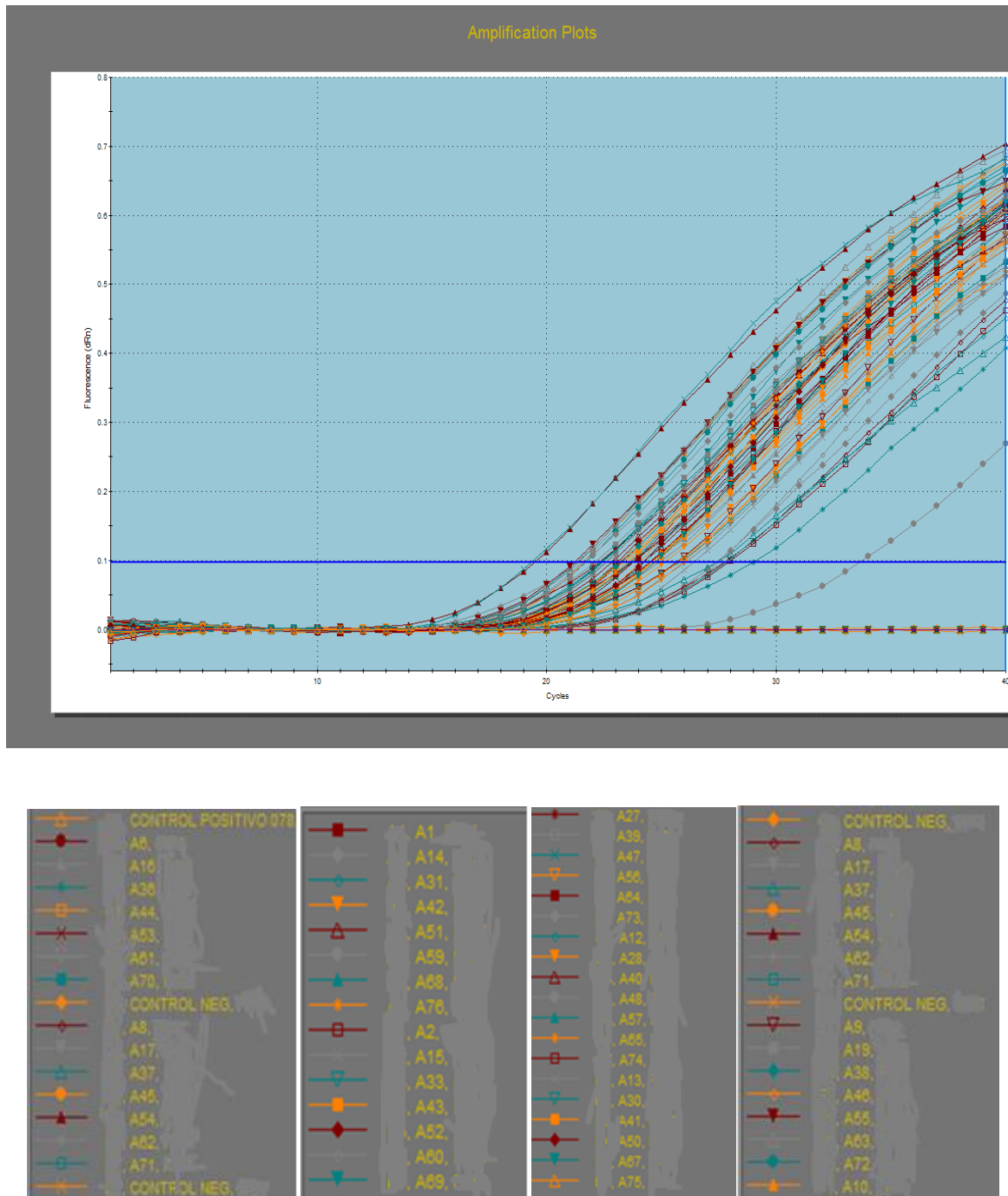


Figura 9. Amplificación por PCR en tiempo real (qPCR) de 63 aislamientos de *Ralstonia solanacearum* (moko) amplificadas con la sonda TaqMan Mus 20P y cebadores Mus 20F/Mus 20RP

Tabla 3. Valores de amplificación (Ct) por qPCR de aislamientos de *Ralstonia solanacearum* con la sonda TaqMan® Mus 20P y cebadores específicos Mus 20F/Mus 20PR

Aislamiento	Ct (dRn)	Aislamiento	Ct (dRn)
No.		No.	
A59	33.62	A67	24.72
A36	28.98	A28	24.62
A2	27.89	A10	24.58
A12	27.78	A16	24.53
A8	27.74	A1	24.51
A58	27.51	A74	24.51
A37	27.39	A57	24.27
A14	27.38	A51	18.98
A15	26.4	A50	17.98
A17	26.06	A46	19.64
A56	25.93	A53	23.78
A70	25.76	A64	23.73
A75	25.72	A68	23.67
A9	25.67	A60	23.67
A42	18.54	A71	23.64
A13	24.9	A76	23.6
A35	21.62	A69	22.36
A19	22.07	A27	22.29
A72	17.77	A62	21.32
A73	21.68	A55	21.19
A44	18.65	A54	19.51
A61	21.57	A47	19.35
A63	21.41	A48	16.45
A31	21.33	A35	21.62
A22	28.04	A7	22.32
A9	25.91	A43	20.16
A3	25.5	A40	19.34
A26	25.17	A38	18.78
A32	24.69	A33	20.08
A20	24.1	A52	15.56
A25	24	A41	17.98
A18	23.89	Control + 078	21.68
A34	20.04	Control + 078	23.22
A4	23.29	Control -	No Ct

