

Aislamiento, identificación molecular y diversidad genética de las cepas de *Ralstonia solanacearum* causantes del Moko bacteriano en banano en México

Blondy Canto-Canché^{1*}, Miguel Tzec-Simá²; Luciano Martínez Bolaños³, José Abraham Obrador-Sánchez⁴

¹Unidad de Biotecnología, ²Unidad de Biología Integrativa, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Calle 43 No. 130 Col. Chuburná de Hidalgo, C.P. 97205 Mérida, Yucatán, México. ³Centro Regional Sur. Universidad Autónoma Chapingo. Zimatlán, Oaxaca, México. C.P. 71200.

⁴Departamento de Parasitología Unidad Laguna, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

***Autor de**

Correspondencia:

Blondy Canto-Canché
cantocanche@cicy.mx

Contribución:

Científica

Sección:

Fitosanidad

Recibido:

15 Diciembre, 2023

Aceptado:

15 Enero, 2024

Publicado:

16 Abril, 2024

Cita:

Canto-Canché B, Tzec-Simá M, Martínez BL y Obrador-Sánchez JA. 2024. Aislamiento, identificación molecular y diversidad genética de las cepas de *Ralstonia solanacearum* causantes del Moko bacteriano en banano en México. *Acorbat Revista de Tecnología y Ciencia* 1(1): 83
<https://doi.org/10.62498/AR.TC.2483>

RESUMEN

Ralstonia solanacearum es causante de la enfermedad Moko en bananos y plátanos; esta bacteria es difícil de aislar y caracterizar genéticamente. En este trabajo se tuvo como objetivos incrementar el éxito del aislamiento de *R. solanacearum* raza 2 y realizar la genotipificación de las cepas de México. Se encontró que éstas pertenecen al secuevar 6, identificándose por primera vez en este secuevar dos cepas no patogénicas en banano. La construcción de árboles filogenéticos basados en secuencias de *hrpB* y *pga* fueron capaces de agrupar en clados diferentes las cepas patogénicas de las no patogénicas. Es probable que estas cepas correspondan a nuevos ecotipos de *R. solanacearum* de la raza 2.

Palabras clave: Moko, aislamiento *Ralstonia solanacearum*; filogenia, Fitosanidad.

ABSTRACT

Ralstonia solanacearum is the causal agent of Moko disease in banana and plantain; this bacterium is elusive for isolation and genetic characterization. The goals of this work were improve the chance of isolation of *R. solanacearum* race 2 and perform the genetic genotyping of Moko mexican strains. Strains from Mexico belong to sequevar 6, and for first time it was found two strains non-pathogenic on banana. Phylogenetic trees based on *hrpB* and *pga* sequences were able to place in different clades the pathogenic and the non-pathogenic on banana strains. Probably these strains correspond to new ecotypes of *R. solanacearum* race 2.

Keywords: Moko disease; isolation of *Ralstonia solanacearum*; phylogeny, phytosanity.



INTRODUCCIÓN

Ralstonia solanacearum (Smith, 1986) es una de las bacterias más destructivas en la agricultura mundial. Es cosmopolita y afecta al menos 54 familias de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas. Muchas de las plantas hospederas son cultivos de importancia agrícola o alimentos importantes de subsistencia, como la papa (*Solanum tuberosum*), el tomate (*S. lycopersicum*), la berenjena (*S. melongena*), el cacahuate (*Arachis hypogea*), y los bananos y plátanos (*Musa* spp.) (Fegan y Prior, 2005a).

R. solanacearum se ha clasificado en cinco razas, con base el rango de hospederos que infecta; la raza 2 infecta heliconias y plátanos, causando el Moko bacteriano en los cultivos de bananos y plátanos. La enfermedad está presente en América, Asia, África y Oceanía y es un problema fitosanitario serio en los países tropicales. Moko ingresó a México en 1960 y actualmente está distribuida en muchos municipios de Chiapas y Tabasco, los dos principales productores de banano en México.

