

Variabilidad genética de la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Burkholderiales: Burkholderiaceae) en la zona bananera de Urabá (Colombia)

Carolina Cardozo¹, Paola Rodríguez², José Miguel Cotes¹ & Mauricio Marín¹

1. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Cra 64 x Calle 65, Autopista Norte, Medellín, Colombia; mamarinm@unal.edu.co
2. Centro de Investigaciones del Banano, Cenibanano, Augura, Calle 3 Sur No 41-65, piso 9, Medellín, Colombia; paolaandrea.rodriguez@bayercropscience.com

Recibido 03-IV-2009. Corregido 10-X-2009. Aceptado 20-X-2009.

Abstract: Genetic variability of the bacterium *Ralstonia solanacearum* (Burkholderiales: Burkholderiaceae) in the banana-growing region of Uraba (Colombia). The banana *moko* disease, caused by the bacterium *Ralstonia solanacearum*, is one of the most important phytopathological problems of the banana agribusiness in tropical countries. In Uraba and Magdalena (Colombia), the main exporting regions of banana in Colombia, this disease causes a destruction estimated in 16.5ha/year. The bacterium presents an extremely high level of genetic variation that affects control measures. This is the first study of its variation in Colombia and was done with AFLP molecular markers on a population of 100 isolates from banana plants, soils and “weeds”. The high level of genetic diversity, with Nei and Shannon indexes of $h=0.32$ and $I=0.48$, respectively, and the AMOVA, showed that this population is substructured ($F_{st}=0.66$): the host is the main factor of differentiation. Even so, previous tests show that all varieties have pathogenicity on *Musa*. Rev. Biol. Trop. 58 (1): 31-44. Epub 2010 March 01.

Key words: AFLP, moko disease, molecular markers, *Musa* sp., *Ralstonia solanacearum*.

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 Departamento de Magdalena, en donde se cultivan cerca de 44 000 ha que producen 1 399 623 ton de fruta fresca y genera 35 000 empleos directos (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural 2006).

Desde el punto de vista fitosanitario, el cultivo del banano presenta diversas limitantes biológicas, entre las que se destacan la Sigatoka negra (*Mycosphaella fijiensis*) y el Moko causado por la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Smith) (Yabuuchi *et al.* 1995). Se estima que el Moko

provoca pérdidas para la región de Urabá de 16.5 ha anuales de área productiva, lo que representó la destrucción de 528 ha de cultivo en el período entre 1970 y 2000 (Castañeda & Espinosa 2005). El efecto directo de esta enfermedad se agrava por la capacidad de su agente causal de sobrevivir por largos períodos de tiempo en el suelo, inhabilitando la resiembra inmediata de los lotes afectados. Adicionalmente, la gran plasticidad genética de la bacteria, la carencia de genotipos de banano resistentes a su ataque, el alto número de plantas arvenses hospedantes que presenta y su fácil dispersión, dificultan las prácticas dirigidas a su control (Fegan & Prior 2006).

R. solanacearum es un fitopatógeno altamente agresivo con una distribución global y un inusual amplio rango de hospedantes,

que incluye cientos de plantas de al menos 50 familias botánicas diferentes (Hayward 1995). Algunos de sus hospedantes de importancia económica son: la papa, el tomate, el tabaco, el banano, la heliconia, el anturio y el maní. Esta especie era considerada hasta hace algunos años, del grupo de *Pseudomonas* no fluorescentes, pero actualmente se considera un miembro del género *Ralstonia* ubicado en el Dominio Bacteria, División *Gracillicutes*, Clase *Proteobacteria*, Subclase β .

En diferentes estudios moleculares, bioquímicos y patogénicos 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 (Fegan & Prior 2005). El término complejo de especies fue inicialmente aplicado a *R. solanacearum* por Gillings & Fahy (1994) para reflejar el grado de variación fenotípica y genotípica encontrada dentro de esta especie. Luego, Taghavi *et al.* (1996) expandieron el concepto para incluir a la bacteria que causa la enfermedad BDB (*Blood disease bacterium*) del banano y *P. syzygii*, el agente causal de la enfermedad de Sumatra de plantas de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*).

Desde el punto de vista genético, la especie se ha segmentado en dos divisiones (I y II) determinadas a partir del análisis de RFLP's de una colección mundial de aislamientos (Cook *et al.* 1989). La División I comprende representantes de los biovares 3, 4 y 5 principalmente encontrados en Asia; mientras que la División II contiene los biovares 1, 2 y N2 de origen americano, los que se caracterizan por ser metabólicamente poco versátiles. Esta agrupación fue posteriormente confirmada mediante análisis de las secuencias 16S del ADNr (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*. Este linaje genético fue luego confirmado mediante secuenciación directa de la región intergénica del ADNr (ITS) y de los

genes que codifican para poligalacturonasa y endoglucanasa (Fegan *et al.* 1998). Por otra parte, Poussier *et al.* (2000) demostraron la existencia de un subgrupo de aislamientos de origen africano dentro del biovar 1, mediante la utilización de un análisis de PCR-RFLP del gen *hrp*, secuenciación de la región 16S del ADNr y AFLP's. Más recientemente Fegan & Prior (2005), plantean la existencia de cuatro grupos genéticos correspondientes a diferentes orígenes geográficos (Asia *sensu lato*, América, Indonesia y África) y proponen una clasificación jerárquica de este complejo de especies basada en cuatro niveles equivalentes a especie, subespecie, grupos infra-subespecíficos y líneas clonales. Los autores utilizan los términos filotipo y secuevar para definir los grupos subespecíficos e infra-subespecíficos, respectivamente.

Anterior al empleo de metodologías genéticas y moleculares para la caracterización de los miembros del complejo de especies de *R. solanacearum*, era frecuente la utilización de los aspectos patogénicos y de crecimiento en cultivos axénicos de las cepas bacteriales; que para el caso del agente causal del Moko del plátano y banano, comúnmente denominado como raza 2, incluía cuatro categorías: **SFR** (colonias con forma redonda, pequeña y fluida), **B** (cepas causantes de marchitamiento rápido en banano), **D** (cepas causantes de distorsión foliar y marchitamiento lento en banano) y **H** (aislamientos patogénicos contra plátano pero no contra banano). 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. Estos grupos se correlacionaban con diferentes orígenes geográficos: MLG24: Centro América, MLG25: Colombia y Perú y MLG28: 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).

