



ORGANISMO INTERNACIONAL
REGIONAL DE SANIDAD
AGROPECUARIA

Medidas de bioseguridad para la introducción y movimiento de material de propagación de musáceas en la región OIRSA



Marzo de 2021



Medidas de bioseguridad para la introducción y movimiento de material de propagación de musáceas en la región OIRSA

San Salvador, marzo 2021.

Medidas de bioseguridad para la introducción y movimiento de material de propagación de musáceas en la región OIRSA

DIRECTORIO

M.Sc. Efraín Medina Guerra

Director Ejecutivo

Ing. Oscar Zelaya Estradé

Director Técnico

MBA. Marco Castro Garnier

Director de Administración y Finanzas

Dr. Carlos Urías

Director Regional de Sanidad Vegetal

Dr. Abelardo De Gracia

Director Regional de Salud Animal

Ing. Raúl Rodas Suazo

Director Regional de Servicios Cuarentenarios

Lic. Raúl Peralta Girón

Director Regional de Inocuidad de Alimentos

OIRSA

Calle Ramón Beloso, final pasaje Isolde, Edificio OIRSA,

Colonia Escalón, San Salvador, El Salvador

PBX: + (503) 2263-1123 / + (503) 2209-9200

www.oirsa.org

oirsa@oirsa.org

Comunicación Institucional y Relaciones Públicas

M. Sc. Juan Pablo Guzmán

comunicaciones@oirsa.org

Tel.: + (503) 2209-9200, Ext. 403

San Salvador, marzo 2021.



Esta es una publicación del Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA). Se prohíbe la reproducción del material contenido en este documento sin previa autorización escrita del OIRSA.

Como citar este documento: Medidas de bioseguridad para la introducción y movimiento de material de propagación de musáceas en la región OIRSA. San Salvador, El Salvador. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. No de páginas:200

Primera edición, marzo 2021
www.oirsa.org

CONTENIDO

Medidas de bioseguridad para la introducción y movimiento de material de propagación de musáceas en la región del OIRSA.

Índice de cuadros	
	13
Índice de figuras	
	15
Resumen ejecutivo	
	17
Introducción	
	19
 1. Capacidad analítica para plagas de musáceas en algunos países de la región	
	23
 2. Normas de medidas fitosanitarias actuales	
	25
 3. Acciones para la exclusión de plagas cuarentenarias y endémicas ligadas al movimiento de germoplasma	
	26
 4. Procedimientos de contención y manipulación del germoplasma	
	30
4.1 Requisitos y normas estructurales de las instalaciones de contención.	30
4.2 Normas para el equipamiento	36
4.3 Requisitos y normas operacionales.	36
 5. Patógenos transmisibles en material de propagación	
	44
5.1 Virus que pueden transmitirse en germoplasma	48
5.1.1 El bunchy top del banano causada por el <i>Banana bunchy top virus</i> (BBTV)	48
5.1.2 Rayado del banano causado por el complejo de especies del <i>Banana streak virus</i>	52
5.1.3 Mosaico del banano por el <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	56
5.1.4 Mosaico de la bráctea causado por <i>Banana bract mosaic virus</i> (BBrMV)	58

5.1.5	Virus del Mosaico suave del banano causado por el <i>Banana mild mosaic virus</i> (BanMMV).	61
5.1.6	Mosaico del abacá causado por el Sugarcane mosaic virus (SCMV-Ab)	62
5.2	Procariotes patógenos transmisibles en material de propagación de musáceas	63
5.2.1	Marchitez bacteriana por <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>Musacearum</i> (Xvm)	64
5.2.2	Moko y Bugtok causadas por <i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1996	68
5.2.3	Marchitez roja bacteriana o Blood disease del banano (BDB) por <i>Ralstonia zyzygii</i> ssp. <i>celebesensis</i> ssp. nov. (Rzc; Salfi et al., 2014).	73
5.2.4	Pudriciones suaves por <i>Dickeya paradisiaca</i> Dickey and Victoria, 1980; Samson et al., 2004 y <i>Pectobacterium carotovorum</i> s. sp. <i>carotovorum</i> . (Jones, 1901, Haubent et al., 1999)	75
5.2.5	Pudrición acuosa del pseudotallo y necrosis del rizoma por <i>Dickeya paradisiaca</i> Dickey and Victoria, 1980; Samson et al., 2004.	75
5.2.6	Pudrición blanda del rizoma por <i>Pectobacterium carotovorum</i> s. sp. <i>Carotovorum</i>	78
5.2.7	Fitoplasmas asociados a musáceas transmisibles en material de plantación	80
5.2.8	Marchitez por fitoplasma del banano (BWAP), asociada al “ <i>Candidatus Phytoplasma Asteris</i> ” y marchitez del banano y síndrome Bogia del coCôtero (Banana wilt and Bogia coconut syndrome) asociada al “ <i>Candidatus Phytoplasma noviguineense</i> ”.	81
5.2.9	Elefantiasis del banano y el plátano asociada a <i>Candidatus Phytoplasma asteris</i> '.	83
5.3	Patógenos fúngicos regulados que se diseminan en el material de propagación	84
5.3.1	Marchitez por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 4 Tropical	84
5.3.2	Recomendaciones para el diagnóstico	89
5.3.3	Protocolo Banana virus indexing ring test 2017 mediante inmuno captura y reverso transcripción, PCR múltiple [Multiplex IC-(RT)-PCR para la detección de BBTv, CMV, BBrMV y BanMMV, basado en el protocolo de Sharman et al. (2000b)]	90
5.3.4	Protocolos de detección de <i>Banana Bunchy top virus</i> (BBTV)	92
5.3.5	Protocolos de detección de las especies del <i>Banana streak virus</i> (BSV)	93
5.3.6	Diagnóstico de BSV a través de PCR múltiple con inmunocaptura según Grupo temático de conservación de MusaNet en 2017 para ensayos Inter laboratorios	97
5.3.7	Protocolos de diagnóstico del mosaico del banano por el <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	99
5.3.8	Protocolos de detección del <i>Banana Bract Mosaic virus</i> (BBrMV)	102
5.3.9	Protocolos de detección del Banana mild mosaic virus (BanMMV)	107

5.3.10	Protocolo de diagnóstico de la marchitez bacteriana por <i>X. vasicola</i> pv. <i>Musacearum</i>	109
5.3.11	Protocolos de diagnóstico del complejo de especies de <i>Ralstonia solanacearum</i>	114
5.3.12	Protocolo de diagnóstico de Moko y Bugtok por <i>R. solanacearum</i> raza 2	121
5.3.13	Protocolos de diagnóstico de <i>R. zyzygii</i> spp <i>celebesensis</i> (Rzc) agente causal de la marchitez roja bacteriana del banano	128
5.3.14	Detección de <i>Ralstonia zyzygii</i> ssp <i>celebesensis</i> por PCR Plant Health Australia 2006 y Timin et al., 2014)	130
5.3.15	Protocolos de diagnóstico de bacterias del grupo de las pudriciones blandas (<i>Dickeya paradisiaca</i> Dickey and Victoria, 1980; Samson et al., 2004. y <i>Pectobacterium carotovorum</i> . s. sp. <i>carotovorum</i> (Jones, 1901, Haubent et al., 1999)	131
5.3.16	Protocolo de diagnóstico de la marchitez del banano causada por BWAP y ‘ <i>Candidatus Phytoplasma noviguineense</i> ’	137
5.3.17	Diagnóstico de ‘ <i>Candidatus Phytoplasma asteris</i> ’ asociado a la elefantiasis del banano (adaptado de Aliaga et al., 2018; Smart et al., 1996; Lorenz et al., 1995; Christensen et al., 2004).”	139
5.3.18	Protocolo para la detección de la raza 4 tropical (R4T) de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> agente causal de la marchitez por Fusarium del banano (<i>Fusarium odoratissimum</i>).	141

6. Términos y definiciones

151

7. Referencias

159

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Factores reportados que determinan la emergencia de las plagas en poblaciones de plantas	20
Cuadro 2.	Frecuencia de epidemias causadas por diferentes organismos patógenos	21
Cuadro 3.	Lista de chequeo para la Inspección de instalaciones especializadas en el confinamiento de plantas	40
Cuadro 4.	Enfermedades importantes de las musáceas transmitidas en material de propagación y su distribución continental	44
Cuadro 5.	Posibilidad de transmisión de los patógenos que causan enfermedades en varios tipos de materiales de musáceas	47
Cuadro 6.	Ensayos para la determinación de los biovares de <i>Ralstonia solanacearum</i>	71
Cuadro 7.	Lista de materiales y equipos recomendados para la colecta de muestras de plantas sospechosas de estar infectadas por patógenos cuarentenarios de las musáceas	89
Cuadro 8.	Composición de las mezclas de los componentes para las reacciones de PCR	91
Cuadro 9.	Secuencia de nucleótidos de los cebadores utilizados en M-IC-PCR para detectar BSV	95
Cuadro 10.	Secuencias de siete juegos de cebadores usados para la amplificación específica por PCR de <i>X. vasicola pv. Musacearum</i>	113
Cuadro 11.	Determinación de las razas de <i>Ralstonia solanacearum</i>	118
Cuadro 12.	Cebadores y especificidad de la reacción de PCR	124
Cuadro 13.	Preparación de la mezcla de cebadores 10X para PCR para identificar sequevares de <i>R. solanacearum</i>	125
Cuadro 14.	Pares de cebadores, especificidades y tamaño de los productos esperados	127
Cuadro 15.	Ensayo para la determinación de los fenotipos para diferenciar <i>D. chrysanthemi</i> de <i>D. paradisiaca</i>	132
Cuadro 16.	Lista de diferentes informes de protocolos de diagnóstico de R4T por PCR	141
Cuadro 17.	Relación de equipos reactivos y utensilios que se requieren en los protocolos descritos de extracción y purificación de ADN (Dita, 2010)	146

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Capacidad analítica para 10 plagas en musáceas de algunos países consultados de la región pertenecientes a la región del OIRSA	23
Figura 2.	Infraestructura (instalaciones de confinamiento) para realizar cuarentena a germoplasma y material de propagación de musáceas importado	24
Figura 3.	Síntomas de la enfermedad del cogollo arrellado causada por el <i>Banana bunchy top virus</i> (BBTV)	51
Figura 4a.	Síntomas del rayado del banano por el complejo de especies del Banana streak virus (BSV) en follaje y pseudotallo	54
Figura 4b.	Síntomas del rayado del banano por el Banana streak virus (BSV) en frutos	55
Figura 5.	Síntomas del mosaico del banano por el Cucumber mosaic virus (CMV)	58
Figura 6.	Mosaico de la bráctea por el potyvirus BBrMV en Cavendish	60
Figura 7.	Marchitez por <i>X. vasicola</i> pv <i>musacearum</i>	68
Figura 8.	Marchitez bacteriana (Moko y Bugtok) por <i>R. solanacearum</i> en bananos y plátanos	72
Figura 9.	Marchitez roja bacteriana o Blood disease del banano (BDB) por <i>Ralstonia zyzygii</i> ssp. <i>Celebesensis</i>	74
Figura 10.	Pudrición acuosa del pseudotallo y del rizoma por <i>D. paradisiaca</i>	77
Figura 11.	Pudrición húmeda del rizoma por <i>Pectobacterium carotovorum</i> pv. <i>carotovorum</i>	79
Figura 12.	Marchitez del banano asociada a los fitoplasmas BWP y “Candidatus Phytoplasma novoguineense”	82
Figura 13.	Elefantiasis de los bananos y plátanos	83
Figura 14.	Marchitez por <i>Fusarium</i> de las musáceas	88
Figura 15.	Diagrama de flujo para el diagnóstico de <i>R. solanacearum</i> , <i>R. pseudosolanacearum</i> , y <i>R. zyzygii</i> en plantas sintomáticas y asintomáticas	114
Figura 16.	Exudado bacteriano lechoso blanco al colocar tejidos afectados en agua	115
Figura 17.	Morfología de las colonias de <i>R. solanacearum</i> en medio TCZ de Kelman	116
Figura 18.	Esquema del flujo de aislamiento, y diagnóstico de identificación de <i>P. carotovorum</i> y <i>D. paradisiaca</i>	131
Figura 19.	Flujo para el diagnóstico molecular de la raza 4 tropical de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Cubense</i>	148

RESUMEN EJECUTIVO

El aumento de la productividad y la búsqueda de nuevos genotipos de plantas para su uso dentro de programas de innovación tecnológica o como fondo genético para programas de mejora convencional y biotecnológica con diferentes fines, implica usualmente la necesidad de mover germoplasma. El creciente intercambio de material vegetal internacional, regional y local, ha incrementado la necesidad de actualizar el conocimiento existente en todas las disciplinas relacionadas con la bioseguridad durante el movimiento del germoplasma.

Las medidas de bioseguridad para la introducción y movimiento de material de propagación de musáceas han sido preparadas por FAO y OIRSA en razón a que el germoplasma es componente esencial de los programas de innovación agrícola con distintos fines y, además, porque esta actividad, involucra inevitablemente los riesgos inherentes de introducción accidental de patógenos de riesgo cuarentenario asociados al hospedante.

Para minimizar este riesgo, se requieren acciones efectivas de diagnóstico (indexing), que aseguren que el material movilizado está libre de plagas de interés cuarentenario y económico, así como prácticas armonizadas de bioseguridad para su manipulación durante las operaciones inherentes a la introducción.

El presente documento brinda información esencial sobre los patógenos de riesgo y su distribución actual reconocida por los ONPF; es un referente para autoridades, instituciones y expertos, que toman decisiones relacionadas con el movimiento de germoplasma para diferentes propósitos. Es igualmente una guía para la detección de patógenos de musáceas potencialmente transmisibles en el material de propagación, con el único propósito de preservar la sanidad y productividad de las musáceas en la región.

En el documento se describen los riesgos fitosanitarios potenciales para el sistema de producción de musáceas, la capacidad analítica e infraestructura actual para su cuarentena en la región del OIRSA, los principales patógenos transmisibles en materiales para propagación de musáceas exóticos en esta región, su impacto y su distribución mundial. Se describen los niveles de riesgo de acuerdo a las fuentes del germoplasma, las actividades regulatorias previas a la introducción, se listan los requisitos que deben cumplir las instalaciones para el confinamiento y aislamiento de los materiales importados y los procedimientos para la contención y manipulación del germoplasma desde su llegada al país hasta su diagnóstico definitivo y liberación.

