

# Techniques for isolation, identification and molecular characterization of Moko disease-related *Ralstonia solanacearum* strains

## Técnicas para el aislamiento, identificación y caracterización molecular de cepas de *Ralstonia solanacearum* relacionadas a Moko del plátano

José Abraham Obrador-Sánchez, Miguel Tzec-Simá, Blondy Canto-Canché\*, Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Calle 43 No. 130 X 32 y 34, Colonia Chuburná de Hidalgo, C.P. 97205, Mérida, Yucatán, México; Inocencio Higuera-Ciajara, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Av. Normalistas 800, Colinas de La Normal, C.P. 44270, Guadalajara, Jalisco, México. \*Autor para correspondencia: cantocanche@cicy.mx.

Recibido: 05 de Mayo, 2017.

Aceptado: 24 de Julio, 2017.

Obrador-Sánchez JA, Tzec-Simá M, Canto-Canché B, Higuera-Ciajara I. 2017. Techniques for isolation, identification and molecular characterization of Moko disease-related *Ralstonia solanacearum* strains. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 509-533.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1705-1

Primera publicación DOI: 01 de Septiembre, 2017.

First DOI publication: September 01, 2017.

**Resumen.** *Ralstonia solanacearum* es uno de los fitopatógenos más destructivos en la agricultura; en el cultivo de plátano la raza 2 causa la enfermedad denominada Moko del plátano, la cual en México está restringida a algunas áreas y provoca pérdidas cuando ocurren brotes epidémicos. La raza 2 comprende subgrupos (sequevares), los cuales usualmente son identificados mediante PCR de tipo Multiplex. El aislamiento de *R. solanacearum* es usualmente difícil, aún sobre medios semiselectivos, debido a su crecimiento lento y a la frecuente

**Abstract.** *Ralstonia solanacearum* is one of the most destructive phytopathogens in the agriculture. In banana cultivation, the race 2 causes Moko disease, which is present in some areas in Mexico, and when epidemic outbreaks burst there are losses. Race 2 comprises subgroups (sequevars) which are usually identified by Multiplex PCR reactions. Isolation of *R. solanacearum* is usually hard, even on semiselective media, because it grows slowly and it is frequently contaminated with *Pseudomonas*, *Klebsiella* and *Erwinia* bacteria, which show similar phenotypes. This work shows a strategy that make easy the isolation, identification and classification of *R. solanacearum* race 2. The protocol comprises immunodiagnosis of plant suspicious samples, confirmation of diagnosis by PCR, isolation on semiselective media SMSA and B-King, and genotyping of sequevars by single, specific PCR reactions. In the present work 25 strains were isolated from Tabasco, and they genotyped in sequevar 6. Their previous genotyping by Multiplex yielded confuse results,

contaminación con bacterias *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Erwinia*, que presentan fenotipos similares. En este trabajo se presenta una estrategia que facilita el aislamiento, identificación y clasificación de *R. solanacearum* raza 2. El protocolo comprende inmunodiagnóstico del material vegetal sospechoso, confirmación mediante PCR, aislamiento sobre medios semiselectivos SMSA y B-King, y genotipificación de los secuevares mediante reacciones de PCR sencillas, específicas. En el presente trabajo se aislaron 25 cepas de muestras obtenidas del estado de Tabasco, las cuales genotipificaron en el secuevar 6. Su previa genotipificación mediante Multiplex fue confusa, lo que evidencia que ese ensayo puede llevar a conclusiones erróneas. Por lo tanto no es válido proponer divergencia genética y emergencia de nuevas cepas con base en su resultado, como se ha hecho en algunos reportes recientes.

**Palabras claves.** Plátano, diagnóstico, aislamiento bacteriano, genotipificación, secuevar.

*Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) es uno de los fitopatógenos bacterianos más destructivos en la agricultura. Existe una alta variabilidad dentro de la especie, por lo que *R. solanacearum* es considerada una “especie complejo”, abreviado como RSSC por sus siglas en inglés “*Ralstonia solanacearum* species complex” (Safni *et al.*, 2014; Prior *et al.*, 2016). Una especie complejo es definida como un grupo de aislados relacionados cercanamente, cuyos miembros individuales pueden representar más de una especie (Fegan y Prior, 2005). *R. solanacearum* tiene una amplia distribución mundial y un alto número de plantas hospedantes, que incluye cientos de plantas de al menos 54 familias botánicas, tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas (Prior *et al.*, 2016). Muchas de las especies vegetales afectadas son cultivos agrícolas estratégicos

which make evident that Multiplex can result in incorrect conclusions. We discourage to propose genetic divergence and emergency of new strains based on Multiplex results, as done in some recent reports.

**Key words:** Banana, diagnosis, bacterial isolation, genotyping, sequevar.

*Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) is one of the most destructive bacterial plant pathogens in agriculture. There is a high variability within the species, therefore *R. solanacearum* is considered a “species complex”, abbreviated as RSSC, for “*Ralstonia solanacearum* species complex” (Safni *et al.*, 2014; Prior *et al.*, 2016). A species complex is defined as a group of closely-related isolations, the individual members of which can represent more than one species (Fegan and Prior, 2005). *R. solanacearum* has a wide global distribution and a high number of host plants, which include hundreds of plants from at least 54 botanical families, both dicotyledonous and monocotyledonous (Prior *et al.*, 2016). Many of the plant species affected are strategic crops or important subsistence foods. They include potatoes (*Solanum tuberosum*), tomato (*S. lycopersicum*), eggplant (*S. melongena*), peanut (*Arachis hypogea*) and banana (*Musa* spp.) (Cardozo *et al.*, 2010).

Bananas are the most widely produced tropical fruit in the world. In 2013, a worldwide production of approximately 17 million tons was reported (FAO, 2014). India is the main producer, with 26% of the global production. Bananas are a basic staple food and its export is an important source of income and jobs in several developing countries.

Mexico is one of the world’s 15 largest banana producers (FAO, 2017; Workman, 2017), with a production volume of 2.2 million tons and a

o importantes alimentos de subsistencia. Entre estos figuran la papa (*Solanum tuberosum*), tomate (*S. lycopersicum*), berenjena (*S. melongena*), maní (*Arachis hypogea*) y los plátanos (*Musa* spp.) (Cardozo *et al.*, 2010).

El plátano es la fruta tropical de mayor producción a nivel mundial. En el 2013 se reportó una producción de alrededor de 17 millones de toneladas (FAO, 2014). India es el principal productor, con el 26% del total mundial. El plátano es un producto básico para la alimentación y su exportación genera divisas y es fuente de empleo en numerosos países en desarrollo.

México está entre los primeros quince países en la producción de plátano (FAO, 2017; Workman, 2017), con un volumen de producción de 2.2 millones de toneladas y una derrama económica de M\$ 6,209,716.85 (SIAP, 2017). Se cultiva en 17 estados de México, siendo Chiapas y Tabasco los principales estados productores, contribuyendo con el 60% de la producción (SIAP, 2017).

El Moko bacteriano es uno de los problemas fitosanitarios más importantes en la agroindustria platanera en países tropicales, siendo la principal enfermedad bacteriana en este cultivo. En la actualidad la enfermedad se encuentra presente en varios países productores de plátano en América, Asia, África y Oceanía (Cardozo *et al.*, 2010).

El patógeno sobrevive o permanece latente en residuos de cosecha infectados y rizósfera de malezas hospedantes, siendo este el inóculo primario e infecta a plantas sanas por las raíces y heridas, colonizando los vasos del xilema. Los síntomas incluyen hojas amarillas y flácidas que finalmente colapsan y quedan adheridas a la planta; los frutos son chiclosos, de aspecto oscuro y tendiendo a degradarse. Se observa una necrosis vascular interna y la presencia de puntos oscuros debido a una infección sistémica. Esta enfermedad es común en el genotipo ABB (plátano de cocción), pero todos los

revenue of MXN\$ 6,209,716.85 (SIAP, 2017). It is planted in 17 states of Mexico, with Chiapas and Tabasco as the states with the highest production rate, contributing with 60% of the country's production (SIAP, 2017).

The bacterial Moko is one of the most important plant health problems in the banana agroindustry in tropical countries, since it is the main bacterial disease in this crop. Currently, the disease is present in several banana-producing countries in the Americas, Asia, Africa, and Oceania (Cardozo *et al.*, 2010).

The pathogen survives or remains latent in infected harvest residues and the rhizosphere of host weeds, the latter being the main inoculant, and infecting healthy plants through the roots and lesions, colonizing the xylem vessels. Symptoms include yellow, flaccid leaves that finally collapse and adhere to the plant; fruits have a gummy texture, with a dark appearance, and tending to degrade. An internal vascular necrosis is present, along with dark dots due to a systematic infection. This disease is common in the genotype ABB (cooking banana), but all types of bananas are affected (Albuquerque *et al.*, 2014). In Mexico, this disease appears in some areas and is subjected to official control; the campaign against banana Moko operates in the states of Chiapas, Tabasco, and Nayarit in order to reduce the spreading of the disease into areas without it (SENASICA, 2016).

Reports on *R. solanacearum*, the cause of Moko, claim it was introduced into Mexico in 1960 in the banana-producing area of Tapachula, Chiapas. Eight years later, the disease spread into another 12 municipal areas of the same state. In 1991, the first reports were presented in Teapa, Tabasco, and in 2009, the disease spread to the areas of Cunduacán, Huimanguillo, Centro, Cárdenas, and Jalapa. The banana Moko is present in the banana-producing municipal areas of Pichucalco, Huehuetán,

genotipos de plátanos son afectados (Albuquerque *et al.*, 2014). En México esta enfermedad se presenta en algunas áreas y está sujeta a control oficial; la campaña contra Moko del plátano opera en los estados de Chiapas, Tabasco y Nayarit, con el objetivo de reducir el riesgo de dispersión a zonas sin presencia (SENASICA, 2016).

Se tienen reportes que *R. solanacearum* causante de Moko se introdujo a México en 1960 en la zona platanera de Tapachula, Chiapas. Ocho años más tarde la enfermedad se extendió a otros 12 municipios de dicho estado. En 1991 se presentaron los primeros reportes en Teapa, Tabasco, y en el 2009 la enfermedad se extendió a los municipios de Cuauacán, Huimanguillo, Centro, Cárdenas y Jalapa. El Moko del plátano se encuentra presente en las zonas plataneras de Pichucalco, Huehuetán, Mazatán, Suchiate y Tapachula en el estado de Chiapas; en los municipios de Centro, Cuauacán, Huimanguillo, Jalapa, Teapa y Cárdenas en el estado de Tabasco, y en el municipio de Santiago Ixcuintla en el estado de Nayarit. Su incidencia ha aumentado en el estado de Tabasco en los últimos años (SENASICA, 2015). Actualmente está sujeta a control oficial, mediante la campaña fitosanitaria contra Moko del plátano, que opera en los estados de Chiapas, Tabasco y Nayarit, con el objetivo de reducir el riesgo de dispersión a zonas sin presencia, reduciendo los niveles de infestación en las zonas bajo control fitosanitario (SENASICA 2017).

*R. solanacearum* se subdivide en cinco biovarios, con base en su metabolismo de carbohidratos, y cinco razas, en base al rango de hospedantes que infecta (Denny y Hayward, 2001; Fegan y Prior, 2005; Champoiseau *et al.*, 2009). Las razas pueden ser hospedante-específico como las 4 y 5 que infectan jengibre y mora respectivamente, o pueden presentar un amplio rango como la raza 1 (tomate, papa, berenjena, entre otros), la raza 3 (papa, tomate y geranio) y la raza 2 (heliconias y

Mazatán, Suchiate, and Tapachula in the state of Chiapas; in the municipal areas of Centro, Cuauacán, Huimanguillo, Jalapa, Teapa, and Cárdenas in the state of Tabasco, and in Santiago Ixcuintla in the state of Nayarit. Its incidence has increased in the state of Tabasco in recent years (SENASICA, 2015). It is currently under official control, with the plant health campaign against the Moko disease of banana, which is operant in the states of Chiapas, Tabasco, and Nayarit, with the aim of reducing the risk of spreading to areas with no incidence, reducing infestation levels in the areas under phytosanitary control (SENASICA 2017).