A pesar de los avances en la caracterización genética en secuevares de las cepas de la raza 2 de *R. solanacearum*, es necesario continuar evaluando el grado de variabilidad de este patógeno en diferentes ecosistemas, especialmente en ambientes tropicales, donde su efecto patogénico es muy limitante en diversos cultivos agrícolas. Esta situación se evidenció en un estudio realizado con aislamientos de *R. solanacearum* colectados durante un período de 14 años en la isla de Martinica sobre diferentes hospedantes (anturio, cucurbitáceas, tomate y musáceas, entre otras), en el cual sorpresivamente una gran cantidad de cepas correspondieron al filotipo II, secuevar 4, pero no fueron patogénicas a las musáceas evaluadas en el estudio (banano Cavendish AAA y Musa sp. AAB), razón por la cual fueron denominadas como cepas II/4NPB (*No pathogenic to banana*) (Wicker *et al.* 2007).

Esta investigación se planteó con el objeto de evaluar el grado de variación genética mediante marcadores moleculares AFLP de una población de aislamientos de *S. solanacearum* procedentes de la región productora de banano de exportación de Urabá (Colombia), como base para el diseño de estrategias de control de la enfermedad del Moko en el cultivo del banano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos bacteriales: El estudio incluyó 100 aislamientos procedentes de plantas de banano, suelos y malezas asociadas a cultivos de banano del Urabá Antioqueño y en menor proporción del departamento del Magdalena (Colombia). De estas cepas, 60 habían sido previamente aisladas y purificadas por Obregón (2007) en el Centro de Investigaciones del Banano (Cenibanano), mientras que las cepas Rs074 y Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) 1008 fueron suministradas por el CIAT para su utilización como patrones de referencia, al ser representativas del filotipo II de *R. solanacearum* (Cuadro 1). Las cepas empleadas en el estudio fueron colectadas en los municipios de Apartadó,

Carepa, Chigorodó y Turbo del Urabá Antioqueño y su procesamiento inicial fue realizado en el laboratorio de Cenibanano.

Aislamiento y purificación bacterial:

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, con desinfección previa en etanol por 30s e hipoclorito de sodio al 3% por 1min. Este tejido fue macerado y la suspensión resultante cultivada en medio semi-selectivo SMSA modificado (1L: casaminoácidos 1 g, peptona 10g, glucosa 5g, cristal violeta 5mg/L, polimyxin β -sulfato 100mg/L, bacitracina 25mg/L, penicilina 0.5mg/L, agar-agar 17g, TZC 50mg/L). Para el caso de las muestras de suelo provenientes de los focos de enfermedad, se tomaron 500g 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 1g de suelo, obteniendo 100 μ L de las diluciones 10^{-1} y 10^{-3} para su siembra en medio SMSA modificado.

Las colonias bacteriales con apariencia rojiza, mucoide, borde irregular y halo claro, fueron seleccionadas y transferidas a medio AN (1L: extracto de carne 3g, peptona 5g, agar 15g). En todos los aislamientos utilizados en la investigación, incluyendo los colectados y los obtenidos de otras instituciones, 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') (Opina *et al.* 1997). Para esta prueba se tomó una lupada bacterial de cada aislamiento en 100 μ L de agua destilada estéril y se llevó a ebullición en baño María por 5min, utilizándose 1 μ L en las reacciones de PCR.

Las amplificaciones de PCR consistieron de un volumen total de 20 μ L conteniendo 0.1 μ M de cada cebador, 1U de Taq ADN polimerasa recombinante (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 0.2mM de cada dNTP, 1X de buffer de enzima (100mM Tris-HCl pH 8.8; 500mM KCl y 0.8% Nonidet P40) y 1.5mM MgCl₂.

TABLE 1
Isolates of Ralstonia solanacearum used in this study

Aislamiento	Planta hospedante (Nombre científico – nombre común)	Lugar de colección	Aislamiento	Planta hospedante (Nombre científico – nombre común)	Lugar de colección
Col 1	<i>Musa</i> sp.- Banano	Apartadó	Col 51	<i>Solanum nigrum</i> - Hierbamora	Carepa
Col 2	<i>Cissus sicyodes</i> - Uvilla	Apartadó	Col 52	<i>Portulaca oleracea</i> - Verdolaga	Carepa
Col 3	<i>Solanum nigrum</i> - Hierbamora	Apartadó	Col 53	<i>Ipomoea trifida</i> - Batatilla	Carepa
Col 4	<i>Musa</i> sp.- Banano	Santa Marta	Col 54	<i>Synedrella nodiflora</i> - Cerbatana	Carepa
Col 5	<i>Musa</i> sp.- Banano	Carepa	Col 55	<i>Musa</i> sp.- Banano	Carepa
Col 6	<i>Musa</i> sp.- Banano	Carepa	Col 56	<i>Musa</i> sp.- Banano	Turbo
Col 7	<i>Musa</i> sp.- Banano	Apartadó	Col 57	<i>Tripogandra cumaniensis</i> - Suelda con suelda	Turbo
Col 8	<i>Desmodium</i> – Pega pega	Apartadó	Col 58	<i>Musa</i> sp.- Banano	Apartadó
Col 9	<i>Solanum nigrum</i> - Hierbamora	Apartadó	Col 59	<i>Musa</i> sp.- Banano	Apartadó
Col 10	<i>Ipomoea trifida</i> - Batatilla	Carepa	Col 60	<i>Cissus sicyodes</i> - Uvilla	Chigorodó
Col 11	<i>Desmodium incanum</i> - Fabaceae	Carepa	Col 61	<i>Musa</i> sp.- Banano	Chigorodó
Col 12	<i>Piper</i> sp.- Santa Maria	Carepa	Col 62	<i>Emilia sonchifolia</i> - Emilia	Chigorodó
Col 13	<i>Solanum nigrum</i> - Hierbamora	Carepa	Col 63	<i>Musa</i> sp.- Banano	Chigorodó
Col 14	<i>Cissus sicyodes</i> - Uvilla	Carepa	Col 64	<i>Musa</i> sp.- Banano	Apartadó
Col 15	<i>Musa</i> sp.- Banano	Chigorodó	Col 65	<i>Musa</i> sp.- Banano	Apartadó
Col 16	<i>Solanum nigrum</i> - Hierbamora	Chigorodó	Col 66	<i>Musa</i> sp.- Banano	Carepa
Col 17	<i>Portulaca oleracea</i> - Verdolaga	Chigorodó	Col 67	Suelo	Carepa
Col 18	<i>Emilia sonchifolia</i> - Emilia	Chigorodó	Col 68	Suelo	Carepa
Col 19	<i>Ipomoea trifida</i> - Batatilla	Chigorodó	Col 69	Suelo	Carepa
Col 20	<i>Euphorbia hirta</i> - Lecherrito	Chigorodó	Col 70	Suelo	Carepa
Col 21	<i>Musa</i> sp.- Banano	Carepa	Col 71	Suelo	Apartadó
Col 22	<i>Musa</i> sp.- Banano	Carepa	Col 72	Suelo	Apartadó
Col 23	<i>Musa</i> sp.- Banano	Carepa	Col 73	Suelo	Apartadó
Col 24	<i>Musa</i> sp.- Banano	Chigorodó	Col 74	Suelo	Apartadó
Col 25	<i>Clon manzano</i> - Platano	Apartadó	Col 75	Suelo	Apartadó
Col 26	<i>Cissus sicyodes</i> - Uvilla	Chigorodó	Col 76	Suelo	Chigorodó