Genéticamente *R. solanacearum* se clasifica en filotipos y sequevares (Fegan y Prior, 2005b). Los filotipos correlacionan las cepas con sus orígenes geográficos: filotipo I, cepas principalmente de Asia; II, de América; III, de África y el Océano Índico, y IV de Indonesia, Japón y Australia (Fegan y Prior, 2005b). A su vez, los filotipos se subdividen en secuevares, basados en la secuencia nucleotídica del gen *Egl*, que codifica para una endoglucanasa (Fegan y Prior, 2005a). Los principales secuevares causantes de la enfermedad Moko en banano y plátano son el 3, 4 y 6. En este trabajo se tuvo como objetivo aislar las cepas causantes de Moko en banano en México y genotipificarlas.

R. solanacearum usualmente es aislada en el medio semi-selectivo SMSA pero el aislamiento es difícil debido a que también pueden crecer bacterias de los géneros *Klebsiella*, *Erwinia* y *Pseudomonas* u otras especies de *Ralstonia* (Obrador-Sánchez *et al.*, 2017a). Estas bacterias frecuentemente son contaminantes en los cultivos de *R. solanacearum* y dificultan el aislamiento y los análisis, porque crecen más rápido que *R. solanacearum* y muestran características microscópicas y coloniales similares. En este trabajo se describe una estrategia para facilitar el aislamiento de esta bacteria, así como la caracterización genética de las cepas presentes en México.

Aislamiento de cepas mexicanas de *R. solanacearum*. Los esfuerzos iniciales de aislar *R. solanacearum* fueron negativos, identificando las bacterias aisladas como *Pseudomonas solanacearum*. Por tal motivo se modificó la estrategia, realizando el

diagnóstico inmunológico en las muestras, previo al aislamiento bacteriano (Figura 1, panel superior izquierdo). Para facilitar el aislamiento, las bacterias que crecieron sobre medio SMSA se subcultivaron sobre medio B King (Figura 1, panel inferior izquierdo); las bacterias *Pseudomonas* spp. generan fluorescencia al ser expuestas a 360 nm, mientras que *R. solanacearum* no fluoresce, permitiendo distinguir a las bacterias de interés.