*R. solanacearum* is subdivided into five biovars, based on its carbohydrate metabolism, and five races, based on the range of hosts it infects (Denny and Hayward, 2001; Fegan and Prior, 2005; Champoiseau *et al.*, 2009). Races can be host-specific, such as races 4 and 5, which infect ginger and blackberry, respectively, or they can present a wide range, such as race 1 (tomato, potato, eggplant, and others), race 3 (potato, tomato, and geranium), and race 2 (heliconia and bananas) (Denny and Hayward, 2001; Champoiseau *et al.*, 2009).

Since *R. solanacearum* makes up a heterogenous group of strains with a high genetic and phenotypic diversity, its classification has been under constant reconsideration for 50 years (Hayward, 1964; Fegan and Prior, 2005; Safni *et al.*, 2014; Prior *et al.*, 2016). Classification into biovars does not reflect the genetic background of the strains, so a genetic classification scheme is currently used, hierarchically organized into the categories of phylotypes and sequevars (Fegan and Prior, 2005; Prior *et al.*, 2016). Phylotypes correlate the strains of *R. solanacearum* with its geographic origins: phylotype I comprises mostly Asian strains; phylotype II, strains from the Americas; phylotype III, from Africa and the Indian Ocean; and

plátanos) (Denny y Hayward, 2001; Champoiseau *et al.*, 2009).

Debido a que *R. solanacearum* comprende un grupo heterogéneo de cepas con alta diversidad genética y fenotípica, su clasificación ha estado en continuos replanteamientos desde hace 50 años (Hayward, 1964; Fegan y Prior, 2005; Safni *et al.*, 2014; Prior *et al.*, 2016). La clasificación en bio-vares no refleja el fondo genético de las cepas, por lo que actualmente se utiliza un esquema de clasificación genética organizada jerárquicamente en las categorías de filotipos y secuevares (Fegan y Prior, 2005; Prior *et al.*, 2016). Los filotipos correlacionan las cepas de *R. solanacearum* con sus orígenes geográficos: el filotipo I comprende cepas principalmente de Asia; el Filotipo II los de América; el Filotipo III de África y el Océano Índico; y el filotipo IV de Indonesia, Japón y Australia (Fegan y Prior, 2005). Los filotipos se subdividen en secuevares, los cuales están basados en la secuencia nucleotídica del gen *Egl*, que codifica para una endoglucanasa (Fegan y Prior, 2005). Hasta el momento, se han identificado 54 secuevares en el complejo de *R. solanacearum* (Li *et al.*, 2016); los secuevares causantes de la enfermedad Moko en plátano son el 3, 4, 6, 24, 25, 41 y 53. En el continente americano la enfermedad Moko está presente desde Brasil hasta Estado Unidos (Sanchez-Perez *et al.*, 2008; Norman *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2012; Albuquerque *et al.*, 2014).

Para estudios genéticos, de patogénesis u otras caracterizaciones, *R. solanacearum* es usualmente aislada en medio semiselectivo SMSA (“selective media from south africa”), (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008; Cardozo *et al.*, 2010; Elphinstone *et al.*, 1996). Sin embargo, aún sobre este medio el aislamiento de esta bacteria es difícil debido al crecimiento de otros microorganismos (Champoiseau *et al.*, 2009; Kalpage y De Costa, 2015), particularmente bacteria de los géneros *Klebsiella*, *Erwinia*, y *Pseudomonas*. Estas tres bacterias gram-negativas, como otras especies de *Ralstonia*, como *Ralstonia mannitolilytica*, son mayoritariamente endofíticas en plantas de banana (Thomas *et al.*, 2008; Ganen *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2013). Estas bacterias son contaminantes comunes en plantaciones de *R. solanacearum*, ya que presentan un crecimiento más rápido y morfologías microscópicas y coloniales similares (French *et al.*, 1995; Nasim, 2011).

Phylotype IV, from Indonesia, Japan and Australia (Fegan and Prior, 2005). Phylotypes are subdivided into sequevars, which are based on the nucleotide sequence of the gene *Egl*, which codes for an endoglucanase (Fegan and Prior, 2005). So far, 54 sequevars have been identified in the complex *R. solanacearum* (Li *et al.*, 2016); the sequevars that cause the Moko disease in bananas are 3, 4, 6, 24, 25, 41, and 53. In the Americas, the Moko disease is present from Brazil to the United States (Sanchez-Perez *et al.*, 2008; Norman *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2012; Albuquerque *et al.*, 2014).

For genetic studies, pathogenesis, or other characterizations, *R. solanacearum* is usually isolated in the semiselective media SMSA (“selective media from South Africa”), (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008; Cardozo *et al.*, 2010; Elphinstone *et al.*, 1996). However, even in this medium, isolating this bacterium is difficult, due to the growth of other microorganisms (Champoiseau *et al.*, 2009; Kalpage y De Costa, 2015), particularly bacteria of the genera *Klebsiella*, *Erwinia*, and *Pseudomonas*. These three gram-negative bacteria, like other species of *Ralstonia*, such as *Ralstonia mannitolilytica*, are majority endophytic in banana plants (Thomas *et al.*, 2008; Ganen *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2013). These bacteria are common contaminants in *R. solanacearum* plantations, since they present a faster growth and similar microscopic and colonial morphologies (French *et al.*, 1995; Nasim, 2011).

The isolation of pure *R. solanacearum* strains can take a long time (French *et al.*, 1995; Thera, 2007; Döölökeldieva and Bobuşeva, 2014; Döölökeldieva and Bobuşeva, 2016). This report describes a strategy that makes the isolation and genetic characterization of *R. solanacearum* easier, from banana diseased with Moko.

*al.*, 2009; Kalpage y De Costa, 2015), particularmente bacterias de los géneros *Klebsiella*, *Erwinia* y *Pseudomonas*. Estos tres géneros de bacterias gram-negativas, así como otras especies de *Ralstonia* como por ejemplo *Ralstonia mannitolilytica*, son endófitos mayoritarios en las plantas de plátano (Thomas *et al.*, 2008; Ganen *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2013). Estas bacterias son contaminantes comunes en los cultivos de *R. solanacearum* debido a que presentan mayor capacidad de crecimiento y muestran morfologías microscópicas y coloniales similares (French *et al.*, 1995; Nasim, 2011).

El aislamiento de cepas puras de *R. solanacearum* puede llevar bastante tiempo (French *et al.*, 1995; Thera, 2007; Döölökeldieva y Bobuşeva, 2014; Döölökeldieva y Bobuşeva, 2016). En este reporte se describe una estrategia que facilita el aislamiento y caracterización genética de *R. solanacearum* a partir de plátano enfermo de Moko.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo de tejidos vegetales

Se realizaron muestreos en Tabasco (20-24 de octubre, 2014) con apoyo del personal del Comité Local de Sanidad Vegetal de Tabasco (CESVETAB) para la ubicación, diagnóstico visual y colecta del material, de acuerdo a instrucciones del SENASICA. Las muestras se depositaron en bolsas tipo Ziploc y se etiquetaron con la información del tejido colectado, fecha y sitio de muestreo. Las muestras fueron colocadas en hieleras con geles refrigerantes y enviadas al laboratorio de biotecnología molecular de plátano del Centro de Investigación Científica de Yucatán, donde fueron procesadas.

## MATERIALS AND METHODS

### Sampling plant tissues

Samples were taken in Tabasco (October 20-24, 2014) with the technical support of the personnel from the Tabasco Local Plant Health Committee (Comité Local de Sanidad Vegetal de Tabasco - CESVETAB) for the location, visual diagnosis and collection of material, according to instructions by SENASICA. The samples were deposited in Ziploc bags and labelled with the information of the tissue collected, date and sampling site. The samples were placed in coolers with cooling gels and sent to the banana molecular biotechnology lab in the Scientific Research Center (Centro de Investigación Científica) in Yucatan, where they were processed.

### Detection of *R. solanacearum* by immunology tests

To detect *R. Solanacearum*, the ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) (Agdia®, N.C. SRP 33900) was carried out in a 96-well tray, following the instructions of the manufacturer. Positive controls and samples of plants infected with *R. solanacearum* produce a blue color, whereas negative controls and samples of healthy plants produce a colorless result. The tray was visually examined to avoid false positives by possible contaminations or impurities on the tray and the spectrophotometric absorbance was measured at 655 nm (Bio-Rad Modelo 680XR). Optic densities equal to or lower than 0.09 was considered negative. To scrutinize the samples in the lab, ImmunoStrips (Agdia®, N.C. STX33900)

### Detección de *R. solanacearum* por pruebas inmunológicas

Para la detección de *R. solanacearum* se utilizó el ensayo ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) (Agdia®, N.C. SRP 33900), en placa de 96 pozos, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los controles positivos y muestras de plantas infectadas con *R. solanacearum* generan una coloración azul; los controles negativos y muestras de plantas sanas dan resultado incoloro. Se examinó visualmente la placa para evitar falsos positivos por posibles contaminaciones o suciedad en la placa y se midió la absorbancia espectrofotométrica a 655 nm (Bio-Rad Modelo 680XR). La densidad óptica igual o menor de 0.09 se consideró negativo. Para el escrutinio de las muestras en el laboratorio también se utilizaron inmuntiras (Agdia®, N.C. STX33900), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Extracción de ADN

Para enriquecer la población de *R. solanacearum* en el medio SMSA, un fragmento (1 cm<sup>2</sup>) del tejido vegetal infectado se depositó en el medio líquido y se incubó durante 24 h en agitación a 180 rpm a 28 °C (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008). Una alícuota de este cultivo (1.5 mL) se centrifugó a 5,200 X g durante 5 min. La pastilla bacteriana se resuspendió con 1 mL de buffer CTAB (2% de bromuro de cetil trimetil-amonio, 1% polivinil pirrolidona, 100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA), agitando con vórtex durante 30s. Posteriormente se congeló a -20 °C por 10 min y se incubó a 65 °C a baño María por 20 min. Se temperizó 1 min a temperatura ambiente y centrifugó a 20,800 X g. El sobrenadante se recuperó en tubo de 1.5 mL para microcentrífuga, se adicionaron 500 µL de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y se agitó

were also used, following the instructions of the manufacturer.

### DNA extraction

To enrich the *R. solanacearum* population in the SMSA medium, a fragment (1 cm<sup>2</sup>) of the infected plant tissue was deposited in the liquid medium and incubated for 24 h, shaking constantly at 180 rpm at 28 °C (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008). One aliquot of this culture (1.5 mL) was centrifuged at 5,200 X g for 5 min. The bacterial pellet was resuspended with 1 mL of the buffer CTAB (2% cetyl trimethyl ammonium bromide, 1% polyvinylpyrrolidone, 100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA), stirring with a vortex for 30s. Later it was frozen at -20 °C for 10 min and incubated at 65 °C in a water bath for 20 min. It was tempered for 1 min at room temperature and centrifuged at 20,800 X g. The supernatant was recovered in a 1.5 mL tube for centrifuging, 500 µL of phenol:chlorophorm:isoamylic (25:24:1) were added, and stirred for 10 min at room temperature (CNRF, 2012). Later, it was centrifuged for 5 min at 20,800 X g and the aqueous phase was collected. Next, the standard DNA recovery procedure was carried out using cold absolute ethanol, washings with 70% ethanol, air-drying of the pellet and resuspension in ultrapure distilled water (Sambrook and Russell, 2001). The DNA purity was determined by spectrophotometry at 260nm/280nm and the integrity was determined by electrophoresis in agarose gel.

### Detection of *R. solanacearum* by PCR

Detection was carried out by the amplification of genomic regions with the primers of 759: 5'-GTC GCC GTC AAC TCA CTT TCC - 3' and 760: 5'- GTC GCC GTC AGC AAT GCG GAA

por 10 min a temperatura ambiente (CNRF, 2012). Posteriormente, se centrifugó 5 min a 20,800 X g y se colectó la fase acuosa. Se continuó con el procedimiento estándar de recuperación de ADN con etanol absoluto frío, lavados con etanol al 70%, secado de la pastilla y resuspensión en agua destilada ultrapura (Sambrook y Russell, 2001). La pureza del ADN se determinó por espectrofotometría a 260nm/280nm y la integridad se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa.

