



Detección molecular de *Ralstonia solanacearum* en agroecosistemas bananeros de Colombia

John A. Álvarez Restrepo¹, Paola A. Rodríguez Gaviria² & Mauricio Marín Montoya¹

¹Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Colombia; ²Centro de Investigaciones del Banano, Cenibanano, Augura, Medellín, Colombia.

Autor para correspondencia: Mauricio Marín Montoya, e-mail: mamarinm@unal.edu.co

RESUMEN

El Moko del banano causado por *Ralstonia solanacearum* es una de las enfermedades más limitantes en la producción de este cultivo en el mundo. Una alternativa viable para reducir la incidencia de la enfermedad consiste en la detección temprana de plantas afectadas y de suelos con altos niveles de inóculo bacterial. En esta investigación se evaluaron diferentes metodologías de extracción de ácidos nucleicos a partir de material vegetal y de suelos para su utilización en el diagnóstico molecular de la bacteria, determinándose además las características de los filotipos y secuevares que causan esta enfermedad en la región bananera de Urabá, Colombia. Los resultados indican que para el caso del diagnóstico de material vegetal, los métodos más efectivos consisten en la utilización de kits comerciales de extracción de ADN que utilizan columnas de sílica gel en presencia de altas concentraciones salinas o alternativamente métodos convencionales con buffers que contengan PVPP. Para la detección a partir de muestras de suelo, la metodología más apropiada resultó ser aquella en la cual se realizó previa a la extracción de ADN, el enriquecimiento microbiano en medio líquido semiselectivo SMSA. El diagnóstico molecular mediante PCR múltiple permitió determinar que el agente causal del Moko del banano en Urabá corresponde al Filotipo II, secuevar 4 de *R. solanacearum*. Los procedimientos establecidos se constituyen en una herramienta a ser empleada en nuestro medio para el diagnóstico temprano del Moko del banano tanto en las investigaciones epidemiológicas como en el manejo de esta enfermedad en el campo.

Palabras clave: diagnóstico molecular, Moko, *Musa* sp., PCR múltiple.

ABSTRACT

Molecular detection of *Ralstonia solanacearum* from banana agroecosystems in Colombia

Moko disease of banana caused by *Ralstonia solanacearum* is one of the most limiting factors in the production of this crop in the world. An alternative to reduce the incidence of this disease consists in the early detection of affected plants and soils with high levels of bacterial inoculum. This research evaluated different methods of nucleic acids extraction from plant material and soils, to be used in molecular diagnosis of *R. solanacearum* in the banana-growing region of Urabá, Colombia. Results showed that for diagnosis of plant material, DNA extraction should be done with commercial kits including silica gel columns or alternatively conventional methods using buffers containing PVPP. For bacterial detection from soil samples the most appropriated method was the microbial enrichment in SMSA broth medium before DNA extraction. Multiplex PCR analysis indicated that phylotype II, sequevar 4 was the causal agent of Moko disease of banana in the region of Urabá. Techniques applied in this research could be used in epidemiological studies as well as to support management strategies of this disease in banana plantations.

Keywords: molecular diagnosis, Moko disease, multiplex PCR, *Musa* sp.

INTRODUCCIÓN

La agroindustria de producción de banano en Colombia es la tercera fuente generadora de divisas del sector agropecuario, con un valor que oscila entre 400 y 440 millones de dólares al año. Esta actividad económica se concentra en las regiones de Urabá (Antioquia) y el Nororiente del Magdalena, en donde se cultivan cerca de 44.000 ha que producen 1.399.623 t de fruta fresca y genera 35.000 empleos directos (MADR, 2006). Uno de los problemas más limitantes de esta agroindustria en Colombia es la enfermedad denominada Moko o Maduraviche, causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum*. Se estima que el Moko genera pérdidas económicas para la región de Urabá

de entre 16 y 17 ha anuales de área productiva (Castañeda y Espinosa, 2005), lo que se agrava por la capacidad de la bacteria de sobrevivir por largos períodos de tiempo en el suelo, inhabilitando la resiembra inmediata de los lotes afectados.