En apoyo a la vigilancia y el diagnóstico, se describen los patógenos transmisibles en material de propagación de musáceas, los síntomas que causan y los protocolos de diagnóstico existentes en la actualidad. Las descripciones incluyen el virus del cogollo arrepollado de las musáceas

causado por el *Banana bunchy top virus*, el complejo de especies del *Banana streak virus*, el mosaico del banano por el *Cucumber mosaic virus*, el mosaico de la bráctea del banano causado por el *Banana bract mosaic virus*, el virus del mosaico suave del banano por el *Banana mild mosaic virus*, la marchitez bacteriana por *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum*, el Moko y Bugtok por *Ralstonia solanacearum*, la pudrición roja bacteriana del banano por *Ralstonia zyzygii* pv. *celebesensis*, el complejo de las pudriciones húmedas por *Pectobacterium carotovorum* y *Dickeya paradisiaca*, la marchitez del banano causada por la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (sin. *Fusarium odoratissimum*) [R4T] y los fitoplasmas causantes de la marchitez asociada a fitoplasmas y elefantiasis por “*Candidatus Phytoplasma asteris*”, y “*Candidatus Phytoplasma novoguineensis*”

INTRODUCCIÓN

Las musáceas tienen una gran importancia en Latinoamérica y el Caribe, desde el punto económico, de sostenibilidad alimentaria, social y cultural. En los países miembros del Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA) se cultivan 259,6 miles de hectareas de bananos con una producción total de 1394.7 miles de tm y más de 15,5 miles de hectareas de plátanos con una producción total superior a los 280,4 miles de tm (FAO, 2018).

Diferentes plagas son transmitidas eficientemente en los materiales de multiplicación, particularmente virus, procariotes y hongos. Muchos patógenos importantes que afectan las musáceas no han alcanzado los límites de su distribución y constituyen una amenaza significativa para la región de América Latina y el Caribe (Jones, 2002). Los materiales de propagación derivados de plantas madres donantes infectadas, brindan la posibilidad de la perpetuación de los patógenos dando lugar a bajos rendimientos y frutos de pobre calidad (Kumar, 2013). Aunque la micropropagación ofrece diferentes ventajas sobre la propagación de hijos convencional, esta no excluye plagas pertenecientes a virus, viroides, y procariotes, si están presentes en las plantas madres (Diekmann y Putter, 1996). Los materiales infectados actúan como fuentes de dispersión secundaria de patógenos transmitidos por vectores, como son áfidos, escarabajos, cochinillas y los implementos agrícolas. Este riesgo de diceminación de patógenos a través del material de plantación tiene una gran significación cuarentenaria (Diekmann y Putter, 1996; Jones, 2002; Kumar, 2013).

Los países latinoamericanos y del caribe desarrollan en este momento, fuertes actividades de exclusión y prevención del marchitamiento por *Fusarium* ocasionado por la raza 4 tropical (R4T) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, (sin. *F. odoratissimum*).

El patógeno es altamente agresivo en bananos Cavendish, así como a otros cultivares de bananos y plátanos importantes para la economía de los países, y la agricultura familiar, como son el Gros Michel, Prata, Manzano, plátanos (AAB), de los subgrupos Bluggoe y Pisang awak (ABB) entre otros. Según reportes oficiales (Dita *et al.*, 2018), la plaga se encuentra presente en Asia, África, Medio Oriente, Oceanía y América (Colombia), donde ha afectado más de 100,000 hectáreas de plantaciones de bananos para exportación y otros clones.

Gestionar el riesgo de introducción a países o áreas libres de la raza 4 tropical (R4T) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, constituye el principal desafío de las Organizaciones Nacionales de Protección Fitosanitaria (ONPF) y las Organizaciones Regionales de Protección Fitosanitaria (ORPF). Una de las estrategias a futuro, es la innovación con nuevas variedades con diferentes niveles de resistencia, acompañado de un plan de manejo fitosanitario y agronómico.

Se reconoce que el cultivo de clones con resistencia a FocR4T es un elemento importante en el manejo futuro de esta plaga. Es conocido que los

actuales programas de mejoramiento para la resistencia a R4T, están situados en países en los que concurren, además, otros patógenos de alto impacto en la producción que son exóticos a la región OIRSA y transmisibles en los materiales de propagación. Sin embargo, es esencial para mantener y mejorar la condición fitosanitaria de nuestros países, mantener el movimiento y distribución de material vegetal comercial y germoplasma. Estos procesos involucran los riesgos inherentes de introducción accidental, junto al material, de plagas que siguen la vía de ingreso.

Aquellos patógenos que son frecuentemente asintomáticos y que se pueden transmitir a través del cultivo de tejidos implican un riesgo especial. Esto sustenta la necesidad de medidas efectivas de diagnóstico (indexing), que garanticen que el material distribuido está libre de plagas de interés cuarentenario a través de un planeamiento adecuado de las introducciones y la adopción de más mejores prácticas armonizadas de bioseguridad para el traslado seguro de las plantas entre los países.

El creciente intercambio de material vegetal internacional, regional y localmente, en combinación con los avances de la biotecnología, ha incrementado la necesidad de revisar el conocimiento existente en todas las disciplinas relacionadas con la bioseguridad durante la transferencia de germoplasma. En este sentido FAO y la Junta Internacional de Recursos Fitogenéticos (IBPGR) han promovido programas colaborativos para la transferencia biosegura y ágil de germoplasma (Diekmann, y Putter, 1996), continuados por Bioversity International (Thomas 2015).

El factor antrópico es responsable de la mayoría de los brotes y epidemias de plagas y enfermedades. Otras vías importantes son la cambiante oferta climática, nuevas tecnologías agronómicas, los vectores, la recombinación y las alteraciones del hábitat (Anderson *et al.*, 2004; Cuadro 1).

Cuadro 1.
Factores reportados que determinan la emergencia de las plagas en poblaciones de plantas (datos tomados de Anderson *et al.*, 2004).

Factor	% de casos en relación al total de casos de epidemias estudiadas.
Introducciones (factor antrópico)	57
Clima	25
Técnicas de cultivo	9
Cambios en las poblaciones de vectores	7
Recombinaciones	2
Perturbaciones del hábitat	1

Los principales taxas patogénicos son virus, hongos, bacterias, fitoplasmas y nematodos. (Cuadro 2). Los virus son, por muchos factores, los que más contribuyen a los problemas de introducción de plagas, seguidos de los hongos y bacterias.

Trabajar articuladamente para asegurar un intercambio seguro de germoplasma, permite disminuir considerablemente el riesgo de introducción y diseminación de las plagas exóticas, así como impactar de manera positiva los costos de producción, la competitividad y los precios de venta en favor de la industria y la estabilidad económica para el sector rural de cada país.

Cuadro 2.
Frecuencia de epidemias causadas por diferentes organismos patógenos
(datos de Anderson *et al.*, 2004).

Patógenos	% de casos en relación al total de epidemias estudiadas.
Virus	47
Hongos	30
Bacterias	16
Fitoplasmas	4
Nematodos	1
Desconocidos	2

A partir de la aparición de la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, expertos del OIRSA siguiendo las informaciones producidas en diferentes países con presencia de la plaga en Asia y África, han identificado entre las medidas de supresión/manejo de la enfermedad, la posibilidad de introducción de clones de bananos y plátanos reportados con diferentes niveles de resistencia a la enfermedad, los cuales en su mayoría provienen de regiones que tienen además otras plagas de las musáceas exóticas al hemisferio occidental.

Dado que las *Musa* spp. (bananos y plátanos provenientes de las especies *Musa acuminata* Colla, *Musa balbisiana* Colla y sus híbridos, así como otras diferentes especies) el Abacá (*Musa textilis* Nee), el Ensete [*Ensete ventricosum* (Welw.) Chessm., *Ensete edule* (Gmel.) Horan], pertenecen a la familia *Musaceae* en el orden Zingiberales (Jones y Daniells, 2018), y comparten regiones geográficas y algunas plagas comunes, reguladas en América Latina y el Caribe como son los casos de *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* en *E. ventricosum* (Yirgou and Bradbury, 1968 y 1974; Addis *et al.*, 2004; Tripathi *et al.*, 2009); *Ralstonia solanacearum* raza 2 en Abacá (Revilla y Vargas, 1967); *Banana bunchy top virus* (BBTV) en diferentes *Musa* spp. y *E. ventricosum* (Magee, 1948; Espino *et al.*, 1993; Thomas and Dietzgen, 1991; Sharman *et al.*, 2008; Thomas, 2019); el complejo del *Banana streak virus* (BSV) y BSGF virus en *E. ventricosum* (Geering and Thomas, 2002; Iskra-Caruana *et al.*, 2018); el *Banana bract mosaic virus* (BBrMV), en *E. ventricosum* (Sharman *et al.*, 2008), las medidas descritas en este documento son aplicables al intercambio de

germoplasma y de partes de plantas de estos géneros y de otras *Musa* spp. utilizadas con diferentes propósitos, de acuerdo con la soberanía de cada país.

1. Capacidad analítica para plagas de musáceas en algunos países de la región

Contar con una solida capacidad analítica para la detección de plagas es la base para garantizar un nivel adecuado de protección y mantener la condición fitosanitaria en la región. Al consultar a los países por su capacidad con relación a 10 plagas de interés cuarentenario, se evidencian avances importantes en algunos países de la región. En varios de ellos se cuenta con capacidad analítica oficial para algunas o todas las plagas consultadas. Por ejemplo, para la marchitez por *Fusarium* del banano raza 4 tropical, [(Foc R4T; sinónimo. *Fusarium odoratissimum* (Maryani *et al.*, 2019)], el método analítico que predomina basado en la Reaccion en Cadenas de Polimerasa (PCR), se fundamenta en el esquema sugerido por el Banana Research Group de la Universidad de Wageningen [Dita *et al.*, (2010), y el kit comercial de Clear Detections, para la detección de tejidos de bananos de la raza 4 tropical basado en reacciones mediante PCR cuantitativa (qPCR)].

Para otras plagas como el cogollo arrellado causado por el Banana bunchy top virus (BBTV), la marchitez bacteriana o Moko causado por la raza 2 de *Ralstonia solanacearum*, el mosaico común por el Cucumber mosaic virus (CMV) y el mosaico del Abacá por el Abaca bunchy top virus (ABTV), algunos países cuentan con servicios ofrecidos por privados o por otras instituciones y al menos un país podría tener falta de capacidad analítica para 6 de las 10 plagas consultadas.

En la figura 1, se presenta la capacidad analítica actual en algunos países de la región, la cual es fundamental como soporte de las medidas de bioseguridad para la introducción y movimiento de material de propagación de musáceas en la región OIRSA.

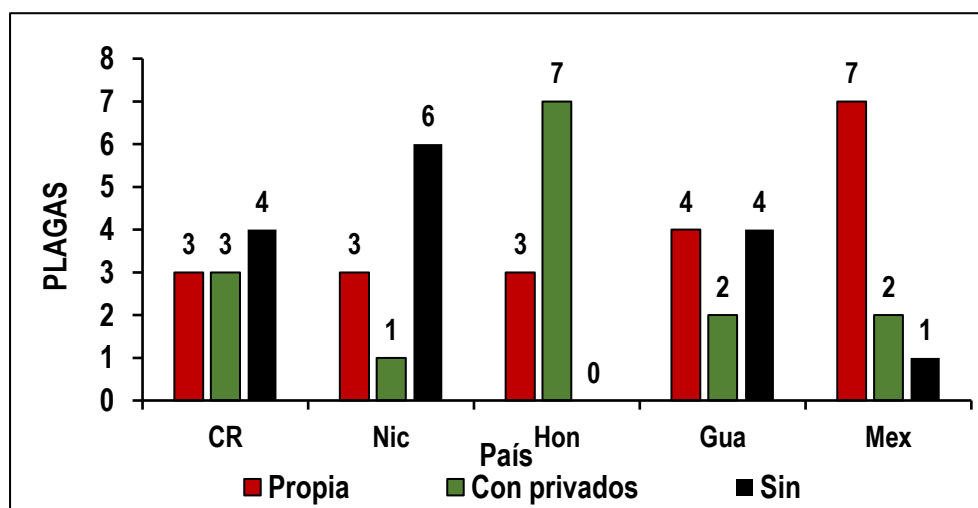


Figura 1. Capacidad analítica para 10 plagas en musáceas de algunos países consultados de la región pertenecientes a la región del OIRSA.

De cinco países en los que se tuvo información sobre la capacidades de diagnóstico para 10 plagas de importancia cuarentenaria y económica (BBTV, BSV, CMV, Banana bract mosaic virus (BBrMV), el Abacá mosaic virus (SCMV-Ab), el ABTV, Banana mild mosaic virus (BanMMV), Banano virus X virus (BVX), Foc R4T], la raza 2 de *Ralstonia solanacearum*), solo un país cuenta con la capacidad propia para su diagnóstico completo, aunque se reconoce que los países cuentan con al menos la posibilidad de realizar diagnostico oficial a cuatro de las plagas preguntadas.

En algunos, casos, los países indicaron que se podría recurrir a otras instituciones privadas o universidades para el diagnóstico del resto de plagas, pero es preocupante que varios países de la región no cuenten con capacidad para el análisis de por lo menos seis de las diez plagas de musáceas de alto interés cuarentenario.

Esta información genera una oportunidad para que cada ONPF realice un trabajo de construcción y fortalecimiento de capacidades, aprovechando la información consignada en el presente documento, de manera que en el corto plazo se puedan tomar decisiones en conjunto con los productores, otras instituciones, OIRSA y demás actores que hacen parte de la cadena.

Junto a la capacidad para el diagnóstico confiable, se requiere disponer de infraestructura para realizar el confinamiento y cuarentena del material vegetal importado. La figura 2 muestra la situación actual de las instalaciones, en las cuales se podrían aplicar las medidas de bioseguridad para la introducción y movimiento de material de propagación de musáceas.

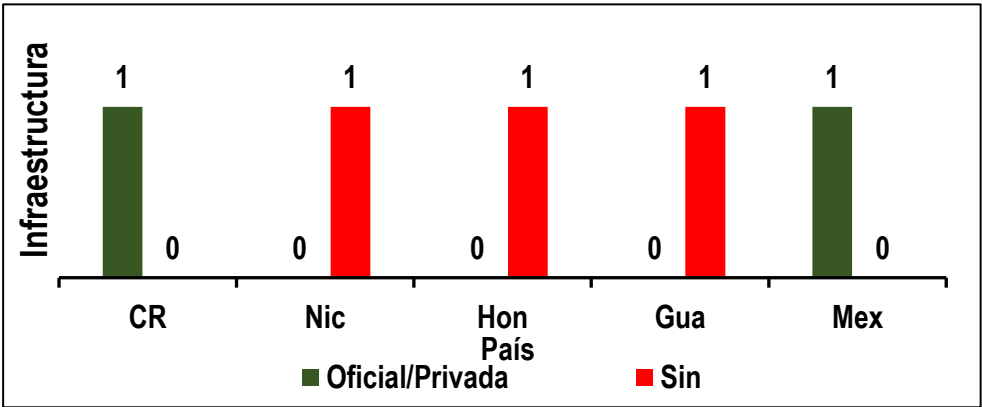


Figura 2. Infraestructura (instalaciones de confinamiento) para realizar cuarentena a germoplasma y material de propagación de musáceas importado.

Con esta información, se da soporte a la pertinencia de abordar en este documento, de manera detallada, los requisitos y normas estructurales de las instalaciones de contención, a fin de apoyar a las ONPF que a bien lo consideren, para asegurar este propósito.