### Detección de *R. solanacearum* por PCR

La detección se realizó mediante la ampliación de regiones genómicas con los iniciadores de 759: 5'- GTC GCC GTC AAC TCA CTT TCC - 3' y 760: 5'- GTC GCC GTC AGC AAT GCG GAA TCG- 3 (Diagnóstico universal de *R. solanacearum*, 280 pb), (Opina *et al.*, 1997); pehA#3-F 5'- CAG CAG AAC CCG CGC CTG ATC CAG- 3' y pehA#6-R 5'- ATC GGA CTT GAT GCG CAG GCC GTT- 3' (gen *pga*, 532pb), (Gillings *et al.*, 1993); ISRso19-F 5'- TGG GAG AGG ATG GCG GCT TT - 3' y ISRso19-R 5' - TGA CCC GCC TTT CGG TGT TT - 3' (iniciadores específicos a la Raza 2; 1884pb), (Lee y Chin, 2003). La mezcla de reacción de PCR se preparó con 20 ng de ADN, 0.1 µM de cada iniciador, 1 U de Taq ADN polimerasa recombinante (Invitrogen®), IX del Buffer de la enzima Taq, , 200 µM de cada dNTP y 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, en 25µL de volumen final. El programa en el termociclador (Bio-Rad modelo T100™) para el diagnóstico universal de *R. solanacearum* (iniciadores 759/760) tuvo un ciclo de desnaturalización de 2 min a 96 °C, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 45 s, alineamiento a 64 °C por 20 s y un ciclo de 72 °C por 1 min y al final, un ciclo de extensión de 72 °C por 5 min. El programa de amplificación para los otros genes fue idéntico, excepto que el paso de alineamiento fue de 70°C por 45 s para el

TCG- 3 (Universal diagnosis for *R. solanacearum*, 280 pb), (Opina *et al.*, 1997); pehA#3-F 5'-CAG CAG AAC CCG CGC CTG ATC CAG- 3' and pehA#6-R 5'- ATC GGA CTT GAT GCG CAG GCC GTT- 3' (gen *pga*, 532pb), (Gillings *et al.*, 1993); ISRso19-F 5'- TGG GAG AGG ATG GCG GCT TT - 3' and ISRso19-R 5' - TGA CCC GCC TTT CGG TGT TT - 3' (primers specific to Race 2; 1884pb), (Lee and Chin, 2003). The PCR reaction mixture was prepared with 20ng of DNA, 0.1 µM of each primer, 1 U of recombinant DNA Taq polymerase (Invitrogen®), IX of the Buffer of the Taq enzyme, 200 µM of each dNTP and 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, in 25µL of final volume. The program in the thermocycler (Bio-Rad model T100™) for the universal diagnosis of *R. solanacearum* (primers 759/760) had a denaturalization cycle of 2 min at 96 °C, followed by 35 cycles of 94 °C for 45 s, alignment step at 64 °C for 20 s, and a step of 72 °C for 1 min, and finally, an extension cycle of 72 °C for 5 min. The amplification program for the other genes was identical, except for the step of alignment was 70 °C for 45 s for the gene *pga*, and for Race 2, alignment was 55°C for 30 s, and the extension of 72 °C for 1.5 min in each cycle. The products (10 µL of each PCR reaction) were analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose gel (p/v) using the buffer TAE (Tris-acetate-EDTA) 1X supplemented with 3 µL of ethidium bromide (10mg/mL). The strips were visualized over a transilluminator using UV light (Gel Doc™ XR, Bio-Rad).

### Isolation of *R. solanacearum*

Tissues (pseudostem and fruit) which were positive at immunology tests ELISA and ImmunoStrips were used for bacterial isolation. Samples were cut into small pieces with a sterilized blade, and later disinfested by washing twice with sterilized water, sodium hypochlorite at 10% (from



gen *pga*, y para la raza 2 el alineamiento fue de 55 °C por 30 s y la extensión de 72 °C por 1.5 min en cada ciclo. Los productos (10 µL de cada reacción PCR) se analizaron por electroforesis, en gel de agarosa de 1.5% (p/v) usando buffer TAE (Tris-acetato-EDTA) 1X suplementado con 3 µL de bromuro de etidio (10mg/mL). La visualización de las bandas se realizó sobre un transiluminador con luz UV (Gel Doc™ XR, Bio-Rad).

### Aislamiento de *R. solanacearum*

Se utilizaron tejidos (pseudotallo y fruto) que fueron positivos en los ensayos inmunológicos de ELISA e inmunitiras. Las muestras se cortaron en pequeños trozos con una cuchilla estéril y posteriormente se desinfectaron mediante dos lavados con agua estéril, hipoclorito de sodio al 10% (partiendo de una solución comercial al 6%) durante 1 min, agua estéril, etanol por 30 s, agua estéril y posteriormente se colocó en buffer TE y se dejó incubar por una hora, con agitación suave. Se sembró una asada sobre medio semiselectivo SMSA (formulación por cada litro: 1g de casaminoácidos, 10g de peptona, 5g de glucosa, 5mg de cristal violeta, 100mg de β-sulfato de polimyxina, 25mg de bacitracina, 5mg de cloranfenicol, 0.5mg de penicilina, 17g de agar bacteriológico, 50mg de TZC (2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio) y se incubó a 28 °C durante 72 h (Kelman, 1954; Cardozo *et al.*, 2010). Las colonias resultantes fueron sembradas por estría cruzada sobre medio B-King sólido y cultivadas a 28 °C por 48 h. El medio B-King permite distinguir a las bacterias *Pseudomonas* spp. debido a que éstas generan fluorescencia al ser expuestas a una longitud UV de 360 nm, mientras que *R. solanacearum* no fluoresce (King *et al.*, 1954; Dulla and Lindow, 2009; Lamichhane y Varvaro, 2013).

a commercial solution at 6%) for 1 min, sterile water, ethanol for 30 s, sterile water, and it was later placed in TE buffer and left to incubate for an hour, stirring softly. A bacterial loop was placed on a semi-selective SMSA medium (formula for every liter: 1g of casamino acids, 10g of peptone, 5g of glucose, 5mg crystal violet, 100mg polymyxin β-sulfate, 25mg bacitracine, 5mg chloranphenicol, 0.5mg penicillin, 17g bacteriological agar, 50mg TZC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) and incubated at 28 °C for 72 h (Kelman, 1954; Cardozo *et al.*, 2010). The bacterial colonies were streak by crossing on a solid B-King medium and incubated at 28 °C for 48 h. The B-King medium helps to distinguish *Pseudomonas* spp. bacteria, since they produce fluorescence when exposed to a UV wavelength of 360 nm, whereas *R. solanacearum* does not fluoresce (King *et al.*, 1954; Dulla and Lindow, 2009; Lamichhane and Varvaro, 2013).

### Characterization of the sequevar

For the characterization of the sequevars, we used the primers of the Mus serie from Fegan and Prior (2005): 5'-CGGGTCGCTGAGACGAATATC-3' and 5'-GCCTTGTCAGAAATCCGAATG-3' (Sequevar 4, 351 pb); 5'-GCAGTAAAGAAACCCGGTGT-3' and 5'-TCTGGCGAAAGACGGGATGG-3' (Sequevar 3, 400pb); 5'-GCTGGCATTGCTCCCGCTCAC-3' and 5'-TCGCTTCCGCCAAGACGC-3' (Sequevar 4 SFR, 167 pb); 5'-CGTTCTCCTTGTCAGCGATGG-3' and 5'-CCCGTGTGACCCCGATAGC-3' (Sequevar 6, 221 pb). PCR was carried out in Multiplex using 20 ng of DNA, 2 U of recombinant DNA Taq polymerase (Invitrogen®), 1X of the Buffer of the Taq enzyme, 200 µM of each dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>

### Caracterización del secuevar

Para la caracterización de los secuevares se utilizaron los iniciadores de la serie Mus de Fegan y Prior (2005): 5'-CGGGTCGCTGAGACGA-ATATC-3' y 5'-GCCTTGTCAGAAATCCGA-ATG-3' (Secuevar 4, 351 pb); 5'-GCAG-TAAAGAAACCCGGTGT-3' y 5'-TCTGGC-GAAAGACGGGATGG-3' (Secuevar 3, 400 pb); 5'-GCTGGCATTGCTCCCGCTCAC-3' y 5'-TCGCTTCCGCCAAGACGC-3' (Secuevar 4 SFR, 167 pb); 5'-CGTTCTCCTTGTCAGCGATGG-3' y 5'-CCCGTGTGACCCCGATAGC-3' (Secuevar 6, 221 pb). Se realizó PCR en Multiplex utilizando 20 ng de ADN, 2 U de Taq ADN polimerasa recombinante (Invitrogen®), 1X del Buffer de la enzima Taq, 200 µM de cada dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> y 6 pmoles de cada iniciador, en un volumen final de 25µL. Las condiciones de PCR fueron similares a las descritas previamente, usando temperatura de alineamiento de 59 °C. Las PCR sencillas para cada secuevar se realizaron en las mismas condiciones, pero usando en cada caso una sola pareja de iniciadores. En cada caso se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 15 µL del producto de la reacción.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó el diagnóstico de Moko bacteriano en muestras de pseudotallo y fruto de plátano de plantas sospechosas. El diagnóstico del material vegetal colectado se realizó mediante 2 pruebas serológicas y 2 ensayos de PCR. Un total de 40 muestras fueron analizadas, de las cuales 35 fueron positivas en el diagnóstico con el ELISA y 28 con el diagnóstico con las inmunitiras. Las 40 muestras fueron analizadas por PCR con los dos pares de iniciadores, y ambas reacciones de PCR amplificaron 28

and 6 pmoles of each primer, in a final volume of 25µL. The PCR conditions were similar to those described previously, using an alignment temperature of 59 °C. Single PCRs for each secuevar were carried out in the same conditions, but using only one pair of primers in each case. In each case, 15 µL of the product of the reaction was analyzed by in gel electrophoresis.

### RESULTS AND DISCUSSION

The diagnosis for bacterial Moko disease was carried out on suspicious banana plant pseudostems and fruits. The diagnosis of the plant material collected was carried out with 2 serological tests and 2 PCR tests. A total of 40 samples were analyzed, out of which 35 were positive in the diagnosis with ELISA and 28 with the diagnosis with ImmunoStrips. All 40 were analyzed with PCR with the two pairs of primers, and both PCR reactions amplified 28 samples. The diagnosis with the ImmunoStrips provided a congruence of 100% with the PCR diagnoses, both in the number of positives and in the samples identified, whereas the ELISA test presented 20% of error (7 false positives out of the 35). Neither of the two immunological methods presented false negatives (Table 1). Figures 1A and 1B show typical results obtained in the ELISA diagnoses and with ImmunoStrips. Some ImmunoStrips were darker than others, depending on the phenolization of the extract, yet the color did not interfere in the reaction of the control line and that of the negative or positive result.

The ELISA technique has been widely used in the protocols for the identification of *R. solanacearum* amongst colonies with similar phenotypes (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008; Dööltokeidieva and Bobusheva, 2016). The diagnosis is based on the use of monoclonal antibodies against

muestras. El diagnóstico con las inmunotiras proporcionó 100% de congruencia con los diagnósticos por PCR, tanto en número de positivas como en las muestras identificadas, mientras que el ensayo ELISA presentó un 20% de error (7 falsas positivas de las 35). Ninguno de los dos métodos inmunológicos presentó falsos negativos (Cuadro 1). Las Figuras 1A y 1B muestran resultados típicos obtenidos en los diagnósticos de ELISA y con las inmunotiras. Algunas inmunotiras eran más oscuras que otras, dependiendo de la fenolización del extracto, pero la coloración no interfirió en la reacción de la línea de control y la del resultado negativo o positivo.