R. solanacearum es un fitopatógeno altamente agresivo con una distribución global y un inusual amplio rango de hospederos, que incluye cientos de plantas de al menos 50 familias botánicas diferentes (Denny & Hayward, 2001). Se considera que es una especie heterogénea que debe tratarse como un complejo que incluye la bacteria que causa la enfermedad BDB (*Blood disease bacterium*) del banano y *P. syzygii*, el agente causal de la enfermedad de Sumatra del árbol del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) (Fegan & Prior, 2005; Taghavi *et al.*, 1996). Tradicionalmente los miembros

de *R. solanacearum* han sido subdivididos en cinco razas con base en su rango de hospedantes (Denny & Hayward, 2001) y en cinco biovares con base en su capacidad metabólica para la utilización de diversas fuentes de carbono. Existe además una variante tropical del biovar 2 (2T o N2) que es considerada por Hayward *et al.* (1992) como un sexto biovar. Desafortunadamente la clasificación en biovares no corresponde con la de razas, excepto para el caso de la raza 3 (específica a papa) que consistentemente presenta individuos pertenecientes al biovar 2.

Desde el punto de vista genético, la especie se ha segmentado en dos divisiones (I y II) determinadas a partir del análisis de RFLPs de una colección mundial de aislamientos (Cook *et al.*, 1989). La división I comprende representantes de los biovares 3, 4 y 5 principalmente encontrados en Asia; mientras que la división II contiene los biovares 1, 2 y N2 de origen Americano. Esta agrupación fue posteriormente confirmada mediante análisis de las secuencias 16S del ADN (Taghavi *et al.*, 1996), estudio que además demostró la existencia de un subgrupo dentro de la división II, conformado por aislamientos de *R. solanacearum* obtenidos en Indonesia y por los organismos relacionados BDB y *P. syzygii*.

Fegan & Prior (2005) plantean la existencia de cuatro grupos genéticos correspondientes a diferentes orígenes geográficos. El filotipo I es equivalente a la división I definida por Cook & Sequeira (1994), cuyo origen es fundamentalmente asiático. El filotipo II es equivalente a la división II e incluye aislamientos de los biovares 1, 2 y 2T con procedencia americana. En este se presentan las cepas que atacan papa y pertenecen a la raza 3 y el patógeno que causa el Moko del plátano y banano (raza 2). El filotipo III contiene los aislamientos africanos de los biovares 1 y 2T y el filotipo IV contiene cepas de Indonesia de los biovares 1, 2 y 2T, además de algunos aislamientos de Australia, Japón y de las especies relacionadas *P. syzygii* y BDB.

El primer análisis genético detallado de los aislamientos de *R. solanacearum* raza 2 fue realizado por Cook *et al.* (1989), quienes mediante la utilización de RFLP encontraron la existencia de tres genotipos definidos como MLG 24, MLG 25 y MLG 28. Estos grupos correlacionaban con diferentes orígenes geográficos: MLG24: Centro América, MLG25: Colombia y Perú y MLG 28: Venezuela (Fegan, 2005). Posteriormente, con el desarrollo de los conceptos de filotipos y secuevares, se determinó que la raza 2 de *R. solanacearum* pertenece al filotipo II y que las cepas de los MLG 24, 25 y 28 correspondían a los secuevares 3, 4 y 6, respectivamente (Fegan, 2005).

Las principales estrategias de control del Moko del banano consisten en la utilización de material semilla sano, la detección prematura de las plantas infectadas, la erradicación de todas las plantas ubicadas en un radio de 5-10 m a partir del foco inicial y en su cuarentena durante al menos seis meses (Belalcazar & Merchan, 1991). Para el éxito de estas medidas se requiere de un sistema de

diagnóstico asintomático y del monitoreo constante de la bacteria en suelos y fuentes de agua, procedimientos que son complejos debido a las bajas densidades del patógeno en estos sustratos y a su distribución espacial irregular en el campo (Van der Wolf *et al.*, 1998; Pradhanang *et al.*, 2000).

El creciente nivel de incidencia del Moko del banano en la región de Urabá, hace necesaria la incorporación de herramientas de diagnóstico temprano de su agente causal en las plantaciones y en los suelos de esta zona. En esta investigación se evaluaron diferentes alternativas metodológicas para la extracción de ácidos nucleicos para su empleo en el diagnóstico molecular de la bacteria, incluyendo la definición del filotipo y los secuevares causantes de la enfermedad en esta región de Colombia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en los Laboratorios de Estudios Moleculares y Biología Celular y Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín y en el Laboratorio de Cenibanano de Augura. Las muestras de plantas y suelos fueron obtenidas en los municipios de Apartadó, Carepa, Chigorodó y Turbo del Urabá Antioqueño.