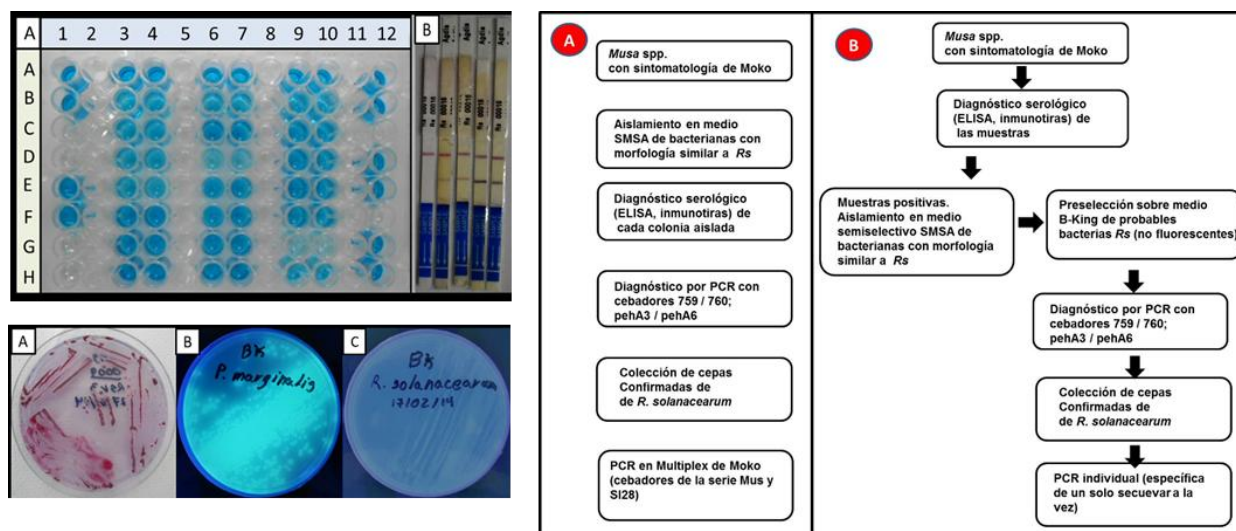


Figura 1. Panel arriba, a la izquierda, confirmación inmunológica de *R. solanacearum* mediante ELISA (las muestras positivas generan color azul) e inmunotiras (las muestras positivas dan la segunda banda observada de arriba hacia abajo). Abajo, se observan las bacterias creciendo sobre medio SMSA (A), *P. marginalis* creciendo en medio B King (B) y *R. solanacearum* sobre medio B King. La figura de la derecha resume la metodología usada generalmente en el aislamiento de *R. solanacearum* (A) y las modificaciones realizadas en el presente trabajo (B). Basado en Obrador-Sánchez *et al.* (2017a).

A partir de las muestras diagnosticadas inmunológicamente como positivas y confirmadas por PCR (cebadores 759/760, banda diagnóstica de 281pb; Opina *et al.* 1997), se aislaron 47 cepas de *R. solanacearum*. El análisis molecular con los cebadores ISRso19-F/ ISRso19-R confirmaron que todas las cepas pertenecen a la raza 2, ya que amplificaron la banda diagnóstica de 1884pb (Opina *et al.*, 1997).

Genotipificación. El análisis de los secuevares se realizó inicialmente con reacciones PCR tipo multiplex (Fegan y Prior, 2005b), como usualmente se recomienda, pero algunas muestras amplificaron simultáneamente bandas esperadas para diferentes secuevares (Figura 2, panel A); las reacciones de PCR sencillas dieron resultados claros, por lo que para la genotipificación se recomienda evaluar multiplex vs reacciones sencillas. Ninguna cepa de México amplificó para los secuevares 3 y 4, las

cepas amplificaron claramente la banda diagnóstica correspondiente al secuevar 6 (Figura 2, panel B).

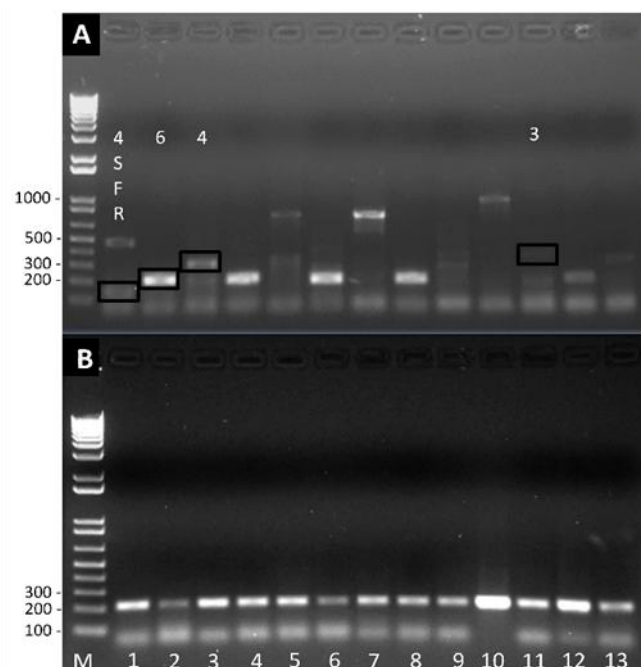


Figura 2. Genotipificación de las cepas de *R. solanacearum* aisladas en México. Panel A) Reacciones de PCR en multiplexado, de acuerdo a Fegan y Prior (2005b). Panel B) Reacciones sencillas de PCR usando los cebadores para el secuevar 6. Basado en Obrador-Sánchez *et al.* (2017a).

La genotipificación de las cepas de *R. solanacearum* como secuevar 6 relaciona las cepas de México con las cepas de Venezuela, Costa Rica, Panamá y Honduras, lo que sugiere que provenga de alguno de estos países (Obrador-Sánchez *et al.*, 2017b).