4. Conclusión y perspectivas futuras

4.1 Conclusiones

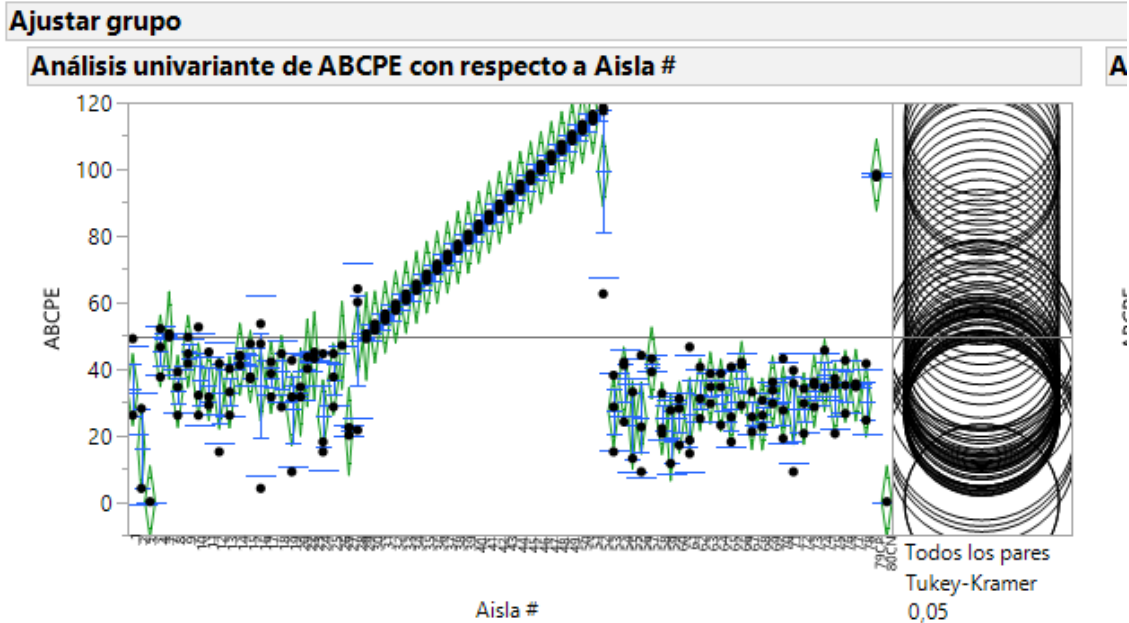
- Los aislamientos obtenidos fueron identificados morfológicamente como *Ralstonia solanacearum* y presentaron diferencias significativas en cuanto a su patogenicidad, clasificándose de acuerdo a esta dentro de 3 grupos alta, media y baja sobre la cual tuvo un efecto significativo la variable origen, pero no la variable tejido fuente.
- Se estandarizó e implementó un método de PCR dúplex capaz de detectar aislamientos patogénicos de moko (Filotipo II secuevar IIB-4) con una alta precisión, eficiencia y repetibilidad, el cual podrá ser implementado en laboratorios de investigación y de diagnóstico fitosanitario, ya que permite la detección específica de cepas patogénicas de *Ralstonia solanacearum* raza 2 causantes de moko en cultivos de plátano y banano para la toma de decisiones acertadas en materia cuarentenaria.
- La secuenciación permitió identificar con una identidad del 99% los aislamientos como *Ralstonia solanacearum*, éstos fueron idénticos, lo cual puede deberse a que durante el estudio presentaron características muy homogéneas y fueron los de mayor patogenicidad durante este estudio.
- La alta sensibilidad de la técnica de PCR en tiempo real permitió confirmar todos los aislamientos como *Ralstonia solanacearum* observándose una correlación estadística altamente significativa entre la patogenicidad y el ciclo de amplificación (Ct) de los aislamientos la cual puede deberse a la expresión de un alto número de copias de genes asociados con patogenicidad.
- La alta similitud encontrada entre los aislamientos con los marcadores moleculares empleados en contraste con la variabilidad patogénica observada en los mismos sugiere que es necesario continuar evaluando posibles diferencias genómicas a mayor detalle debido a que estos resultados demuestran que

aparentemente los marcadores moleculares podrían estar evolucionando más lento que las características patogénicas en estas poblaciones bacterianas.

4.2 Perspectivas futuras

- Realizar otros estudios epidemiológicos y de patogenicidad complementarios que permitan analizar la distribución de la enfermedad del moko en otras zonas del Departamento del Valle del Cauca y comparar este comportamiento con la zona norte, la cual se ha caracterizado por tener una alta prevalencia de la enfermedad.
- Realizar estudios filogenéticos, genómicos y fenotípicos que permitan determinar qué diferencias genotípicas existen entre las diferentes razas y filotipos del complejo de *Ralstonia solanacearum* (RSSC) que puedan llevar a un mejor entendimiento del comportamiento patogénico y la evolución genética de este patógeno, así como al diseño de nuevas metodologías de detección más específicas y precisas.
- Secuenciar genomas de aislamientos de *R. solanacearum* obtenidos en Colombia para comparar la información genética generada con la de otros genomas ya reportados en el mundo.
- Desarrollar, estandarizar e implementar métodos de detección rápida como LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) que permitan detectar el patógeno en campo sin necesidad de movilizar material vegetal hacia laboratorio.

A. Anexo: Análisis de varianza para la agresividad de los 75 asilamientos de *R. solanacearum* aislados de tejido de plátano y banano en plantaciones del norte del Valle del Cauca



ANOVA de un factor

Resumen del ajuste

R cuadrado	0,93227
R cuadrado ajustado	0,896523
Raíz del error cuadrático medio	9,409934
Media de respuesta	49,52534
Observaciones (o suma de pesos)	221

Análisis de varianza

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Aisla #	76	175507,45	2309,31	26,0801	<,0001*
Error	144	12750,75	88,55		
C. Total	220	188258,20			

38 Caracterización patogénica y molecular de *Ralstonia solanacearum* raza 2 agente causal del Moko en plantaciones de plátano y banano (*Musa* spp.) en el Norte del Valle del Cauca