Una vez detectadas las plantas de banano con sintomatología de marchitez bacterial se seleccionaron 13 muestras de tejido vegetal (Tabla 2) y se evaluaron cuatro procedimientos para obtener el ADN molde a ser utilizado en las reacciones de PCR, dos denominadas convencionales y dos de detección directa. Para el caso de las muestras de suelo se ubicaron focos de Moko y se seleccionaron 11 muestras tomándose 500 g alrededor de las plantas a una profundidad de 5 cm, evaluándose tres metodologías para obtener el ADN bacterial: convencional, detección directa y enriquecimiento microbiano.

Metodologías para extracción de ADN de Tejido Vegetal

Métodos Convencionales. Se procedió a aislar la bacteria a partir de pequeñas porciones de tejido vascular procedente de cormos, pseudotallos, vástagos, bacotas y frutos, con desinfección previa en etanol por 30 s y en hipoclorito de sodio al 3% por 1 min. Este tejido fue macerado en agua destilada y la suspensión resultante cultivada en medio semi-selectivo SMSA modificado (casaminoácidos 1, peptona 10, glucosa 5, agar-agar 17 g/L; cristal violeta 5, polimyxin β -sulfato 100, bacitracina 25, penicilina 0,5, TZC 50 mg/L) (Engelbrecht, 1994). Las cajas de Petri fueron incubadas a 28 °C por un período de 72 a 96 h. Las colonias bacteriales con apariencia rojiza, mucoides, borde irregular y halo claro, fueron seleccionadas y transferidas a medio AN (extracto de carne 3, peptona 5, agar 18 g/L), para garantizar su pureza y continuar con la extracción de ADN por lisis térmica. La identidad de estas colonias fue confirmada mediante ELISA directa con anticuerpos monoclonales que detectan EPS de *R. solanacearum* (AGDIA, Indiana, USA).

Para la lisis térmica, se tomó una lupada bacterial

de cada aislamiento, se resuspendió en 100 µL de agua destilada estéril y se llevó a ebullición a 95 °C durante 5 min, utilizándose directamente 1 µL de dicha solución en PCR.

En la otra alternativa convencional evaluada, se partió de una lupada bacteriana obtenida en medio agar nutritivo y diluida en 100 µL de agua ultrapura estéril para luego centrifugar durante 4 min a 11.000 rpm con el fin de peletizar la bacteria. Luego se adicionaron 500 µL de buffer de extracción (10 mM NaCl, 25 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 100 µL de SDS 20%) y se continuó con el procedimiento convencional de extracción de ADN mediante limpieza con fenol-cloroformo y precipitación de ácidos nucleicos con isopropanol y acetato de sodio.

Métodos de detección directa. Se partió de 1 g de tejido vegetal con desinfección superficial previa con etanol al 70%. Posteriormente el tejido fue macerado en presencia de dos soluciones tampón diferentes: buffer tris (Tris-HCl 50 mM pH 8.0) y buffer TENPP (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl y 5% de PVPP), dejándose reposar durante 15 min y tomándose 1 mL de la solución para su incubación a 95°C durante 5 min. De esta solución se tomaron 500 µL y se le adicionaron 500 µL de buffer de extracción de ADN suplementado con PVPP al 5%, incubándose a temperatura ambiente por 30 min, para así continuar con el procedimiento de purificación de ADN descrito anteriormente.

La otra metodología directa evaluada consistió en la utilización del kit DNeasy Plant Mini (QIAGEN, CA, USA), para lo cual el material vegetal inicial consistió de 100 mg de tejido vegetal y su maceración en presencia de buffer de lisis AP1, siguiéndose las instrucciones del fabricante.

Metodologías para extracción de ADN de muestras de suelo.

Método convencional. Se resuspendió 1 g de suelo en buffer fosfato 0.05 M, para realizar diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} . De estas diluciones se tomaron 100 µL para su cultivo en medio SMSA modificado. Una vez obtenidas las colonias bacteriales características de *R. solanacearum*, se transfirieron a medio AN y se obtuvo el ADN mediante lisis térmica. La identidad de estas colonias fue confirmada por ELISA (AGDIA).