Algunos países cuentan con instalaciones propias, bajo operación y supervisión de los profesionales de la ONPF. Varios países tendrían la

posibilidad de acceder a instalaciones de contención no oficiales. Se sugiere en función de la optimización de recursos, la posibilidad de explorar para los demás países de la región, mecanismos de cooperación para la habilitación de infraestructura de cuarentena con instituciones de investigación o docencia, que posean capacidades certificadas para cumplimentar los requisitos y protocolos oficiales de la contención de agentes biológicos, la bioseguridad de las estructuras y operaciones y el diagnóstico de las plagas eventuales que presenten los materiales, bajo la supervisión de la ONPF del país.

2. Normas de medidas fitosanitarias actuales

Luego del primer registro en Colombia del *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical en plantaciones de banano Cavendish, en agosto de 2019, FAO, OIRSA, Comunidad Andina y las ONPF mantienen un trabajo sostenido para revisar y actualizar las regulaciones cuarentenarias como soporte y primera línea de defensa del estatus fitosanitario de los países.

Gracias a OIRSA y al apoyo de los países, se incluyen anotaciones sobre el marco regulatorio vigente relacionado y se incluye la referencia de la regulación más reciente adoptada por Colombia. Es recomendable que los ajustes, mejoras y decisiones internas de cada país, se fundamenten en mecanismos bioseguros para el ingreso de material vegetal y germoplasma, para beneficio de miles de productores de musáceas que son el soporte de la seguridad alimentaria y de la industria.

Es claro, que las atribuciones para validar requisitos de importación son de exclusiva competencia de la ONPF. En este sentido, la Mesa Técnica de Sanidad Vegetal ha solicitado al OIRSA elaborar un protocolo regional de importación de materiales de propagación de Banano proveniente de países con reporte de Foc R4T, validado por el Comando Fitosanitario del OIRSA y posteriormente socializado en los países para su posible adopción.

Por tanto, este documento ha considerado los resultados del Análisis de Riesgo de Plagas para *Fusarium* R4T y su contenido se deja a disposición de las ONPF.

OIRSA también reafirma la necesidad de contar con medidas y documentos armonizados con las normas internacionales de medidas fitosanitarias (NIMF) de la CIPF/FAO, tales como las NIMF: 1. Principios fitosanitarios para la protección de las plantas y la aplicación de medidas fitosanitarias en el comercio internacional; 7. Sistema de certificación fitosanitaria (2006); 20. Directrices sobre un sistema fitosanitario de reglamentación de importaciones (2017); 31 Metodologías para muestreo de envíos (2008); 32. Categorización de productos según su riesgo de plagas (2009); 34. Estructura y operación de estaciones de cuarentena postentrada para plantas (2010) y 40. Movimiento de medios de crecimiento en asociación

con plantas para plantación o material vegetal propagativo (2017), principalmente.

3. Acciones para la exclusión de plagas cuarentenarias y endémicas ligadas al movimiento de germoplasma.

Movimiento internacional de germoplasma.

Los principales aspectos a tener en cuenta son:

- Niveles de riesgo de acuerdo a las fuentes del germoplasma: El germoplasma debe de ser obtenido de las fuentes más seguras posibles (Thomas, 2015). Las fuentes más seguras son las colecciones de musáceas de los Institutos Internacionales del consorcio de centros de investigación agrícola (CGIAR). Por ejemplo, existe una colección en el Centro Internacional de Tránsito de Bioversity (ITC), donde puede obtenerse germoplasma seguro mediante solicitud en línea (<http://www.crop-diversity.org/banana>).
- Lo idóneo es que todo el germoplasma que se mueva de un continente a otro transite por ITC o por una estación de cuarentena intermedia, preferiblemente de un país no bananero, donde sea inspeccionado para su sanidad. Otras fuentes de germoplasma seguro son las Instituciones de Investigación Internacionales y Nacionales con programas genéticos de musáceas que cuenten con instalaciones de bioseguridad para el confinamiento de plantas sanas donantes o colecciones de germoplasma en cultivo de tejidos indexados, y laboratorios con capacidad de diagnóstico fitopatológico para todo el rango completo de virus y otros patógenos de las musáceas y que estén reconocidos por las ONPF, que sirvan como soporte científico y técnico para la emisión de los certificados fitosanitarios de la sanidad del material.
- Idealmente, el germoplasma debe moverse en forma de cultivo de tejidos, obtenidos a partir de materiales donantes que hayan sido mantenidos en confinamiento estricto o en una instalación de cuarentena de post entrada, hasta su implantación en cultivos de tejidos y cuya sanidad ha sido certificada mediante los protocolos de diagnóstico reconocidos internacionalmente para cada uno de los patógenos existentes en el país de origen, que potencialmente puedan transferirse en el material de propagación.
- De estos materiales, eventualmente pueden obtenerse semillas agámicas libres de plagas reglamentadas, para hacer pequeñas introducciones de nuevas variedades, las cuales deben ser

establecidas en instalaciones con confinamiento en unidades de post entrada, para su estudio en el país de destino hasta su liberación segura.

- El movimiento del germoplasma debe ser cuidadosamente planeado y consultado con las autoridades de cuarentena y los laboratorios de diagnóstico y debe cumplir con los requerimientos regulatorios del país importador y de OIRSA.
- Un importante y deseable paso en el proceso de importación de germoplasma, es la visita al país de origen del germoplasma (sitio de producción y los laboratorios) por los inspectores de la ONPF del país importador o el OIRSA, para verificar la sanidad de los materiales de origen, las condiciones de bioseguridad de las instalaciones donde se producen, la observancia de las mejores prácticas para su multiplicación diagnóstico y la verificación e inspección del cumplimiento de las medidas hasta la certificación y liberación del material para ser exportadas. Se incluye una guía de referencia para la visita a las instalaciones de contención y multiplicación del material (ver acápite 6 del presente protocolo).
- Es imperativo que el germoplasma sea muestreado y analizado para todos los virus y bacterias conocidos y los patógenos transmisibles en semillas, que afectan *Musa*, de acuerdo a los protocolos descritos en las guías de intercambio seguro de germoplasma de *Musa* de Bioversity International y/o en los protocolos reconocidos en este documento. En algunas ocasiones pueden ser omitidos los ensayos diagnósticos de aquellos patógenos de los cuales existe una evidencia confiable que no están presentes en el país de origen.
- El germoplasma, debe estar acompañado de un certificado fitosanitario. La ONPF del país importador, establecerá previamente los requisitos de importación para la introducción de materiales de propagación de musáceas de acuerdo al ARP para este fin realizada en el país y el OIRSA. La ONPF del país de origen de los materiales, debe emitir el certificado fitosanitario de la sanidad de todo el germoplasma a exportar, de acuerdo a lo establecido en la NIMF 12 (2017), detallando el cumplimiento de los requisitos establecidos por la ONPF del país importador. Se recomienda llegar a acuerdos con las autoridades de origen para que se incluyan los procedimientos y protocolos utilizados para el análisis de los materiales. Si la información requerida para diligenciar los certificados fitosanitarios sobrepasa el espacio disponible en el formulario del certificado, se podrá agregar un adjunto el cual deberá complementar los requisitos establecidos en el acápite 1.3 de la NIMF 12, en relación a los adjuntos de los certificados. Los embalajes deben estar libres de insectos vivos.

- A su llegada al país importador, los inspectores en punto de ingreso de la ONPF, deben verificar: a) el estado del embalaje **del envío para descartar presencia** de artrópodos u otras plagas del país de origen ajenas al objeto de la importación y b) el cumplimiento de las condiciones que establece y ampara el certificado fitosanitario del país exportador de acuerdo a los requisitos solicitados en el permiso de importación del país importador. Esta primera inspección debe realizarse en una instalación y después realizarse en una instalación autorizada, que garantice la bioseguridad y el confinamiento/erradicación o supresión de cualquier plaga acompañante al envío de acuerdo a lo establecido en el acápite relativo a las instalaciones de contención de postentrada de cuarentena y las recomendaciones en relación a la apertura de los embalajes.
- En el caso de importaciones de volúmenes de plantas de cultivo de tejidos para la plantación a escala comercial, **debe ser considerado por la ONPF:**
 - Indexar una muestra al azar de plántulas del lote mediante cualquiera de las variantes de PCR o qPCR, de acuerdo a los protocolos establecidos en el presente documento.
 - Las plantas serán establecidas en viveros autorizados confinados con regulaciones cuarentenarias por la ONPF durante 45-60 días, para dar oportunidad a la replicación eventual de un patógeno potencial presente y serán sometidas a monitoreo de la presencia de síntomas e indexado de nuevo mediante ELISA o PCR de una muestra representativa de la mayor parte del material. Si el material es encontrado sin presencia de los organismos regulados, se procede a la certificación de la sanidad fitosanitaria y registro y a la liberación definitiva del cargamento.
- En todos los casos, las áreas alrededor de las instalaciones de contención, deben ser inspeccionadas para detectar posibles escapes de los patógenos potenciales a estar presentes en las mismas, tal como es indicado en este documento.

Movimiento local de germoplasma y material de plantación.

En el caso de tener que mover materiales de propagación de sitios presencia de patógenos listados en la lista A2 de plagas reguladas que están confinadas en una región específica del país, las medidas a tomar son similares a las del movimiento de germoplasma internacional:

- Deben estar acompañadas de una certificación de su sanidad y un certificado de libre tránsito hacia el destino solicitado. El material

debe estar sometido a inspección por la ONPF e indexados contra las principales plagas y patógenos del país.

- Idealmente, el germoplasma debe moverse en forma de cultivo de tejidos, obtenidos a partir de materiales donantes que hayan sido mantenidos en confinamiento estricto o en una instalación con facilidades para bioseguridad, hasta su implantación en cultivos de tejidos y cuya sanidad ha sido certificada mediante los protocolos de diagnóstico reconocidos por la ONPF para cada uno de los patógenos existentes en el país, que potencialmente puedan transferirse en el material de propagación.
- En el caso de material de plantación procedente de regiones con presencia de plagas endémicas y que requiera ser utilizado como material de plantación rizomas, hijuelos y yemas, estas deben proceder de plantas de bancos de semilla que sean sometidos a inspección sistemática.
- Previo al saque de la semilla, se realizará un muestreo y diagnóstico para plagas de artrópodos, hongos, procariotes, virus y nematodos presentes.
- Los materiales una vez certificada su sanidad y ser extraídos de las plantas donantes, serán sometidos a la eliminación de las hojas y suelo, al mondado los rizomas para eliminar raíces y necrosis de nemátodos y túneles por insectos y se tratarán con insecticidas sistémicos y nematicidas de acuerdo a las normativas de ingredientes activos de la ONPF. Una vez tratados serán colocados sobre carpas limpias para evitar la contaminación de nuevo con suelo.
- Los transportes en que se moverán los materiales deben estar limpios, libres de residuos de plantas y suelo y la cama donde se depositará el material de propagación deberán ser tratados con un amonio cuaternario. Los transportes que mueven el material de plantación deben ser sometidos a un certificado de libre tránsito que certifique los procedimientos realizados.
- Una vez en el destino de acuerdo a las características del material pueden ser sometidos a diferentes procedimientos previo a la siembra en función del tipo de material de que se trate:
 - En el caso de yemas para establecer viveros pueden ser plantadas en una casa de vegetación para tratamiento térmico para eliminar presencia de virus.

4. Procedimientos de contención y manipulación del germoplasma

Los materiales importados deben disponer de un certificado de sanidad de acuerdo al acápite 5 y se procederá en función de su volumen de la siguiente forma:

- a) si es una pequeña introducción de meristemos de los genotipos, serán mantenidos en laboratorios con CAB International y condiciones de bioseguridad, así como con las limitaciones de acceso de acuerdo a lo establecido en los requisitos y normas descritas en el acápite 7 del presente protocolo;
- b) si son plantas de cultivo de tejidos enraizadas libres de suelo y se dispone de diagnóstico molecular, serán establecidas en contenedores con sustrato libre de patógenos y en condiciones de contención para proceder a su indexación contra patógenos.

Infraestructura para el confinamiento y aislamiento de los materiales importados

Los requisitos y normas de las instalaciones de contención que se describen a continuación, han sido tomados de las guías de USDA-APHIS “Containment Guidelines for Plant Pathogenic Bacteria [Including Mycoplasmas, Spiroplasmas, (2010a)]” y USDA-APHIS Containment Guidelines for Viral Plant Pathogenic and its vectors (2010b)”. Los requisitos están divididos en: I. Normas y recomendaciones estructurales de la instalación, II. Normas y recomendaciones para el equipamiento y III. Normas operacionales de la instalación de contención.

4.1 Requisitos y normas estructurales de las instalaciones de contención.

- a. *La instalación debe estar localizada en un área de mínimo riesgo, agrícola y ambiental. Identificar la instalación con sus objetivos y condiciones de seguridad.*
 1. La instalación debe estar localizada en zonas libres de agricultura, de microclimas de alto riesgo, (ej. zonas conocidas que se inundan) u otras áreas de riesgo.
 2. Si es posible, diseñar la estructura de contención como una estructura separada especializada. Si no es posible, el diseño de construcción tiene que contemplar prevenir el escape de plagas.

3. Instalar una banda tampón de 5 m de ancho desde el cimiento, de gravilla o pavimento y rodeando toda la instalación.
4. Construir una cerca de 2 m de alto alrededor de la instalación.
5. En la entrada principal poner una señalización:
 - Director de la instalación/ nombre del oficial a cargo y número de contacto.
 - Una señalización que declare, “ACCESO SOLO DE PERSONAL AUTORIZADO”.
 - Números telefónicos de contacto para un caso de emergencia.

b. Diseñar el piso para prevenir el escape del o de los organismos en contención.

La instalación debe poseer:

1. Una entrada/salida principal.
2. Un vestíbulo para salida de emergencias.
3. Lavatorios fuera del área de contención.
4. Oficinas fuera del área de contención.
5. Puertas de cierre automático a través de la estructura de contención. Puertas exteriores que tengan cierres.
6. Un closet central para los útiles de limpieza.
7. Presión negativa de aire en toda la instalación de contención. Puede requerirse para bacterias.
8. Movimiento del aire desde las áreas de menos riesgo a las de más riesgo.

c. Las paredes, techos y pisos deben ser impenetrables por los organismos en contención y que resistan lavado repetido y descontaminación.

1. Es preferible pisos monolíticos (ej. concreto, losas de asfalto, pinturas resistentes a químicos). No son aceptables pisos de madera.
2. Debe poseer drenajes en el suelo para coleccionar desechos líquidos para su esterilización.
3. Sellar juntas, huecos o penetraciones de las paredes, techos, y pisos mediante yeso, enmasillado, o materiales equivalentes.
4. No son aceptables techos suspendidos.

d. Si se requieren ventanas, instalar ventanas impenetrables para los organismos en contención.

1. Las puertas deben ser de cristal resistente a las rupturas (Plexiglás, Lexan, etc.).
2. Debe poseer ventanas que no abren.
3. Las uniones entre ventanas, marcos, etc. y el piso deben estar selladas con materiales apropiados.
4. Es recomendable disponer de paneles transparentes extra, para un caso de emergencia.

e. Instalar puertas que contribuyan a la seguridad de la instalación.