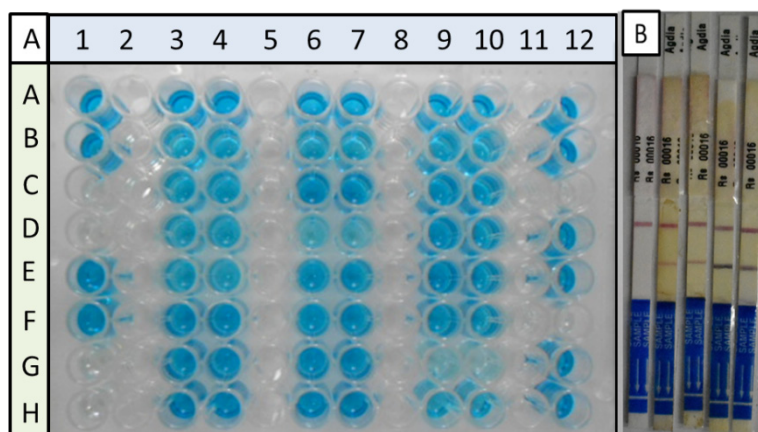
La técnica de ELISA ha sido ampliamente usada en los protocolos de identificación de *R. solanacearum* entre colonias con fenotipo similares (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008; Dööltokeidieva y Bobusheva, 2016). El diagnóstico se basa en el uso de anticuerpos monoclonales contra exopolisacáridos (EPS) producidos por la bacteria. Naranjo-Feliciano y Martínez-Zubiaur (2013) diagnosticaron tejidos vegetales enfermos comparando los ensayos de ELISA, la aglutinación con partículas látex y la detección de *R. solanacearum* por PCR. La aglutinación con partículas látex fue la técnica más rápida y más sencilla entre las 3, pero fue menos específica, ya que reaccionó con otros microorganismos, y un orden de magnitud menos sensible (límite  $10^6$  ufc/mL) que la otra prueba serológica.

exopolysaccharides (EPS) produced by the bacteria. Naranjo-Feliciano and Martínez-Zubiaur (2013) diagnosed diseased plant tissues by comparing the ELISA trials, agglutination with latex particles, and the detection of *R. solanacearum* by PCR. The agglutination with latex particles was the quickest and simplest technique of the 3, but it was less specific, since it reacted with other microorganisms, and it is less sensitive by one order of magnitude (límite  $10^6$  ufc/mL) than the other serological test. According to the manufacturer, the *R. solanacearum* detection limit in the ELISA technique is of  $10^5$  ufc/mL. These authors observed differences in reliability of the detection of the pathogenic bacteria by the 3 methods, when they compared the results of the diagnosis with the development of the plant's disease, afterwards. The reliability of the diagnosis using PCR was up to 20% higher than with the ELISA test. In this work, the PCR test confirmed 80% of the positive cases diagnosed using ELISA, indicating 20% of false positives in this serological tests, which coincides with the report by Naranjo-Feliciano and Martínez-Zubiaur (2013). Other authors have discussed the limitations of the ELISA test and the advantages of molecular markers, which can detect up to  $10^2$  ufc/mL (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008). Eriksson and Aspan (2007) compared PCR and ELISA in the diagnosis of bacteria of the genus *Salmonella* in pig fecal samples, and they found discrepancies

**Cuadro 1. Diagnóstico de la enfermedad Moko bacteriano en plantas de plátano con sintomatología sospechosa.**  
**Table 1. Diagnosis of the bacterial Moko disease in banana plants with suspicious symptomatology.**

	Positivas	PCR Iniciadores 759, 760 (universales para <i>R. solanacearum</i> )	PCR Iniciadores pehA#3-F, pehA#6-R (gen pga)	Falsos positivos	Falsos negativos	Certeza (%)
ELISA <sup>x</sup>	35	28	28	7	0	80
INMUNOTIRAS <sup>x</sup>	28	28	28	0	0	100

<sup>x</sup>Se analizaron en total 40 muestras: 14 de pseudotallo y 26 de fruto / <sup>x</sup>A total of 40 samples were analyzed: 14 pseudostem and 26 fruit samples.



**Figura 1. Diagnóstico serológico de Moko bacteriano en muestras de pseudotallo y fruto de plátano. Panel A, diagnóstico por ELISA. Los controles y muestras fueron analizados por duplicado. Columna 1, controles negativos (Filas C, D, G y H) y positivos (Filas A, B, E y F). Las muestras se colocaron en las columnas 3, 4, 6, 7, 9, 10 y 12. Panel B, diagnóstico mediante inmunotiras; se incluye el resultado de una muestra negativa (una sola línea que corresponde al control); muestras positivas, dos líneas. En ambos diagnósticos se observan diferencias en la intensidad de color de la señal en las muestras positiva, lo cual se relaciona con las diferencias en la cantidad de inóculo, de acuerdo al fabricante.**

**Figure 1. Serological diagnosis of bacterial Moko disease in banana pseudostem and fruit samples. Panel A, diagnosis by ELISA. Controls and samples were analyzed by duplicate. Column 1, negative (Rows C, D, G, and H) and positive controls (Rows A, B, E, and F). Samples were placed in columns 3, 4, 6, 7, 9, 10, and 12. Panel B, diagnosis by immunostrips; the result of a negative sample is included (only one line for the control); positive samples, two lines. Both diagnoses show differences in the intensity in color of the signal in the positive samples, which is related to the differences in the amount of inoculant, according to the manufacturer.**

De acuerdo al fabricante, el límite de detección de *R. solanacearum* en la técnica de ELISA es de  $10^5$  ufc/mL. Estos autores observaron diferencias en la confiabilidad de la detección de la bacteria patógena por los 3 métodos, cuando compararon los resultados del diagnóstico con el desarrollo de la enfermedad en la planta posteriormente. La confiabilidad del diagnóstico por PCR fue hasta 20% superior en comparación con la prueba de ELISA. En el presente trabajo la prueba de PCR confirmó 80% de los casos positivos diagnosticados con ELISA, indicando 20% de falsos positivos en esta prueba serológica, lo que coincide con el reporte de Naranjo-Feliciano y Martínez-Zubiaur (2013). Otros autores han discutido las limitaciones de la prueba de ELISA y las ventajas sobre ella de los métodos moleculares, que pueden detectar hasta

between the results of both techniques due to the low specificity of the antibodies used, which shows that the problem of the immunodiagnosis by ELISA is not exclusive of the *R. Solanacearum* diagnosis.

The *R. solanacearum* diagnosis in the banana samples with ImmunoStrips was 100% congruent with the later detection by PCR. ImmunoStrips are a pocket diagnosis, also sold by Agdia®, Inc. and offers the same limit of detection than the ELISA test ( $10^5$  ufc/mL). These ImmunoStrips have been used in other investigations as a method to confirm the identities of isolated *R. solanacearum* strains (Sánchez-Pérez *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2012). Thera (2007) used ImmunoStrips to diagnose *R. solanacearum* in tomato, potato, tobacco, and green chili pepper tissues. The ImmunoStrips had one false negative in a frozen sample of green

$10^2$  ufc/mL (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008). Eriksen y Aspan (2007) compararon la PCR y el ELISA en el diagnóstico de bacterias del género *Salmonella* en muestras fecales de cerdo, y encontraron discrepancia entre los resultados de ambas técnicas debido a la baja especificidad de los anticuerpos que usaron, lo que muestra que la problemática del inmunodiagnóstico por ELISA no es exclusivo del diagnóstico de *R. solanacearum*.

El diagnóstico de *R. solanacearum* en las muestras de plátano con las inmunitiras fue 100% congruente con la detección posterior por PCR. La inmunitira es un diagnóstico de bolsillo, comercializado también por Agdia®, Inc. y ofrece el mismo límite de detección que el ensayo de ELISA ( $10^5$  ufc/mL). Estas inmunitiras han sido usadas en otros trabajos como método confirmativo de identidad de cepas aisladas de *R. solanacearum* (Sánchez-Pérez *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2012). Thera (2007) utilizó inmunitiras para diagnosticar *R. solanacearum* en tejidos de tomate, de papa, de tabaco y de chile verde. Las inmunitiras tuvieron un falso negativo en una muestra congelada de chile verde y confirmaron 24 de las 25 muestras infectadas (96%), lo que apoya que esta prueba tiene alta certidumbre.

Korus (2011) diagnosticó *Clavibacter michiganensis* comparando ELISA e inmunitiras y obtuvo resultados similares de 100% de eficiencia de detección usando inmunitiras, en comparación con eficiencias de detección variables (entre 33 y 100%) en las pruebas con ELISA para diferentes subespecies del patógeno. Ambos ensayos pueden usar los mismos anticuerpos, como es el caso de los productos Agdia® para detectar *R. solanacearum*. La detección con las inmunitiras es sencilla, *i.e.* la muestra es macerada y aplicada sobre la inmunitira, mientras los ensayos ELISA incluyen múltiples pasos como preparación de buffers, tiempos prolongados de incubación y múltiples lavados, lo cual incrementa la posibilidad de error. También puede

chilies and confirmed 24 of the 25 infected samples (96%), supporting the fact that this test has a high degree of certainty.

Korus (2011) diagnosed *Clavibacter michiganensis* comparing ELISA and ImmunoStrips and obtained similar results of an efficiency of 100% using ImmunoStrips, in comparison with variable detection efficiencies (33 to 100%) in ELISA tests for different pathogen subspecies. Both tests can use the same antibodies, as in the case of Agdia® products to detect *R. solanacearum*. Detection with ImmunoStrips is simple, *i.e.* the sample is macerated and applied on the ImmunoStrip, whereas ELISA tests include multiple steps such as buffer preparations, prolonged incubation times, and multiple washing steps, which increase the possibilities of error. A dilution effect could also occur in the sample in the ELISA test, affecting the detection in some samples (Ruiz-García *et al.*, 2009).

The robustness of the *R. solanacearum* diagnosis with ImmunoStrips in banana tissues in this and other investigations (Thera, 2007), as well as its speed, simplicity and portability, make its use advisable to monitor *R. solanacearum* on the field, and for the gathering of samples for the isolation and study of the bacteria. The confirmation of the diagnosis must continue to be with molecular markers, since the limits of serological detection do not allow for the detection of cases of early infection (Thera, 2007), nor do they distinguish between the different races of *R. solanacearum* (Rajeshwari *et al.*, 1998).

#### Isolation of *R. solanacearum*

With the sequential use of 2 culture media, SMSA and B-King, it was possible to isolate 25 *R. solanacearum* strains from the 28 positive samples. The three samples from which *R. solanacearum*

ocurrir un efecto de dilución de la muestra en el ensayo ELISA, afectando la detección en algunas muestras (Ruiz-García *et al.*, 2009).

La robustez del diagnóstico de *R. solanacearum* con las inmuntiras en los tejidos de plátano, en el presente trabajo y otros (Thera, 2007), así como su rapidez, sencillez y portabilidad, hacen que su uso sea aconsejable para monitorear *R. solanacearum* en campo, y para la colecta de muestras para el aislamiento y estudio de la bacteria. La confirmación del diagnóstico deberá continuar siendo con los métodos moleculares ya que los límites de detección serológicos no permiten detectar casos de infección temprana (Thera, 2007), y tampoco distinguen entre las diferentes razas de *R. solanacearum* (Rajeshwari *et al.*, 1998).

#### **Aislamiento de *R. solanacearum***

Mediante el uso secuencial de 2 medios de cultivo, el SMSA y el B-King, se logró aislar 25 cepas de *R. solanacearum* de las 28 muestras positivas. Las tres muestras donde no se pudo recuperar *R. solanacearum* fueron las que presentaron las líneas diagnósticas más pálidas en las inmuntiras, lo que indica que esas muestras contenían una baja cantidad de bacteria.

El medio SMSA es frecuentemente utilizado para el aislamiento de *R. solanacearum*, porque evita el crecimiento de muchos otros microorganismos (Kelman, 1954; Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008; Cardozo *et al.*, 2010). Sin embargo, aun así *R. solanacearum* es difícil de aislar debido a que *in vitro* presenta crecimiento lento, mientras otras bacterias, *e.g.* *Pseudomonas*, crecen rápido y contaminan los aislamientos (Ramesh *et al.*, 2009; Champoiseau *et al.*, 2009; Nasim, 2011; Kalpage y De Costa, 2015). La combinación del medio SMSA y el medio B-King permite distinguir *R. solanacearum* de *Pseudomonas* spp. Ambos tipos de bacterias crecen sobre el medio SMSA como

could not be recovered had the palest diagnosis lines in the ImmunoStrips, indicating that these samples contained a low bacteria count.