Método de detección directa. A 20 g de suelo se le adicionaron 100 mL de las soluciones de extracción evaluadas: buffer tris (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0) ó buffer PPB (fosfato de potasio 180 mM, pH 7.2), dejándose reposar durante 1 min para favorecer la precipitación de partículas densas. Posteriormente se tomaron 50 mL de la solución sobrenadante y se realizó un vortex vigoroso durante 20 s, centrifugándose por 5 min a 1000 rpm. Luego se tomó 1 mL del sobrenadante y se llevó al baño maría a 95°C durante 5 min. De esta solución se tomaron

500 µL y se mezclaron con 500 µL de buffer de extracción de ADN suplementado con PVPP al 5%, siguiendo el método descrito anteriormente.

Método del enriquecimiento microbiano. Para dar inicio a esta prueba, se utilizó 1 mL del sobrenadante obtenido luego de la primera centrifugación descrita en el procedimiento anterior, para su siembra en tubos de ensayo con 9 mL del medio líquido SMSA sin TZC. Los tubos fueron incubados a 30°C en agitación continua a 180 rpm durante 36 h, período después del cual se llevaron 90 µL a un tubo eppendorf y se procedió a la obtención de ADN mediante la adición de 10 µL de NaOH 0.5 M y ebullición a 95°C por 5 min.

Detección de *R. solanacearum* por PCR

A partir del ADN extraído en cada uno de los métodos evaluados se procedió a determinar la presencia de *R. solanacearum* por PCR con los *primers* específicos 759/760 (759: 5' GTC GCC GTC AAC TCA CTT TCC 3'; 760: 5' GTC GCC GTC AGC AAT GCG GAA TCG 3') (Opina *et al.*, 1997). Las PCR consistieron de un volumen total de 20 µL conteniendo 0.1 µM de cada *primer*, 1 U de Taq ADN polimerasa recombinante (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 0.2 mM de cada dNTP, 1X de buffer de enzima, 1,5 mM MgCl₂, 1 µL de BSA 10X y 3 µL del ADN extraído. En todas las evaluaciones se incluyó como control positivo la cepa de referencia RS074 y agua destilada estéril como control negativo. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador T3 (Biometra, Alemania) y consistieron de una desnaturalización inicial a 96 °C por 2 min, seguida por 40 ciclos de 94 °C por 20 s, 64 °C por 20 s, 72 °C por 30 s y un período final de extensión a 72 °C por 5 min. Luego de la amplificación, se tomaron 5 µL de los productos de reacción y se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, suplementado con 3 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL). La visualización de las bandas se realizó bajo luz ultravioleta utilizando el sistema digital de análisis Bio Doc Analyze (Biometra).

Caracterización de las cepas de *R. solanacearum*

De las muestras de plantas y suelos que resultaron positivas en la evaluación de PCR, se seleccionaron 12 muestras para definir su identidad taxonómica intraespecífica mediante PCR múltiple. Para el diagnóstico de los filotipos se utilizaron los *primers* de la serie Nmult diseñados por Fegan & Prior (2005). Las PCR fueron realizadas en un volumen total de 25 µL que contenía buffer de enzima 1X, 2 U de Taq Polimerasa, 1.5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 6 pmoles de cada *primer*, 1 µL de BSA 10X y 1 µL de ADN. El programa de amplificación consistió de una desnaturalización inicial a 96 °C por 5 min, seguida por 30 ciclos de 94°C por 15 s, 59°C por 30 s, 72°C por 30 s y un período final de extensión a 72°C por 10 min.

Para el diagnóstico de los secuevares se utilizaron los *primers* de la serie Mus diseñados por Prior & Fegan (2005). Las condiciones de amplificación fueron similares a las descritas para el PCR múltiple de detección de filotipos.

RESULTADOS

La identidad de las bacterias aisladas mediante los métodos convencionales a partir de tejido vegetal y suelo en las 24 muestras analizadas, fue confirmada como asociada al complejo *R. solanacearum* mediante la utilización del kit comercial *Ralstonia solanacearum* PathoScreen (AGDIA).

Detección en tejido vegetal

Los métodos de detección de *R. solanacearum* evaluados a partir de tejido vegetal sintomático generaron resultados variables, siendo el método que utiliza el Kit comercial de extracción de ADN, el único que permitió la amplificación de ADN bacterial en todas las muestras, mientras que con los métodos convencionales no fue posible la amplificación con los *primers* 759/760 en cuatro de ellas (Tabla 1). Al comparar los dos métodos de extracción de ADN evaluados en el método convencional, no se encontraron diferencias entre la lisis térmica y el procedimiento de extracción ADN con fenol-cloroformo, ya que ambos permitieron el diagnóstico de la bacteria en igual número de muestras.