Medias y desviaciones estándar						
Nivel	Número	Media	Desviación estándar	Error estándar de la media	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%
1	3	33,666667	13,279056	7,6666667	0,6796624	66,653671
2	2	16	16,970563	12	-136,4745	168,47446
3	3	0	0	0	0	0
4	3	45,333333	7,3200638	4,2262408	27,149287	63,51738
7	2	50	0,7071068	0,5	43,646898	56,353102
8	3	33,166667	6,6017674	3,8115322	16,766967	49,566366
9	3	45,166667	4,0414519	2,3333333	35,127144	55,20619
10	3	36,833333	13,895443	8,0225377	2,3151396	71,351527
11	3	35,166667	8,6071676	4,9693505	13,785277	56,548056
12	3	32,666667	15,299782	8,8333333	-5,340099	70,673432
13	3	33	7	4,0414519	15,611036	50,388964
14	3	42,833333	1,6072751	0,9279607	38,840641	46,826026
15	3	40,666667	5,9231185	3,4197141	25,952825	55,380509
16	3	35	27,013885	15,596474	-32,10621	102,10621
17	3	37,333333	5,3463383	3,0867099	24,052293	50,614374
18	3	39,166667	9,2376043	5,3333333	16,219185	62,114148
19	3	27,666667	17,075811	9,8587243	-14,752	70,085334
20	2	33	2,1213203	1,5	13,940693	52,059307
22	2	41,75	2,4748737	1,75	19,514142	63,985858
23	2	44	1,4142136	1	31,293795	56,706205
24	3	25,833333	16,23525	9,3734258	-14,49726	66,163929
25	3	36,833333	8,0208063	4,6308147	16,908546	56,758121
26	2	47	0	0	47	47
27	2	21,15	1,6263456	1,15	6,5378646	35,762135
28	3	48,5	23,468063	13,549293	-9,797901	106,7979
29	2	49,75	1,0606602	0,75	40,220346	59,279654
30	3	52,5	1	0,5773503	50,015862	54,984138
31	3	55,5	1	0,5773503	53,015862	57,984138
32	3	58,5	1	0,5773503	56,015862	60,984138
33	3	61,5	1	0,5773503	59,015862	63,984138
34	3	64,5	1	0,5773503	62,015862	66,984138
35	3	67,5	1	0,5773503	65,015862	69,984138
36	3	70,5	1	0,5773503	68,015862	72,984138
37	3	73,5	1	0,5773503	71,015862	75,984138
38	3	76,5	1	0,5773503	74,015862	78,984138
39	3	79,5	1	0,5773503	77,015862	81,984138
40	3	82,5	1	0,5773503	80,015862	84,984138
41	3	85,5	1	0,5773503	83,015862	87,984138
42	3	88,5	1	0,5773503	86,015862	90,984138
43	3	91,5	1	0,5773503	89,015862	93,984138
44	3	94,5	1	0,5773503	92,015862	96,984138
45	3	97,5	1	0,5773503	95,015862	99,984138
46	3	100,5	1	0,5773503	98,015862	102,98414
47	3	103,5	1	0,5773503	101,01586	105,98414
48	3	106,5	1	0,5773503	104,01586	108,98414
49	3	109,5	1	0,5773503	107,01586	111,98414
50	3	112,5	1	0,5773503	110,01586	114,98414
51	3	115,5	1	0,5773503	113,01586	117,98414
52	3	99,5	32,046841	18,502252	19,891234	179,10877
53	3	27,166667	11,557826	6,6729137	-1,544564	55,877897
54	3	35,666667	10,115994	5,8404718	10,537145	60,796189
55	2	23	14,142136	10	-104,062	150,06205
56	3	25,166667	17,651723	10,191227	-18,68264	69,015978
57	3	41,666667	2,3094011	1,3333333	35,929796	47,403537
58	3	25	6,5383484	3,7749172	8,7578421	41,242158
59	2	19,5	11,313708	8	-82,14964	121,14964
60	3	25,333333	7,3711148	4,2557151	7,0224691	43,644198
61	3	26,5	17,435596	10,066446	-16,81242	69,812421
62	3	32,166667	7,8155827	4,5123288	12,751683	51,58165
63	3	34,166667	4,5092498	2,6034166	22,965069	45,368264
64	3	32	8,0467385	4,6457866	12,010794	51,989206
65	3	28	11,456439	6,6143783	-0,459373	56,459373
66	3	37,333333	7,2341781	4,1766547	19,362639	55,304028
67	3	26,5	6,0621778	3,5	11,440715	41,559285
68	3	26,333333	4,0104031	2,3154073	16,37094	36,295727
69	3	33	3,2787193	1,8929694	24,85521	41,14479
70	3	29,833333	12,16895	7,0257463	-0,396013	60,06268
71	3	28	16,575584	9,5699181	-13,17603	69,176034
72	3	28	6,8738635	3,968627	10,924376	45,075624
73	3	33,166667	4,0722639	2,3511227	23,050602	43,282731
74	3	38	6,5	3,7527767	21,853105	54,146895
75	3	30,833333	9,0046284	5,1988247	8,4645962	53,20207
76	3	34,666667	8,0052066	4,6218082	14,780631	54,552702
77	3	35	0,5	0,2886751	33,757931	36,242069
78	3	30,166667	9,8149546	5,6666667	5,7849679	54,548365
79CP	3	98,266667	0,5859465	0,3382964	96,811095	99,722239
80CN	3	0	0	0	0	0