The SMSA medium is frequently used to isolate *R. solanacearum*, since it avoids the growth of many other microorganisms (Kelman, 1954; Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008; Cardozo *et al.*, 2010). However, even so, *R. solanacearum* is difficult to isolate since it has slow growth rates *in vitro*, while other bacteria, *e.g.* *Pseudomonas*, grow quickly and contaminate the isolations (Ramesh *et al.*, 2009; Champoiseau *et al.*, 2009; Nasim, 2011; Kalpage and De Costa, 2015). The combination of the media SMSA and B-King helps to distinguish *R. solanacearum* from *Pseudomonas* spp. Both of these bacteria grow on the SMSA medium as mucoid cultures, with irregular, white edges, and pink to red centers. On the B-King medium, *Pseudomonas* spp. fluoresces, whereas *R. solanacearum* do not (Figure 2), helping to put them apart. Ramesh *et al.*, (2009) point out that genus *Pseudomonas* is opportunist during the colonization of the host by *R. solanacearum*. Along with *Pseudomonas*, the bacteria *Klebsiella*, *Erwinia*, and other species of the genus *Ralstonia*, such as *Ralstonia mannitolilytica*, are mostly endophytic of the banana (Thomas *et al.*, 2008; Ganen *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2013). The bacteria recovered from the 3 samples that produced faint lines on the ImmunoStrips presented fluorescence on the B-King medium and did not amplify in any of the PCR diagnosis reactions for *R. solanacearum*. Some of these bacteria were identified by sequencing the 16S, and belonged to *Pseudomonas fulva*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Pseudomonas citronellolis*, consistent with reports by the bibliography.

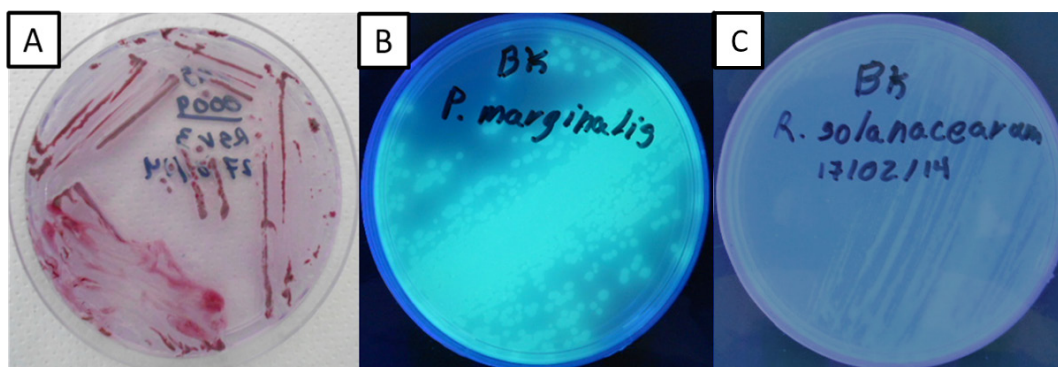
#### **Confirmation of the identity of *R. solanacearum***

The identity of the *R. solanacearum* strains was confirmed by sequencing the amplified fragment

colonias mucoides, de bordes blancos irregulares y centros rosas a rojos. Sobre el medio B-King las colonias de *Pseudomonas* spp. fluorescen mientras que las de *R. solanacearum* no lo hacen (Figura 2), lo que permite distinguirlas entre sí. Ramesh *et al.*, (2009) señalan que las bacterias del género *Pseudomonas* son oportunistas durante la colonización del hospedero por *R. solanacearum*. Además de las *Pseudomonas*, las bacterias *Klebsiella*, *Erwinia* y otras especies del género *Ralstonia*, como *Ralstonia mannitolilytica*, son endófitas mayoritarias del plátano (Thomas *et al.*, 2008; Ganen *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2013). Las bacterias recuperadas de las 3 muestras que dieron las líneas tenues en las inmuntiras presentaron fluorescencia sobre el medio B-King y no amplificaron en ninguna de las reacciones de PCR de diagnóstico para *R. solanacearum*. Algunas de esas bacterias fueron identificadas mediante secuenciación del 16S, y correspondieron a *Pseudomonas fulva*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas citronellolis*, consistente con lo reportado en la bibliografía.

with primers pehA#3-F, pehA#6-R (fragment of the gene *pga*). The 25 strains that amplified the 532pb diagnostic band were confirmed to be *R. solanacearum* using the BlastN analysis with the sequences obtained, and compared with the GenBank database (hit 99-100% identity with *R. solanacearum*). Based on the positive PCR results when using the primers ISRso19, the 25 isolated strains corresponded to Race 2.

The identification of the sequevars was first determined by PCR Multiplex, using the primers of the series Mus (Fegan and Prior, 2005). According to these authors, each sample must give only one diagnostic DNA band: ~167 pb (sequevar 4 ecotype SFR), ~350 pb (sequevar 4), ~220 pb (sequevar 6), ~400 pb (sequevar 3). These DNA bands were observed among the products of the Multiplex (Figure 3A), although they were not unique DNA bands per sample. According to the Multiplex (Figure 3A), the Race 2 *R. solanacearum* strains genotype in sequevar 3 (lanes 11 and 13), sequevar 4 (lanes 3 and 5), sequevar 4 SFR (lane



**Figura 2.** Pre-selección de bacterias con fenotipo similar a *R. solanacearum*. Aislamiento sobre medio SMSA (panel A). Las colonias con características mucoides, bordes blancos irregulares y centros rojos fueron transferidas sobre medio B-King. Las bacterias del género *Pseudomonas* fluorescen sobre este medio (Panel B). Se seleccionaron las bacterias no fluorescentes (panel C) para continuar el aislamiento de *R. solanacearum*.

**Figure 2.** Preselection of bacteria with similar phenotypes to *R. solanacearum*. Isolation on SMSA medium (panel A). Strains with mucoid characteristics, white, irregular edges and red centers were transferred on a B-King medium. Bacteria of the genus *Pseudomonas* fluoresce on this medium (Panel B). Non-fluorescent bacteria were selected (panel C) to continue the isolation of *R. solanacearum*.

### Confirmación de la identidad *R. solanacearum*

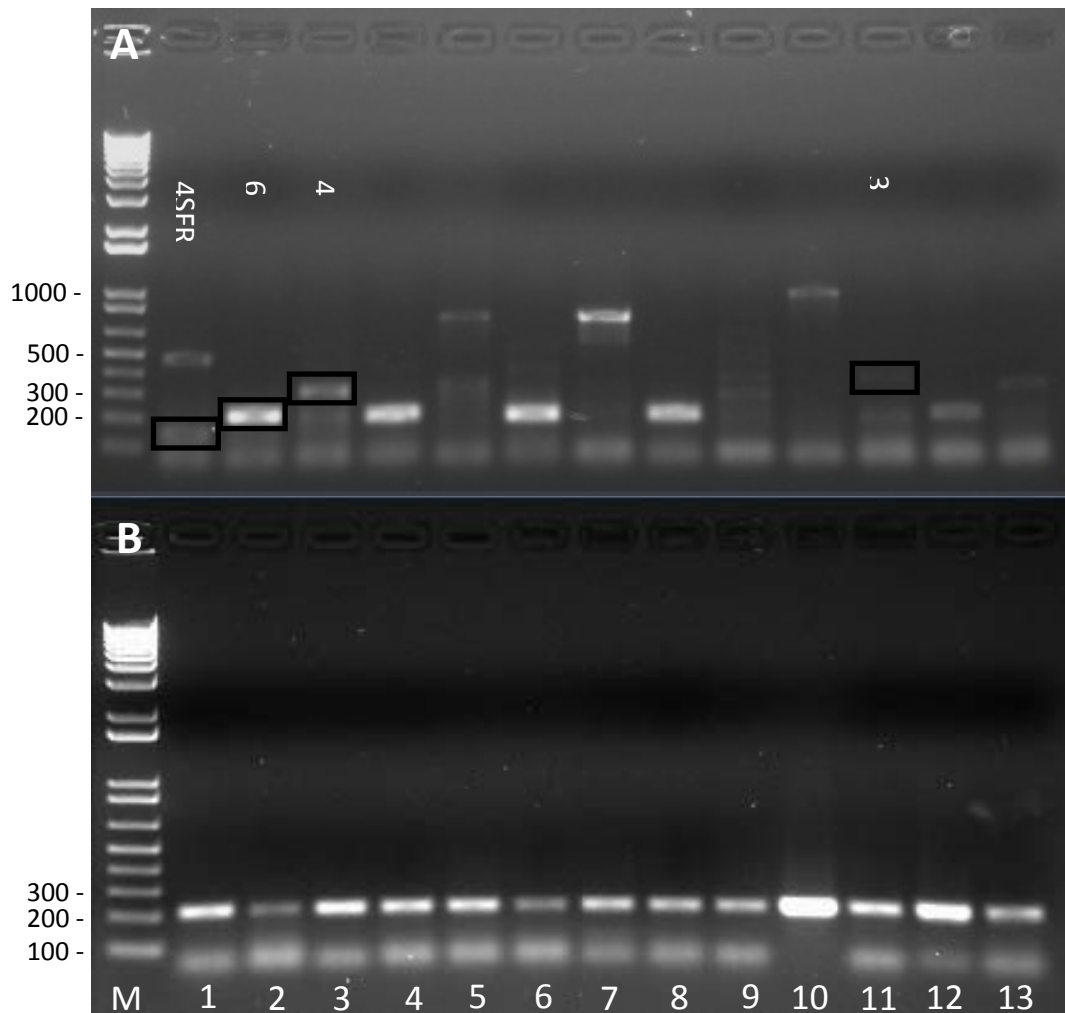
La identidad de las cepas *R. solanacearum* fue confirmada mediante secuenciación del fragmento amplificado con los iniciadores *pehA#3-F*, *pehA#6-R* (fragmento del gen *pga*). Las 25 cepas que amplificaron la banda diagnóstica de 532pb fueron confirmadas como *R. solanacearum* mediante el análisis BlastN con las secuencias obtenidas, y comparando con la base de datos de GenBank (hit 99-100% de identidad con *R. solanacearum*). Con base en los resultados positivos de la PCR cuando se usaron los iniciadores *ISRso19*, las 25 cepas aisladas corresponden a la Raza 2.

La identificación de los secuevares se determinó primero mediante PCR Multiplex, usando los iniciadores de la serie Mus (Fegan y Prior, 2005). De acuerdo a estos autores, cada muestra debe de dar una sola banda diagnóstica: de ~167 pb (secuevar 4 ecotipo SFR), ~350 pb (secuevar 4), ~220 pb (secuevar 6), ~400 pb (secuevar 3). Estas bandas se visualizaron en los productos de la Multiplex (Figura 3A), pero no fueron bandas únicas por muestra. De acuerdo a la Multiplex (Figura 3A), las cepas de *R. solanacearum* Raza 2 genotifican en el secuevar 3 (carriles 11 y 13), secuevar 4 (carriles 3 y 5), secuevar 4 SFR (carril 1) y secuevar 6 (carriles 2, 4, 6, 8). Otras cepas generaron perfiles que no pudieron asignarse a ninguno de los secuevares (*e.g.* carriles 7, 10). Debido a la inconsistencia en los resultados de la PCR en Multiplex, cada cepa fue posteriormente genotificada mediante PCR independiente para cada secuevar. Ninguna cepa de Tabasco amplificó con las parejas de iniciadores para los secuevares 3, 4 y 4 SFR (datos nos mostrados). Las 25 cepas amplificaron la banda diagnóstica de ~220 pb con la pareja de iniciadores *SI28*, que corresponde al secuevar 6 (Figura 3B). El secuevar 6 se originó en las islas del Caribe (Trinidad) y llegó al continente en Venezuela; en 1950 se introdujo

1), and sequevar 6 (lanes 2, 4, 6, 8). Other strains produced profiles that could not be assigned to any of the sequevars (*e.g.* lanes 7, 10). Due to the inconsistency in results of the PCR in Multiplex, each strain was later genotyped using independent PCR for each sequevar. No Tabasco strains amplified with the pairs of primers for sequevars 3, 4 and 4 SFR (data not shown). The 25 strains amplified the diagnostic DNA band of ~220 with the pair of primers *SI28*, that corresponds to sequevar 6 (Figure 3B). Sequevar 6 originated in the Caribbean islands (Trinidad) and entered the continent mainland through Venezuela; in 1950, it was accidentally introduced into Costa Rica in infected banana corms. In 1960, a commercial freight ship introduced it accidentally into Honduras, and from there it spread rapidly northward to Mexico and southward to Panama (Sequeira, 1998). The first report in Mexico was in 1960 in Chiapas. Currently, sequevar 6 has been reported in North America in Hawaii (Fegan and Prior, 2005) and Florida (Hong *et al.*, 2012); in Central America, in Guatemala (Sánchez-Pérez *et al.*, 2008), and in South America, in Brazil (Albuquerque *et al.*, 2014). Central and South America are considered the center of origin of strains related to the Moko disease of banana (Sequerira, 1998; Fegan and Prior, 2005, 2006). Other countries in the Americas have, along with sequevar 6, some of the sequevars 3, 4, 24, 25, 41, and 53 (Raymundo *et al.*, 1998; Prior and Fegan, 2005; Albuquerque *et al.*, 2014). Studies in Mexico must be broadened to determine if there are other sequevars related to the bacterium causing Moko disease in banana.