Hipersensibilidad y virulencia. Todas las cepas aisladas fueron positivas en las pruebas de hipersensibilidad en *Nicotiana tabacum*, generando desecamiento en el área de inoculación, con bordes amarillos en la periferia. En las pruebas de patogenicidad en plantas de banano, excepto las cepas MC01 y MC02, todas las cepas generaron síntomas de desecamiento a partir de la segunda semana post-inoculación. Se realizaron cortes horizontales cada 3 cm y para MC01 y MC02 sólo se observó presencia de pequeñas lesiones en la zona de inoculación; al realizarse la detección de *R. solanacearum* por PCR con ADN aislados de estos cortes, sólo se detectó la presencia de la bacteria en las secciones muy cercanas al punto de inoculación (Figura 3).

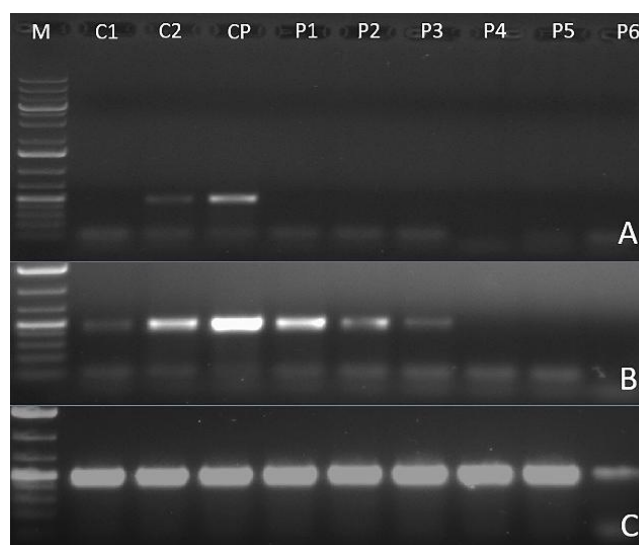


Figura 3. Detección por PCR de *R. solanacearum* a partir del ADN extraído de plantas de banano inoculadas con las cepas MC01 (A), MC02 (B) y la cepa patogénica MT08 (C). Basado en Obrador-Sánchez *et al.* (2017b).

Relaciones filogenéticas. El análisis de *egl*, *hrpB* y *pga* posicionó a las cepas mexicanas de *R. solanacearum* dentro del filotipo IIA, en el cluster del secuevar 6. El árbol filogenético basado en las secuencias de *egl* juntó en un mismo agrupamiento a las cepas patógenas y no patógenas de México, pero los árboles filogenéticos contruidos con secuencias de *hrpB* y *pga* sí las separaron. Las cepas patógenas mexicanas se agruparon juntas, con la cepa Granada 91 perteneciente al secuevar 6, patógena en banana. Las cepas no patogénicas en bananao (NPB) MC01 y MC02 se agruparon en un clado hermano. Las secuencias para *hrpB* y *pga* son menos utilizados que *egl* para el genotipo *R. solanacearum*, pero estos resultados muestran que probablemente sean marcadores moleculares útiles para el estudio de cepas de América, particularmente del secuevar 6. La Figura 4 muestra como ejemplo el árbol filogenético contruido con las secuencias de *hrp*.

Las dos cepas NPB mexicanas son filogenéticamente más cercanas a las cepas patógenas de México, que a las cepas NPB que se han descrito anteriormente en Martinica, sugiriendo que las cepas NPB mexicanas son nuevos ecotipos que amplían la diversidad fenotípica y posiblemente la diversidad genética dentro del complejo de *R. solanacearum*.