CUADRO 1

Aislamientos de Ralstonia solanacearum utilizados en este estudio

TABLE 1
Isolates of Ralstonia solanacearum used in this study

Aislamiento	Planta hospedante (Nombre científico – nombre común)	Lugar de colección	Aislamiento	Planta hospedante (Nombre científico – nombre común)	Lugar de colección
Col 27	<i>Musa</i> sp.- Banano	Apartadó	Col 77	Suelo	Chigorodó
Col 28	<i>Peperonia pellucida</i>	Apartadó	Col 78	Suelo	Chigorodó
Col 29	<i>Musa</i> sp.- Banano	Apartadó	Col 79	Suelo	Chigorodó
Col 30	<i>Musa</i> sp.- Banano	Apartadó	Col 80	<i>Musa</i> sp.- Banano	Carepa
Col 31	<i>Musa</i> sp.- Banano	Carepa	Col 81	<i>Musa</i> sp.- Banano	Carepa
Col 32	<i>Cissus sicyodes</i> - Uvilla	Carepa	Col 82	<i>Musa</i> sp.- Banano	Carepa
Col 33	<i>Musa</i> sp.- Banano	Carepa	Col 83	<i>Musa</i> sp.- Banano	Chigorodó
Col 34	<i>Solanum nigrum</i> - Hierbamora	Chigorodó	Col 84	<i>Musa</i> sp.- Banano	Chigorodó
Col 35	<i>Musa</i> sp.- Banano	Chigorodó	Col 85	<i>Musa</i> sp.- Banano	Chigorodó
Col 36	<i>Portulaca oleracea</i> - Verdolaga	Chigorodó	Col 86	<i>Musa</i> sp.- Banano	Apartadó
Col 37	<i>Musa</i> sp.- Banano	Carepa	Col 87	<i>Musa</i> sp.- Banano	Apartadó
Col 38	<i>Emilia sonchifolia</i> - Emilia	Carepa	Col 88	<i>Musa</i> sp.- Banano	Apartadó
Col 39	<i>Musa</i> sp.- Banano	Carepa	Col 89	<i>Musa</i> sp.- Banano	Apartadó
Col 40	<i>Solanum nigrum</i> - Hierbamora	Carepa	Col 90	<i>Musa</i> sp.- Banano	Apartadó
Col 41	<i>Musa</i> sp.- Banano	Chigorodó	Col 91	<i>Musa</i> sp.- Banano	Apartadó
Col 42	<i>Musa</i> sp.- Banano	Chigorodó	Col 92	<i>Musa</i> sp.- Banano	Apartadó
Col 43	<i>Musa</i> sp.- Banano	Carepa	Col 93	<i>Musa</i> sp.- Banano	Santa Marta
Col 44	<i>Tripogandra cumananensis</i> - Suelta con suelta	Carepa	Col 94	<i>Musa</i> sp.- Banano	Santa Marta
Col 45	<i>Musa</i> sp.- Banano	Carepa	Col 95	<i>Musa</i> sp.- Banano	Santa Marta
Col 46	<i>Musa</i> sp.- Banano	Turbo	Col 96	<i>Musa</i> sp.- Banano	Cienaga
Col 47	<i>Tripogandra cumananensis</i> - Suelta con suelta	Turbo	Col 97	<i>Musa</i> sp.- Banano	Cienaga
Col 48	<i>Musa</i> sp.- Banano	Chigorodó	Col 98	<i>Musa</i> sp.- Banano	Cienaga
Col 49	<i>Solanum nigrum</i> - Hierbamora	Chigorodó	Col 99	<i>Musa</i> sp.- Banano (Ciat 1008)	Ibague
Col 50	<i>Synedrella nodiflora</i> - Cerbatana	Chigorodó	Col 100	<i>Musa</i> sp.- Banano (Rs 074)	ND

En todas las evaluaciones se incluyó como control positivo las cepas de referencia Rs074 y CIAT1008. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador T3 (Biometra, Alemania) y consistieron en una desnaturalización inicial a 96°C por 2min, seguida por 40 ciclos a 94°C por 20s, 64°C por 20s, 72° por 30s y un período final de extensión a 72°C por 5min. Luego de la amplificación, se tomaron 5µL de los productos de reacción y se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE (TBE 5X: 54g/L TrisBase; 27.5g/L de ácido bórico; 20mL/L de EDTA 0.5M pH 8.0), suplementado con 3µL de bromuro de etidio (10mg/mL). La visualización de las bandas se realizó bajo luz ultravioleta utilizando el sistema digital de análisis Bio Doc Analyze (Biometra).

Extracción de ADN para AFLP's: Se partió de una lupada bacterial obtenida en medio agar-nutritivo y diluida en 100µL de agua ultrapura estéril para luego centrifugar durante 4min a 11 000rpm con el fin de peletizar la bacteria y adicionar 500µL de buffer de extracción (10mM NaCl, 25mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 8.0 y 100µL de SDS 20%), incubándose en baño María a 37°C durante 1h. Posteriormente se agregó 1vol. de fenol – cloroformo y se centrifugó durante 10min a 13 000rpm con el fin de separar las fases orgánicas con residuos de proteínas, lípidos y otros componentes celulares. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo al cual se le adicionó 300 µl de cloroformo, centrifugándose nuevamente por 5min a 13 000rpm. La precipitación de ácidos nucleicos se realizó mediante la adición de 0.6vol. de isopropanol y 0.1vol. de acetato de sodio 3M pH 5.5 e incubación a -20°C durante al menos 1h; para finalmente centrifugar a 13 000rpm por 10min, descartar el sobrenadante y limpiar el pellet con 400µL de Etanol al 70%. El precipitado se resuspendió en 20µL de agua ultrapura estéril y se procedió a digerir el ARN mediante la adición de 3µL de ARNasa e incubación a 37°C durante 12h. La integridad del ADN se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X suplementado con 3µL de bromuro

de etidio (10mg/mL). La cantidad de ADN obtenida se determinó por espectrofotometría a 260nm de longitud, utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 6 Uv-Vis (Waltham, MA, USA).