The taxonomic classification of the strains of the *R. solanacearum* species complex (RSSC) has been under constant revision and correction for over 50 years, and more frequently in the last 10 years (Peeters *et al.*, 2013; Prior *et al.*, 2016). As the world collections increase, and along





**Figura 3.** Caracterización de bacterias *R. solanacearum* aisladas a partir de plantas de plátano; tipificación de los secuevaros. Panel A, PCR en Multiplex (Iniciadores de la serie Mus y SI28 juntos). El carril 1 presentó una banda de ~167 pb que corresponde a lo esperado para el secuevar 4 SFR y otra de ~450 pb no descrita para ningún secuevar; el carril 2 muestra una banda de aproximadamente ~220 pb que corresponde a lo descrito para el secuevar 6; en el carril 3 se observó una banda de ~350 pb, lo que corresponde al secuevar 4. En los carriles siguientes se observaron bandas inesperadas, como por ejemplo ~850 pb (carriles 5 y 7) y ~1000pb (carril 10). Panel B, PCR con iniciadores específicos para el secuevar 6 (iniciadores SI28, banda diagnóstica de ~220 pb). En ambos paneles los carriles corresponden a: M) Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen® Carlsbad, CA, USA); carriles 1-13, cepas de *R. solanacearum*, 1) MT01, 2) MT02, 3) MT03, 4) MT04, 5) MT05, 6) MT06, 7) MT07, 8) MT08, 9) MT09, 10) MT10, 11) MT11, 12) MT12, 13) MT13.

**Figure 3.** Characterization of *R. solanacearum* bacteria isolated from banana plants; tipification of the sequevars. Panel A, PCR in Multiplex (primers of the series Mus and SI28 together). Lane 1 shows a band of ~167 pb that corresponds to expected for sequevar 4 SFR, and another of ~450 pb, not described for any sequevar; lane 2 shows a band of approximately ~220 pb that corresponds to descriptions for sequevar 6; lane 3 showed a band of ~350 pb, which corresponds to sequevar 4. The following lanes showed unexpected bands, such as ~850 pb (lanes 5 and 7) and ~1000pb (lane 10). Panel B, PCR with specific primers for sequevar 6 (primers SI28, diagnosis band of ~220 pb). In both panels the lanes correspond to: M) Marker 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen® Carlsbad, CA, USA); lanes 1-13, strains of *R. solanacearum*, 1) MT01, 2) MT02, 3) MT03, 4) MT04, 5) MT05, 6) MT06, 7) MT07, 8) MT08, 9) MT09, 10) MT10, 11) MT11, 12) MT12, 13) MT13.

accidentalmente a Costa Rica en cormos de plátano infectados. En 1960 un embarque comercial lo introdujo accidentalmente en Honduras y de allí se dispersó rápidamente por el norte a México y por el sur a Panamá (Sequeira, 1998). En México el primer reporte fue en 1960 en Chiapas. Actualmente el secuevar 6 se ha reportado en Norte América en Hawai (Fegan y Prior, 2005) y Florida (Hong *et al.*, 2012); en Centroamérica en Guatemala (Sánchez-Pérez *et al.*, 2008) y en Sudamérica en Brasil (Albuquerque *et al.*, 2014). El Centro y Sudamérica es considerado el centro de origen de las cepas relacionadas a Moko del plátano (Sequerira, 1998; Fegan y Prior, 2005, 2006). Otros países en América tienen, además del secuevar 6, alguno(s) de los secuevares 3, 4, 24, 25, 41 y 53 (Raymundo *et al.*, 1998; Prior y Fegan, 2005; Albuquerque *et al.*, 2014). El estudio en México debe ampliarse para determinar si existen otros secuevares relacionadas al Moko bacteriano del plátano.

La clasificación taxonómica de las cepas del complejo de especies de *R. solanacearum* (RSSC) ha estado en constante revisión y corrección desde hace 50 años y más frecuentemente en los últimos 10 (Peeters *et al.*, 2013; Prior *et al.*, 2016). A medida que las colecciones mundiales van aumentando y junto con ella la diversidad genética global conocida del RSSC, se han encontrado discrepancias en los resultados de clasificación de algunas cepas mediante diferentes herramientas de diagnóstico (Hong *et al.*, 2012), e incluso en clasificación de poblaciones, como son los casos de las *R. solanacearum* aisladas de Solanáceas y Cucurbitáceas en la Guayana Francesa y de tomate en Guadalupe (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008; Deberdt *et al.*, 2014). Aunque las razones de las inconsistencias no son del todo claras, algunas de las diferencias se han convertido en herramientas de diagnóstico. Por ejemplo, muchas cepas del secuevar 4 producen la banda de 351 pb con los iniciadores Mus06, pero

with them, the known global genetic diversity of the RSSC, discrepancies have been found in the classification results of some strains with different diagnosis tools (Hong *et al.*, 2012), and even in the classification of populations, such as in the cases of the isolated *R. solanacearum* of Solanaceae and Cucurbits in the French Guyana, and tomatoes in Guadalupe (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008; Deberdt *et al.*, 2014). Although the reasons for the inconsistencies are not entirely clear, some of the differences have turned into diagnosis tools. For example, many strains of secuevar 4 produce a 351 pb band with primers Mus06, but they additionally amplify a band of 167pb (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008), while some strains of secuevar 4 isolated in Florida in 2008 do not produce the diagnosis band of 351pb, but only the unspecific 167pb band, therefore the authors propose that the Florida strains that only amplify the 167pb band are emerging strains (Hong *et al.*, 2012).

The Multiplex to distinguish between secuevares 3, 4, and 6 within Race 2 (*i.e.* strains causing banana Moko) was generated by Fegan and Prior (2005) and it has been used to classify strains in Martinique (Wicker *et al.*, 2007, 2009), Colombia (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008), United States (Hong *et al.*, 2012), French Guyana (Deberdt *et al.*, 2014), Brazil (Albuquerque *et al.*, 2014), and others. In the reports that show electrophoresic analyses of the PCR products, we can notice unspecific bands in some lanes, alongside the diagnosis band (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2012; Albuquerque *et al.*, 2014), as observed in this investigation about Mexico. Even the analysis of one same secuevar shows discrepancies between the different research groups. Secuevar 4 amplifies 2 bands in the Moko Multiplex, although the band sizes are different between the report by Álvarez-Restrepo *et al.*, (2008) and the one by Albuquerque *et al.*, (2014), despite both investigations having

adicionalmente amplifican una banda de 167pb (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008), mientras que algunas cepas del secuevar 4 aisladas en Florida en 2008 no producen la banda diagnóstica de 351pb sino únicamente la banda inespecífica de 167pb, con lo que los autores proponen que las cepas de Florida que amplifican únicamente la banda de 167pb son cepas emergentes (Hong *et al.*, 2012).

El Multiplex para identificar entre los secuevares 3, 4 y 6 dentro de la Raza 2 (*i.e.* cepas causantes de Moko en plátano) fue generado por Fegan y Prior (2005) y ha sido usado para clasificar cepas en Martinica (Wicker *et al.*, 2007, 2009), Colombia (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008), Estados Unidos (Hong *et al.*, 2012), La Guayana francesa (Deberdt *et al.*, 2014), Brasil (Albuquerque *et al.*, 2014), entre otros. En los reportes que muestran los análisis electroforéticos de los productos de PCR se pueden observar en algunos carriles bandas inespecíficas adicionales a la banda diagnóstica (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2012; Albuquerque *et al.*, 2014), como lo observado en el presente trabajo de México. Incluso el análisis de un mismo secuevar muestra discrepancias entre los diferentes grupos de investigación. El secuevar 4 amplifica 2 bandas en el Multiplex de Moko, pero los tamaños de las bandas son diferentes entre el reporte de Álvarez-Restrepo *et al.*, (2008) y el de Albuquerque *et al.*, (2014); a pesar de que en ambos trabajos se utilizaron geles de agarosa de la misma concentración (1.5% p/v).

En el presente trabajo el diagnóstico por Multiplex fue ambiguo. En el caso de las cepas que amplificaron la banda de 221pb (secuevar 6), esta fue una banda única (Figura 3A, carriles 2, 4, 6, 8, 12), contrario al resultado de Albuquerque *et al.*, (2014) que obtuvieron 2 bandas para la cepa IBSBF2661 (secuevar 6), pero similar a lo obtenido por Hong *et al.*, (2012), quienes también obtuvieron una sola banda para la cepa 527 (secuevar 6) en la Multiplex

used agarose gels with the same concentrations (1.5% p/v).

In this investigation the diagnosis by Multiplex was ambiguous. In the case of the strains that amplified the 221pb band (secuevar 6), it was a single band (Figure 3A, lanes 2, 4, 6, 8, 12), contrary to results by Albuquerque *et al.*, (2014) who obtained 2 bands for the strain IBSBF2661 (secuevar 6), but similar to results obtained by Hong *et al.*, (2012), who also obtained one band for strain 527 (secuevar 6) in the Moko Multiplex. In some Mexican strains, the diagnostic band expected for secuevars 3 (400pb, lane 11) and 4 (351pb, 167pb, lanes 1 and 3) were amplified, although other bands observed in those same lanes do not coincide with any of the reports. PCR bands were also observed that have not been reported previously in the Multiplex results for Moko strains (Figure 3A, lanes 5, 7, 10), or in other words, they are new bands. The new ~850 pb band amplifies in different strains (Figure 3A, lanes 5 and 7), suggesting they have a genetic origin, and it reflects the diversity in the populations of *R. solanacearum*. These results are difficult to interpret in further detail because the diagnosis primers amplify marker bands, although the function in the microorganism of those genomic regions is unknown (Deberdt *et al.*, 2014).

The presence of new and reproducible PCR products in different strains (*e.g.* ~850 pb band in strains MT05 and MT07) could be interpreted as an emergence of new strains of *R. solanacearum* in Tabasco, as proposed for the Florida strains that presented atypical results in this Multiplex diagnosis (Hong *et al.*, 2012). Due to the ambiguity of results, the individual diagnosis of each secuevar was carried out. No amplification of any strain was obtained in the diagnosis of secuevars 3 or 4 (data not shown). All the strains isolated in Tabasco in this investigation belong to secuevar 6 (Figure 3B). The recommendation by the present report is

de Moko. Con algunas cepas mexicanas se observó amplificación de la banda de diagnóstico esperada para los secuevares 3 (400pb, carril 11) y 4 (351pb, 167pb, carriles 1 y 3), pero otras bandas observadas también en esos mismos carriles no coinciden con ninguno de los trabajos reportados. También se observaron bandas de PCR que no se han reportado previamente en los resultados de Multiplex de cepas de Moko (Figura 3A, carriles 5, 7, 10) es decir, son bandas nuevas. La banda nueva de ~850 pb amplifica en diferentes cepas (Figura 3A, carriles 5 y 7), lo que sugiere que tienen una base de origen genético y refleja la diversidad en las poblaciones de *R. solanacearum*. Es difícil interpretar con más detalle estos resultados porque los iniciadores de diagnóstico amplifican bandas marcadoras, pero la función en el microorganismo de esas regiones genómicas es desconocida (Deberdt *et al.*, 2014).

La presencia de productos de PCR nuevos y reproducibles en diferentes cepas (*e.g.* banda de ~850 pb en cepas MT05 y MT07), pudiera interpretarse como emergencia de nuevas cepas de *R. solanacearum* en Tabasco, como fue propuesto para las cepas de Florida que presentaron resultados atípicos en este diagnóstico Multiplex (Hong *et al.*, 2012). Debido a la ambigüedad de resultados se realizó el diagnóstico individual de cada secuevar. No se obtuvo amplificación de ninguna cepa en los diagnósticos de los secuevares 3 y 4 (datos no mostrados). Todas las cepas aisladas en Tabasco en el presente trabajo pertenecen al secuevar 6 (Figura 3B). La recomendación que surge en el presente reporte es no basarse en resultados de Multiplex de Moko para proponer emergencia de nuevas cepas de *R. solanacearum*. Se sugiere que los productos amplificados sean secuenciados.

