

# Caracterización molecular del complejo de especies *Ralstonia solanacearum* en la zona bananera de Urabá

## Molecular characterization of the *Ralstonia solanacearum* species complex in the banana growing region of Uraba

Carolina Cardozo<sup>1</sup>, Paola Rodríguez<sup>2</sup> y Mauricio Marín<sup>1,3</sup>

### RESUMEN

La enfermedad del moko, causada por *Ralstonia solanacearum*, es uno de los problemas fitosanitarios más importantes de la agroindustria bananera de Urabá. Esta bacteria se caracteriza por presentar una gran plasticidad genética, lo cual dificulta el diseño de estrategias para su control. Con el fin de determinar los componentes del complejo de especies de *R. solanacearum* presentes en la región de Urabá, en esta investigación se realizó la caracterización genotípica de una población de *R. solanacearum* procedente de plantas de banano, arvenses y suelos de diversas plantaciones de esta zona. La evaluación se realizó mediante PCR múltiple y secuenciación de tres regiones del genoma (genes *egl*, *fliC* y región 16S del ADNr). Los resultados indican que todas las cepas bacteriales estudiadas están asociadas al filotipo II, y en su mayoría pertenecen al secuevar 4, aunque en el caso de algunos aislamientos no fue posible su filiación con ninguno de los tres secuevares reportados para la raza 2. Dos aislamientos obtenidos del departamento del Magdalena, utilizados con fines comparativos, resultaron estar asociados al secuevar 6. Los resultados de esta investigación plantean importantes aspectos epidemiológicos a ser tenidos en cuenta en el manejo de la enfermedad del moko en las plantaciones de banano del Urabá antioqueño.

**Palabras clave:** ADNr 16S, endoglucanasa, filotipo, flagelina, moko, secuevar.

### ABSTRACT

Moko disease, caused by *Ralstonia solanacearum*, is one of the most important phytopathological problems of the banana agribusiness in Uraba (Colombia). This bacterium is featured by having high genetic plasticity, which difficults the design of control strategies. The aim of the present research was to establish the components of the *R. solanacearum* species complex, through the study of the genotypic features of a series of strains isolated from banana plants, weeds and soils from different plantations in Uraba. The analysis was carried out through multiple PCR and sequencing of three genomic regions (*egl* and *fliC* genes, and region 16S of 16S rDNA). The results indicate that all the studied isolates are associated to phylotype II, and most of them belong to sequevar 4. However, in the case of some strains, it was not possible to associate the PCR results with the sequevars that have been reported for race 2. Interestingly, two isolates from the department of Magdalena used as comparative controls for the bacterial population of Uraba, were found to belong to sequevar 6. These results raise important epidemiological aspects of the management of moko disease in the banana growing region of Uraba.

**Key words:** rDNA 16S, endoglucanase, phylotype, flageline, Moko disease, sequevar.

## Introducción

La enfermedad del moko del plátano y banano causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* es uno de los problemas fitosanitarios más limitantes de este cultivo en Colombia, siendo los departamentos de Antioquia (en la región de Urabá) y Quindío las áreas más afectadas por esta enfermedad (Obregón, 2007). *R. solanacearum* es un fitopatógeno altamente agresivo, con una distribución global y un inusual amplio rango de hospederos de al menos 50 familias botánicas diferentes, incluyendo cultivos como papa, tomate, tabaco, banano, heliconias, anturios y maní (Hayward *et al.*, 1998). En diferentes estudios se ha encontrado

que *R. solanacearum* es una especie heterogénea que debe considerarse como un complejo, es decir, como un grupo de aislamientos relacionados cuyos miembros individuales pueden representar más que una especie (Taghavi *et al.*, 1996; Fegan y Prior, 2005). Tradicionalmente los miembros de *R. solanacearum* han sido subdivididos en cinco razas con base en su rango de hospederos y en cinco biovares según su capacidad metabólica para la utilización de diversas fuentes de carbono. Una variante tropical del biovar 2 (2T o N2) es considerada por Hayward *et al.* (1992) como un sexto biovar. Desde el punto de vista genético, la especie se ha

Fecha de recepción: 16 de febrero de 2009. Aceptado para publicación: 2 de julio de 2009

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín.

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones del Banano (Cenibanano), Augura, Medellín; actualmente: Investigación y Desarrollo, Bayer CropsScience S.A., Carepa-Antioquia (Colombia).

<sup>3</sup> Autor de correspondencia. mamarinm@unalmed.edu.co

segmentado en dos divisiones (I y II) (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 ADNr (Taghavi *et al.*, 1996). Por otra parte, Poussier *et al.* (2000) demostraron la existencia de un subgrupo de aislamientos de origen africano dentro del biovar 1. Fegan y Prior (2005) plantean la existencia de cuatro grupos genéticos denominados filotipos y correspondientes a diferentes orígenes geográficos (Asia *sensu lato*, América, Indonesia y África). Cada filotipo está conformado por un número de secuevares, que son definidos como un grupo de cepas con una secuencia altamente conservada dentro de una región determinada del genoma, que para el caso de *R. solanacearum* corresponde al gen endoglucanasa (*egl*). Los secuevares incluyen un número de líneas clonales identificadas a partir de análisis con marcadores moleculares tipo AFLP o rep-PCR (Fegan y Prior, 2005).