Variabilidad genética de *R. solanacearum* mediante AFLP's: Esta metodología se realizó siguiendo los procedimientos descritos por Vos *et al.* (1995) y Janssen *et al.* (1996), con algunas modificaciones propuestas por Poussier *et al.* (2000) para el estudio de *R. solanacearum*, utilizándose inicialmente cuatro aislamientos de diferente procedencia (Col1, Col11, Col16 y Col26) para la evaluación del grado de polimorfismo generado con las seis combinaciones de cebadores probados. Para esto se realizaron digestiones dobles con las enzimas *EcoRI/MseI* a partir de 5µL ADN [aprox. 100ng/µL], 2X de Buffer Tango Y+, 1.25U de las enzimas de restricción, 1mM de DTT y un volumen total de 12.5µL. La mezcla fue incubada a 37°C durante 2h y las reacciones detenidas a 70°C por 15min. La efectividad de la restricción fue monitoreada en un gel de agarosa al 2%, para luego proceder a la ligación de los adaptadores de doble cadena, específicos para cada sitio de restricción generado. Para el caso de *MseI*: 5' GAC GAT GAG TCC TGA G 3', 5' TAC TCA GGA CTC AT 3' y *EcoRI*: 5' CTC GTA GAC TGC GTA CC 3', 5' AAT TGG TAC GCA GTC TAC 3'. Las reacciones de ligación consistieron de 25µL de volumen final, incluyendo los 12.5µL de solución de digestión, 1U de la enzima T4 ADN ligasa, 5 pmoles/µL de adaptador *EcoRI*, 50 pmoles/µL de adaptador *MseI*, 1X de buffer de enzima, 0.5mM de DTT y 0.4mM de ATP. La mezcla se incubó a 20°C por 2h y se almacenó a -20°C hasta su utilización. Para la visualización de la digestión-ligación, se tomaron 5µL de la solución y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Posteriormente, se procedió a realizar las amplificaciones mediante la utilización de los juegos de cebadores +1: EA-MA, EA-MG, EC-MA, EC-MG, EC-MC y EA-MC diseñados a partir de los cebadores *EcoRI*+0:

5'-GACTGCGTACCAATT-3' y *Mse*I+0: 5'-GATGAGTCCTGAGTA-3'. Las reacciones de PCR consistieron de 5µL de ADN digerido y ligado, 1.25µL de cada cebador [10pmoles/µL], 0.8mM de dNTPs, 2.5mM de MgCl₂, 1X de buffer de enzima (100mM Tris-HCl pH 8.8, 500mM KCl, 0.8% Nonidet P40), 2U de Taq ADN polimerasa recombinante (Fermentas, Vilnius, Lithuania) y un volumen final de 25µL. El programa de amplificación fue de 2 min a 94°C, seguido de 40 ciclos a 94°C por 30s, 55°C por 1min y 72°C por 1min, con una extensión final a 72°C por 5min. Finalmente los productos fueron visualizados en gel de agarosa al 1.5% y seleccionadas las cuatro combinaciones de cebadores que generaron los perfiles más polimórficos para su utilización con toda la población bajo estudio y su corrido en geles de poli(acrilamida) al 6% + 7.5M de urea.

Para este proceso se utilizó una cámara de electroforesis Biorad (Hercules, CA, USA) con geles de 25cm. Se realizó un corrido previo a 2 000V y 55°C de temperatura, para luego cargar 5µL de muestra previamente desnaturada a 95°C por 5min y 2µL de buffer de carga (100ml: 0.05g Azul de Bromofenol, 0.05g Xilene Cianol, 10ml TBE 10X), y se efectuó un corrido a 2 000V por 80min. La visualización de los perfiles se realizó siguiendo una modificación de la metodología de tinción de plata propuesta por Sambrook & Russell (2001). Para esto se ubicó el gel en una solución fijadora de etanol al 10% por 8 min, transfiriéndose luego a ácido nítrico al 1% por 3min y lavándose con agua desionizada durante 10s. Posteriormente se adicionó la solución de tinción (1L: 1g de nitrato de plata, 1 500µL formaldehído) por 30min, lavándose con agua destilada por 1min, para proceder al revelado (500mL: 15g carbonato de sodio, 750µL formaldehído, 100µL tiosulfato de sodio) por 2-5min. Finalmente se adicionó la solución fijadora (ácido acético glacial al 10%) por 5min y se lavó el gel con agua destilada para proceder a la lectura de las bandas.

Análisis de datos: Para cada combinación de cebadores se construyó una matriz binaria

basada en la presencia/ausencia de cada banda en los aislamientos evaluados. Para el análisis de agrupamiento de los aislamientos se obtuvo la matriz de distancias con base en el coeficiente de disimilaridad de Jaccard y se realizó el dendrograma utilizando la distancia promedio (UPGMA), validando la estructura del árbol con base en el valor *p* y la probabilidad de ocurrencia obtenida a través de bootstrap utilizando 10000 remuestreos (repeticiones). Para ello se utilizó el paquete pvclust (Suzuki & Shimodaira 2006) del programa estadístico R (R Development Core Team, 2008). Posteriormente se establecieron grupos de genotipos con base en el dendrograma, con el fin de realizar un análisis molecular de varianza (AMOVA) propuesto por Excoffier *et al.* (1992), utilizando el software Arlequin v3.1 (Excoffier *et al.*, 2006). Se realizó una prueba de hipótesis para los componentes de varianza entre y dentro de poblaciones utilizando 1000 permutaciones. Finalmente se calculó el número de *loci* polimórficos, el índice de diversidad genética de Nei y el índice de diversidad genotípica de Shannon mediante el software POPGENE (Yeh & Boyle 1997).