Medias para ANOVA de un factor						
Nivel	Número	Media	Error estándar	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%	
1	3	33,667	6,8776	20,1	47,25	
2	3	10,667	6,8776	-2,9	24,25	
3	3	0,000	6,8776	-13,6	13,59	
4	3	45,333	6,8776	31,7	58,92	
7	3	33,333	6,8776	19,7	46,92	
8	3	33,167	6,8776	19,6	46,75	
9	3	45,167	6,8776	31,6	58,75	
10	3	36,833	6,8776	23,2	50,42	
11	3	35,167	6,8776	21,6	48,75	
12	3	32,667	6,8776	19,1	46,25	
13	3	33,000	6,8776	19,4	46,59	
14	3	42,833	6,8776	29,2	56,42	
15	3	40,667	6,8776	27,1	54,25	
16	3	35,000	6,8776	21,4	48,59	
17	3	37,333	6,8776	23,7	50,92	
18	3	39,167	6,8776	25,6	52,75	
19	3	27,667	6,8776	14,1	41,25	
20	3	22,000	6,8776	8,4	35,59	
22	3	14,500	6,8776	0,91345	28,09	
23	3	29,333	6,8776	15,7	42,92	
24	3	25,833	6,8776	12,2	39,42	
25	3	36,833	6,8776	23,2	50,42	
26	3	31,333	6,8776	17,7	44,92	
27	3	6,667	6,8776	-6,9	20,25	
28	3	48,500	6,8776	34,9	62,09	
29	3	33,167	6,8776	19,6	46,75	
30	3	52,500	6,8776	38,9	66,09	
31	3	55,500	6,8776	41,9	69,09	
32	3	58,500	6,8776	44,9	72,09	
33	3	61,500	6,8776	47,9	75,09	
34	3	64,500	6,8776	50,9	78,09	
35	3	67,500	6,8776	53,9	81,09	
36	3	70,500	6,8776	56,9	84,09	
37	3	73,500	6,8776	59,9	87,09	
38	3	76,500	6,8776	62,9	90,09	
39	3	79,500	6,8776	65,9	93,09	
40	3	82,500	6,8776	68,9	96,09	
41	3	85,500	6,8776	71,9	99,09	
42	3	88,500	6,8776	74,9	102,09	
43	3	91,500	6,8776	77,9	105,09	
44	3	94,500	6,8776	80,9	108,09	
45	3	97,500	6,8776	83,9	111,09	
46	3	100,500	6,8776	86,9	114,09	
47	3	103,500	6,8776	89,9	117,09	
48	3	106,500	6,8776	92,9	120,09	
49	3	109,500	6,8776	95,9	123,09	
50	3	112,500	6,8776	98,9	126,09	
51	3	115,500	6,8776	101,9	129,09	
52	3	99,500	6,8776	85,9	113,09	
53	3	27,167	6,8776	13,6	40,75	
54	3	35,667	6,8776	22,1	49,25	
55	3	15,333	6,8776	1,7	28,92	
56	3	25,167	6,8776	11,6	38,75	
57	3	41,667	6,8776	28,1	55,25	
58	3	25,000	6,8776	11,4	38,59	
59	3	13,000	6,8776	-0,5865	26,59	
60	3	25,333	6,8776	11,7	38,92	
61	3	26,500	6,8776	12,9	40,09	
62	3	32,167	6,8776	18,6	45,75	
63	3	34,167	6,8776	20,6	47,75	
64	3	32,000	6,8776	18,4	45,59	
65	3	28,000	6,8776	14,4	41,59	
66	3	37,333	6,8776	23,7	50,92	
67	3	26,500	6,8776	12,9	40,09	
68	3	26,333	6,8776	12,7	39,92	
69	3	33,000	6,8776	19,4	46,59	
70	3	29,833	6,8776	16,2	43,42	
71	3	28,000	6,8776	14,4	41,59	
72	3	28,000	6,8776	14,4	41,59	
73	3	33,167	6,8776	19,6	46,75	
74	3	38,000	6,8776	24,4	51,59	
75	3	30,833	6,8776	17,2	44,42	
76	3	34,667	6,8776	21,1	48,25	
77	3	35,000	6,8776	21,4	48,59	
78	3	30,167	6,8776	16,6	43,75	
79CP	3	98,267	6,8776	84,7	111,85	
80CN	3	0,000	6,8776	-13,6	13,59	

El error estándar utiliza una estimación combinada de la varianza del error

40 Caracterización patogénica y molecular de *Ralstonia solanacearum* raza 2 agente causal del Moko en plantaciones de plátano y banano (*Musa* spp.) en el Norte del Valle del Cauca

Informe de letras de unión		
Nivel		Media
51	A	115,50000
50	A B	112,50000
49	A B C	109,50000
48	A B C D	106,50000
47	A B C D E	103,50000
46	A B C D E F	100,50000
52	A B C D E F G	99,50000
79CP	A B C D E F G	98,26667
45	A B C D E F G	97,50000
44	A B C D E F G H	94,50000
43	A B C D E F G H I	91,50000
42	A B C D E F G H I J	88,50000
41	A B C D E F G H I J K	85,50000
40	A B C D E F G H I J K L	82,50000
39	A B C D E F G H I J K L M	79,50000
38	A B C D E F G H I J K L M N	76,50000
37	B C D E F G H I J K L M N O	73,50000
36	C D E F G H I J K L M N O P	70,50000
35	D E F G H I J K L M N O P Q	67,50000
34	E F G H I J K L M N O P Q R	64,50000
33	F G H I J K L M N O P Q R S	61,50000
32	G H I J K L M N O P Q R S	58,50000
31	H I J K L M N O P Q R S T	55,50000
30	I J K L M N O P Q R S T U	52,50000
28	J K L M N O P Q R S T U V	48,50000
4	K L M N O P Q R S T U V W	45,33333
9	L M N O P Q R S T U V W	45,16667
14	M N O P Q R S T U V W	42,83333
57	N O P Q R S T U V W X	41,66667
15	M N O P Q R S T U V W X	40,66667
18	M N O P Q R S T U V W X	39,16667
74	M N O P Q R S T U V W X	38,00000
17	N O P Q R S T U V W X	37,33333
66	N O P Q R S T U V W X	37,33333
25	N O P Q R S T U V W X	36,83333
10	N O P Q R S T U V W X	36,83333
54	N O P Q R S T U V W X	35,66667
11	N O P Q R S T U V W X	35,16667
16	N O P Q R S T U V W X	35,00000
77	N O P Q R S T U V W X	35,00000
76	O P Q R S T U V W X	34,66667
63	O P Q R S T U V W X	34,16667
1	O P Q R S T U V W X	33,66667
7	O P Q R S T U V W X	33,33333
8	O P Q R S T U V W X	33,16667
29	O P Q R S T U V W X	33,16667
73	O P Q R S T U V W X	33,16667
13	O P Q R S T U V W X	33,00000
69	O P Q R S T U V W X	33,00000
12	O P Q R S T U V W X	32,66667
62	O P Q R S T U V W X	32,16667
64	O P Q R S T U V W X	32,00000
26	P Q R S T U V W X	31,33333
75	P Q R S T U V W X	30,83333
78	P Q R S T U V W X	30,16667
70	P Q R S T U V W X	29,83333
23	P Q R S T U V W X	29,33333
65	Q R S T U V W X	28,00000
71	Q R S T U V W X	28,00000
72	Q R S T U V W X	28,00000
19	Q R S T U V W X	27,66667
53	Q R S T U V W X	27,16667
61	Q R S T U V W X	26,50000
67	Q R S T U V W X	26,50000
68	Q R S T U V W X	26,33333
24	Q R S T U V W X	25,83333
60	R S T U V W X	25,33333
56	R S T U V W X	25,16667
58	R S T U V W X	25,00000
20	S T U V W X	22,00000
55	T U V W X	15,33333
22	T U V W X	14,50000
59	U V W X	13,00000
2	V W X	10,66667
27	W X	6,66667
3	X	0,00000
80CN	X	0,00000