Con respecto a los métodos de detección directa que utilizaban buffers Tris y TENPP para la maceración del tejido acoplada a la extracción de ADN con un buffer suplementado con PVPP, sólo fue posible la obtención de un

amplicón en una de las muestras cuando se utilizó el buffer Tris y en tres de ellas con el buffer TENPP.

Detección en muestras de suelo

De los métodos evaluados para la detección de *R. solanacearum* a partir de suelo, se encontró que los métodos convencionales que utilizan diluciones seriadas y siembra en medio semiselectivo SMSA, permitieron la amplificación de ADN bacterial en nueve de las 11 muestras evaluadas, independientemente de los métodos de extracción de ADN utilizados (lisis térmica vs purificación con fenol-cloroformo) (Tabla 2). Un resultado similar se obtuvo con el procedimiento de enriquecimiento, que permitió la generación de amplicones específicos en 10 y nueve muestras, cuando se utilizaron como soluciones tampón PPB y Tris, respectivamente. De otra parte, los métodos de detección directa a partir de muestras de suelo con los dos buffers evaluados, no permitieron la amplificación del ADN bacterial con los *primers* 759/760 en ninguna de las muestras analizadas, lo cual demuestra un claro efecto inhibitorio de la PCR.

Caracterización del complejo de especies *R. solanacearum*

Las PCR múltiples identificaron las 12 cepas evaluadas en el filotipo II secuevar 4 de *R. solanacearum*. Para el caso de la amplificación con *primers* de la serie NmUlt, se obtuvo un amplicón de 372 pb, mientras que el PCR con los *primers* Mus y S128, generaron dos bandas: 351 pb y 167 pb, la primera de ellas permite asociar las cepas con el secuevar 4 y la segunda es un indicativo de su potencial patogénico en *Musa* spp. (Figura 1).

TABLA 1 - Muestras de tejido vegetal de banano con sintomatología de la enfermedad del Moko y resultado de las evaluaciones realizadas

Muestra	Procedencia		Métodos evaluados			
	Localidad	Órgano evaluado	Convencional	Directa		Kit Comercial
				Tris	TENPP	
Bp	Carepa, Finca Cascarón	Fruto	+	-	-	+
Cp	Carepa, Finca Colbanano	Bacota	+	-	-	+
Dp	Chigorodó, Finca San Nicolás	Pseudotallo	+	+	-	+
Ep	Carepa, Finca Colbanano	Vástago	-	-	-	+
Fp	Chigorodó, Finca San Nicolás	Cormo	+	-	-	+
Gp	Chigorodó, Finca San Nicolás	Cormo	+	-	-	+
Hp	Carepa, Finca Colbanano	Cormo	+	-	+	+
Ip	Apartadó, Finca Cativos	Cormo			+	+
Jp	Turbo, Finca Providencia	Cormo	+	-	+	+
Kp	Apartadó, Finca Palmera	Cormo	+	-	-	+
Lp	Carepa, Finca Araguatos I	Vástago	-	-	-	+
Mp	Chigorodó, Finca Girasoles	Cormo	-	-	-	+
Np	Carepa, Finca Cascarón	Cormo	+	-	-	+

TABLA 2 - Muestras de suelo procedentes de lotes con registros de la enfermedad del Moko y resultado de las evaluaciones realizadas

Muestra	Procedencia		Metodologías evaluadas				
	Localidad	Lote	Convencional	Directa		Enriquecimiento Microbiano	
				Tris	PPB	Tris	PPB
Bs	Carepa, Finca Colbanano	Lote 1 M1	+	-	-	+	+
Cs	Chigorodó, Finca San Nicolás	Lote 2 M4	+	-	-	+	+
Ds	Apartadó, Finca Palmera	Lote 6	+	-	-	+	+
Es	Apartadó, Finca Cativos	Lote 9 M2	+	-	-	+	+
Fs	Chigorodó, Finca Girasoles	Lote 3	+	-	-	+	+
Gs	Carepa, Finca Colbanano	Lote 3 M1	+	-	-	+	+
Hs	Carepa, Finca Colbanano	Lote 1 M2	+	-	-	+	+
Is	Apartadó, Finca Palmera	Lote 1	-	-	-	+	+
Js	Carepa, Finca Araguatos I	Lote 1 M1	+	-	-	+	+
Ks	Turbo, Finca Providencia	Lote 15	+	-	-	-	-
Ls	Santa Marta, Finca Vijagual	M1	-	-	-	-	+