RESULTADOS

Confirmación de la identidad de los aislamientos: En los 100 aislamientos incluidos en el estudio, se confirmó su asociación al complejo de especies *R. solanacearum*, al obtenerse mediante PCR el amplicón esperado de 282pb. Este amplicón fue igualmente obtenido en las cepas de referencia Rs074 y CIAT 1008.

Variabilidad genética de *R. solanacearum* mediante AFLP's: De las seis combinaciones de cebadores evaluadas, se seleccionaron EA-MA, EA-MG, EC-MA, y EC-MC por generar los mayores niveles de polimorfismo entre los aislamientos inicialmente evaluados. Con los cuatro pares de cebadores se registraron a partir de los geles un total de 354 amplicones (EA-MA: 94, EA-MG: 91, EC-MA: 66 y EC-MC: 103 amplicones) que oscilaron entre 80 y 1200pb. A pesar de haberse empleado la

metodología con los 100 aislamientos, el análisis final se realizó en las 78 cepas en las que se obtuvo la totalidad de los perfiles electroforéticos con los cuatro marcadores, evitándose sesgos en el estudio por datos perdidos.

La población de *R. solanacearum* resultó altamente variable, con un porcentaje de loci polimórficos del 96.8%, un índice de diversidad genética de Nei de $h=0.32$ ($SE=0.16$) y de diversidad genotípica de Shannon de $I=0.48$ ($SE=0.2$). El dendrograma UPGMA generado dividió los aislamientos en tres grandes grupos (I, II, III), el primero de ellos (grupo I, valor $p: 0.79$ y bootstrap: 79%) incluyó 13 aislamientos procedentes de suelos de la región bananera de Urabá. El grado de variación al interior de este grupo fue alto, con un coeficiente de disimilaridad máximo de 0.35. En el segundo grupo (II, valor $p: 0.96$ y bootstrap: 71%) se presentaron cinco subgrupos bien definidos, relacionados con un coeficiente de disimilaridad inferior a 0.41, que con algunas excepciones representan la procedencia de los aislamientos así, IIA: cinco cepas obtenidas en plantas de banano; IIB: siete cepas obtenidas en *S. nigrum*, además de una cepa de *Piper* sp. y una de *Desmodium* sp.; IIC: representado por tres cepas de *Portulaca oleraceae*; IID: subdividido a su vez en cuatro clados, tres de ellos conteniendo aislamientos de banano y plátano y uno con tres cepas de *Emilia sonchifolia* y una de *Euphorbia hirta* (IID-4). El subclado IID-1: incluye las cepas identificadas como pertenecientes al secuevar

6 y cuya procedencia es la región bananera de Santa Marta; el subclado IID-2: incluye 20 aislamientos obtenidos en banano de la región de Urabá y el subclado IID-3: contiene siete aislamientos de banano de la región de Urabá, además de un aislamiento de plátano y un aislamiento de *Peperonia pellucida*. Finalmente, el grupo III (valor $p: 0.86$ y bootstrap: 29%) incluye cuatro aislamientos obtenidos de *Cissus sicyodes* y dos de banano. Este grupo presenta un coeficiente de disimilaridad máximo de 0.41. Adicional a estos grupos, se presentan algunas cepas que se ubicaron individualmente a lo largo del dendrograma. Algunos ejemplos son la cepa Col16 obtenida de *S. nigrum*, Col11 de *Desmodium incanum* y la cepa Col59 de banano. Un aspecto importante del análisis es el hecho que al interior del clado IID, que incluye mayoritariamente cepas de banano se presentan altos niveles de similitud genética y subclados altamente soportados por los análisis de probabilidad y bootstrap (Fig. 1).

El AMOVA demostró que la variación genética total de la población bajo estudio se puede explicar en un 33.9% debido a diferencias dentro de los grupos, mientras que un 66.10% se debió a la varianza entre los grupos. El análisis de subestructuración genética resultó significativo ($F_{st}=0.66$; $p<0.00001$), indicando diferenciación genética entre las poblaciones de *R. solanacearum* de la región bananera de Urabá, siendo su hospedante de origen el principal factor asociado a su estructura (Cuadro 2).

CUADRO 2

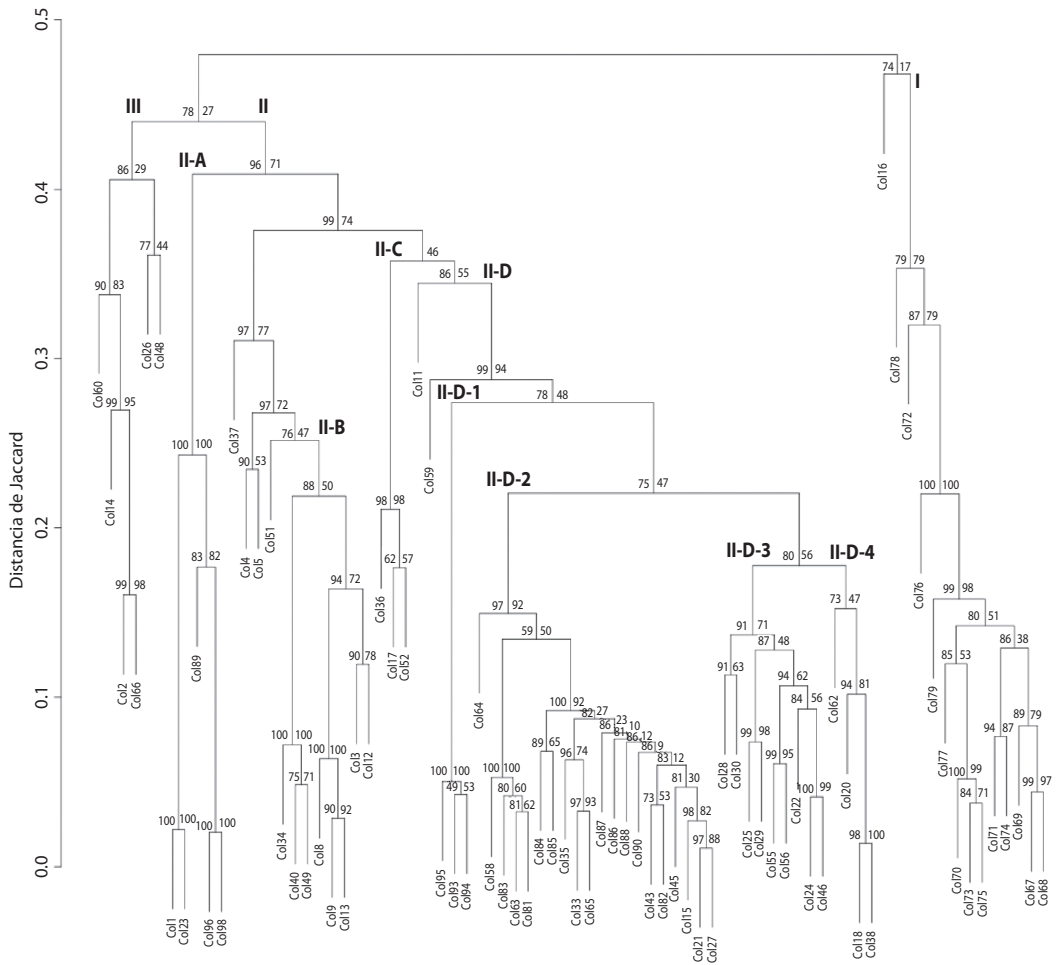
Análisis de varianza molecular (AMOVA) basado en análisis con marcadores AFLP en una población de 78 aislamientos de *Ralstonia solanacearum* de la zona bananera de Urabá (Colombia)