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

B. Anexo: Análisis de efectos de las variables origen y tejido sobre la variable patogenicidad (ABCPE).

ANOVA de un factor

Resumen del ajuste

R cuadrado	0,044814
R cuadrado ajustado	0,031609
Raíz del error cuadrático medio	28,78664
Media de respuesta	49,52534
Observaciones (o suma de pesos)	221

Análisis de varianza

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
ORIGEN	3	8436,69	2812,23	3,3937	0,0188*
Error	217	179821,51	828,67		
C. Total	220	188258,20			

Medias y desviaciones estándar

Nivel	Número	Media	Desviación estándar	Error estándar de la media	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%
Alca	103	52,371845	30,762985	3,031167	46,359539	58,38415
Caice	83	42,307229	24,517146	2,6911064	36,953761	47,660697
Quindío	6	49,133333	53,824146	21,973615	-7,351644	105,61831
Ulloa	29	60,155172	26,402145	4,9027553	50,112333	70,198011

Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
2,58907	0,05

Matriz del umbral de HSD

Abs. (Dif.) - HSD	Ulloa	Alca	Quindío	Caice
Ulloa	-19,573	-7,884	-22,405	1,771
Alca	-7,884	-10,386	-28,062	-0,929
Quindío	-22,405	-28,062	-43,030	-24,681
Caice	1,771	-0,929	-24,681	-11,569

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

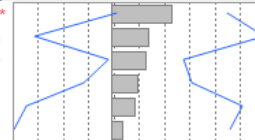
Informe de letras de unión

Nivel	Media
Ulloa A	60,155172
Alca A B	52,371845
Quindío A B	49,133333
Caice B	42,307229

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

Informe de las diferencias ordenadas

Nivel	- Nivel	Diferencia	Error estándar de la diferencia	Límite de control inferior	Límite de control superior	Valor p
Ulloa	Caice	17,84794	6,20958	1,7709	33,92496	0,0229*
Ulloa	Quindío	11,02184	12,91072	-22,4049	44,44856	0,8286
Alca	Caice	10,06462	4,24610	-0,9288	21,05805	0,0859
Ulloa	Alca	7,78333	6,05146	-7,8843	23,45097	0,5727
Quindío	Caice	6,82610	12,16946	-24,6815	38,33366	0,9435
Alca	Quindío	3,23851	12,08955	-28,0621	34,53917	0,9933



42 Caracterización patogénica y molecular de *Ralstonia solanacearum* raza 2 agente causal del Moko en plantaciones de plátano y banano (*Musa* spp.) en el Norte del Valle del Cauca

ANOVA de un factor

Resumen del ajuste

R cuadrado	0,02052
R cuadrado ajustado	0,006979
Raíz del error cuadrático medio	29,15042
Media de respuesta	49,52534
Observaciones (o suma de pesos)	221

Análisis de varianza

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
TEJIDO	3	3863,15	1287,72	1,5154	0,2114
Error	217	184395,05	849,75		
C. Total	220	188258,20			

Medias para ANOVA de un factor

Nivel	Número	Media	Error estándar	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%
Heliconia	6	29,6667	11,901	6,211	53,122
Peciol	44	46,5182	4,395	37,857	55,180
Pseudo	153	50,2876	2,357	45,643	54,932
Raquis	18	57,0167	6,871	43,475	70,559

El error estándar utiliza una estimación combinada de la varianza del error

Medias y desviaciones estándar

Nivel	Número	Media	Desviación estándar	Error estándar de la media	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%
Heliconia	6	29,666667	12,532624	5,1164224	16,514484	42,818849
Peciol	44	46,518182	27,168991	4,0958795	38,258054	54,77831
Pseudo	153	50,287582	29,083347	2,3512493	45,642233	54,932931
Raquis	18	57,016667	37,022445	8,7262741	38,605838	75,427496

Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
2,58907	0,05

Matriz del umbral de HSD

Abs. (Dif.) - HSD

	Raquis	Pseudo	Peciol	Heliconia
Raquis	-25,157	-12,077	-10,618	-8,228
Pseudo	-12,077	-8,629	-9,141	-10,789
Peciol	-10,618	-9,141	-16,091	-15,994
Heliconia	-8,228	-10,789	-15,994	-43,574

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

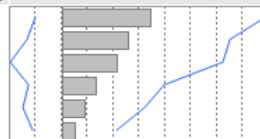
Informe de letras de unión

Nivel	Letra	Media
Raquis	A	57,016667
Pseudo	A	50,287582
Peciol	A	46,518182
Heliconia	A	29,666667