Uno de los primeros análisis genéticos 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. Posteriormente, con el desarrollo de los conceptos de filotipos y secuevares, se determinó que la raza 2 de *R. solanacearum* está asociada 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). Más recientemente, Fegan y Prior (2006), basados en secuencias del gen *egl*, demostraron que las cepas causantes del moko tenían un origen polifilético, con algunos genotipos muy relacionados con aislamientos patogénicos a tomate y papa. A pesar de los avances en la caracterización genética de las cepas de la raza 2 de *R. solanacearum*, es necesario continuar evaluando el grado de variabilidad de este patógeno en diferentes agroecosistemas, por cuanto se cree que la diversidad de dicha raza está subestimada (Fegan y Prior, 2006). Esta investigación se planteó con el fin de obtener la información relacionada con los componentes del complejo de especies de *R. solanacearum* en la zona bananera de Urabá, como una herramienta para el apoyo de los programas de manejo del moko de las musáceas en Colombia.

## Materiales y métodos

### Cepas bacteriales

El estudio incluyó 50 aislamientos, 33 de los cuales hacen parte de una colección de cepas bacteriales previamente establecida por Cenibanano en plantas de banano y arvenses

asociadas al cultivo (Obregón, 2007), mientras que las otras 17 cepas fueron aisladas y purificadas en esta investigación a partir de cultivos de banano y suelos de la región de Urabá y el departamento del Magdalena; estas últimas cepas fueron utilizadas con fines comparativos. Adicionalmente se incluyeron como control positivo dos cepas representativas del filotipo II proveídas por el CIAT (Tab. 1).

### Aislamiento y purificación de las bacterias en medio de cultivo

Una vez detectadas las plantas de banano con sintomatología de marchitez bacterial, se procedió a aislar la bacteria a partir de pequeñas porciones de tejido vascular siguiendo la metodología de Gómez *et al.* (2005). Para el caso de las muestras de suelo provenientes de los focos de la enfermedad, se tomaron 500 g alrededor de las plantas y a una profundidad de 5 cm. Una vez en el laboratorio se realizaron diluciones seriadas en buffer fosfato 0,05 M a partir de 1 g de suelo, obteniendo 100  $\mu$ L de las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-3}$  para su siembra en medio SMSA modificado.

### Confirmación de la identidad de los aislamientos

En todos los aislamientos utilizados en la investigación se verificó su identidad taxonómica mediante la utilización de los cebadores 759/760 (759: 5' GTC GCC GTC AAC TCA CTT TCC 3'; 760: 5' GTC GCC GTC AGC AAT GCG GAA TCG 3') (Fegan y Prior, 2005). Para esta prueba se tomó una lupada bacterial de cada aislamiento en 100  $\mu$ L de agua destilada estéril y se llevó a ebullición al baño María por 5 min, utilizándose 1  $\mu$ L en las reacciones de PCR.

### Caracterización del complejo de especies *R. solanacearum*

Se utilizó la técnica de PCR múltiple para la definición de filotipos con los cebadores Nm21:1F (5' CGT TGA TGA GGC GCG CAA TTT 3'), Nm21:2F (5'AAG TTA TGG ACG GTG GAA GTC 3'), Nm23:AF (5'ATT ACS AGA GCA ATC GAA AGA TT 3'), Nm22:InF (5'ATT GCC AAG ACG AGA GAA GTA 3') y el cebador reverso Nm22:RR (5' TCG CTT GAC CCT ATA ACG AGT A 3'), siguiendo la metodología descrita por Fegan y Prior (2005). Para el diagnóstico de los secuevares causantes del moko del banano se utilizaron los cebadores Mus20-F (5' CGG GTC GCT GAG ACG AAT ATC 3') - Mus20-R (5' GCC TTG TCC AGA ATC CGA ATG 3'); Mus35-F (5' GCA GTA AAG AAA CCC GGT GTT 3') - Mus35-R (5' TCT GGC GAA AGA CGG GAT GG 3'), Mus06-F (5' GCT GGC ATT GCT CCC GCT CAC 3') - Mus06-R (5' TCG CTT CCG CCA AGA CGC 3') y S128-F (5'CGT TCT CCT TGT CAG CGA TGG 3') - S128-R (5' CCC GTG TGA CCC CGA TAG C 3'). Las condiciones del PCR fueron similares a las descritas por Prior y Fegan (2005).

**TABLA 1.** Aislamientos de *Ralstonia solanacearum* utilizados en este estudio, indicando su origen de colección, filotipo y secuevar determinado mediante PCR múltiple.