TABLE 2

Analysis of molecular variance (AMOVA) based on AFLP's markers of a population of 78 isolates of *Ralstonia solanacearum* from the banana-growing region of Urabá (Colombia)

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Componentes de Varianza	Porcentaje de Variación
Entre poblaciones	13	3170.800	41.1190	66.10
Dentro de poblaciones	67	1413.951	21.0918	33.90

FST: 0.66096. Valor $p<0.0001$.



Aislamiento

Fig. 1. Dendrograma UPGMA generado mediante el análisis de marcadores AFLP para una población de 78 aislamientos de *Ralstonia solanacearum* de la región de Urabá (Colombia). Los números sobre las ramas indican el valor p (a la izquierda) y la probabilidad de *bootstrap* (a la derecha). Los números romanos indican los grupos principales y secundarios derivados del análisis UPGMA, sus nombres se explican en el texto.

Fig. 1. UPGMA dendrogram generated through analysis of AFLP markers for a population of 78 isolates of *Ralstonia solanacearum* from the region of Urabá (Colombia). Numbers above branches show p value (left-side) and bootstrap probability (right-side). The roman numerals indicate major and secondary groups with the UPGMA analysis, their names are explained in the text.

DISCUSIÓN

En este estudio se realizó una caracterización molecular del nivel de variabilidad de aislamientos de *R. solanacearum* procedentes de plantaciones de banano, suelos y plantas

arvenses de al menos ocho familias botánicas (*Asteraceae*, *Commelinaceae*, *Convolvulaceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae*, *Piperaceae*, *Portulacaceae* y *Vitaceae*) colectados mayoritariamente en la región de Urabá y algunos en la zona bananera del Departamento del

Magdalena. Los resultados indican que los 100 aislamientos incluidos en el estudio están asociados al complejo *R. solanacearum*, tal como se desprende de la obtención de un amplicón de 282pb, que también fue generado en las cepas de referencia.

El análisis de diversidad genética utilizando AFLP's reveló la existencia de un alto nivel de variación al interior de la población de *R. solanacearum* evaluada, con niveles de disimilaridad genética entre algunos grupos de cepas que superan valores de 0.47 (ej. cepas obtenidas de suelo vs cepas de *Cissus sicyodes*). Evaluaciones morfológicas y patogénicas realizadas con cepas colombianas de *R. solanacearum* (Granada *et al.* 1995, Granada 1996a, 1996b, Martínez & García 2003, Gómez *et al.* 2005, Obregón 2007) habían sugerido la existencia de un alto nivel de variación de esta bacteria en Colombia, situación que es confirmada plenamente al menos para la población de *R. solanacearum* asociada a la enfermedad del Moko en la región bananera de Urabá.

Estos niveles de diversidad se ven reflejados por los altos índices de Nei y Shannon encontrados en el análisis poblacional ($h=0.32$, $I=0.48$) y resultan frecuentes en los diversos estudios que se han realizado con poblaciones de *R. solanacearum* en el mundo y que utilizan marcadores moleculares tipo AFLP's y RAPD's (Poussier *et al.* 2000, Yu *et al.* 2003, Grover *et al.* 2006, Jeong *et al.* 2007). En estos estudios consistentemente se confirma la división del complejo de especies *R. solanacearum* en cuatro filotipos, sin embargo al interior de cada filotipo se encuentra un alto nivel de variación. Así por ejemplo Yu *et al.* (2003) al evaluar una población de 55 aislamientos de *R. solanacearum* provenientes de la región cultivadora de jengibre en Hawai mediante 10 marcadores AFLP's, encontraron que los niveles de similitud genética entre aislamientos del mismo cultivo presentaban valores tan bajos como 0.46 a 0.53, mientras que la disimilaridad genética promedio de la población fue de 0.5. Por otra parte, Grover *et al.* (2006), al evaluar la diversidad de 44 aislamientos de *R. solanacearum* obtenidos en 16 diferentes terrazas de

cultivo de un mismo campo en Shimla (India) detectaron 42 genotipos distintos cuando se estableció como parámetro un índice de similitud de 0.7, encontrándose además valores de distancia genética entre algunos aislamientos de hasta 0.88.

El análisis al interior del dendrograma generado en este estudio y el posterior AMOVA, permite la separación de los aislamientos dependiendo de su hospedante de origen (con algunas excepciones), generándose grupos bien definidos para los aislamientos procedentes de suelo de la región de Urabá, así como de las plantas arvenses *E. sonchifolia*, *S. nigrum*, *P. oleraceae*, *C. sicyodes*.