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

Informe de las diferencias ordenadas

Nivel	- Nivel	Diferencia	Error estándar de la diferencia	Límite de control inferior	Límite de control superior	Valor p
Raquis	Heliconia	27,35000	13,74164	-8,2280	62,92804	0,1948
Pseudo	Heliconia	20,62092	12,13171	-10,7889	52,03074	0,3263
Peciol	Heliconia	16,85152	12,68609	-15,9936	49,69667	0,5459
Raquis	Peciol	10,49848	8,15602	-10,6180	31,61496	0,5721
Raquis	Pseudo	6,72908	7,26375	-12,0773	25,53543	0,7907
Pseudo	Peciol	3,76940	4,98661	-9,1413	16,68008	0,8741



C. Anexo: Análisis de correlación entre las variables patogenicidad ABCPE y ciclo de amplificación por qPCR (Ct).

Multivariante

Correlaciones

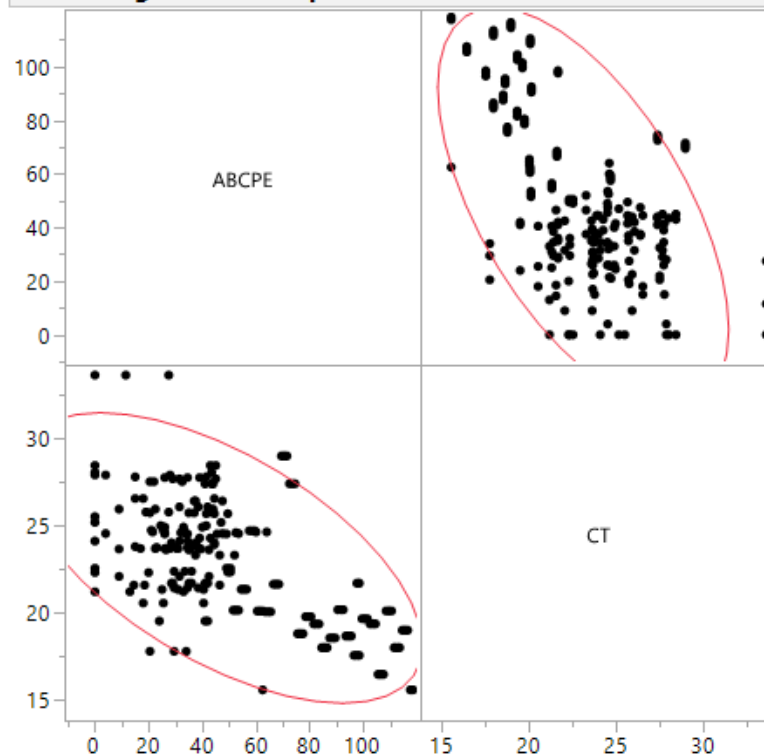
	ABCPE	CT
ABCPE	1,0000	-0,6028
CT	-0,6028	1,0000

Existen 3 valores faltantes. La estimación de las correlaciones se realiza mediante el método REML.

Probabilidad de correlación

	ABCPE	CT
ABCPE	<,0001	<,0001
CT	<,0001	<,0001

Matriz de gráficos de dispersión



Bibliografía

- Ailloud, F; Lowe, T.M; Robène, I; Cruveiller, S; Allen, C; Prior, P. In planta comparative transcriptomics of host-adapted strains of *Ralstonia solanacearum*. PeerJ 4: e1549; DOI 10.7717/peerj.1549.
- Álvarez E; Llano G; Loke J; González A. 2007. Nuevas alternativas para el manejo del Moko de plátano. *Asiava* 78:12–15.
- Álvarez E; Pantoja A; Gañán L; Ceballos G. 2013. Estado del arte y opciones de manejo del Moko y la Sigatoka negra en América Latina y el Caribe. [folleto]. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Cali, Colombia.
- Álvarez, E. 2017. El Moko en Colombia: Situación actual, regulaciones fitosanitarias y prácticas de manejo. En presentaciones IV Congreso Latinoamericano y del Caribe de Plátanos y Bananos, XVIII Congreso Nacional Mexicano de Productores de Plátano y XII Reunión del Comité Directivo de MUSALAC. 27 al 30 de Noviembre de 2017. Tecomán, Colima, México.
- Álvarez, E; Gómez, E; Mejía, J; Prior, P. 2010. Developing a TaqMan probe to detect, through real- time PCR, *Ralstonia solanacearum* which causes moko in spp. in Colombia: [P2-25]. En: Proceedings of the 12th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria: programme, abstracts, list of participants. INRA, Université de la Réunion, IRD.s.l.: s.n., Résumé, 64.
- AUGURA (Asociación de bananeros de Colombia). 2013. En línea: www.augura.com.co.
- Belalcázar S; Rosales FE; Pocasangre LE. 2003. El "Moko" del plátano y banano y el rol de las plantas hospederas en su epidemiología. En: Rivas, G., Rosales, F (eds).
- Buddenhagen IW. 1986. Bacterial wilt revisited. En: Persley GJ, ed. Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Proceedings of an International Workshop held at PCARRD, Los Baños, Filipinas, 8–10 de octubre de 1985. p. 126–143. ACIAR Proceedings 13.