La Figura 4B presenta un resumen del protocolo propuesto a partir del presente trabajo, con el objetivo de simplificar el aislamiento de cepas de *R. solanacearum* Raza 2. Se compara con el procedimiento

to avoid basing only in Moko Multiplex results to propose the emergence of new *R. Solanacearum* strains. We suggest amplified products to be sequenced.

Figure 4B presents a summary of the protocol proposed from the present investigation, in order to simplify the isolation of *R. solanacearum* Race 2 strains. It is compared with the procedure followed by other investigations (Figure 4A). Procedure 4A is more expensive, since the diagnosis by ELISA or ImmunoStrips must be carried out on each isolated bacterial strain. In the present research, that strategy had little success. When the samples were not diagnosed before isolation, a large part of the bacteria isolated on the SMSA were not *R. solanacearum*. The sequential use of B-King medium after the isolation on SMSA is a quick and inexpensive option that allows the phenotypic preselection of *R. solanacearum*. According to the bibliography, the most reliable *R. solanacearum* identity diagnoses are PCR and sequencing, whether of ITS or specific genes (Fegan and Prior, 2005). After confirming the identity of *R. solanacearum*, the collection of isolated bacteria can be characterized genetically, phenotypically, phylogenetically, or be used for other studies. We recommend performing individual PCR with the specific primers of each Moko secuevar instead of the Moko Multiplex whenever results are unclear.

Moko is a quarantine-regulated disease in Mexico and a phytosanitary campaign is established. Identified outbreaks are therefore under continuous surveillance and eradication measures. It is important to emphasize that due to regulations and for food security, it is crucial to prevent the dispersal of the pathogen by collection of the material by inexperienced personnel. For this reason, all studies of this pathogen in Mexico should be carried out with the permission of, and in collaboration with the General Plant Health Board

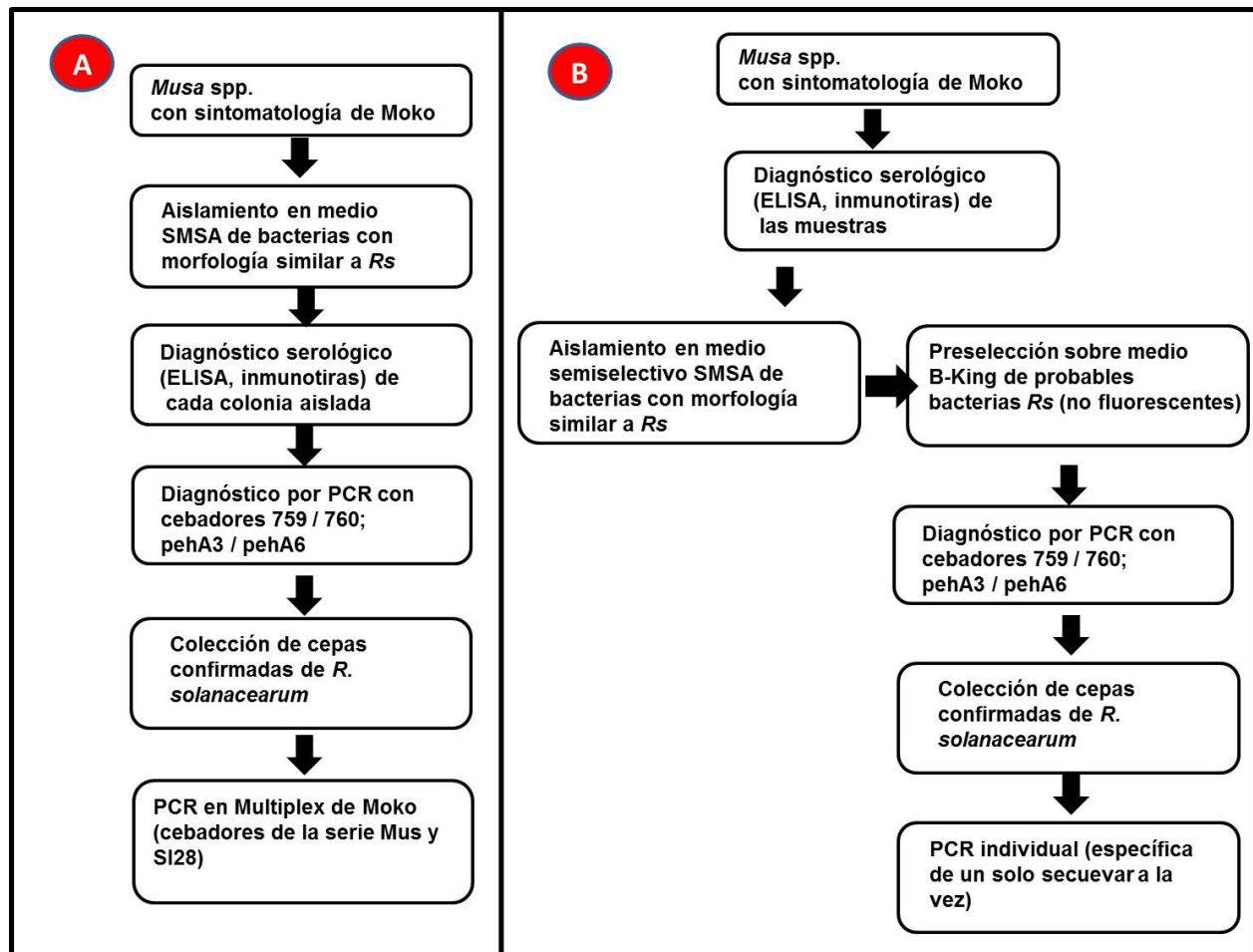


Figura 4. Comparación esquemática del protocolo generalmente usado para el aislamiento de *R. solanacearum* relacionadas a la enfermedad Moko (Panel A), y el protocolo recomendado en el presente estudio (panel B). El panel A se basa en Álvarez-Restrepo et al. (2008); Dööolotkeldieva y Bobusheva (2016); Hong et al. (2012); Sánchez-Pérez et al. (2008).

Figure 4. Schematic comparison of the protocol generally used for the isolation of *R. solanacearum* related to the Moko disease (Panel A), and the protocol recommended in the present study (panel B). Panel A is based on Álvarez-Restrepo et al. (2008); Dööolotkeldieva and Bobusheva (2016); Hong et al. (2012); Sánchez-Pérez et al. (2008).

seguido en otros trabajos (Figura 4A). El procedimiento 4A es más costoso debido a que el diagnóstico por ELISA o inmunotiras debe realizarse sobre cada colonia aislada. En este trabajo esa estrategia tuvo poco éxito. Cuando no se diagnosticaron las muestras previamente al aislamiento, una gran parte

(Dirección General de Sanidad Vegetal - DGSV), the National Food Health, Safety and Quality Service (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria - SENASICA) and the State Plant Health Committees (Comités Estatales de Sanidad Vegetal).

de las bacterias aisladas sobre el SMSA no fueron *R. solanacearum*. El uso secuencial de medio B-King después del aislamiento sobre SMSA es una opción rápida y económica que permite la preselección fenotípica de *R. solanacearum*. De acuerdo a la literatura los diagnósticos de identidad más confiables de *R. solanacearum* son la PCR y secuenciación, ya sea de ITS o de genes específicos (Fegan y Prior, 2005). Una vez confirmada la identidad de *R. solanacearum* la colección de bacterias aisladas puede ser caracterizada genéticamente, fenotípicamente, filogenéticamente, o usarse para otros estudios. Se recomienda realizar PCR individual con los iniciadores específicos de cada secuevar de Moko, en vez del Multiplex de Moko, cada vez que los resultados no sean claros.

Moko es una enfermedad bajo regulaciones cuarentenarias en México y se tiene establecida la campaña fitosanitaria, y por lo tanto se mantiene bajo continua vigilancia y medidas de erradicación de los brotes identificados. Es importante enfatizar que por normatividad y por seguridad alimentaria, es indispensable prevenir la dispersión del patógeno por colecta del material por personal inexperto. Por ello, todos los estudios que se realicen sobre este patógeno en México deberán ser llevados a cabo con el permiso y en colaboración con la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV), el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) y los Comités Estatales de Sanidad Vegetal.

## CONCLUSIONES

Se recomienda incluir el uso sistemático de inmunotiras para fortalecer el diagnóstico de *R. solanacearum* en campo.

El aislamiento e identificación de *R. solanacearum* es difícil, como han mencionado otros autores.

## CONCLUSIONS

The systematic use of ImmunoStrips is recommended to strengthen the diagnosis of *R. solanacearum* in the field.

The isolation and identification of *R. solanacearum* is difficult, as other authors have mentioned. The modification of the procedure published in the bibliography for the isolation of *R. solanacearum* facilitated the bacterial isolation from diseases banana plants: the serological diagnosis of the suspicious samples, the systematic inclusion of the B-King medium to discard bacteria of the genus *Pseudomonas*, and the confirmative diagnosis by PCR with primers *pehA#3-F-pehA#6-R*, and *ISRso19F-ISRso19R*.

The detection of atypical results in the Multiplex PCR for Moko disease of banana must be interpreted with care. The results must be confirmed using individual (specific) PCRs for each sequevar.

## Acknowledgements

This research was carried out with the authorization of the DGSV, SENASICA, Mexico. We would like to thank all the support given for this project by Dr. Francisco Javier Trujillo-Arriaga, Director of the DGSV, Dr. José Abel López-Buenfil, M.C. Oscar Morales-Galván and the staff of the Bacteriology Laboratory for Technical training of José Abraham Obrador Sánchez (JAOS) in the National Plant Health Reference Center (Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria - CNRF). The authors would also like to thank the Tabasco Local Plant Health Committee (Comité Local de Sanidad Vegetal de Tabasco - CESVETAB) for the sampling of banana plants with Moko symptoms, and the Phytosanitary Epidemiological Surveillance Program (Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria - PVEF) for the shipping of samples to our lab. This research was funded by the National Science and Technology Council (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - CONACyT), with Project 60246 and scholarship

La modificación del procedimiento citado en la literatura para el aislamiento de *R. solanacearum* facilitó aislar la bacteria a partir de plátanos enfermos: el diagnóstico serológico de las muestras sospechosas, la inclusión sistemática del medio B-King para descartar bacterias del género *Pseudomonas*, y el diagnóstico confirmativo por PCR con los iniciadores pehA#3-F -pehA#6-R, e ISRso19F-ISRso19R.

La detección de resultados atípicos en la PCR Multiplex para Moko debe interpretarse con cuidado. Los resultados deben confirmarse empleando PCRs individuales (específicas) para cada secuencia.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con autorización de la DGSV, SENASICA, México. Reconocemos todo el apoyo para este proyecto del Dr. Francisco Javier Trujillo-Arriaga, Director de la DGSV, del Dr. José Abel López-Buenfil, M.C. Oscar Morales-Galván y el personal del laboratorio de Bacteriología para la formación técnica de José Abraham Obrador Sánchez (JAOS) en el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF). Los autores también desean expresar su agradecimiento al Comité Local de Sanidad Vegetal de Tabasco (CES-VETAB) por el muestreo de tejidos de plantas de banano con síntomas de Moko, y al Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (PVEF) por el envío de muestras a nuestro laboratorio. Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con el Proyecto 60246 y la beca 344769 a JAOS, y parcialmente apoyado por el CONACyT proyecto 269833.