Los aislamientos obtenidos de banano, se dividieron en al menos cinco subgrupos, uno de los cuales representa el secuevar 6 detectado por Cardozo (2008), mientras que los otros grupos presentan indistintamente cepas del secuevar 4 y cepas asociadas al filotipo II, pero cuyo secuevar no pudo ser definido en dicho estudio, debido a la falta de amplificación en la prueba de PCR múltiple (Cardozo 2008). Un hecho notable de estos grupos de aislamientos obtenidos de banano, es que presentan un menor nivel de variabilidad con respecto a aquellos obtenidos en suelo y algunas plantas arvenses como *C. sicyodes*. Esta situación puede representar la existencia de líneas clonales al interior de los secuevares presentes en la población. Sin embargo, los niveles de variación al interior de cada línea indican que éstas no son estables, pues debido a la ocurrencia de diferentes fuentes de variación como resultado de la presión de selección a que se ven sometidas en los sistemas agrícolas, continuamente se generan nuevos genotipos. Una situación similar fue planteada por Castillo & Greenberg (2007), quienes determinaron la diversidad genética, el grado de recombinación y la divergencia poblacional de 58 aislamientos representando los diferentes filotipos de la bacteria presentes en diversas regiones del mundo y concluyeron que *R. solanacearum* se presenta como una bacteria fundamentalmente clonal, pero con una alta capacidad de generar nuevos genotipos. El gran potencial de variación que presenta

R. solanacearum fue recientemente confirmado por Grover *et al.* (2006), quienes luego de evaluar los niveles de variación de una línea clonal de *R. solanacearum* sometida a nueve transferencias en medio de cultivo, determinaron mediante RAPD's la existencia de 22 genotipos diferentes cuando se utilizó como parámetro de separación un nivel de similitud de 0.7. Tal variación, puede explicarse gracias a los altos niveles de transferencia horizontal de genes entre cepas bacteriales de *R. solanacearum* ó con otras especies de procariotes (incluso con archaeobacterias, Gophna *et al.* 2004) debido a la existencia de múltiples elementos móviles en su genoma (profagos, secuencias de inserción, transposones); a la presencia de sitios calientes (*hot spots*) de recombinación y a la alta tasa de mutación reportada para esta bacteria (Grover *et al.* 2006). Un indicativo adicional de la gran variabilidad de este complejo de especies fue aportado por el estudio de Guidot *et al.* (2007), quienes en el estudio de microarreglos con 5120 genes de la cepa tipo GMI1000 e hibridización con el genoma de 16 cepas representativas de los cuatro filotipos de *R. solanacearum*, determinaron que de la totalidad de genes bajo análisis, tan sólo 2690 (53%) estaban presentes en todas las 17 cepas evaluadas.

A pesar del hallazgo de una subestructura al interior de la población de *R. solanacearum* de la zona de Urabá con un alto valor de *Fst* (0.66) y cuyo determinante principal es el hospedante de origen de los aislamientos, la patogenicidad en banano de las cepas procedentes de plantas arvenses utilizadas en este estudio fue probada en un trabajo reciente realizado por Obregón (2007), quien luego de inocular plantas del clon Gran enano de dos meses de edad y propagadas por cultivo *in vitro*, encontró que 34 de las cepas (obtenidas de *Cissus sicyodes*, *Solanum nigrum*, *Emilia sonchifolia*, *Ipomoea trifida*, *Portulaca oleraceae*, *Piper sp.*, *Euphorbia hirta*, *Synedrella nodiflora*, *Desmodium sp.*, *Peperonia pellucida* y *Tripogandra cumanenses*) tenían la capacidad de inducir los síntomas de marchitez y necrosis vascular que caracterizan la enfermedad del Moko de las musáceas. Esto posiblemente

indica que aunque en general, se presentan diferencias genéticas entre aislamientos de *R. solanacearum* procedentes de plantas arvenses y/o suelos con respecto a aquellos colectados en plantas de banano, aquellos genes como *hrp* (respuesta hipersensible y patogenicidad), *eg* (endoglucanasa) y *flic C* (flagelina) ubicados en el megaplásmido bacterial asociados a patogenicidad (Salanoubat *et al.* 2002) son constantemente transferidos horizontalmente entre las cepas que comparten los agroecosistemas bananeros, de manera que su rango de hospedantes se extiende, posibilitándose así la afección de otras plantas, en este caso *Musa sp.* Sin embargo, de gran interés resulta la presencia de aislamientos originalmente obtenidos de plantas de banano compartiendo clados con aislamientos de plantas arvenses (ej. Clado III), pues esto refleja que no sólo los genes del megaplásmido son similares, sino también que las regiones de su cromosoma bacterial comparten altos niveles de identidad. Es por esto que de gran interés resultaría la secuenciación masiva de ambos replicones en aislamientos seleccionados con base en el análisis de AFLP aquí realizado, con el fin de profundizar en la búsqueda de respuestas al por qué a pesar de presentarse estructuración al interior de la población estudiada, los miembros de diferentes clados no presentan patogenicidad diferencial.

Desde el punto de vista práctico, los hallazgos de esta investigación y la 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 infectados 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. Estos resultados representan una grave problemática epidemiológica para el manejo de esta enfermedad en las regiones bananeras de Colombia y sugieren la necesidad de incluir en evaluaciones de resistencia de variedades, control químico y capacidad de sobrevivencia

de la bacteria en los focos tratados, de un alto número de genotipos, los que deberían ser seleccionados con base en su hospedante de origen.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se financió con el apoyo de COLCIENCIAS (Contrato 8242-07-16025), AUGURA y la Universidad Nacional de Colombia. Los autores agradecen a Mónica Obregón de Cenibanano y Elizabeth Álvarez del CIAT, por proveer algunas de las cepas utilizadas en el estudio.

RESUMEN

La enfermedad del *moko* de las musáceas, causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum*, es uno de los problemas fitopatológicos más importantes de la agroindustria del banano en los países tropicales. En Urabá y el Magdalena (Colombia), las principales regiones exportadoras de banano en Colombia, esta enfermedad provoca una destrucción estimada en 16.5ha/año. La bacteria presenta un nivel extremadamente alto de variación genética que afecta las medidas de control. Este es el primer estudio de su variación en Colombia y se hizo con los marcadores moleculares AFLP en una población de 100 aislamientos de plantas de banano, suelos y arvenses. El alto nivel de diversidad genética, con índices de Nei y de Shannon de $h=0,32$ y $I=0,48$, respectivamente, y la AMOVA, demostró que esta población es subestructurada ($F_{st}=0,66$): el hospedero es el principal factor de diferenciación. Aun así, las pruebas anteriores mostraron que todas las variedades presentan patogenicidad en *Musa*.

Palabras clave: AFLP, enfermedad del Moko, marcadores moleculares, *Musa* sp. *Ralstonia solanacearum*

REFERENCIAS

Cardozo, C. 2008. Diversidad genética de *Ralstonia solanacearum* en la zona bananera de Urabá. Tesis Maestría Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Medellín.

Castañeda, D.Y & J.A. Espinosa 2005. Comportamiento e impacto de la enfermedad del Moko en la zona de Urabá (Colombia), en las últimas tres décadas y media y propuesta de un índice de riesgo de la enfermedad. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín 58: 2587-2599.