Aislamiento	Planta hospedante (Nombre científico – nombre común)	Lugar de colección	Filotipo/Secuevar
Col1	<i>Musa</i> sp. - Banano	Apartadó	II/4PB
Col2	<i>Cissus sicyodes</i> - Uvilla	Apartadó	II/4PB
Col3	<i>Solanum nigrum</i> - Hierbamora	Apartadó	II
Col4	<i>Musa</i> sp. - Banano	Santa Marta	II
Col5	<i>Musa</i> sp. - Banano	Carepa	II/4PB
Col 6	<i>Musa</i> sp. - Banano	Carepa	II/4PB
Col 7	<i>Musa</i> sp. - Banano	Apartadó	NA
<u>Col 8</u>	<i>Desmodium</i> - Pega pega	Apartadó	II/4PB
<u>Col 9</u>	<i>Solanum nigrum</i> - Hierbamora	Apartadó	II/4PB
Col 10	<i>Ipomoea trifida</i> - Batatilla	Carepa	NA
<u>Col 11</u>	<i>Desmodium incanum</i> - Fabaceae	Carepa	II/4PB
<u>Col 12</u>	<i>Piper</i> sp. - Santa María	Carepa	II/4PB
Col 13	<i>Solanum nigrum</i> - Hierbamora	Carepa	NA
Col 14	<i>Cissus sicyodes</i> - Uvilla	Carepa	II/4PB
Col 15	<i>Musa</i> sp. - Banano	Chigorodó	II/4PB
Col 16	<i>Solanum nigrum</i> - Hierbamora	Chigorodó	II/4PB
Col 17	<i>Portulaca oleracea</i> - Verdolaga	Chigorodó	II/4PB
Col 18	<i>Emilia sonchifolia</i> - Emilia	Chigorodó	II/4PB
Col 19	<i>Ipomoea trifida</i> - Batatilla	Chigorodó	II/4PB
Col 20	<i>Euphorbia hirta</i> - Lecherito	Chigorodó	II/4PB
Col 22	<i>Musa</i> sp. - Banano	Carepa	II
Col 24	<i>Musa</i> sp. - Banano	Chigorodó	II
<u>Col 26</u>	<i>Cissus sicyodes</i> - Uvilla	Chigorodó	II/4PB
Col 28	<i>Peperonia pellucida</i>	Apartadó	II
Col 29	<i>Musa</i> sp. - Banano	Apartadó	II/4PB
Col 30	<i>Musa</i> sp. - Banano	Apartadó	II
Col 31	<i>Musa</i> sp. - Banano	Carepa	II
Col 37	<i>Musa</i> sp. - Banano	Carepa	II
<u>Col 41</u>	<i>Musa</i> sp. - Banano	Chigorodó	II/4PB
Col 42	<i>Musa</i> sp. - Banano	Chigorodó	II/4PB
Col 44	<i>Tripogandra cumanensis</i> - Suelda con suelda	Carepa	II/4PB
Col 47	<i>Tripogandra cumanensis</i> - Suelda con suelda	Turbo	II
<u>Col 48</u>	<i>Musa</i> sp. - Banano	Chigorodó	II/4PB
Col 51	<i>Solanum nigrum</i> - Hierbamora	Carepa	II/4PB
<u>Col 52</u>	<i>Portulaca oleracea</i> - Verdolaga	Carepa	II/4PB
<u>Col 60</u>	<i>Cissus sicyodes</i> - Uvilla	Chigorodó	II/4PB
Col 66	<i>Musa</i> sp. - Banano	Carepa	II/4PB
<u>Col 71</u>	Suelo	Apartadó	II/4PB
Col 72	Suelo	Apartadó	II/4PB
Col 75	Suelo	Apartadó	II/4PB
Col 76	Suelo	Chigorodó	II/4PB
Col 77	Suelo	Chigorodó	II/4PB
Col 78	Suelo	Chigorodó	II/4PB
Col 80	<i>Musa</i> sp. - Banano	Carepa	II/4PB
Col 82	<i>Musa</i> sp. - Banano	Carepa	II/4PB
Col 85	<i>Musa</i> sp. - Banano	Chigorodó	II
Col 87	<i>Musa</i> sp. - Banano	Apartadó	II
Col 88	<i>Musa</i> sp. - Banano	Apartadó	II
Col 94	<i>Musa</i> sp. - Banano	Santa Marta	II/6
Col 95	<i>Musa</i> sp. - Banano	Santa Marta	II/6
CIAT 1008	<i>Musa</i> sp. - Banano	Ibague, Tolima	II/4
CIAT RS074	<i>Musa</i> sp. - Banano	ND	II

NA: No amplificó. Los aislamientos subrayados fueron empleados en la secuenciación de los genes *egl*, *IIIC* y *ADNr*, sus números de accesión incluidos en la base de datos del GenBank corresponden al rango: EU795331 a EU795360.

Para aquellos aislamientos en los que no fue posible la obtención de amplicones con alguno de los dos juegos de cebadores, se variaron las condiciones del PCR y se utilizaron dos metodologías adicionales de extracción de ADN: kit DNeasy Plant Mini (Qiagen, CA, USA) y el método convencional de SDS (Sambrook y Russell, 2001).