1. Disponer de puertas de acero auto-cerrables con cierres magnéticos, a través de las estructuras de contención.
2. Disponer de puertas exteriores.
3. La estructura debe poseer umbrales y cierres que sellen las puertas y sus marcos por el exterior e interior. El espacio entre el sello y el marco de la puerta no debe exceder de 6.3 mm
4. Puertas de emergencia
 - Disponer de carteles en el exterior e interior de las puertas de emergencia que anuncien la ONPF.
 - En la instalación de confinamiento - Solamente Salida.
 - Garantizar que las puertas de emergencia no se utilicen como entrada. (eliminar las agarraderas exteriores, y usar puertas con las bisagras por su interior, etc.).
 - Disponer de alarmas audibles que se puedan activar cuando una puerta de emergencia sea abierta.

f. Instalación de un Sistema de CVAc (Calor, Ventilación y Aire Acondicionado) que prevenga el escape de los organismos sometidos a confinamiento.

1. Disponer, si es posible, un sistema CVAc dedicado al área de confinamiento. Si no es posible, se deben instalar filtros para prevenir el escape de las áreas de confinamiento y de las áreas o edificios fuera de la estructura de contención.
2. Disponer de filtros de evacuación que prevengan el escape de esporas bacterianas.

3. Asegurar que el aire se mueva de afuera hacia adentro cuando las puertas se abran.
4. El movimiento del aire debe ser de las áreas de menor riesgo a las de mayor riesgo. Instalar equipos que garanticen la dirección del aire.
5. Las conexiones de los ductos de aire deben estar selladas mediante calafateo o enmasilladas. Las ventanas deben estar selladas mediante enmasillado o calafateadas.
6. El Sistema de CVAc debe disponer de filtros y mallas que sean de fácil limpieza, descontaminación y reemplazo.
7. Instalar filtros en tándem, de forma que una parte del conducto de ventilación y su filtro pueda ser limpiado mientras que el otro suministra el aire.

g. El diseño del sistema de instalación eléctrica debe garantizar las condiciones del confinamiento bajo situaciones normales y de emergencia y que sea impenetrable para los organismos en confinamiento.

1. Si la instalación requiere presión de aire negativa, debe instalarse una alarma que indique el fallo de energía.
2. Si la instalación funciona con presión negativa para contener la dispersión de esporas bacterianas, debe contar con una fuente alterna de energía (generador, banco de baterías, etc.), que se empleará si la fuente de energía normal se rompe o interrumpe su funcionamiento.
3. Las instalaciones de las cajas eléctricas, receptáculos, luces, interruptores, etc. deben estar selladas a prueba de agua. El material para sellar (enmasillado, espuma, etc.), debe garantizar que las cajas, luces, alambres, conductores, etc., sean impenetrables por los organismos en confinamiento y resistir lavados repetidos y descontaminaciones con cloro u otras soluciones causticas.

h. Existencia de un sistema de plomería que mantenga la contención y permita la eliminación de residuos líquidos.

1. Las cloacas y drenajes deben estar sellados (lavabos, piso, duchas, etc.) y disponer de una instalación para coleccionar los efluentes y para su esterilización.
2. Los efluentes de los lavabos, piso y drenajes, etc. deben esterilizarse con vapor o su equivalente antes de liberarlos al sistema de alcantarillado.

3. Los respiraderos o rejillas del alcantarillado deben disponer de filtros para prevenir el escape de células bacterianas.
- i. *La instalación debe disponer de un sistema de vacío para la limpieza, que prevenga el escape de los organismos en contención.*
1. Usar los equipos de vacío solo dentro de la instalación.
 2. Los filtros y la basura deben ser autoclavados antes de ser eliminados y desechados.
- j. *La instalación debe disponer de un sistema de comunicación que permita intercambio de información entre el interior y el exterior de la instalación y la prevención del escape de organismos.*
1. Si la instalación de confinamiento es independiente de las demás instalaciones de la institución, debe disponer de un teléfono o extensión telefónica o sistema de intercomunicadores.
 2. Disponer de un (LAN, modem, etc.) o Fax para permitir la comunicación y transferencia de datos desde y hacia la instalación.
- k. *La construcción de la casa de vegetación debe tener seguridad y poseer medidas de contención.*
1. Los cimientos deben ser de concreto, bloques de concreto, ladrillos o de un material similar.
 2. Extender los cimientos por debajo de la línea del suelo para asegurar una estructura permanente y estable y construirlos hasta 1 m por encima de la línea del suelo.
 3. Los pisos de la casa de vegetación deben ser de materiales que sean impermeables (no porosos) que resistan desinfección repetida con líquidos cáusticos.
 4. La armadura de la casa debe ser suficientemente fuerte para soportar las paredes y cobertura translúcidas.
 5. Las paredes y techos translúcidos deben ser de un material suficientemente fuerte para garantizar la seguridad de la instalación. Son aceptables el Plexiglás, Lucita, lexon, cristal de seguridad y el cristal reforzado con alambre. No son aceptables el polietileno, vinyl y/o el laminado plástico.
 6. Las paredes translúcidas deben ser selladas, por la superficie interior y exterior, con un material apropiado para este fin.

7. Para evitar el daño de las granizadas es recomendable proteger el techo con una malla.
8. Es recomendable considerar la instalación de una alarma para detectar la rotura de paneles de vidrio u otras brechas de contención.
9. Sellar las juntas entre la casa de vegetación y las demás habitaciones de contención con masilla u otro material apropiado.
10. Si la casa de vegetación de confinamiento está adherida a una instalación primaria, debe de existir un vestíbulo para cada puerta (ver punto para normas de los vestíbulos).
11. La casa de vegetación debe disponer de puertas de acceso al resto de la instalación, que cierren completamente y estén selladas a su estructura.
12. Asegurar que el sistema de vacío sea equivalente en diseño y operación al utilizado en la instalación de contención primaria o principal y también que esté apagado durante las fumigaciones.
13. Si se tienen conductos de ventilación, estos deben estar cubiertos con filtros para contener la dispersión aérea de esporas. Estos deben permitir la limpieza, desinfección y reemplazo de acuerdo a la necesidad.

l. Requisitos para los vestíbulos.

1. Cada puerta de entrada o salida debe tener un vestíbulo (En las salidas de emergencia están prohibidos).
2. Las habitaciones para duchas deben contar con un vestíbulo en la entrada principal.
3. El vestíbulo debe tener al menos 2 metros de distancia entre los umbrales de las puertas.
4. El cierre de los vestíbulos debe estar sincronizado de forma que solo pueda estar abierta una puerta al mismo tiempo.
5. Asegurarse que los umbrales de las puertas y las juntas estén sellados a sus marcos.

m. Requisitos para las duchas y baños.

1. Las duchas y baños deben de estar cerca de los lugares de menos riesgo.
2. Los umbrales y las juntas de los baños deben de estar sellados con sus marcos.

4.2 Normas para el equipamiento

- a. *Uso de bancos, tablas y otros muebles que son fáciles para inspeccionar y limpiar*
 1. Las superficies de trabajo y muebles de laboratorio (bancos, etc.) deben ser impermeables al agua y resistentes a reactivos y al calor.
 2. Los espacios entre bancos, cabinas, cabinas de pared y el equipamiento deben facilitar la limpieza y la inspección
 3. Los utensilios para la limpieza (trapeadores, escobas, baldes, etc.), deben ser para el uso exclusivo en el área de la instalación de contención y almacenados dentro de esta.
- b. *Usar equipos de esterilización de los organismos en contención, suelo, material de plantas, basura sólida, o descontaminar la basura sólida y los artículos contaminados o infestados antes de sacarlos de la instalación.*
 1. Se debe disponer de una autoclave. Comprobar la eficacia de la esterilización de la autoclave al menos una vez en el año.
 2. Los efluentes de las casas de vegetación, lavaderos, drenajes y otras fuentes deben ser colectados y tratados con calor (121°C) por al menos una hora. La eficacia del Sistema debe ser comprobada en una base anual.
 3. Instalar un esterilizador de gas para artículos que se puedan dañar por vapor. Este sistema debe ser comprobado una vez al año.
 4. Si se está considerando un incinerador dentro de la instalación debe cumplir con las leyes locales y del país y las ordenanzas.
- c. *Disponer de un gabinete de Bioseguridad para trabajar con los organismos.*
 1. Utilizar un gabinete de Bioseguridad Clase II, tipo A/B3, para abrir los paquetes provenientes del extranjero. Estos deben certificarse anualmente por un profesional licenciado

4.3 Requisitos y normas operacionales.

- a. *Nombrar un Director de Operaciones responsable de la operación diaria de la instalación y de su integridad física.*

Debe existir un oficial responsable de los organismos sometidos a contención en la instalación. Este debe mantener una copia del

Manual de las Normas y Procedimientos de Operación (MPNOs) de la instalación. Este MPNOs contiene las directivas de uso, mantenimiento y desinfección de la instalación y su equipamiento.

El MPNOs debe también describir como:

- Responder a un evento típico de emergencia en el área de contención (corte de energía, fuego, ruptura de vidrios, inundaciones, huracanes, temblores de tierra, tornados, etc.). La bioseguridad de un movimiento no autorizado de materiales desde el área de contención.
- Reemplazar los paneles traslúcidos en el invernadero.
- Monitoreo y registro de visitantes.

Deben existir copias de los MPNOs asequibles para los trabajadores dentro del área de confinamiento. Cada revisión debe ser actualizada. El MPNOs debe ser revisado cuando se implemente un cambio de procedimientos y debe ser chequeado regularmente para conocer si es necesario realizar una revisión. Las revisiones del MPNOs deben ser enviadas al personal de la instalación de contención.

El Oficial Responsable de Contención es el encargado de:

1. Implementar el MPNOs y las condiciones listadas en los permisos para los organismos mantenidos en la instalación.
2. Entrenar a los empleados y/o personal autorizado sobre el MPNOs.
3. Actualizar las copias de los registros de construcción (impresiones azules) de la instalación.
4. Mantener los registros diarios, semanales y mensuales de la instalación.

El oficial de Contención, también debe actualizar las siguientes listas:

- Nombres y números de personas a llamar durante la emergencia cuando ocurran cambios.
- Las especies de plantas en la instalación cuando ocurran cambios.
- Personal autorizado cuando ocurran cambios.
- Entrada y salida de embarques de organismos permitidos, incluyendo la muerte o destrucción de organismos entrantes y será el encargado de presentar esta lista al ONPF cada año, en la fecha prevista por este (ej. enero 31).

El MPNOs también debe describir los procedimientos de todas las operaciones normalizadas que se presentan a continuación:

b. Solo el personal autorizado podrá tener acceso de rutina a la instalación.

El comportamiento de las personas que entran a la instalación tendrá más impacto en el confinamiento de organismos que cualquier otro detalle o aspecto de contención. La selección del personal que trabaja en la instalación es un aspecto crítico del mantenimiento de la contención de plagas de las plantas.

Además de seleccionar un buen personal, debe considerarse:

1. Mantener cerradas todo el tiempo, todas las puertas exteriores y asegurarse de que solo el personal autorizado tiene llaves.
2. Entrenar frecuentemente al personal sobre el MPNOs.
3. Tener una lista del personal autorizado a entrar en la instalación.
4. Exigir que los visitantes se registren y firmen el diario de registro. El personal autorizado debe acompañar a los visitantes todo el tiempo, para asegurarse de que no ingresan o extraen plagas.
5. Asegurar que las puertas de salida de emergencia no son utilizadas rutinariamente como entrada.

c. Utilice y manipule vestimenta personal estéril para minimizar el riesgo de escape de organismos.

1. Los visitantes y empleados deben utilizar vestimenta de laboratorio en el área de contención y quitársela antes de abandonar la misma. Dependiendo de la naturaleza del fitopatógeno a ser contenido, puede ser apropiado utilizar cubre cabeza y cubre pies, guantes, overoles y capas.
2. Prohibir la entrada de sobretodos, capas, sombreros, mochilas, carteras, etc. en el área de contención, ya que estos artículos pueden permitir la ocultación y escape de plagas.

d. Garantizar la higiene del personal para la contención de organismos.

1. Si en la instalación existen esporas de fitopatógenos dispersables en el aire, debe asegurarse que el personal autorizado y los visitantes se bañen antes de salir de la misma.

e. Limpiar y desinfectar regularmente el interior de la instalación.

1. Limpiar y desinfectar la instalación, muebles y equipos regularmente, con cloro o un desinfectante similar.
2. Describir como cambiar los filtros de aire sin contaminar el área de contención.

3. Eliminar de la instalación, las plagas indeseables y patógenos (ej. cualquier artrópodo que pueda contener fitopatógenos)
 4. Autoclavar y esterilizar los desechos sólidos (cultivos, material de plantas, suelo, basura, etc.) antes de botarlos.
 5. Los desechos deben ser esterilizados sistemáticamente y no debe permitirse su acumulación y descomposición.
- f. *Abra y manipule paquetes de los organismos permitidos para prevenir su liberación en lugares seguros.*
1. Debe disponerse de un área cerrada fácil de desinfectar, para abrir los paquetes recibidos de fuentes en el extranjero.
 2. Coloque los paquetes de fuentes extranjeras en un gabinete de seguridad antes de abrirlo.
 3. Autoclave o incinere los materiales de empaque inmediatamente después de sacar los especímenes y cultivos.
 4. Establezca procedimientos para plagas escondidas (insectos, hongos y bacterias fitopatógenas, etc.).
- g. *Comenzar, cultivar y almacenar cultivos con tan pocos contaminantes como sea posible. Las contaminaciones cruzadas indican una pobre práctica de laboratorio. Sin embargo, esto no puede indicar problemas de liberación de la contención.*
1. Listar todas las plantas no indicadoras usadas para el cultivo de fitopatógenos.
 2. Esterilizar y destruir todos los envíos y contaminantes poco tiempo después de su recepción.
 3. Autoclavar y esterilizar los medios utilizados para mantener los organismos antes de extraerlos de la instalación de contención.
 4. Destruir los organismos contaminados tan pronto son detectados. Esto implica la destrucción de cultivos beneficiosos si en estos son encontrados patógenos.
 5. Almacenar los cultivos de tejidos en viales con tapa de rosca o equivalentes.

A continuación (Cuadro 3) se presenta una Lista de chequeo para la inspección de las instalaciones especializadas en el confinamiento de plantas:

Cuadro 3.

Lista de chequeo para la inspección de instalaciones especializadas en el confinamiento de plantas

Nombre de la entidad: _____

Edificio: _____

Fecha de la inspección_____

Inspector Líder: _____

Dirección (Calle y número): _____

Otros Inspectores: _____

Ciudad, Estado, Zip: _____

Referencia	Planteamiento/Requisito	Si	No	N/A	Comentarios
	La entidad debe desarrollar e implementar un plan escrito de bioseguridad (Biocontención) medible, con los riesgos de la introducción dado su origen e intención de uso				
	El plan debe de tener suficiente información y documentación para describir los procedimientos de bioseguridad y contención de las plagas de riesgo de entrada en el material de acuerdo a la especie de planta, tipo de material, su origen y sus características biológicas				
	Los procedimientos de biocontención deben ser suficientes para la contención de las plantas y las plagas determinadas de riesgo (ej. estructura física y características de la entidad y los procedimientos y actividades operacionales de salvaguarda).				