DISCUSIÓN

La detección de microorganismos fitopatógenos a partir de material vegetal, vectores biológicos y reservorios naturales como el suelo y las fuentes de agua, es de vital importancia para garantizar las condiciones fitosanitarias de los sistemas agrícolas. En los últimos años, las técnicas de diagnóstico han evolucionado de manera tal que se han alcanzado niveles de detección rápidos y confiables permitiendo incluso la detección asintomática en material de siembra sexual o asexual y de inóculo en sitios de siembra; puntos críticos para cualquier programa de manejo integrado de enfermedades (Kageyama *et al.*, 2003). En esta investigación se evaluó el potencial que presenta la detección molecular de *R. solanacearum* a partir de material vegetal y de suelos de la región bananera de Colombia, mediante el empleo de *primers* específicos que amplifican regiones útiles para el diagnóstico de esta bacteria. Los resultados obtenidos permiten concluir que cuando se parte de tejido vegetal, la utilización del Kit comercial DNeasy Plant Mini (QIAGEN) fue la alternativa más efectiva para generar ADN de alta calidad; mientras que para la detección de la bacteria en el suelo, la preparación de diluciones seriadas y su siembra en medio semiselectivo SMSA ó el enriquecimiento en medio líquido SMSA sin TZC, previa suspensión del suelo en buffer Tris ó PPB, resultaron ser igualmente eficientes; sin embargo, esta última técnica es preferible ya que requiere tan sólo 48 h para su realización.

Tradicionalmente, la detección de *R. solanacearum*, se ha basado en métodos como el aislamiento en medios de cultivo, pruebas de patogenicidad sobre plantas indicadoras y el uso de técnicas serológicas especialmente del tipo ELISA (Robinson-Smith *et al.*, 1995). Cada uno de estos métodos presentan ventajas y desventajas relacionadas con sus niveles de sensibilidad y especificidad, rapidez y nivel de costos. Así

por ejemplo, las pruebas basadas exclusivamente en medios selectivos resultan económicas y técnicamente sencillas, aunque requerem de tiempos extensos y sus niveles de sensibilidad sólo alcanzan en promedio 10^4 UFC/g de tejido ó suelo. De otra parte, las pruebas de patogenicidad ofrecen la ventaja de estar asociadas a la interacción hospedante-patógeno, de tal manera que solamente detectan aquellas cepas con características virulentas; pero al estar supeditadas a las condiciones que rigen el desarrollo de la enfermedad, sus resultados pueden ser muy poco repetitivos. Además, requieren largos períodos de tiempo y sus niveles de detección pueden verse afectados por la presencia de microorganismos antagonistas a las poblaciones del fitopatógeno (Janse, 1988; Pradhanang *et al.*, 2000). Los métodos serológicos representan una alternativa que permite la celeridad en el diagnóstico de *R. solanacearum*, sin embargo su nivel de sensibilidad es frecuentemente bajo, oscilando entre 10^4 y 10^6 UFC/g de tejido o suelo, y presentando el inconveniente de poder generar falsos positivos o falsos negativos (OEPP/EPPO, 2004).

Debido a los inconvenientes mencionados, es claro que el empleo de técnicas de detección molecular como las evaluadas en este estudio presenta múltiples ventajas, tales como el no requerir la purificación o el cultivo del patógeno por largos períodos de tiempo y ofrecer altos niveles de especificidad y sensibilidad. Esta situación ha sido previamente confirmada para el caso de *R. solanacearum* por Pradhanang *et al.*, (2000), quienes reportan que mediante la utilización de PCR anidada con *primers* que amplifican la región 16S del ADNr, es posible la detección de este fitopatógeno en niveles tan bajos como 10^2 UFC/g suelo, mientras que Schonfeld *et al.*, (2003) al usar PCR seguida por hibridaciones del tipo *Southern blot* pudieron detectar el equivalente a 10^3 UFC de *R. solanacearum*/g suelo. A pesar de las ventajas que ofrecen las técnicas moleculares,