### **Análisis de secuencias de aislamientos de *R. solanacearum***

Se seleccionaron diez aislamientos de diferentes hospederos (Tab. 1) para la secuenciación parcial de la región 16S del ADNr utilizando los cebadores Oli1 (5'GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC 3') y Y2 (5'CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT 3') (Seal *et al.*, 1993), el gen *egl* con los cebadores Endo-F (5' ATG CAT GCC GCT GGT CGC CGC 3') y Endo-R (5' GCG TTG CCC GGC ACG AAC ACC 3') (Fegan *et al.*, 1998) y el gen *fliC* (flagelina C) con los cebadores Rsol\_ *fliC*-F: (5' GAA CGC CAA CGG TGC GAA CT 3') y Rsol\_ *fliC*-R (5' GGC GGC CTT CAG GGA GGT C 3') (Sehonfeld *et al.*, 2003). El programa de amplificación constó de una desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, seguida por 35 ciclos de 94°C durante 2 min; 62°C para *fliC*, 64°C para la región 16S del ADNr o 70°C para *egl*, por 1 min; 72°C por 2 min y un periodo final de extensión a 72°C durante 7 min. Los productos amplificados fueron purificados mediante el kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, CA, USA) para proceder a su secuenciación directa en ambas direcciones en la compañía Macrogen (Corea del Sur). Las secuencias obtenidas con cada cebador fueron editadas mediante los programas BioEdit 6.0.6 y Chromas 1.45. Paralelamente, se obtuvieron del GenBank secuencias de los genes estudiados de cepas de *R. solanacearum* de diferentes regiones del mundo y hospederos, para su alineación con las generadas en este proyecto mediante el *software* Clustal W. La matriz de alineación fue empleada para el análisis filogenético basado en máxima parsimonia con soporte de *Bootstrap* (1000 permutaciones) y utilizando PAUP 4.0b.

## **Resultados**

### **Confirmación de la identidad de los aislamientos**

La utilización de la prueba de PCR con los cebadores 759/760 permitió la selección de los 50 aislamientos incluidos en la investigación como asociados al complejo *R. solanacearum*, al obtenerse la amplificación del fragmento esperado de 282 pb.

### **Caracterización del complejo de especies *R. solanacearum***

La realización de las reacciones de PCR múltiples dirigidas a determinar los filotipos arrojó la amplificación de un

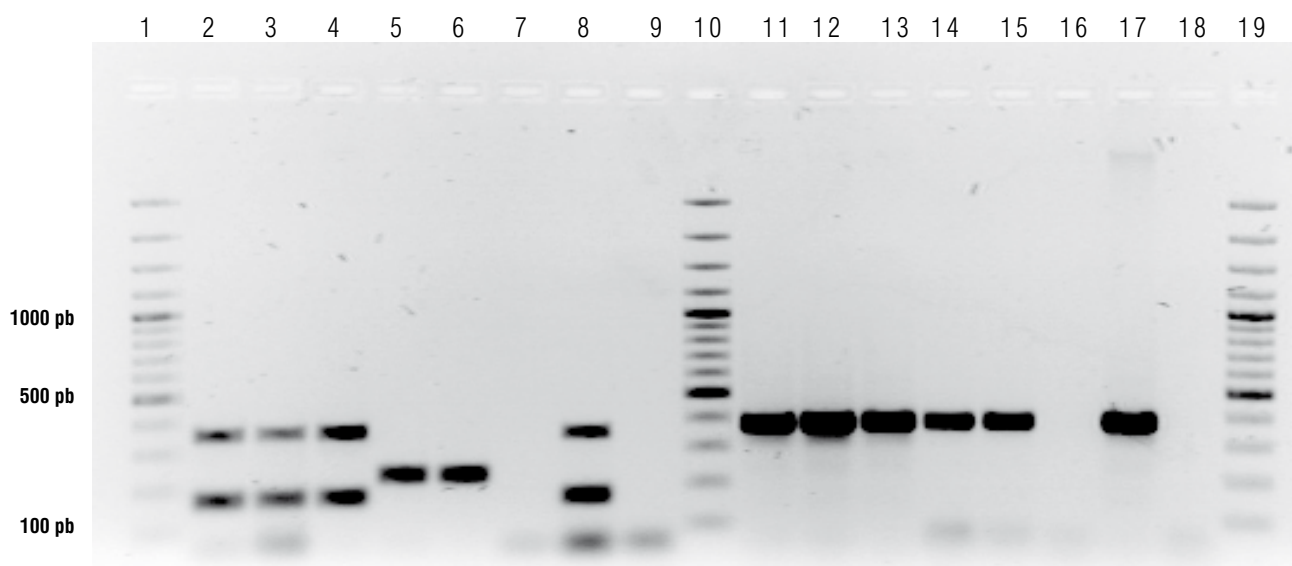
fragmento de 372 pb en 47 de las cepas evaluadas (Fig. 1), mientras que no fue posible la obtención del amplicón en los aislamientos Col 7 (de *Musa* sp.), Col10 (de *Ipomoea trifida*) y Col13 (de *S. nigrum*). La ocurrencia de este amplicón permite asociar dichas cepas con el filotipo II y confirmar la presencia de dicho filotipo en hospederos tan diversos como *Musa* sp., *Cissus sicyodes*, *Solanum nigrum*, *Desmodium* sp., *Piper* sp., *Portulaca oleraceae*, *Emilia sanchifolia*, *Ipomoea trifida*, *Euphorbia hirta*, *Peperonia pellucida*, *Tripogandra cumanenses*, y en cepas aisladas a partir de suelos cultivados con banano (Tab. 1).