	Al desarrollar el plan de bio-contención la entidad consideró los documentos: 1) Robert P. Khan and S.B. Mathur eds., (1999). The Containment Facilities and Safeguards for Exotic Plant Pathogens and Pests APS; 2) USDA/APHIS. 2010. Containment Guidelines for Plant Pathogenic Bacteria (Includes Mycoplasmas, Spiroplasmas). 3) Traynor, P., Dain, A. and Irwin, R. 2001. A practical guide to containment. Greenhouse research with transgenic plants and microbes. Information systems for Biotechnology. Blackburg, Virginia. http://www.isb.vt.edu.				
	El plan debe ser revisado anualmente y actualizado según necesidad				
	Se realizan simulacros al menos anualmente para probar y evaluar la eficacia del plan.				
	El plan es ajustado y revisado según necesidad después de los simulacros y ejercicios y de cualquier incidente.				
Sección A	Locales especializados en el Confinamiento de Plantas				
APHIS/PPQ Norma: A (1)	La estructura es reforzada. Las paredes y el techo transparentes son suficientemente seguros para contener agentes patógenos y toxinas (Plexiglás, Lucita, Lexan, vidrio laminado resistente al calor, vidrio reforzado con alambre). Las láminas de polietileno y vinyl no son aceptables.				
APHIS/PPQ Norma: A (2)	Las paredes y techos están sellados (ej. masilla).				

APHIS/PPQ Norma: A (3)	Las paredes y el techo transparentes son monitoreados y/o hay alarmas para detectar roturas debido a sonido, movimiento y presión.				
APHIS/PPQ Norma: A (4)	Los pisos están contruidos de material monolítico impermeable a los líquidos.				
	El sistema de puertas instalado contribuye a la seguridad de la instalación (sistema de apertura y cierre alternativo) y hermeticidad para asegurar la contención.				
APHIS/PPQ Standard: A (11)	Las puertas y ventanas están selladas y existe control de acceso				
	El techo posee protección contra granizadas				
	La casa de vegetación cuenta con vestíbulo para cada puerta				
APHIS/PPQ Norma A (5)	Los restos de plantas (suelo y material de plantas) son colectados y tratados antes de desecharlos.				
APHIS/PPQ Standard: A (6)	Existe un sistema de plomería que mantiene la contención y los desechos de agua son colectados y tratados antes de eliminarlos. Hay drenajes en los suelos y el agua es colectada para su esterilización.				
APHIS/PPQ Standard: A (7)	Se mantiene presión negativa en la instalación para prevenir escapes de esporas				
APHIS/PPQ Standard: A (8)	Existe filtración del escape de la salida de aire				

APHIS/PPQ Standard: A (9)	El sistema de calor, ventilación y aire acondicionado tiene un back up de energía de emergencia				
APHIS/PPQ Standard: A (10)	Dispone de un sistema de humedad relativa				
	Las superficies de trabajo y muebles de laboratorio (bancos, etc.) son impermeables al agua y resistentes a reactivos y al calor. Los espacios entre bancos, cabinas, cabinas de pared y el equipamiento facilitan la limpieza y la inspección. Los utensilios para la limpieza (trapeadores, escobas, baldes, etc.), son de uso exclusivo en el área de la instalación de contención y se almacenan dentro de esta.				
Sección B	<i>Requisitos y normas operacionales</i>				
	Existe un manual de protocolos de operaciones el cual es de conocimiento de los trabajadores y revisado y actualizado una vez al año como mínimo				
	Solo el personal autorizado tiene acceso de rutina a la instalación				
	Existe control de visitantes e incidencias				
	Existe un área cerrada fácil de desinfectar, para abrir los paquetes recibidos de fuentes en el extranjero.				

5. Patógenos transmisibles en material de propagación

El conocimiento de los patógenos trasmisibles en material de propagación y su distribución mundial actual, son la base para la toma de decisiones por parte las ONPF. El cuadro 4 relaciona las enfermedades importantes de las musáceas transmitidas en material de propagación y su distribución continental.

Cuadro 4.

Enfermedades importantes de las musáceas transmitidas en material de propagación y su distribución continental (Stover, 1972; CAB International, 2007; Quito-Avila et al., 2013; Thomas, 2015; diversos autores citados en Jones, 2018).

Enfermedad	Agente Causal	Australasia/ Paófico	Europa /Medio Oriente	África/ Océano Indico	AméricaLa tina/ Caribe
Marchitez por Fusarium de los Cavendish	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> , raza 4 tropical (<i>F.</i> <i>odoratissimum</i>)	Malasia, Indonesia, Las Filipinas, R. P. China, Taiwán, Vietnam, Laos, Myanmar, India, Paquistán, Australia	Omán, Jordania , Israel, El Líbano Turquía	Mozamb ique Mayotte (O. Indico)	Colombia
Moko	<i>Ralstonia</i> <i>solanacearum</i> raza 2	Filipinas	-	Ausente	Ampliament e distribuida con excepción de Cuba y algunas islas de las Antillas Menores.
Marchitez roja del banano (Blood disease)	<i>Pseudomonas</i> <i>zyzygii</i> s.sp. <i>celebesensis</i>	Indonesia, Malasia, Papua Nueva Guinea	Ausente	Ausente	Ausente

Marchitez bacteriana del banano y Enset.	<i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>musacearum</i>	Ausente	Ausente	Etiopía, Uganda, R. del Congo, Rwanda, Kenia Tanzania, y Burundi	Ausente
Pudrición acuosa del pseudotallo y necrosis del rizoma	<i>Dickeya paradisiaca</i>	Ampliamente distribuida	Ampliamente distribuida	Ampliamente distribuida	Ampliamente distribuida
Pudrición del rizoma (Head rot)	<i>Pectobacterium carotovora</i>	Ampliamente distribuida	Ampliamente distribuida	Ampliamente distribuida	Ampliamente distribuida
Marchitez de bananos ABB asociada a fitoplasma	“Candidatus fitoplasma Asteris” del grupo 16Sr1 rDNA	Papua Nueva Guinea e Islas Salomon	-	-	-
Marchitez de los bananos (ABB), asociada a fitoplasma (BWAP)	“Candidatus Phytoplasma noviguineense”	Papua Nueva Guinea	-	-	-
Elefantiasis	“Candidatus fitoplasma Asteris”	Colombia, R. Dominicana, C. Rica, Panamá y Honduras	-	-	-
Bunchy top	<i>Banana bunchy top virus</i>	Bangladesh, Cambodia, R. P. China Taiwán y Hong Kong, Indonesia, India, Paquistán, Irán, Japón, Corea, Laos, Malasia,	-	Angola, Benín, Burundi, Camerún, Congo, Egipto, Gabón, Malawi, R. Centro	-

		Myanmar, Vietnam, Las Filipinas, Sri Lanka, Australia, Fiji, Guam, Kiribati, Islas Marianas, Nueva Caledonia, Samoa, Tahití, Tonga, Tuvalu, Hawái, Samoa Americana, Islas Wallis		Africana , Mozambique, Nigeria, A. del Sur, Zambia.	
Mosaico de la bráctea	<i>Banana bract potyvirus</i>	Las Filipinas, India, Sri Lanka, Vietnam, Tailandia, Hawái. Samoa occidental Taiwán	+	-	Ecuador, Colombia
Banana streak virus	<i>Banana Streak badnavirus complex</i>	Ampliamente distribuido en todos los países.			
Mosaico del banano	<i>Cucumber mosaic cucumovirus</i>	Ampliamente distribuido en todos los países			
Banana virus X	<i>Banana X betaflexiviridae virus</i>	-	-	-	Guadalup e
Mosaico suave del banano	<i>Banana mild mosaic betaflexiviridae virus</i>	Probablemente ampliamente distribuido en todos los países según (Thomas, 2015; De Clerck <i>et al.</i> , 2017; Thomas <i>et al</i> ; 2018b).			

– Sin reportes o ausente

En el cuadro 5 se listan los principales patógenos trasmisibles en diferentes estructuras de la planta.

Cuadro 5.

Posibilidad de transmisión de los patógenos que causan enfermedades en varios tipos de materiales de musáceas.

Enfermedad	Hijos con hojas	Cormos, o fragmentos de cormos	Cultivo de tejido	Semillas	Hojas utilizadas para empaquetar alimentos o como decoración	Frutos
Marchitez por Fusarium	X	X	-	-	X	-
<i>Ralstonia solanacearum</i>	X	X	X	-	X	-
Marchitez roja del banano (Blood disease)	X	X	X	-	X	-
Marchitez bacteriana por <i>X. vasicola</i> pv <i>musacearum</i>	X	X	X	-	X	-
Pudrición del pseudotallo y del rizoma	X	X	X		X	-
Pudrición húmeda del rizoma						
Bunchy top			X	-	X	?
Banana streak <i>Banana streak virus</i>	X	X	X	X	X	?
Mosaico del banano	X	X	X	X	X	?
Mosaico de la bráctea	X	X	X	-	X	?
Mosaico suave del banano						
Banana virus X	X	X	X	X	X	?

5.1. Virus que pueden transmitirse en germoplasma

Los virus son los principales patógenos que se distribuyen en el germoplasma de *Musa in vitro* (Thomas, 2015). Tres de los virus identificados hasta el presente en el Caribe se encuentran probablemente presentes en todos los países productores de bananos y plátanos (Stover, 1972; Jones, 2013; Thomas 2015; Pérez-Vicente *et al.*; 2020): el complejo de los virus del rayado del banano (*Banana streak virus*, BSV; *Caulimoviridae*, *Badnavirus*), el mosaico del banano (*Cucumber mosaic virus*, CMV; *Bromoviridae*, *Cucumovirus*) y el virus del mosaico suave del banano (*Banana mild mosaic virus*, BanMMV; *Betaflexiviridae*), se encuentran distribuidos en colecciones de germoplasma de *Musa in vitro* e *in vivo* (Thomas, 2015). El Banana virus X, (también de la familia *Betaflexiviridae*), ha sido informado en Guadalupe en forma de infecciones asintomáticas en algunos cultivares (Teycheney *et al.*, 2005). El *Banana bunchy top virus* (BBTV; *Babuvirus*, *Nanoviridae*) y el *Banana bract mosaic virus* (BBrMV; *Potivirus*, *Potyviridae*), no están presentes en la región, pero sus áfidos vectores responsables de su transmisión *Pentalonia nigronervosa* (en el caso del BBTV) y *Aphis gossypii* y *Rhopalosiphum maidis*, vectores del CMV y el BanMMV, son endémicos (Pérez-Vicente *et al.*, 2020).

A continuación, se describen las principales enfermedades por virus transmitidos en material de plantación:

5.1.1. El bunchy top del banano causada por el *Banana bunchy top virus* (BBTV).

La enfermedad del bunchy top del banano (cogollo arrepollado), ha sido consistentemente asociado al *Banana bunchy top virus* (BBTV, género *Babuvirus*, familia *Nanoviridae*) y es ampliamente considerada como la enfermedad viral más importante de las musáceas por las grandes pérdidas que ha causado donde está presente (Kumar *et al.*, 2015; Ploetz *et al.*, 2015; Thomas, 2018). La enfermedad fue primeramente informada en Fiji por Maggee in 1887 y se considera que pudo estar presente desde 1879 (Thomas, 2018). En el presente, el BBTV está presente en 36 países de África, Asia y Oceanía (Blomme *et al.*, 2013; Diekmann y Putter, 1996; Jones, 2013; Kumar *et al.*, 2015). Excepto para Hawái (USA), no existen registros de BBTV en el nuevo mundo. Lo brotes de BBTV en varios países han causado reducciones severas de la productividad (Kumar *et al.*, 2015). La primera epidemia de BBTV re-gistrada en Cavendish en Fiji, redujo la producción de 788,000 a 114,000 racimos al final del siglo XIX; en Australia destruyó 90% de la cosecha de Queensland and Nueva Gales del Sur en 1920 según Fist en 1970; en Tamil - Nadú en la India, redujo el área de producción de un clon del subgrupo Pome, (AAB), de 18,000 a 2000 ha previo a 1980 y más recientemente causó pérdidas de 50 millones de USD anuales en los estados de Andhra Pradesh y Maharashtra.

Aunque no se ha demostrado de forma inequívoca que el *Banana bunchy top virus* es el agente causal, los anticuerpos policlonales y monoclonales producidos contra el virus y los ácidos nucleicos, reaccionan con extractos de plantas enfermas indicando que están involucradas en la

etiología (Thomas & Dietzgen, 1991; Thomas, 2018). Las partículas virales obtenidas de plantas enfermas son icosaédricas, tienen 18-20 nm de diámetro y consisten en una cobertura de proteínas de 20.5 KDa y un DNA de cadena simple de 1 kb. El virus está compuesto de 6 componentes DNA, cada uno de 1000-1100 nucleótidos de largo (Thomas, 2018).

La sintomatología ha sido descrita por diferentes autores (Dietmann y Putter, 1999; Kumar *et al.*, 2015; Thomas, 2015 y 2018 entre otros). Los síntomas de la enfermedad son muy particulares y se distinguen rápidamente de los causados por otros virus del banano, con excepción de los causados por el *Abaca bunchy top virus* (ABTV). La infección puede ocurrir en cualquier momento del desarrollo de las plantas y existen algunas diferencias iniciales entre los síntomas producidos por la transmisión por áfidos, de los encontrados en plantas provenientes de material de plantación infectado. En las plantas inoculadas con áfidos, usualmente los síntomas comienzan por el envés la segunda hoja que emerge después de la inoculación consistente en algunas rayas verde oscuras o puntos (como un código Morse) en las venas secundarias de la lámina de las hojas. Estas rayas forman ganchos cuando se introducen en la nervadura central de la hoja (figura 3), las cuales son más evidentes al mirarlas a trasluz. Este punteado puede ser a veces evidente en el peciolo y las vainas de las hojas. La hoja siguiente que emerge puede tener rayas blanquecinas en las venas secundarias estando aún enrolladas, las que se tornan verde oscuras según la hoja se expande. Las hojas sucesivas que emergen son más cortas tanto de largo como de ancho, se desarrollan más erectas de lo normal tienen una apariencia ondulada y pueden tener los márgenes amarillos. Hay una progresiva producción de hojas más cortas, estrechas, duras y de forma de cepillo que se arraciman en el extremo de la planta y le da el nombre a la enfermedad. Los hijos de los plantones infectados muestran síntomas severos al emerger las primeras hojas y pueden igualmente tener hojas en forma de roseta y rayas verdes oscuras en la lámina de las hojas. Los hijos que emergen de clones susceptibles infectados en una etapa muy temprana presentan un enanismo severo.

Las plantas infectadas producen pequeños racimos después de la infección y no fructifican en los años siguientes. En las plantas infectadas tardíamente en el ciclo de desarrollo, los síntomas pueden ser solamente la aparición de rayas oscuras en el extremo de las brácteas florales o la aparición de racimos pequeños y deformados (Kumar *et al.*, 2015).