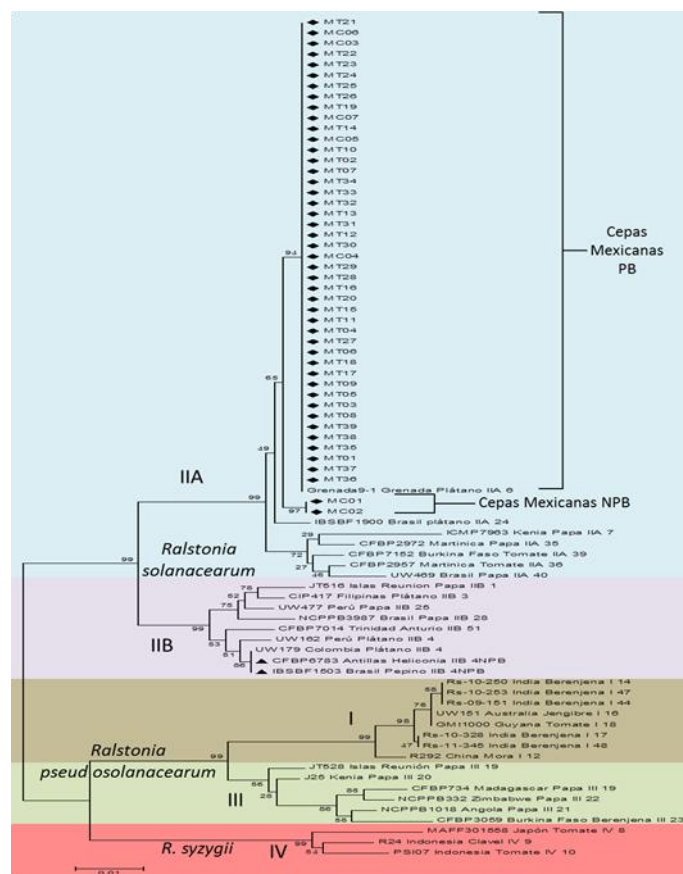


Figura 4. Árbol filogenético generado con secuencias de *hrp* de las cepas de *R. solanacearum* causantes de la enfermedad de Moko en México. Los diamantes cerrados son cepas de México. Los triángulos cerrados son cepas 4NPB. Basado en Obrador-Sánchez *et al.* (2017b).

CONCLUSIONES

La identificación inmunológica de plantas de banano positivas a Moko en combinación con el aislamiento secuencial en los medios semi-selectivos SMSA y B-King favorecen el aislamiento exitoso de *R. solanacearum*.

La tipificación de secuevares de *R. solanacearum* raza 2 es más fiable con PCRs sencillas, en comparación con la PCR multiplex.

Las cepas de *R. solanacearum* raza 2 de México pertenecen al secuevar 6. Es probable que se relacionen filogenéticamente con las cepas de Venezuela y Honduras.

Se identificó por primera vez dos cepas de *R. solanacearum* raza 2, secuevar 6, que son no patogénicas en banano, lo que sugiere la evolución de nuevos ecotipos.

REFERENCIAS

1. Fegan M, Prior P, eds, 2005a. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. Minnesota: APS Press.
2. Fegan M, Prior P, 2005b. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”. In: Allen C, Prior P, Hayward AC, eds. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. St Paul, MN: APS Press.
3. Gillings M, Fahy P, Davies C, 1993. Restriction analysis of an amplified polygalacturonase gene fragment differentiates strains of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas solanacearum*. Letters in Applied Microbiology 17: 44-8.
4. Obrador-Sánchez JA, Tzec-Simá M, Canto-Canché B, Higuera-Ciajara I. 2017a. Techniques for isolation, identification and molecular characterization of Moko disease-related *Ralstonia solanacearum* strains. Revista Mexicana de Fitopatología 35(3): 509-533.
5. Obrador-Sánchez JA, Tzec-Simá M, Higuera-Ciajara I. Canto-Canché B, 2017b. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from Mexico associated with Moko disease. European Journal of Plant Pathology 149:817–830.
6. Obrador-Sánchez JA, Tzec-Simá M, Higuera-Ciajara I. Canto-Canché B, 2017c. A quick and effective in-house method of DNA purification from agarose gel, suitable for sequencing. 3 Biotech, 7(3), 180.
7. Opina N, F. Tavner, G. Holloway, et al., 1997. A novel method for development of species and strain – specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology 5: 19-33.
8. Zulperi D, Sijam K, Ahmad Z, Awang Y, Ismail S, Asib N, Hata E. 2016. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II sequevar 4 strains associated with Moko disease of banana (*Musa* spp.) in Peninsular Malaysia. European Journal of Plant Pathology, 144: 257-270.