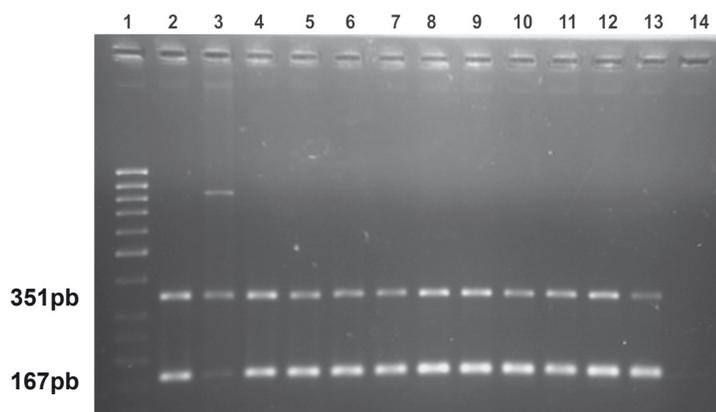


FIG. 1 - Amplificación por PCR del ADN extraído de muestras de tejido vegetal de banano utilizando el método del Fenol-Cloroformo, con la serie de *primers* Mus que permiten la identificación de los Secuevares de *Ralstonia solanacearum*. **Línea 1.** Marcador 100 pb. **Muestras:** 2. Bp. 3. Bs. 4. Cp. 5. Dp. 6. Fs. 7. Gp. 8. Hs. 9. Jp. 10. Kp. 11. Lp. 12. Np. 13. Control positivo RS 074. 14. Control Negativo.

éstas presentan el problema de la posible inhibición de la PCR por parte de diversos compuestos presentes en los crudos bacteriales, savia de las plantas y partículas de suelo. Según McGregor *et al.* (1996) las sustancias inhibitorias desnaturalizan o se unen a la enzima ADN polimerasa, quelatan el cofactor de Mg^{++} ó se unen directamente al ADN. Entre dichas sustancias se destacan los ácidos húmicos y fúlvicos presentes en la materia orgánica del suelo, los compuestos fenólicos generados en el metabolismo secundario de las plantas y los polisacáridos ácidos de alto peso molecular presentes en las paredes celulares de las bacterias y plantas (Dittapongpitch & Surat, 2003). Esta situación reafirma la necesidad de adelantar estudios como el aquí presentado, pues al no ser posible generalizar el empleo de un método determinado sobre diferentes tipos de plantas ó de suelos, se requiere del análisis particular de cada situación, más aún en casos tan determinantes como el que representa para el manejo de la enfermedad del Moko, la detección temprana de su agente causal. Bajo este principio, en nuestro estudio se emplearon diferentes métodos con potencial para evitar el efecto inhibitorio de la PCR, como el enriquecimiento en medios semiselectivos de las suspensiones bacteriales extraídas de diferentes fuentes naturales que permiten disminuir la concentración de dichas sustancias y simultáneamente aumentar la cantidad de células bacteriales objetivo, la inclusión de aditivos en los buffer de extracción convencionales y el empleo de resinas comerciales de purificación de ácidos nucleicos. De especial utilidad resultó el empleo de BSA y PVPP, previamente recomendados por Poussier *et al* (2002) para la detección de *R. solanacearum* a partir de sustratos naturales. Una ventaja adicional de la implementación de un esquema de diagnóstico molecular de *R. solanacearum* es la posibilidad de obtener información taxonómica y filogenética de las cepas bacteriales detectadas, a partir de la utilización de *primers* específicos que permiten la discriminación en filotipos (Fegan & Prior, 2005) y secuevares (Prior & Fegan, 2005) de las poblaciones de esta bacteria. Así, en el presente estudio fue posible confirmar la identidad de los aislamientos

bajo estudio como pertenecientes al filotipo II secuevar 4, el cual con base en análisis de la secuencia parcial del gen que codifica para endoglucanasa ha sido recientemente descrito por Fegan & Prior (2006) como uno de los cuatro grupos de cepas de *R. solanacearum* causantes de la enfermedades del Moko de las musáceas y en este caso particular está asociado al MLG 25 de la anteriormente denominada raza 2.

Los resultados de esta investigación constituyen una herramienta adicional de diagnóstico de la bacteria *R. solanacearum* en las plantaciones de banano y plátano de Colombia. Su efectividad ha sido evaluada en plantas sintomáticas y muestras de suelos procedentes de plantaciones con historia de la presencia de la enfermedad del Moko. Sin embargo, ya que el principal valor práctico de estos procedimientos consiste en la capacidad de detectar la bacteria en plantas asintomáticas y en material de siembra, esta investigación continuará con un estudio que evalué las condiciones sanitarias de un alto número de muestras obtenidas al azar en la región bananera de Urabá y que tenga como controles plantas obtenidas bajo cultivo *in vitro* y muestras de suelos sin historia de la presencia de la bacteria.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue realizada gracias al apoyo financiero de COLCIENCIAS PROYECTO 8242-07-16025, Cenibanano-AUGURA y la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Los autores agradecen a la Dra. Elizabeth Álvarez del CIAT, por proveer la cepa de referencia de *R. solanacearum* RS 074.