Los síntomas en abacá incluyen la reducción de la lámina de la hoja y el desarrollo de la apariencia arracimada de las hojas en la planta el encrespamiento hacia arriba y la amarillez de las hojas (Thomas, 2018).

En Taiwán se informan diferentes razas del virus (Su *et al.*, 1993; Dr. Chin Ping Chao, Taiwán Banana Research Institute, comunicación personal). Hay razas suaves que producen solo un aclaramiento de las venas y el moteado de rayas verdes oscuras. Los síntomas de rayas en

peciolos y hojas característicos de la enfermedad, pueden ser raros o estar ausentes. Han sido descritos dos grupos de aislamientos del virus en función de las diferencias de las secuencias de nucleótidos, pero no de los síntomas que expresan (Thomas, 2018): el “grupo del Pacífico Sur” (Australia, Islas del Pacífico, África y Sur de Asia (incluyendo a Myanmar), y el “grupo de Asia” (aislamientos del sur de China, Taiwán y Japón).

La transmisión del virus ocurre mediante: i) los áfidos vectores *Pentalonia nigronervosa* y *P. caladii* (Thomas, 2015); el primero ampliamente distribuido a nivel mundial y en las Américas y ii) mediante el movimiento de material vegetativo infectado, pero no por inoculación mecánica.

Pentalonia nigronervosa Coquerel se encuentra ampliamente distribuido en regiones tropicales y subtropicales del mundo América Central y el Caribe (Schmutterer, 1990, CAB International, 2007, Cubillo, 2013). Es una plaga nativa de Asia introducida a América y Europa con el banano. El insecto se desarrolla bajo la base del pseudotallo del banano y por debajo de algunos cm del nivel del suelo donde puede realizar hasta 25 generaciones por año; puede atacar guineo, *M. textilis*, yautía o malanga, jengibre, cardamomo, y otras plantas de las familias Musaceae, Araceae y Zingiberaceae (Schmutterer, 1990; Thomas, 2018). Se informa que *P. caladii* es vector principalmente en miembros de la familia Zingiberaceae (Thomas, 2018). La transmisión del BBTv es principalmente del tipo circulativo no propagativo con períodos de adquisición mínimo de 4h 17 min, con un período mínimo de inoculación de 15 min – 2h y una retención del virus de 13 días (Thomas, 2018). No hay evidencias de su transmisión a la descendencia partenogenética ni de la multiplicación del virus en el áfido y la eficiencia de la transmisión es de un 46-60%. El virus no se desarrolla en hojas emitidas antes de la transmisión por el insecto (Thomas, 2015). La temperatura tiene un efecto en la transmisión siendo mayor a 25-30°C que a 10-16°C (Thomas, 2018). El insecto puede transmitir el virus de plantas aplicadas con glifosato que no han muerto por más de y secado totalmente por más de 30 días, por lo que se recomienda en la erradicación de plantas enfermas, utilizar un insecticida nicotinoide (Thomas, *et al.*, 2013).

Después de la inoculación por el áfido, los síntomas no aparecen generalmente hasta después de la aparición de tres o más hojas, período que puede variar entre 19 y 125 días en los subtrópicos (Thomas *et al.*, 2013). Drew *et al.*, (1989) demostraron que el BBTv es transmisible a través del cultivo de tejidos y que virus puede permanecer en plantas asintomáticas durante 16 meses en el cultivo de tejidos sin mostrar diferencias con plantas sanas. Estas plantas un mes después de la plantación en invernadero, empezaron a mostrar síntomas típicos de la enfermedad y cinco meses después tenían 72% de plantas infectadas. La transmisión en plantas de cultivo tejido tiene una gran importancia para la diseminación del patógeno en germoplasma. No hay evidencias de inmunidad natural al BBTv, pero las especies y cultivares difieren marcadamente en la expresión de síntomas y se ha notado que la susceptibilidad de muchos cultivares con genoma B es

menor (Thomas, 2019). Hay evidencias de otros hospedantes (consultar Thomas, 2019).

La detección del BBTV puede ser llevada a cabo mediante serología por ELISA con anticuerpos monoclonales o policlonales y por diferentes variantes de PCR con cebadores específicos para el virus (ver diagnóstico de BBTV en acápite 8).

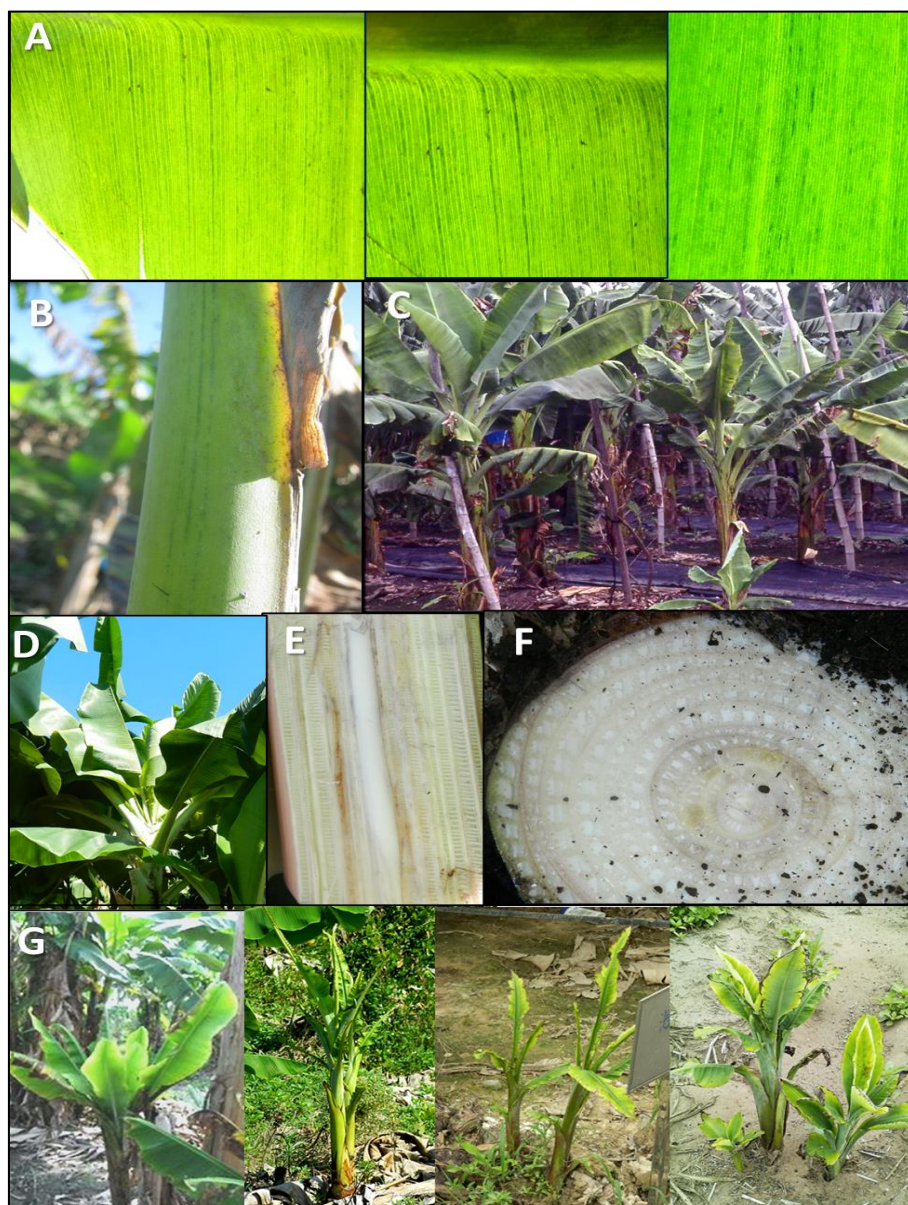


Figura 3. Síntomas de la enfermedad del cogollo arrepollado causada por el *Banana bunchy top virus* (BBTV): A) Síntomas de rayas largas y cortas (código Morse) y ganchos (en la nervadura central) en el envés de la primera y segunda hoja más joven abierta; B) rayas verdes oscuras en el peciolo de las hojas en Cavendish; C) plantas sanas y afectadas de Cavendish gigante en Taiwán; D) planta afectada por infección secundaria transmitida por áfidos (notar arrepollamiento de las hojas más jóvenes en Cavendish gigante; Davao, Filipinas); E) Tejidos

pardos en el interior del pseudotallo sección longitudinal; F) ídem E) en sección transversal; G) Rebrotos de plantas infectadas por BBTv de Taiwán, Filipinas y China (Fotos: A-B, D-E-F-G de L. Pérez-Vicente de Davao, Filipinas; C, cortesía del Dr. C.P. Chao.

5.1.2. Rayado del banano causado por el complejo de especies del *Banana streak virus* (BSV).

El BSV es un complejo heterogéneo de especies de badnavirus que causan el rayado del banano y son los virus de las musáceas más distribuidos a nivel mundial (Bhat *et al.* 2016; Iskra-Caruana *et al.* 2018; Kumar, 2015; Pérez-Vicente *et al.* 2020). Los BSVs son pararetrovirus que pertenecen al género *Badnavirus*, familia *Caulimoviridae*. Las partículas virales son de forma baciliforme (120–150_30 nm), de genoma de DNA circular de doble cadena cerrada no-covalente (dsDNA), de aproximadamente 7.2–7.8 kb de largo, que usa para su replicación una transcriptasa reversa (RT) codificada en el virus (Kumar *et al.*, 2015).

Harper y Hull (1998) fueron los primeros en describir la estructura del genoma del virus el cual nombraron Banana streak Obino l'Ewai virus (BSOLV). Dentro del complejo del BSV, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (International Committee of taxonomy of viruses; ICTV), reconoce nueve especies (King *et al.* 2011; Adams *et al.* 2015). Estos son: *Banana streak OL virus* (BSOLV), *Banana streak Mysore virus* (BSMYV), *Banana streak GF virus* (BSGFV), *Banana streak VN virus* (BSVNV), *Banana streak IM virus* (BSIMV), *Banana streak UA virus*, *Banana streak UI virus*, *Banana streak UL virus* y *Banana streak UM virus*. Los genomas de las especies *Banana streak CA virus* (BSCAV), *Banana streak UJ virus* (BSUJV), *Banana streak UK virus*, (BSUKV) y *Banana streak acuminata Yunnan virus* están también en GenBank. (Pérez-Vicente *et al.*, 2020). En los países de la cuenca del Caribe están presentes las especies BSOLV, BSMYV, BSGFV, BSVNV y BSIMV (Javer-Higgison *et al.*, 2014; Thomas, 2015). En estudios de población en Cuba, las especies BSOLV, BSGoFV y BSIMV han sido detectadas con una prevalencia de (3.1%) en bananos de postre (AAA) (Javer-Higginson *et al.* 2014) y en híbridos interespecíficos de *M. acuminata* y *M. balbisiana* (Javer *et al.* 2009; Javer-Higginson *et al.*, 2016).

La mayoría de los aislados del BSV producen un punteado/rayado conspicuo clorótico discontinuo en las hojas, que se vuelve necrótico (Lockhart, 1986); la necrosis y muerte de las hojas emergentes, una rajadura basal del pseudotallo y manchas necróticas en la piel y el pericarpio de los frutos (figuras 4A y 4B). La infección viral produce la muerte de la planta o no produce síntomas en absoluto, en independencia del aislamiento viral, el hospedante y las condiciones ambientales (Wambulwa *et al.* 2013). Algunas veces los hijos de plantas madres con síntomas severos, son asintomáticos y producen normalmente.

Algunos aislados producen inmediatamente enanismo con rayado necrótico severo que resulta en la necrosis de la hoja enrollada en apertura que da lugar rápidamente a la muerte de la planta (Thangavelu, *et al.*, 2000).

En las plantas afectadas se alternan estados sintomáticos y asintomáticos pero el virus puede ser detectado en todos los casos (Harper *et al.*, 2002; Lassoudière, 1974; Lockhart y Jones, 1999).

Lassoudière (1974), registró pérdidas de rendimiento de hasta 90% en el cultivar Poyo (subgrupo Cavendish AAA), que produjo unos pocos racimos exportables. Sin embargo, Daniells *et al.* (2001), solo observaron un efecto medio (pérdidas de alrededor del 10%), en el triploide Williams del subgrupo Cavendish de *M. acuminata* (AAA) bajo condiciones de crecimiento bueno para el banano, con solamente un retardo de la emergencia y la maduración. El impacto sobre la productividad puede considerarse multifactorial y debido a la severidad de la frecuencia de la infección en la plantación y la prevalencia de condiciones estresantes para el desarrollo de las plantas. Pérez-Vicente en el 2011 en Piura, en el Perú, encontró plantaciones del clon Robusta (subgrupo Cavendish, AAA) establecida a partir de rizomas de plantas infectadas que bajo las condiciones del sitio mostraban más del 90% de las plantas con síntomas (informe no publicado). El mismo autor en la localidad de Güira de Melena en Cuba, encontró plantas de FHIA 18 que después de un frente frío en el mes de febrero, mostraron síntomas severos de rayados de las hojas, rajadura del pseudotallo, necrosis de los frutos. Después de destruir la planta con síntomas y reestablecerse las condiciones de temperatura adecuadas para el desarrollo del cultivo, desarrollaron hijos y racimos normales comercializables.

Existen dos tipos de formas infecciosas de BSV: (i) la forma episomal, resultante de la infección de las células de la planta que sigue a la infección por pseudocóccidos y (ii) las formas endógenas por las secuencias virales de BSV (eBSV), integradas dentro del genoma B de *M. balbisiana*. Se informa que los estreses físicos inducen la producción de novo de las partículas virales (forma episomal) de BSV (Côte *et al.*, 2010b; Lheureux, *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2015), posiblemente a través de recombinación entre secuencias homólogas (HR).

De esta forma, el patógeno es transmitido por la propagación vegetativa y diferentes especies de pseudocóccidos (Hemíptera, *Pseudococcidae*) (Thomas 2015; Iskra-Caruana, *et al.*, 2018). La transmisión por chinches harinosas o cochinillas no es eficiente y tiene un rol secundario en relación a la transmisión por material de plantación (Meyer, 2005; Javer-Higginson *et al.* 2014). Entre las especies de cochinillas que pueden transmitir el virus se encuentran *Planococcus citri*, *P. ficus*, *Saccharicoccus sacchari*, *Dysmicoccus brevipes* (Lockhart y Jones, 1999) y *P. minor* (González *et al.*, 2002).

EL BSV no fue considerado un problema serio por muchos años, hasta que la aparición de las secuencias endógenas infecciosas (eBSVs) de las especies BSOLV, BSGFV and BSIMV, fueran identificadas en el genoma de *M. balbisiana* (genoma B) (Chabannes *et al.*, 2013). La activación de eBSVs bajo factores de estrés como el cultivo *in vitro* (Côte *et al.*, 2010b) y las diferencias de temperaturas (Dahal *et al.*, 1998), en híbridos interespecíficos están bien documentadas. La transmisión de infecciones

episomales y a las eBSVs integradas en el genoma de *Musa* en formas activadas y muertas (Lava Kumar *et al.*, 2015), determinan que la epidemiología de este complejo de virus sea compleja.