- 46 Caracterización patogénica y molecular de *Ralstonia solanacearum* raza 2 agente causal del Moko en plantaciones de plátano y banano (*Musa* spp.) en el Norte del Valle del Cauca
-

- Cai, T., G. Lou, J. Yang, D. Xu, and Z. Meng. 2008. Development and evaluation of real-time loop-mediated isothermal amplification for hepatitis B virus DNA quantification: a new tool for HBV management. *J. Clin. Virol.* 41:270-27.
- Cardozo, C., Rodríguez, P., Marín, M. 2009. Caracterización molecular del complejo de especies *Ralstonia solanacearum* en la zona bananera de Urabá. *Agronomía colombiana* 27 (2): 203-210.
- Castañeda D, Espinosa JA (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.
- Ceballos, G.; Truke, M. J., Alvarez, E. 2017. Caracterización de aislamientos de *Ralstonia Solanacearum* Raza 2, agente causal de Moko de plátano, en el Valle del Cauca, Colombia. En memorias del XXV Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología, Congreso XIX Congreso Latinoamericano de Fitopatología, LVII APS Caribbean Division Meeting, 2 al 5 de octubre de 2017. Termas de Chillán, Chile.
- Cellier G, Moreau A, Chabirand A, Hostachy B, Ailloud F, Prior P (2015). A duplex PCR Assay for the Detection of *Ralstonia solanacearum* Phylotype II Strains in *Musa* spp. *PLoS ONE* 10(3).
- Denny TP. 2006. Plant pathogenic *Ralstonia* species. En: Gnanamanickam SS, ed. *Plant-Associated Bacteria*. Springer, Dordrecht, Los Países Bajos. p 573–644.
- Denny TP; Hayward AC. 2001. Gram-negative bacteria. *Ralstonia*. En: Schaad NW; Jones JB; Chun W, eds. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. American Phytopathological Society (APS) Press. St. Paul, MN, Estados Unidos. p 151–173.
- Doyle J.J., Doyle J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. – *Focus*, 12:13-15.
- Engelbrecht MC (1994) Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. *Bacterial Wilt Newsletter* 10:3-5.
- EPPO. 2010. Quarantine procedure No. 26. *Ralstonia solanacearum* inspection and test methods. European and Mediterranean Plant Protection Organization. *EPPO Bull.* 20, 255-262. Doi: 10.1111/j.1365-2338.1990.tb01205.x.

- Espinal CF; Martínez HJ; Peña Y. 2005. La cadena de plátano en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Observatorio Agro cadenas Colombia. Documento de Trabajo No. 61. <http://www.agrocadenas-gov.co>.
- Eyres N; Hammond N; Mackie A. 2005. Moko disease *Ralstonia solanacearum* (Race 2, Biovar 1). Factsheet. Note: 175. Department of Agriculture and Food, Government of Western Australia. 2 p. Disponible en: www.agric.wa.gov.au/objtwr/imported_assets/content/pw/ph/dis/fn/fs2006_moko_neyres.pdf.
- FAO. 2004. International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. CR 1/123. FAO, Rome.
- FAO. 2018. Situación del mercado del banano. Resultados preliminares relativos a 2017.
- FAOSTAT (División de Estadísticas de la FAO). 2011. En línea: www.faostat.fao.org.
- FAOSTAT (División de Estadísticas de la FAO). 2012. En línea: www.faostat.fao.org.
- FAOSTAT (División de Estadísticas de la FAO). 2015. En línea: www.faostat.fao.org.
- FAOSTAT (División de Estadísticas de la FAO). 2018. En línea: www.faostat.fao.org.
- Fegan M, Hollway G, Hayward AC, Timmis J, 1998. Development of a diagnostic test based upon the polymerase chain reaction (PCR) to identify strains of *Ralstonia solanacearum* exhibiting the biovar 2 genotype. In: Prior P, Allen C, Elphinstone J, eds. Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects. Paris, France: INRA Editions, 19–33.
- Fegan, M. y P. Prior. 2005. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”? pp. 449-461. En: Allen, C., P. Prior y A.C. Hayward (eds.). Bacterial wilt: the disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. APS Press, St.Paul, MN.
- Fegan, M. y P. Prior. 2006. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana. Australas. Plant Pathol. 35, 93-101.
- Europe counter season avocado market. Frutitrop. English edition. Close- up Banana. 2015 forestcap. 2015. CIRAD (231) April 2015.
- Galileo Rivas y Franklin Rosales, editores. Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos. Actas del Taller "Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka

48 Caracterización patogénica y molecular de *Ralstonia solanacearum* raza 2 agente causal del Moko en plantaciones de plátano y banano (*Musa* spp.) en el Norte del Valle del Cauca

- negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas”, celebrado en Guayaquil, Ecuador. 11- 13 de agosto, 2003.
- Genin S; Denny TP. 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. Annual Review of Phytopathology 50:67–89. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211173000>
- Gómez, E; Álvarez E; Llano G. 2006. Variabilidad genética de *Ralstonia solanacearum* raza 2, agente causante del Moko de plátano en Colombia. Fitopatología Colombiana, 30(1):1-7.
- Gómez, E; Álvarez, E; Llano, G ".2005. Identificación y caracterización de aislamientos de *Ralstonia solanacearum* raza 2, agente causante del Moko de plátano en Colombia.". Fitopatología colombiana, 28(2): 71-75
- Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., and Hanaki, K. I. 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. Bio Techniques 46:167-172.
- Granada, A. 2003. Manejo integrado del Moko (*Ralstonia solanacearum* Raza 2) en cultivos de bano y plátano. Boletín Técnico Cenibanano. Augura 2, 9-13.
- Hayward AC. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 27:265–277.
- Hayward AC. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 29:65–87. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.29.090191.000433>
- He, L.Y., Sequeira, L. & Kelman, A. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. PlantDisease. 67 (12): 1357-1361.
- Hill, J., S. Beriwal, I. Chandra, V.K. Paul, A. Kapil, T. Singh, R.M. Wadowsky, V. Singh, et al. 2008. Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of common strains of *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 46:2800-2804. (Hill et al., 2008).
- Huang, W;Zhang, H; Xu, J;Wang, Kong, X;Ding, W; Xu, J and Feng, J. 2017. Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for the Rapid Detection of *Ralstonia solanacearum* Phylotype I Mulberry Strains in China. Frontiers in Plant Science.