Con respecto a los PCR para secuevares, se logró la amplificación de un fragmento de 351 pb en 33 aislamientos y en la cepa de referencia RS 074 CIAT, mientras que en los aislamientos Col94 y Col95 la banda obtenida correspondió a 167 pb (Fig. 1). Este resultado permite identificar al primer grupo como cepas patogénicas a banano del secuevar 4, y al segundo grupo como cepas del secuevar 6. Es importante resaltar que en 15 de los aislamientos no fue posible la amplificación de ningún fragmento, a pesar de la modificación de diferentes variables del PCR.

### **Análisis de secuencias de aislamientos de *R. solanacearum***

#### **Gen *egl* (endoglucanasa)**

Para el análisis filogenético del gen *egl* se incluyeron secuencias de 34 aislamientos, 24 del Genbank, con al menos una cepa representativa de cada uno de los cuatro filotipos. El alineamiento final de las secuencias incluyó 686 sitios, de los cuales 107 resultaron informativos para el análisis de parsimonia (Fig. 2A). El filograma presentó cuatro clados bien definidos, que representan los cuatro filotipos del complejo. Sin embargo el filotipo I se presentó segmentado en un grupo principal con tres cepas (JT523, R292 y R292) y tres ramas independientes correspondientes a las cepas GMI100, CFBP2968 y NCPPB3190, cuyo origen corresponde a la división "Asiática". El filotipo II se presenta con un fuerte soporte estadístico (99%) y dividido en cuatro subgrupos, uno de los cuales incluye todas las cepas secuenciadas en esta investigación y procedentes de diferentes hospederos en la región de Urabá, además de una cepa obtenida de plátano en Colombia (Fegan y Prior, 2005). El grupo constituyendo el filotipo III presentó un alto soporte estadístico (99%) y estuvo conformado por tres aislamientos procedentes de papa y berenjena de países de África, mientras que el filotipo IV sólo estuvo representado en el análisis por el aislamiento PSI7 obtenido de tomate en Indonesia.



**FIGURA 1.** Determinación mediante PCR múltiple de los secuevares (izquierda) y filotipos (derecha) y de aislamientos de *Ralstonia solanacearum* procedentes de las regiones bananeras de Urabá (Antioquia) y Magdalena. Líneas 1, 10, 19: marcador de 100 pb; 2, 11: Col 41; 3, 12: Col 44; 4, 13: Col 60; 5, 14: Col 94; 6, 15: Col 95; 7, 16: Col 3; 8, 17: control positivo; 9, 18: control negativo.

### Gen *fliC* (flagelina C)

Para el análisis filogenético del gen *fliC* se incluyeron secuencias de 30 aislamientos, 20 de las cuales fueron obtenidas del Genbank, incluyendo cuatro representantes de la especie *R. pickettii*, y dos cepas de *Pseudomonas putida* y *R. eutropha* como grupos externos para el análisis (Fig. 2B). El alineamiento final de las secuencias incluyó 428 sitios, de los cuales 150 resultaron informativos. El árbol filogenético generado presentó dos clados bien soportados, que claramente separan las especies *R. pickettii* y *R. solanacearum*. En este último clado, se presentan varios subgrupos, pero con un débil soporte. Estos subgrupos no están diferenciados por filotipos, procedencia geográfica u hospedante, aunque todos los aislamientos obtenidos en la región de Urabá se agruparon en un solo clado, con un soporte del 86%.