Castillo, J.A. & J.T. Greenberg. 2007. Evolutionary dynamics of *Ralstonia solanacearum*. Appl. Environ. Microbiol. 73: 1225-1238.

Cook, D., E. Barlow & 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.

Excoffier, L., P.E. Smouse & J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. Genetics 131: 479-491.

Excoffier, L., L. Guillaume & S. Schneider. 2006. Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for populations genetics. Computational and molecular population genetics lab (CMPG), Universidad de Berna, Berna, Suiza.

Fegan, M., M. Taghavi, L. Sly & A.C. Hayward. 1998. Phylogeny, diversity and molecular diagnostics of *Ralstonia solanacearum*, p. 19-33. In C. Allen, P. Prior & A.C. Hayward (eds.). Bacterial wilt: the disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. American Phytopathological Society, San Pablo, EEUU.

Fegan, M. 2005. Bacterial wilt diseases of banana: evolution and ecology, p. 379-386. In C. Allen, P. Prior & A.C. Hayward (eds.). Bacterial wilt: the disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. American Phytopathological Society, San Pablo, EEUU.

Fegan, M. & P. Prior. 2005. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”? p. 449-461. In C. Allen, P. Prior & A.C. Hayward (eds.). Bacterial wilt: the disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. American Phytopathological Society, San Pablo, EEUU.

Fegan, M. & P. Prior. 2006. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana. Australas. Plant Pathol. 35: 93-101.

Gillings, M.R. & Y.P. Fahy. 1994. Genomic fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex, p. 95-112. In A.C. Hayward & G.L. Hartman (eds.). Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. CABI, Wallingford, Reino Unido.

Gómez, E.A., E. Álvarez & 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.

- Granada, G., M. Howell, & D. Cook. 1995. Caracterización molecular de cepas colombianas de *Pseudomonas solanacearum* raza 2, a través de la técnica de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, p. 187-191. In Instituto Colombiano Agropecuario, ICA (ed.). Mejoramiento de la producción del cultivo del plátano. Corpoica, Armenia, Colombia.
- Gophna, U., R.L. Charlebois & W.F. Doolittle. 2004. Have archaeal genes contributed to bacterial virulence? Trends. Microbiol. 12: 213-219.
- Granada, G.A. 1996a. Hospederos de *Pseudomonas solanacearum* raza 2, bajo condiciones de la zona platanera del departamento del Quindío, p. 95- 96. In Comité departamental de cafeteros del Quindío (ed.). Tecnología del eje cafetero para la siembra y explotación rentable del cultivo del plátano. Tercer informe técnico, 1994-1996. Corpoica, Armenia, Colombia.
- Granada, G.A. 1996b. Supervivencia de *Pseudomonas solanacearum* raza 2, bajo condiciones de la zona platanera del departamento del Quindío, p. 96. In Comité departamental de cafeteros del Quindío (ed.). Tecnología del eje cafetero para la siembra y explotación rentable del cultivo del plátano. Tercer informe técnico, 1994-1996. Corpoica, Armenia, Colombia.
- Grover A., W. Azmi, A.V. Gadewar, D. Pattanayak, P.S. Naik, G.S. Shekhawat & S.K. Chakrabarti. 2006. Genotypic diversity in a localized population of *Ralstonia solanacearum* as revealed by random amplified polymorphic DNA markers. J. Appl. Microbiol. 101: 798-806.
- Guidot, A., P. Prior, J. Schoenfeld, S. Carrère, S. Genin & C. Boucher. 2007. Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. J. Bacteriol. 189: 377-387.
- Hayward, A.C. 1995. Research on bacterial wilt: a perspective on international linkages and access to the literature, p. 1-8. In C. Allen, P. Prior & A.C. Hayward (eds.). Bacterial wilt: the disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. American Phytopathological Society, San Pablo, EEUU.
- Janssen, P., R. Coopman, G. Huys, J. Swings, M. Bleeker, P. Vos, M. Zabeau & K. Kersters. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. Microbiology 142: 1881-1893.
- Jeong, Y., J. Kim & Y. Kang. 2007. Genetic diversity and distribution of Korean isolates of *Ralstonia solanacearum*. Plant Dis. 91: 1277-1287.
- Obregon, 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 Uraba. Tesis Maestría Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- Opina , N., F. Tavner, G. Holloway, J.F. Wang, T. Li, R. Maghirang, M. Fegan, A.C. Hayward, V. Krishnapillai, W.F. Hong, B.W. Holloway & J.N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain – specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). Asian – Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol. 5: 19-33.
- Poussier, S., D. Trigalet-Demery, P. Vandewalle, B. Goffinet, J. Luisetti & A. Trigalet. 2000. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the hrp gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. Microbiology 146: 1679-1692.
- R Development Core Team. 2008. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Salanoubat, M., S. Genin & F. Artiguenave. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. Nature 415: 497-502.
- Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, EEUU.
- Suzuki, R. & H. Shimodaira. 2006. Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. Bioinformatics 22: 1540-1542.
- Taghavi, M., C. Hayward, L. Sly & 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.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van De Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, M. & M. Zabeau. 1995. AFLP a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23: 4407-4414.
- Wicker, E., L. Grassart, R. Coranson-Beaudu, D. Mian, C. Guilbaud, M. Fegan & P. Prior. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains for Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. Appl. Environ. Microbiol. 73: 6790-6801.

- Yabuuchi, E., Y. Kosako, I. Yano, H. Hotta, & Y. Hishiuchi. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and *Alcaligenes* species to *Ralstonia* Gen. Nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) Comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1986) Comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) Comb. Nov. Microbiol. Immunol. 39: 897-904.
- Yeh, F.C. & T.J.B. Boyle. 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. Belg. J. Bot. 129: 157.
- Yu, Q., A.M. Alvarez, P.H. Moore, F. Zee, M.S. Kim, A. De Silva, P.R. Hepperly & R. Ming. 2003. Molecular

Diversity of *Ralstonia solanacearum* isolated from Ginger in Hawaii. Phytopathology 93: 1124-1130.

REFERENCIAS DE INTERNET

- Martínez, A. & F. García. 2003. Manejo de la enfermedad del Moko ó ereke en el cultivo del plátano para la Orinoquía colombiana. Corpoica ecoregión Caribe (Consultado 10 Diciembre 2007, www.turipana.org/anejo_enfermedad_moko.htm).
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural-MADR. 2006. Perfil del cluster del banano. Colombia (Consultado 12 Agosto 2007, www.minagricultura.gov.co).