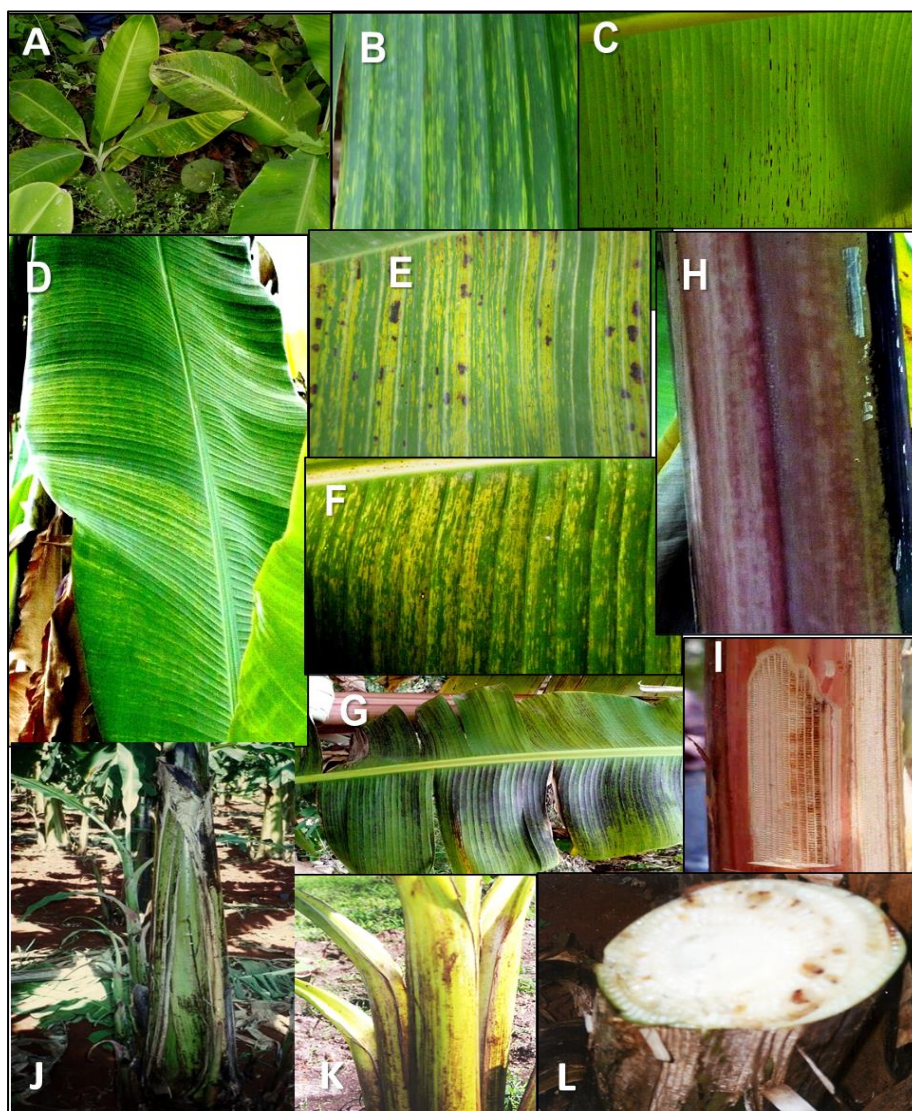


Figura 4a. Síntomas del rayado del banano por el complejo de especies del *Banana streak virus* (BSV) en follaje y pseudotallo: A) Síntomas de rayas amarilla en un rebrote joven de una planta enferma del clon Robusta; B) rayas amarillas en hojas; C y E) rayas tornándose necróticas en el limbo de hojas; D y F) hoja del clon Robusta con síntomas intensos del BSV en el limbo foliar; G) hoja cubierta de síntomas necróticos en el clon FHIA 18; H) manchas cloróticas en la superficie de las vainas de hojas en el pseudotallo; I) necrosis internas del pseudotallo del clon Robusta; J) rajadura de la base del pseudotallo de FHIA 21; K) pseudotallo de FHIA 18 con líneas y desprendimiento de las vainas de las hojas; L) necrosis de los vasos en el interior del pseudotallo. (Fotos L. Pérez-Vicente).

En bananos Cavendish (AAA) y otros clones sin presencia de genoma B, la transmisión del virus ocurre mediante i) material de plantación infectado con formas episomales del virus, o ii) a través de vectores infectados. En los clones con genoma B, aun cuando las plantas

puedan no tener infecciones activadas (sanas), la presencia de las secuencias del virus integradas en el genoma de la planta bajo condiciones de estrés, causan la activación de las mismas y la expresión de síntomas. Hasta hace poco las eBSVs eran un obstáculo importante para producir híbridos interespecíficos en programas de mejoramiento y el intercambio de germoplasma de *Musa* spp. Actualmente se dispone de procedimientos para identificar las secuencias integradas en el genoma y las secuencias genéticas que regulan la activación (Chabanne *et al.*, 2013; Chabanne *et al.*, 2018). Por otro lado, la coexistencia de las formas homologas episomales e integradas de las especies de BSV, dificulta el diagnóstico. Actualmente se usa la Multiplex- Inmunocaptura- PCR (M-IC-PCR) (Le Provost *et al.*, 2006), con un paso adicional de tratamiento con DNase I treatment para evitar que los genomas de *Musa* sp. estén presentes como contaminantes en la PCR (Thomas, 2015).

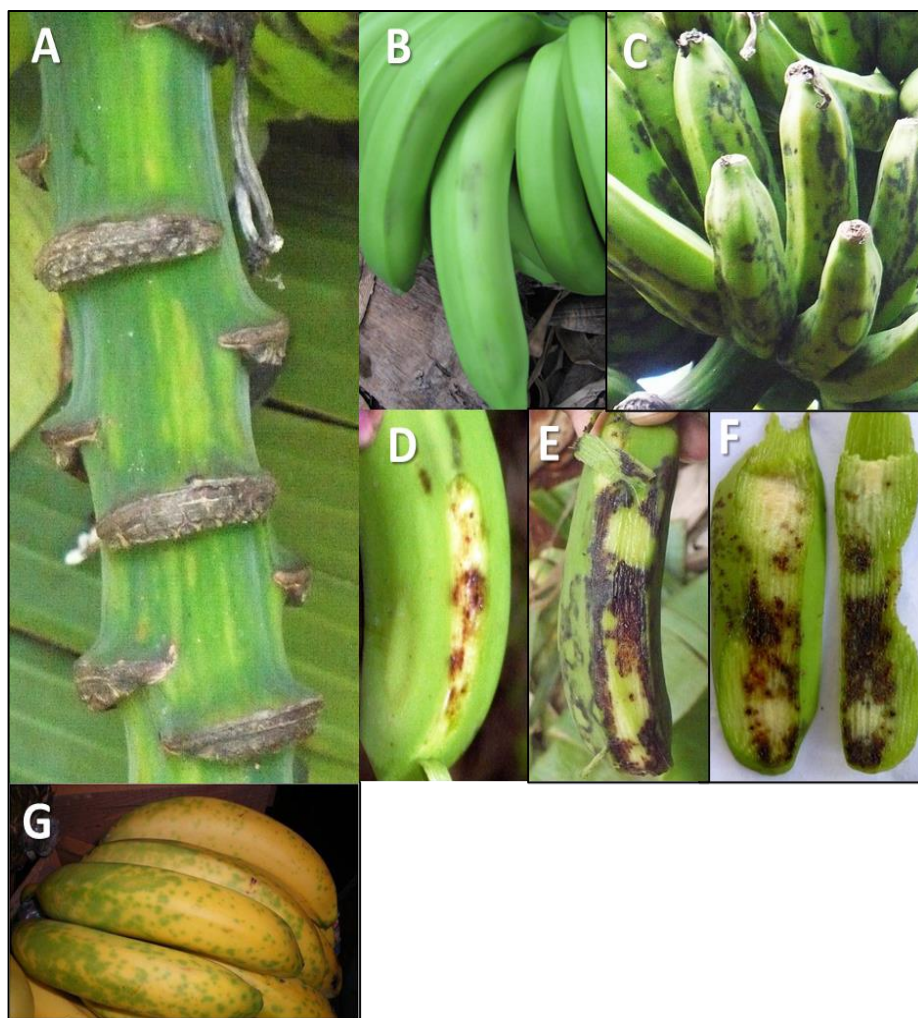


Figura 4b. Síntomas del rayado del banano por el Banana streak virus (BSV) en frutos: A) zonas amarillas en el tallo del racimo; B) inicio de necrosis en la cáscara de frutos de banana Robusta (Cavendish AAA); C) frutos necrosados en racimo de FHIA 18; D,E, F) necrosis de los vasos de la cáscara y la pulpa en frutos de FHIA 18 y Cavendish; G) manchas verdosas en frutos orgánicos

5.1.3. Mosaico del banano por el *Cucumber mosaic virus* (CMV).

El mosaico del banano llamado también clorosis infecciosa es producido por el *Cucumber mosaic virus* (CMV), el cual pertenece al género *Cucumovirus*, familia *Bromoviridae* (Kumar *et al.*, 2015).

El CMV tiene partículas icosaédricas de un diámetro de 28–30 nm, encapsuladas separadamente en el genoma tripartito de una sola cadena de RNA. Los Subgrupos I y II de aislados de CMV han sido registrados en Musa (Thomas, 2015). La mayoría de los aislados de CMV de bananos (CMV-B) pertenecen al subgrupo I. Ha sido informado infecciones por una raza de CMV que contenía un RNA satélite en plantas de bananos con síntomas de mosaico en el valle del Jordán en Israel (Gafny *et al.*, 1996).

El CMV difiere del resto de los virus del banano por su amplio rango de hospedantes que incluye más de 800 especies de plantas incluyendo plantas cultivadas (ej. tomate, pimiento, y cucurbitáceas) y malezas (ej. *Commelina s.sp.*), la cual sirve como reservorio de infección en bananos y que contribuye a su amplia dispersión (Thomas, 2015). El virus está ampliamente distribuido en todos los países productores de musáceas y en las islas del Caribe de habla inglesa, y es particularmente importante en San Vicente y las Granadinas, donde está ampliamente distribuido solo y en mezcla con BSV, entre otros motivos, por la amplia distribución en ese país de *Commelina* spp. infectadas y la ausencia de un programa eficiente de producción de material de plantación libre del virus (Jones, 2000; Pérez-Vicente, 2012).

La mayoría de las razas más comunes del CMV no producen daños significantes en bananos, sin embargo, algunas razas pueden causar necrosis en el pseudotallo (pudrición del corazón) e inclusive la muerte de la planta (Bouhida & Lockhart, 1990). En las plantas infectadas los síntomas pueden aparecer esporádicamente y muchas de las hojas se muestran asintomáticas. Estos pueden variar de un mosaico leve a un rayado intenso que lo confunde con el BSV (Kumar *et al.*, 2015; Pérez-Vicente *et al.*, 2020) y el Mosaico de la bráctea (Lockhart *et al.*, 2018) es conocido que fluctúan durante la estación de crecimiento en relación a la temperatura y la lluvia (Kumar *et al.*, 2015). El virus induce un mosaico clorótico difuso, patrones lineales, y anillos en la lámina de la hoja y ocasionalmente, hojas deformadas y encrespadas. Las plantas infectadas antes de la diferenciación floral, pueden no producir un racimo. Los síntomas severos pueden causar la necrosis de las hojas emergentes enrolladas (figura 5). En infecciones mixtas severas con el BanMMV, el CMV puede causar un mosaico necrótico en las hojas (Iskra-Caruana y Galzi, 1998).

Las razas del CMV pueden mostrar diferencias de patogenicidad y

de los daños que pueden causar (Sivaprasad *et al.*, 2016). La mayoría de las razas del virus llamadas comunes, no producen síntomas severos o daños significativos al cultivo (Lockhart y Jones 1999), aunque algunos racimos pueden distorsionarse o portar frutos pequeños. Algunas razas más severas producen necrosis internas del pseudotallo, e inclusive la muerte de la planta (Niblett *et al.* 1994). La enfermedad puede ser un problema en plantaciones establecidas con plantas de cultivo de tejidos (Tsai *et al.*, 1986; Niblett *et al.* 1994; Lockhart *et al.*, 2018).

La transmisión del CMV puede ocurrir mediante material de plantación infectado y horizontalmente, de manera no persistente por los áfidos *Aphis gossypii*, *A. craccivora*, *Rhopalosiphum maidis*, *R. prunifolium* y *Myzus persicae*, los que adquieren las partículas virales cuando se alimentan principalmente de otras especies de plantas, más que de bananos (Lockhart, 2011, Kumar, 2015, Thomas, 2015).

Aphis gossypii Glover tiene una muy amplia distribución mundial y se alimenta de un amplio número de plantas (polífago) entre los que se encuentran banano, cacao, guayaba, maracuyá papaya, pimienta negra, cucurbitáceas, solanáceas entre otros (Schmutterer, 1990; Cubillo 2013; CAB International 2007). Esta especie es regulada por coccinelidos y por Bracónidos (Schmutterer, 1990). Se alimenta del envés de las hojas de los brotes jóvenes y pseudotallos. En condiciones tropicales son principalmente partenogénéticos, pero en condiciones templadas son sexualmente ovíparos (Cubillo, 2013). Transmite el CMV, BBrMV, SCMV-Ab de forma no persistente.

Aphis craccivora Koch. El áfido negro de las legumbres es un insecto polífago que ataca leguminosas, cítricos, cacao bananos, ornamentales como la gliricidia. Presenta igualmente una amplia distribución mundial, pero prefiere claramente las regiones tropicales y subtropicales (Schmutterer, 1990; CAB, International, 2007). Hace muchas generaciones por año en el Caribe pues su ciclo es de 8 días.

Rhopalosiphum maidis (Fitch). El áfido verde del maíz es una especie tropical y subtropical (Schmutterer, 1990). Ataca además la caña de azúcar, sorgo, arroz, bananos. Transmite CMV, BBrMV, SCMV-Ab, de forma no persistente.

Myzus persicae (Sulz.). El áfido verde del melocotonero y del tabaco tiene una altísima distribución mundial. Es un insecto polífago con más de 400 plantas hospedadoras de las familias Solanaceae, Cruciferae, y Leguminosae (Schmutterer, 1990; CAB, International, 2007). En el tabaco, papa, ají, tomate, col, cítricos, cacao, lechuga, berenjena, habichuela, maní y otros muchos cultivos causan daños por succión, debido a la eficiente transmisión de virus, particularmente de los potyvirus. Su movimiento al banano es principalmente al azar, debido a la perturbación de sus hospedantes principales (Lockhart *et al.*, 2018). Se multiplica por partenogénesis durante el año entero y debido a las altas poblaciones y la excreción favorece el desarrollo de fumagina en el

envés de las hojas (Schmutterer, 199). La regulación más importante de *M. persicae* es por coccinelidos. Transmite muy eficientemente el CMV y los virus de la familia Potyviridae.