- Instituto Colombiano Agropecuario ICA. 2013. Propuesta de intervención fitosanitaria para la identificación, manejo y erradicación de focos con Moko *Ralstonia solanacearum* raza 2 y Mal de Panamá en las plantaciones de plátano y banano en el Valle del Cauca.
- International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. 12, Saint-Denis, Réunion, 7 Juin 2010/11 Juin 2010. Texto integral no disponible. Disponible en <http://agritrop.cirad.fr/555761/>.
- Keremane, M.L; Ramadugu, C; Rodriguez, E; Kubota, R; Shibata, S; Hall, D.G; Roose, M.L; Jenkins, D; Lee, R.F. 2014. A rapid field detection system for citrus Huanglongbing associated '*Liberibacter asiaticus*' from the psyllid vector, *Diaphorina citri* Kuwayana and its implications in disease management. Crop protection 68 (2015): 41-48.
- Kubota, R; Vine, B; Alvarez, A; Jenkins, D. 2008. Detection of *Ralstonia solanacearum* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. The American Phytopathological Society. Volumen 98, número 9: 1045-1051.
- Lenarcic, R, Morisset, D, Pirc, M, Llop, M, Ravnikar, M, Dreo, T (2014). Loop-mediated Isothermal Amplification of Specific Endoglucanase Gene Sequence for Detection of the Bacterial Wilt Pathogen *Ralstonia solanacearum*. PLOS ONE. Volumen 9. Disponible en: www.plosone.org.
- López, D., Pardo, J. M., Álvarez, E. 2017. Reconstructing the pan-genome of *Ralstonia solanacearum* sensu lato and its use in the design of a rapid molecular typing tool in agriculture. BIATA2017 August 1–5, 2017 Saint Petersburg, Russia.
- Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos. Taller "Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas", Guayaquil, Ecuador. 11-13 de agosto, 2003.
- Martins, O. 2000. Polymerase chain reaction in the diagnosis of Bacterial Wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* Georg-August University, Göttingen, Germany. 127 pp.
- Mejía GA. 1996. Comportamiento del Moko en Urabá entre 1985 y 1986 y en Magdalena en 1996. Carta Informativa Augura, Colombia (2):6–7.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2014. Documento indicadores cadenas plátano- 2014.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2017. Cadena de plátano cifras sectoriales.

- Obregón M. 2007. Diagnóstico, hospederos y sobrevivencia de la bacteria *Ralstonia solanacearum* en banano y aplicaciones al control integrado de la enfermedad en la zona de Urabá. Tesis M.Sc. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- Opina, N., Tavner, F., Hollway, G. Wang, J. -F., Li, T-H., Maghirang, R., Fegan, M., Hayward, A.C., Krishnapillai, V., Hong, W.F., Holloway, B.W. and Timmins, J. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia Pacific J. Mol. Biol. Biotech.* 5:19-30.
- Parida, M., K. Horioka, H. Ishida, P.K. Dash, P. Saxena, A.M. Jana, M.A. Islam, S. Inoue, et al. 2005. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Clin. Microbiol.* 43:2895-2903.
- Ploetz R. 2004. Enfermedades y plagas: Un análisis de su importancia y manejo. *Infomusa* 13(2):11-16.
- Pradhanang PM, Elphinstone JG, Fox RTV (2000). Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil: a comparison of different detection techniques. *Plant Pathology* 49: 414-422.
- Producción de material de 'siembra' limpio en el manejo de las enfermedades limitantes del plátano. 2013. Publicación CIAT No. 384 ISBN 978-958-694-120-4.
- Ravindran, A., Levy, J., Pierson, E., and Gross, D. C. 2012. Development of a loop-mediated isothermal amplification procedure as a sensitive and rapid method for detection of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' in potatoes and psyllids. *Phytopathology* 102:899-907.
- Restrepo, J.A; Rodríguez, A; Marín, M. Detección molecular de *Ralstonia solanacearum* en agroecosistemas bananeros de Colombia. 2008. *Tropical Plant Pathology* 33 (3).
- Seals, S.E; Taghavi, M; Fegan, N; Hayward, A.C y Fegan, M. 1999. Determination of *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum* rDNA subgroups by PCR test. *Plant Pathology* 48: 115-120.
- Stover, R. H. (1972). *Banana, Plantain and Abaca diseases*. Surrey, England, Commonwealth Mycological Institute.

- Sugawara, K., Himeno, M., Keima, T., Kitazawa, Y., Maejima, K., Oshima, K., & Namba, S. (2012). Rapid and reliable detection of phytoplasma by loop-mediated isothermal amplification targeting a housekeeping gene. *Journal of general plant pathology*, 78(6), 389-397.
- Tomlinson J.A, Boonham, N., Dickinson M. (2010). Development and evaluation of a one-hour DNA extraction and loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of phytoplasmas. *Plan Pathology* (2010) 59, 465-471.
- Toomey G. 2004. Colombia's campaign to save plantain from Moko – Farmers and scientists join forces to counter bacterial wilt epidemic sweeping number 2 crop. Green Ink Publishing Services Ltd. 7 p.
- Van der Wolf JM, Bonants PJM, Smith JJ, Hagenaar M, Nijhuis E, van Beckhoven JRCM, Saddler GS, Trigalet A, Feuillade R (1998). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* race 3 in Western Europe determined by AFLP, RC-PFGE and Rep-PCR. In: Prior P, Allen C, Elphinstone J (Eds.) *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*. Berlin. Springer. pp. 44-49.
- Vargas, J.E. 2001. El moko del plátano y banano y su manejo Institucional en el departamento del Quindío. p. 25 - 30. En: *Memorias Seminario-Taller manejo integrado de la Sigatoka negra, Moko y Picudo negro del plátano*. Armenia (Colombia).
- Vásquez CR. 2008. Moko bacteriano del plátano (*Ralstonia solanacearum* E. F. Smith). Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Colima. Secretaría de Desarrollo Rural. México.
- Weller, S.A; Elphinstone, J.G; Smith, N.C; Boonham, N; Stead, D.E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* Strains with a Quantitative, Multiplex, Real-Time, Fluorogenic PCR (TaqMan) Assay. *Applied and Environmental Microbiology* (2000) 66.