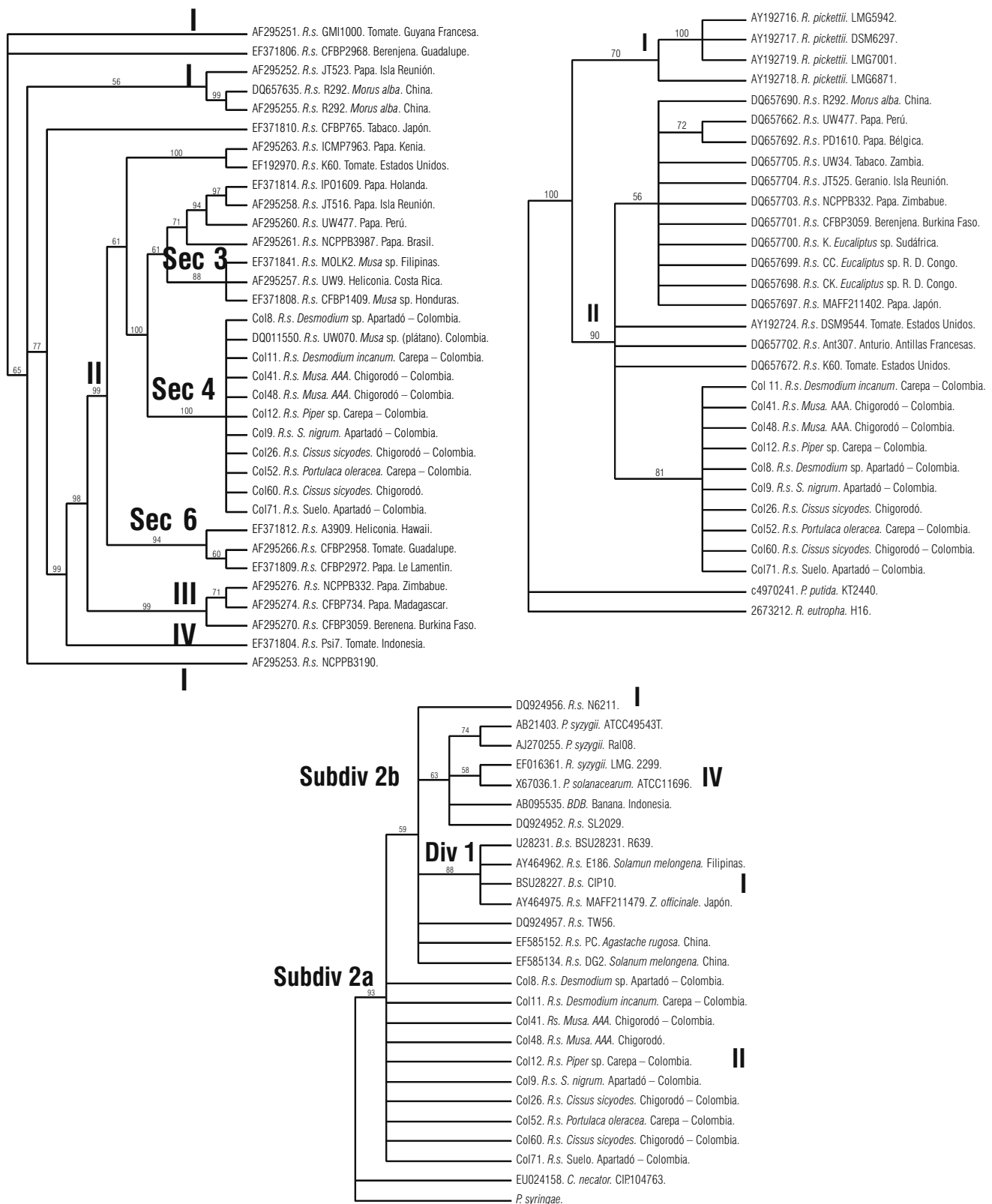
### Región 16S del ADNr

Para el análisis filogenético de la región 16S del ADNr se incluyeron secuencias de 26 aislamientos, 16 de las cuales fueron obtenidas del Genbank, dos cepas de *P. syzygii*, una cepa de BDB y *Cupriavidus necator* (*R. eutropha*) y *P. syringae* como grupos externos (Fig. 2C). El alineamiento final incluyó 289 sitios, nueve de los cuales resultaron informativos. El filograma generado presentó un clado bien soportado (93%) y claramente diferenciado de los grupos externos. Este clado representa el complejo de especies *R. solanacearum*, incluyendo *P. syzygii*, BDB y *R. solanacearum sensu stricto*. En el clado se presentaron tres subgrupos que representan el filotipo IV, el filotipo

I y el filotipo II, respectivamente. Sin embargo, el bajo grado de polimorfismo encontrado entre las secuencias analizadas de *R. solanacearum* para esta región del genoma no permitió generar altos soportes de *bootstrap* para dichos grupos.

### Discusión

En este estudio se realizó una caracterización molecular de los componentes del complejo de especies de *R. solanacearum* a partir de una población de 50 aislamientos procedentes de cultivos de banano, suelos y plantas arvenses de al menos ocho familias botánicas (*Asteraceae*, *Commelinaceae*, *Convolvulaceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae*, *Piperaceae*, *Portulacaceae* y *Vitaceae*) colectadas en la región de Urabá. Los resultados indican que los 50 aislamientos evaluados están asociados al complejo *R. solanacearum*, tal como se desprende de la obtención de un amplicón de 282 pb en todas las cepas estudiadas. La secuenciación de la región 16S del ADNr permitió asociar a dichos aislamientos con la subdivisión 2A *sensu* (Poussier *et al.*, 2000), la cual está conformada fundamentalmente por miembros del biovar 1, 2 y N2, aunque la definición original basada en análisis de RFLP que indica a la división 2 como “Americana” y planteada por Cook *et al.* (1989) queda desvirtuada en estos análisis, al incluir indistintamente aislamientos africanos y asiáticos obtenidos de musáceas y otros hospederos en estos continentes, lo cual reafirma la mayor resolución que ofrece el análisis de secuencias para plantear este tipo de hipótesis taxonómicas. De acuerdo con los resultados



**FIGURA 2.** Árbol filogenético generado con secuencias parciales de los genes *egl* (A) (longitud: 190; IC: 0,789; IR: 0,940 e IH: 0,211), *fliC* (B) (longitud: 491; IC: 0,85; IR: 0,84 e IH: 0,14) y 16S del ADNr (C) (longitud: 55; IC: 0,98; IR: 0,96 e IH: 0,018) de aislamientos de *Ralstonia solanacearum* de la zona bananera de Urabá (Colombia) y otras regiones del mundo. Los números romanos en A y C indican los filotipos; en B indican los clados mayores. Los valores de bootstrap  $\geq 50$  se presentan sobre las ramas. IC: índice de consistencia, IR: índice de retención e IH: índice de homoplasia.