#### LITERATURA CITADA

Albuquerque GMR, Santos LA, Felix KC, Rollemberg CL, Silva AM, Souza EB, Cellier G, Prior P and Mariano RL. 2014. Moko disease-causing strains of *Ralstonia solanacearum* from Brazil extend known diversity in paraphyletic phylotype II. *Phytopathology* 104:1175-1182. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-12-13-0334-R>

344769 to JAOS, and partially supported by CONACyT project 269833.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- Álvarez-Restrepo J, Rodríguez-Gaviria P y Marín-Montoya M. 2008. Detección molecular de *Ralstonia solanacearum* en agrosistemas bananeros de Colombia. *Tropical Plant Pathology* 33:197-203. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762008000300004>
- Cardozo C, Rodríguez P, Cotes JM y Marín M. 2010. Variabilidad genética de la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Burkholderiales: Burkholderiaceae) en la zona bananera de Urabá (Colombia). Genetic variability of the bacterium *Ralstonia solanacearum* (Burkholderiales: Burkholderiaceae) in the banana-growing region of Uraba (Colombia). *Revista de Biología Tropical* 58:31-44. <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v58i1.5192>
- Champoiseau PG, Jones JB, and Allen C. 2009. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties. Disponible en línea: *Plant Health Progress* <http://dx.doi.org/10.1094/PHP-2009-0313-01-RV>
- CNRF, 2012. Protocolo de diagnóstico de *Ralstonia solanacearum* raza 2 (filotipo II) causante del Moko del plátano. SAGARPA -SENASICA. Estandarizado en proceso de revisión. Dirección General de Sanidad Vegetal - Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. México. 30p.
- Denny T and Hayward AC. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minn., USA. 174p.
- Deberdt P, Guyot J, Coranson-Beaudu R, Launay J, Noreksal M, Riviere P, Vigne F, Laplace D, Lebreton L and Wicker E. 2014. Diversity of *Ralstonia solanacearum* in French Guiana expands knowledge of the “emerging ecotype”. *Phytopathology* 104:586–596. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-09-13-0264-R>
- Dööltokeidieva T and Bobuşeva S. 2014. Identification and prevalence of *Ralstonia solanacearum* from potato fields of Kyrgyzstan. *Journal of Agriculture and Life Science* 4:1-9. Disponible en línea: <http://journals.manas.edu.kg/mjavl/index.php/mjavl/article/view/11/11>
- Dööltokeidieva T and Bobuşeva S. 2016. Identification of *Ralstonia solanacearum* in Kyrgyzstan's potato fields and the possibility of using biocontrol agents against this pathogen. *International Journal of Environmental y Agriculture Research* 2(5):146-155. Disponible en línea: <http://ijoeear.com/Paper-May-2016/IJOEAR-MAY-2016-42.pdf>
- Dulla GFJ and Lindow SE. 2009. Acyl-homoserine lactone-mediated cross talk among epiphytic bacteria modulates behavior of *Pseudomonas syringae* on leaves. *The International Society for Microbial Ecology Journal* 3:825-834. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2009.30>
- Eriksson E and Aspan A. 2007. Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for salmonella detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. *BMC Veterinary Research* 3:21 <http://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-3-21>

- Elphinstone JG, Hennessy J, Wilson JK and Stead DE. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* in potato tuber extracts. EPPO/OEPP Bulletin 26:663–678. Disponible en línea: [https://www.researchgate.net/publication/229943089\\_Sensitivity\\_of\\_different\\_methods\\_for\\_the\\_detection\\_of\\_Ralstonia\\_solanacearum\\_in\\_potato\\_tuber\\_extract](https://www.researchgate.net/publication/229943089_Sensitivity_of_different_methods_for_the_detection_of_Ralstonia_solanacearum_in_potato_tuber_extract)
- FAO, 2014. Banana market review 2013-2014. Banana Information Note 2014 8p. Disponible en línea: [http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM\\_MARKETS\\_MONITORING/Bananas/Documents/Banana\\_Information\\_Note\\_2014\\_rev.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Bananas/Documents/Banana_Information_Note_2014_rev.pdf)
- FAO, 2017. Banana statistical compendium 2015-2016. 26p. Disponible en línea: <http://www.fao.org/3/a-i7409e.pdf>
- Fegan M and Prior P. 2005. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”. Pp 1-15. In: Allen C, Prior P, Hayward AC (eds). Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. Minnesota, American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minn., USA. 386p
- French EB, Gutarra L, Aley P and Elphinstone J. 1995. Culture media for *Ralstonia solanacearum* isolation, identification and maintenance. Fitopatologia 30:126-30. Disponible en línea: <https://betuco.be/Potato/Bacterial%20wilt%20-%20culture%20media%20of%20Ralstonia%20Solanacearum.pdf>
- Ganan STS, Nietsche S, Pereira MCT, Reis ST, Xavier AA, Santos TM and Fernandes TP. 2009. Microbial contamination in explants of banana cultivars ‘galil 18’ and ‘tropical’. Acta Horticulturae 829:341-344. <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.829.53>
- Gillings M, Fahy P and Davies C. 1993. Restriction analysis of an amplified polygalacturonase gene fragment differentiates strains of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas solanacearum*. Letters in Applied Microbiology 17:44-48. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.1993.tb01432.x>
- Hayward AC. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 27: 265-277. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1964.tb04912.x>
- Hong JC and Norman DJ, Reed DL, Momol MT, Jones JB, 2012. Diversity among *Ralstonia solanacearum* strains isolated from the southeastern United States. Phytopathology 102: 924-936. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-12-11-0342>
- Kalpage M and De Costa D. 2015. Isolation of bacteriophages and determination of their efficiency in controlling *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt of tomato. Tropical Agricultural Research 26:140-151. <http://dx.doi.org/10.4038/tar.v26i1.8079>
- Kelman A. 1954. The relationship of pathogenicity in *P. solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44:693-695. Disponible en línea: <http://garfield.library.upenn.edu/classics/1983/A1983QM45400001.pdf>
- King EO, Ward MK and Raney DE. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 44:301-307.
- Korus KA. 2007. Evaluating commercially available diagnostic tests for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. nebraskensis, cause of Goss’s bacterial wilt and leaf blight in corn. Tesis de Maestría. Universidad de Nebraska. 73p. Disponible en línea: [http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1025&context=agronhor\\_tdiiss](http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1025&context=agronhor_tdiiss)
- Lamichhane JR and Varvaro L. 2013. A new medium for the detection of fluorescent pigment production by pseudomonads. Plant Pathology 62:624-632. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02670.x>
- Lee Y-A and Chin N-K. 2003. A novel Insertion sequence, ISRso19, isolated from *Ralstonia solanacearum* and its application to race differentiation. Plant Pathology Bulletin 12:57-64. <http://dx.doi.org/140.112.183.1/cpps/pdf/12-1/12-1-7>
- Li Y, Feng J, Liu H, Wang L, Hsiang T, Li X and Huang J. 2016. Genetic Diversity and Pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* Causing Tobacco Bacterial Wilt in China. Plant Disease 100:1288-1296. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-15-0384-RE>
- Naranjo Feliciano E y Martínez Zubiaur Y. 2013. Avances en el diagnóstico de la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*): situación actual y perspectivas en Cuba. Revista de Protección Vegetal 28: 160-170. Disponible en línea: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522013000300001](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000300001)
- Nasim B. 2011. Biological diversity of *Ralstonia Solanacearum* strains causing Bacterial Wilt of solanaceous crops in Pakistan. Arid Agriculture University, Rawalpindi. 153p. Disponible en línea: <http://eprints.hec.gov.pk/7587/1/1063S.htm>
- Norman DJ, Huang Q, Yuen JMF, Mangravita-Novo A and Byrne D. 2009. Susceptibility of Geranium Cultivars to *Ralstonia solanacearum*. HortScience 44:1504-1508. Disponible en línea: <http://hortsci.ashspublishings.org/content/44/5/1504.full>
- Opina N, Tavner F, Holloway G, Wang JF, Li TH, Maghirand R, Fegan M, Hayward AC, Krishnapillai V, Hong WF, Holloway BW and Timmis JN. 1997. A novel method for development of species and strain – specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology 5:19-33. Disponible en línea: <https://www.researchgate.net/publication/37625749>
- Peeters N, Guidot A, Vailleau F and Valls M. 2013. *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. Molecular Plant Pathology 14:651-662. <http://dx.doi.org/10.1111/mpp.12038>
- Prior P, Ailloud F, Dalsing BL, Remenant B, Sanchez B and Allen C. 2016. Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. BMC Genomics 17:1-11. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-016-2413-z>
- Rajeshwari N, Shylaja MD, Krishnappa M, Shetty HS, Mortensen CN and Mathur SB. 1998. Development of ELISA for the detection of *Ralstonia solanacearum* in tomato: its application in seed health testing. World Journal of Microbiology and Biotechnology 14: 697-704. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008892400077>
- Ramesh, R, Achari GA and Gaitonde S. 2014. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* infecting solanaceous ve-



- getables from India reveals the existence of unknown or newer sequevars of Phylotype I strains. *European Journal of Plant Pathology* 140:543-562. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-014-0487-5>
- Raymundo AK, Aves-Ilagan Y and Denny TP. 1998. Analysis of genetic variation of a population of banana infecting strains of *Ralstonia solanacearum*. Pp: 56–60. In: Prior P, Allen C and Elphinstone J (eds.). *Bacterial wilt disease: Molecular and ecological aspects*. Paris: INRA Editions.
- Ruiz-García N, Mora-Aguilera G, Rivas-Valencia P, Góngora-Canul C, Loeza-Kuk E, Ochoa-Martínez D, Ramírez-Valverde G, Gutiérrez-Espinosa MA and Álvarez-Ramos R. 2009. Sensibilidad de inmunopresión-ELISA y DAS-ELISA en el diagnóstico y muestreo del virus de la tristeza de los cítricos en huertos comerciales de Tamaulipas, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15:41-47. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1027-152X2009000100007](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2009000100007)
- Safni I, Cleenwerck I, De Vos P, Fegan M, Sly L and Kappler U. 2014. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:3087-3103. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.066712-0>
- Sambrook J and Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. United States of America. 2100p.
- Sánchez-Pérez A, Mejía L, Fegan M and Allen C. 2008. Diversity and distribution of *Ralstonia solanacearum* strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection. *Plant Pathology* 57:320-331. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01769.x>
- SENASICA, 2015. Campaña contra el Moko de platano. Informe mensual No. 12 (Diciembre 2015). 6p. Disponible en línea: <http://cesavenay.org.mx/wp-content/uploads/Informes-Fisicos-Financieros/2015/12-IFF-DICIEMBRE-MOKO.PDF>
- SENASICA, 2016. Moko del plátano. *Ralstonia solanacearum* raza 2 Smith. Ficha técnica No. 3. 24p. Disponible en línea: [http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/130955/Ficha\\_Técnica.pdf](http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/130955/Ficha_Técnica.pdf)
- SENASICA, 2017. Campaña fitosanitaria Moko del plátano. Disponible en línea: <http://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/plaga-Moko-del-platano>. Fecha de consulta 04 de enero del 2017.
- SIAP. Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera. 2017. Disponible en línea: <http://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>. (consulta, enero 2017).
- Sequeira L. 1998. Bacterial wilt: the missing element in international banana improvement programs. Pp 6-14. In: Prior P, Ass CA, Elphinstone J (eds). *Bacterial Wilt Disease*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 145p.
- Smith EF. 1896. A bacterial disease of tomato, pepper, egg-plant, and Irish potato (*Bacillus solanacearum* nov. sp.). U. S. Dept. Agric. Div. Vegetable Physiol. Pathol. Bulletin 12:1-28. Disponible en línea: <https://archive.org/stream/bacterialdisease12smit#page/n1/mode/2up>
- Souza SA, Xavier AA, Costa MR, Cardoso AMS, Pereira MCT and Nietsche S. 2013. Endophytic bacterial diversity in banana 'Prata Anã' (*Musa* spp.) roots. *Genetics and Molecular Biology* 36:252-264. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572013000200016>
- Thera AT, 2007. Bacterial wilt management: a prerequisite for a potato seed certification program in Mali. Montana State University-Bozeman, College of Agriculture. 142p. Disponible en línea: <http://scholarworks.montana.edu/xmlui/bitstream/handle/1/2415/TheraA1207.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Thomas P, Swarna GK, Roy PK and Patil P. 2008. Identification of culturable and originally non-culturable endophytic bacteria isolated from shoot tip cultures of banana cv. Grand Naine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 93:55-63. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-008-9341-9>
- Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, Mian D, Guilbaud C, Fegan M and Prior P. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and Environmental Microbiology* 73:6790-6801. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.00841-07>
- Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, Mian D and Prior P. 2009. Epidemiological evidence for the emergence of a new pathogenic variant of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies). *Plant Pathology* 58:853–861. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02098.x>
- Workman D. 2017. Bananas Exports by Country. Disponible en línea: <http://www.worldstopexports.com/bananas-exports-country/>. Fecha de consulta 24 de julio del 2017.