REFERENCIAS

Belalcazar S, Merchan V (1991) Control de enfermedades. In: Comité Departamental de Cafeteros del Quindío (Ed.) El cultivo del plátano (*Musa* AAB Simonds) en el trópico. Manual de asistencia técnica N° 50. Cap. VI. Armenia. INIBAP. pp. 243-290.

- 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.
- Cook D, Barlow E, Sequeira L (1989) Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment polymorphism with DNA probes that specify virulence and hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2:113-121.
- Cook D, Sequeira L (1994) Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In: Hayward AC, Hartman GL (Eds.) *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. Wallingford. CAB International. pp. 77-93.
- Denny TP, Hayward AC (2001) *Ralstonia*. In: Schaad NW, Jones JB, Chun W (Eds.) *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Saint Paul MN. APS Press. pp. 151-166.
- Dittapongpitch V, Surat S (2003) Detection of *Ralstonia solanacearum* in soil and weeds from commercial tomato fields using immunocapture and the polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology* 151:239-246.
- Engelbrecht MC (1994) Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. *Bacterial Wilt Newsletter* 10:3-5.
- Fegan M (2005) Bacterial wilt diseases of banana: evolution and ecology. In: Allen C, Prior P, Hayward AC (Eds.) *Bacterial wilt: the disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. Saint Paul MN. APS Press. pp. 379-386.
- Fegan M, Prior P (2005) How complex is the "Ralstonia solanacearum species complex"? In: Allen C, Prior P, Hayward AC (Eds.) *Bacterial wilt: the disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. Saint Paul MN. APS Press. pp. 449-461.
- Fegan M, Prior P (2006) Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana. *Australasian Plant Pathology* 35:93-101.
- Hayward AC, Sequeira L, French ER, El-Nashar HM, Nydegger U (1992) Tropical variant of biovar 2 of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 82:608.
- Janse JD (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *Bulletin OEPP/EPPO* 18:343-351.
- Kageyama K, Komatsu T, Suga H (2003) **Refined PCR protocol for the detection of plant pathogens in soil.** *Journal of General Plant Pathology* 69:153-160.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (2006) La cadena de banano en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Bogotá. MADR.
- Mcgregor DP, Forster S, Steven J, Adair J, Leary SEC, Leslie DL, Harris WJ, Titball RW (1996) Simultaneous detection of microorganisms in soil suspension based on PCR amplification of bacterial 16S rRNA. *BioTechniques* 21:463-471.
- OEPP/EPPO (2004) *Ralstonia solanacearum*. Diagnostic protocols for regulated pest. European and Mediterranean plant protection organization. *Bulletin OEPP/EPPO* 34:173-178.
- Opina N, Tavner F, Holloway G, Wang JF, Li TH, Maghirang R, Fegan M, Hayward AC, Krishnapillai V, Hong WF, Holloway BW, Timmis JN (1997) A novel method for development of species and strain - specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 5:19-33.
- Poussier S, Cheron JJ, Conteau A, Luisetti J (2002) **Evaluation of procedures for reliable PCR detection of Ralstonia solanacearum in common natural substrates.** *Journal of Microbiological Methods* 51:349-359.
- 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.
- Prior P, Fegan M (2005) Diversity and molecular detection of *Ralstonia solanacearum* race 2 strains by multiplex PCR. In: Allen C, Prior P, Hayward AC (Eds.) *Bacterial wilt: the disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. Saint Paul MN. APS Press. pp. 405-414.
- Robinson Smith A, Jones P, Elphinstone JG, Forde SMD (1995) Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food and Agricultural Immunology* 7:67-79.
- Schonfeld J, Heuer H, van Elsas JD, Smalla K (2003) Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the basis of PCR amplification of *ftiC* fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 69:7248-7256.
- Taghavi M, Hayward C, Sly LI, Fegan M (1996) Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46:10-15.
- 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.

Recebido 3 Setiembre 2007 - Acepto 28 abril 2008 - TPP 7099
 Editor Asociado: Valmir Duarte