de la PCR múltiple con los cebadores de la serie Nmult, todos los aislamientos corresponden al filotipo II de *R. solanacearum*, grupo que incluye además los biovares 1, 2 y 2T de origen americano, la raza 3, patogénica a papa y con distribución global, y la raza 2 conocida como el agente causal del moko de las musáceas. Con respecto a los secuevares, se encontró que, de las 50 cepas analizadas, 33 se pueden identificar como pertenecientes al secuevar 4 y dos al secuevar 6, mientras que en 15 cepas no fue posible la amplificación, situación que sugiere la existencia de otros secuevares dentro de la raza 2 de *R. solanacearum*. Un resultado similar fue encontrado por Fegan y Prior (2006), quienes determinaron que las cepas ICMP6782 e ICMP9600, obtenidas de plantas de banano en Brasil, no se agruparon en los clados que definían los secuevares 3, 4 y 6 en su estudio basado en el análisis de secuencias del gen *egl*.

La ausencia del secuevar 3 y el bajo número de aislamientos del secuevar 6 encontrados en este trabajo fue inesperado, por cuanto dichos secuevares se han reportado frecuentemente en países cultivadores de banano de Centro y Suramérica, con los cuales existen vínculos comerciales y de intercambio de material de propagación con las zonas bananeras del país. Así por ejemplo, el secuevar 3, previamente definido como el MLG 24 (Cook y Sequeira, 1994) se reporta en cultivos de banano, plátano y heliconia de Costa Rica, Honduras y Panamá (Prior y Fegan, 2005), este último país, fronterizo con la región de Urabá. El secuevar 6, previamente definido como el MLG 28 (Cook y Sequeira, 1994), ha sido detectado en Honduras, Venezuela (Prior y Fegan, 2005) y recientemente en Guatemala por Sánchez *et al.* (2008). De otra parte, todos los aislamientos definidos como secuevar 4 (MLG25) en nuestro estudio presentaron la banda de 167 pb que identifica a dichas cepas como putativamente patogénicas a *Musa* sp. (Prior y Fegan, 2005). La patogenicidad en banano de las cepas procedentes de arvenses fue probada en un trabajo reciente realizado por Obregón (2007) en plantas del clon Gran enano. De gran interés resultó el hecho que las especies *Desmodium* sp., *P. pellucida* y *T. cumanenses* no habían sido reportadas como hospederos de la bacteria, y que la especie *C. sicyodes* representa el primer registro de la familia Vitaceae como hospedante de *R. solanacearum*. Estos hallazgos basados en pruebas de patogenicidad y evaluaciones moleculares amplían el conocimiento sobre la diversidad genética de esta bacteria en Suramérica y refuerzan las hipótesis de Fegan y Prior (2006), que plantean que es posible que el nivel de variabilidad que presenta *R. solanacearum* raza 2 sea mayor que el hasta ahora encontrado en los estudios realizados a nivel mundial.

El análisis filogenético realizado con las secuencias parciales del gen *egl* agrupó las cepas procedentes del Urabá con la cepa UW070, cuya secuencia (DQ011550) fue depositada en el Genbank por Fegan y Prior (2005) y que fue aislada de una planta de plátano en Colombia. Esta cepa había sido caracterizada como perteneciente al filotipo II/secuevar 4 SFR (*Small, Fluidal, Round*), lo cual coincide con el alto número de cepas que fueron encontradas en el presente estudio como pertenecientes a este secuevar. Este grupo se presentó asociado (con un soporte del 100%) al clado que contenía cepas que causan marchitamiento vascular en heliconia (Costa Rica) y *Musa* sp. en Filipinas (Bugtok) y Honduras (Moko), así como con el secuevar 1 que contiene cepas causantes de pudrición bacteriana en papa. Adicionalmente, estos grupos se relacionaron con las secuencias representativas de cepas del secuevar 6 (heliconia, Hawaii) y del secuevar 5 (papa, Isla Martinica y tomate, Isla de Guadalupe). Todo el clado presenta un soporte del 99%, constituyéndose en el subclado B reportado por Wicker *et al.* (2007), y confirmado por el análisis de Castillo y Greenberg (2007) con base en el análisis de secuencias de cinco genes del cromosoma bacteriano y tres genes del megaplásmido.

Los demás clados que se conformaron en el análisis (subclado filotipo II-A, clado filotipo III y clado filotipo IV) tuvieron altos soportes *bootstrap* indicando su naturaleza monofilética. Sin embargo esta situación no ocurrió así para el filotipo I, que aunque en el análisis de máxima parsimonia se presentó como un solo grupo, no tuvo soporte estadístico, y por el contrario fue dividido en al menos tres grupos de cepas. Este resultado difiere del reportado por Villa *et al.* (2005), quienes utilizando análisis de secuencias de *egl* y *hrpB* confirmaron el carácter monofilético de este grupo de "origen asiático". Es evidente que dicha discrepancia se origina de las diferentes cepas utilizadas en los dos estudios, y hace necesario que futuros estudios incluyan un mayor número de aislamientos que confirmen o rechacen la hipótesis del carácter monofilético de dicho grupo.

De otra parte, el filograma generado a partir del análisis de secuencias del gen *fliC* generó dos grupos principales, que separaron las cepas de *R. pickettii* de aquellas representantes del complejo de especies *R. solanacearum*. Sin embargo este análisis no presentó el nivel de resolución necesario para diferenciar los filotipos en que se divide este complejo, ya que algunos clados estuvieron compartidos por aislamientos de diferentes orígenes filogenéticos. Este resultado sugiere que la utilidad del análisis de este gen debe restringirse al empleo de cebadores específicos *Rsol\_fliC* para la detección de los miembros del complejo, aunque

la sola prueba de PCR es insuficiente para lograr esto, pues se ha demostrado que dichos cebadores amplifican un fragmento de similar tamaño en *P. syzigii*, haciéndose necesaria la secuenciación de los fragmentos amplificados o el uso de la técnica DGGE previamente reportada por Schonfeld *et al.* (2003).

## Conclusiones

Los hallazgos de esta investigación y de aquella realizada por Obregón (2007) reafirman la necesidad de eliminar completamente las plantas arvenses de los focos detectados con la enfermedad de moko en la región de Urabá, evitar al máximo el transporte de suelos infestados con la bacteria y garantizar la correcta desinfección de las herramientas de trabajo utilizadas en las prácticas culturales, por cuanto la población de *R. solanacearum* en esta zona presenta un alto potencial de ser patogénica a plantas de banano. El establecimiento de prácticas cuarentenarias es fundamental para el manejo de esta enfermedad en la zona bananera de Urabá, de manera que se evite el ingreso de nuevos genotipos bacteriales en esta región, como por ejemplo de aquellos asociados al secuevar 6 detectados en este estudio en el departamento del Magdalena, o de cepas de otros países, que claramente en los análisis filogenéticos de secuencias se agruparon en clados diferentes a los ocupados por las cepas colombianas de esta bacteria.

## Agradecimientos

Esta investigación tuvo financiación de Colciencias (8242-07-16025), Augura y la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Los autores agradecen a Mónica Obregón y a Elizabeth Álvarez del CIAT, por proveer algunas de las cepas utilizadas en el estudio.

## Literatura citada

- Castillo, J.A. y J.T. Greenberg. 2007. Evolutionary dynamics of *Ralstonia solanacearum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1225-1238.
- Cook, D., E. Barlow y L. Sequeira. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment polymorphism with DNA probes that specify virulence and hypersensitive response. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2, 113-121.
- Cook, D. y L. Sequeira. 1994. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. pp. 77-93. En: Hayward, A.C. y G.L. Hartman (eds.). *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, UK.
- Fegan, M. 2005. Bacterial wilt diseases of banana: evolution and ecology. pp. 379-386. 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. 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.
- Gómez, E.A., E. Álvarez y G. Llano. 2005. Identificación y caracterización de cepas de *Ralstonia solanacearum* raza 2, agente causante del Moko de plátano en Colombia. *Fitopatol. Colomb.* 28, 71-75.
- Hayward, A.C., L. Sequeira, E.R. French, H.M. El-Nashar y U. Nydegger. 1992. Tropical variant of biovar 2 of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathol.* 82, 608.
- Hayward, A.C., J.C. Elphinstone, D. Caffier, J. Janse, E. Stefani, E. French y A.J. Wriarth. 1998. Round table on bacterial wilt (brown rot) of potato. pp. 420-430. En: Prior, P., C. Allen y J.G. Elphinstone (eds.). *Bacterial wilt disease: molecular and ecology aspects*. Springer-Verlag, Berlin.
- 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 de maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- Prior, P. y M. Fegan. 2005. Diversity and molecular detection of *Ralstonia solanacearum* race 2 strains by multiplex PCR. pp. 405-414. 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.
- Sambrook, J. y D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, Harbor, NY.
- Sánchez, A., L. Mejía, M. Fegan y C. Allen. 2008. Diversity and distribution of *Ralstonia solanacearum* strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection. *Plant Pathol.* 57, 320-331.
- Schonfeld, J., H. Heuer, J.D. Van Elsas y K. Smalla. 2003. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the basis of PCR amplification of *fliC* fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7248-7256.
- Seal, S.E., L.A. Jackson, J.P. Young y M.J. Daniels. 1993. Differentiation of a *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1587-1594.
- Taghavi, M., C. Hayward, L. Sly y M. Fegan. 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. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 46, 10-15.
- Villa, J.E., K. Tsuchiya, M. Horita, M. Natural, N.Y. Opina y M. Hyakumachi. 2005. Phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* species complex strains from Asia and others continents based on 16S rDNA, endoglucanase, and *hrpB* gene sequences. *J. Gen. Plant Pathol.* 71, 39-46.