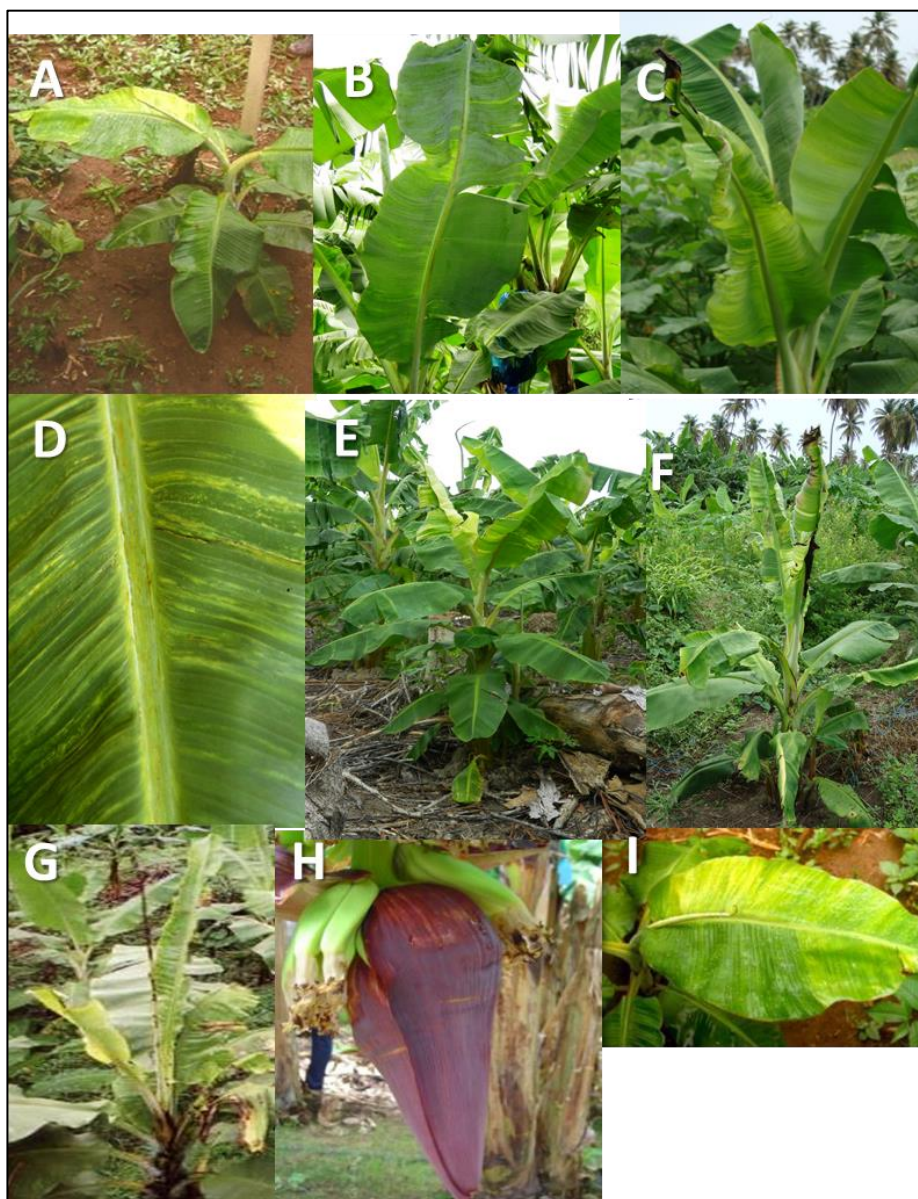


Figura 5. Síntomas del mosaico del banano por el *Cucumber mosaic virus* (CMV). A) Síntomas en plantilla de semilla infectada (Perú); B) y C) hojas deformadas (San Vicente y Granadinas); D) síntomas en hojas, de infecciones mezcladas de CMV con BSV; E) CMV en plátano (Guyana); G) necrosis de la hoja emergente probablemente debido a infecciones mezcladas de CMV y BanMMV (San Vicente y Granadinas; H) síntomas de mosaico en las brácteas florales; I) síntomas foliares típicos de mosaico en Cavendish. (Fotos L. Pérez-Vicente).

5.1.4. Mosaico de la bráctea causado por el *Banana bract mosaic virus* (BBrMV).

La enfermedad se encuentra presente en Filipinas, India, Sri Lanka, Tailandia, Vietnam, Samoa Occidental, y Taiwán (Rodoni *et al.*, 1999; Thomas, 2015; Thomas *et al.*, 2018a), y ha sido informada más recientemente en Colombia y Ecuador en América (Quito-Ávila *et al.*, 2013). Se informan pérdidas de cosecha entre 10 y 40% en los cultivos Cardaba (ABB) y

Lakatan (AAA) en Mindanao. Han sido informadas pérdidas variables entre 30% y 70% en la India y las Filipinas (Cherian, *et al.*, 2002). En las Filipinas, donde se implementaron programas de saneamiento y extracción de plantas, se han informado pérdidas de hasta 40% de rendimiento. Según Thomas *et al.* (2018a) se encontró una correlación entre altas tasas de rechazo de frutos debido a dedos malformados y alta incidencia del virus del mosaico de la bráctea. El rechazo de los frutos se ha debido a un pobre llenado de los frutos y a la aparición de rayas en los mismos. Las plantas infectadas del cultivar Nendran en la India, muestran una apreciable reducción de la altura, el grosor, el área de la hoja, el peso de los dedos y el diámetro de los tallos en relación a las plantas sanas.

Las evidencias bioquímicas, serológicas y citopatológicas demuestran que el mosaico de la bráctea es causado por el *Banana bract mosaic virus* el cual pertenece al género *Potyvirus* y a la familia *Potyviridae* (Bateson *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1987). El virus tiene partículas flexuosas de alrededor de 700–750 nm de largo, con una cápside proteica de ca. 3 kDa, y un genoma de RNA de una sola cadena (Thomas, *et al.*, 2015 y 2018a). El BBrMV purificado en gradientes de sacarosa entre 10 y 40%, produce una sola banda (Espino, 1990). El virus ha sido encontrado en infecciones mezcladas con los virus CMV y el mosaico suave del banano (Rodoni *et al.*, 1997, Thomas, *et al.*, 2019a). Las células infectadas contienen inclusiones helicoidales típicas de las desarrolladas en plantas infectadas por potyvirus (Thomas *et al.*, 1997) que pueden utilizarse para confirmar en plantas infectadas la presencia de un potyvirus.

Los síntomas del virus son distintivos, pero pueden estar afectados por el cultivo y la presencia de otros virus. EL virus (figura 6), causa rayas características en forma ahusada, púrpuras en las brácteas, pseudotallos, venas principales, pedúnculos y hasta en los frutos (Rodoni *et al.*, 1997; Selvarajan y Jeyabaskaran, 2006; Thomas *et al.*, 1997; Thomas, *et al.*, 2018a). Los síntomas de rayas y las lesiones en forma de huso en las hojas, se desarrollan paralelamente a las nerviaciones secundarias. En plantas que han sido recientemente infectadas por áfidos, se presentan parches cloróticos anchos o estrías de forma de huso. Los patrones de mosaico en las brácteas tienen carácter diagnóstico y permite distinguir la enfermedad, de los síntomas de otras virosis que causan mosaico en el follaje. Cuando se separan las vainas se hacen evidentes patrones de mosaicos y rayas en forma de huso, las que se pueden extender hasta el peciolo de las hojas. Algunas veces los síntomas son cloróticos en un fondo rojo o rojizos en un fondo verde. Las rayas pueden oscurecerse hasta rojo oscuro y negro. Los racimos de plantas infectadas presentan frecuentemente pedúnculos muy cortos o muy largos y en algunos cultivares como el Nendran, la planta toma la apariencia del árbol del viajero (*Ravenala madagascariensis*). La producción de hijos se suprime y los que emergen son deformados y muy pigmentados. En los pedúnculos de los frutos aparecen rayas cloróticas y las plantas infectadas tienen muestran una alta frecuencia de

dedos deformados en los racimos. Los frutos que desarrollan son de pequeño tamaño. La característica de que los síntomas aparecen durante la floración muchas veces la enfermedad no es reconocida en las etapas temprana del desarrollo de las plantas (Dasanayake, 2001).

El virus es transmitido horizontalmente de forma no persistente, por al menos tres especies de áfidos *Aphis gossypii*, *Ropalosiphum maidis* (Magnaye y Espino, 1990) y *Pentalonia nigronervosa* (Thomas, 2015; ver acápite relativo al CMV en referencia a los vectores). No ha sido posible transmitirlo mediante savia a plantas indicadoras, pero si ocasionalmente mediante la savia de bananos a bananos. Puede ser transmitido por material de plantación infectado como hijuelos, yemas, cormos y plantas de cultivo de tejidos.

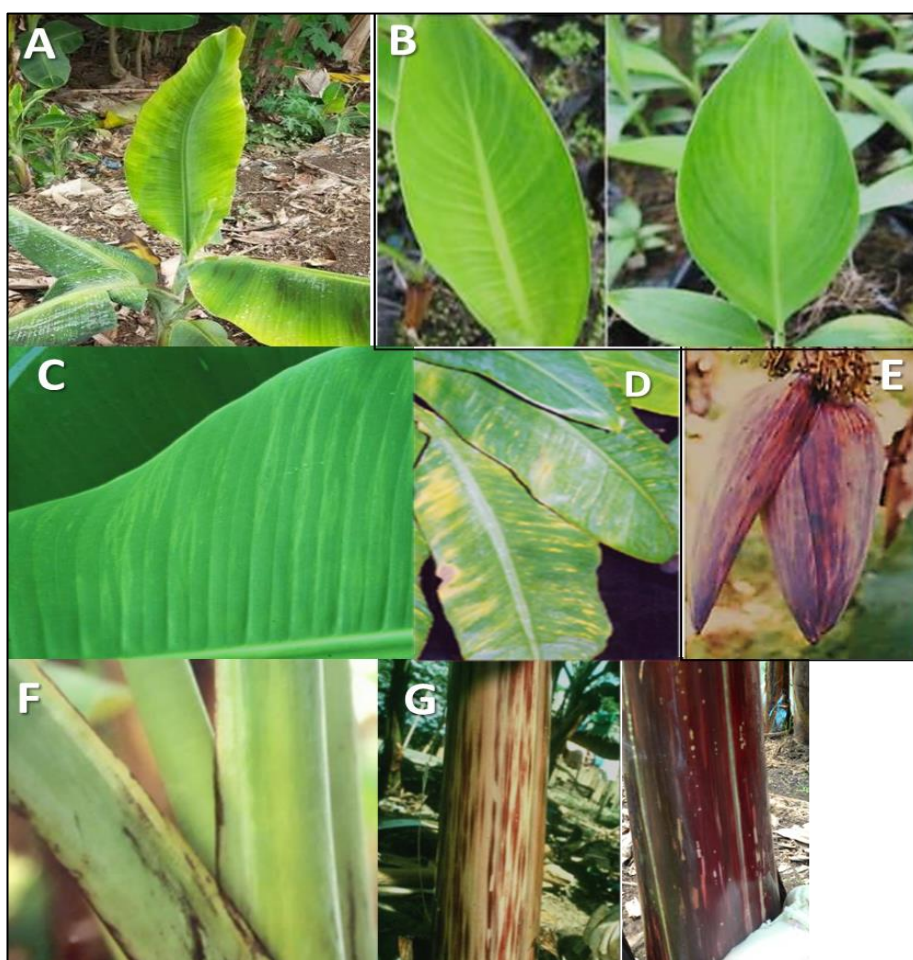


Figura 6. Mosaico de la bráctea por el potyvirus BBrMV en Cavendish: A) rebrote joven con mosaico en la hoja más joven abierta; B) parches de husos cloróticos en mosaico en la lámina foliar en plantas de cultivo de tejidos; C) lesiones en forma de huso en las hojas, que se desarrollan paralelamente a las nerviaciones secundarias de las hojas; D) mosaico de lesiones amarillo naranja en las hojas; E) manchas en forma de huso en la bráctea floral característico de la enfermedad; F) lesiones cloróticas en el peciolo de las hojas; F) lesiones en forma de uso en las vainas de las hojas rojo pardas en fondo claro y claras en fondo rojizo. (Fotos: A) M. Madrigal; B), C) L. Pérez-Vicente en Davao; D) P.Y. Teycheney; E), F y G) J. Thomas].

El BBrMV afecta numerosos clones incluido el abacá, otras especies de *Musa* (*M. volutina*) y plantas como el *Elletaria cardamom* (Cardamomo) y *Alpinia purpurata*.

Puede ser diagnosticado por microscopía electrónica, serología utilizando ELISA con anticuerpos monoclonales y policlonales y mediante una IC-RT-PCR (Ver acápite 8). Agdia y SEDIAG (SEDIAG S.A.S, 3, Bd de Beauregard - 21600 LONGVIC – France), producen kits diagnósticos, con antisueros específicos contra el virus

5.1.5. Virus del Mosaico suave del banano causado por el *Banana mild mosaic virus* (BanMMV).

El virus del mosaico suave del banano (BanMMV) es un virus flexuoso relativamente nuevo que infecta los bananos (Gambley y Thomas, 2001) y es un miembro no asignado de la familia *Flexiviridae* (Adams *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2015). Aparentemente tiene una distribución mundial estando presente en numerosas colecciones de germoplasma (Kumar *et al.* 2015; De Clerck *et al.*, 2017; Thomas *et al.*, 2018b).

El BanMMV tiene partículas flexuosas de alrededor de 580 nm de largo con una cápside de proteína de 26.8 kDa, y un genoma de RNA de una sola cadena (Gambley y Thomas 2001; Thomas *et al.* 2000b) y presenta una alta frecuencia de variación entre diferentes aislamientos, de los nucleótidos en la región conservada de la polimerasa y las regiones que codifican la proteína de la cápside (Teycheney *et al.*, 2005). La diversidad genética del BanMMV, puede en parte estar determinada por el intercambio de germoplasma entre diferentes partes del mundo y también por la transferencia de aislamientos de virus de planta a planta (Teycheney *et al.*, 2005).

El virus está frecuentemente presente en plantas asintomáticas de *Musa* spp. (Kumar *et al.* 2015; Thomas *et al.*, 2018b). Los síntomas consisten en un mosaico suave y estrías como ocurre en Pisang awak (ABB). Estos síntomas se observan en plantas de cultivo de tejidos infectadas y pueden desaparecer según la planta madura (Thomas, *et al.*, 2019b). Según estos últimos autores, pueden aparecer síntomas de rayas transitorias en plátanos (AAB), en el clon Pisang Seribu (AAB), manifiesta rayas plateadas en la lámina foliar mientras que en Gros Michel han observado parches cloróticos en las hojas, enanismo y retardo de la emisión de los racimos. El BanMMV aparece frecuentemente asociado al BSV (De Clerck *et al.*, 2017) causando síntomas similares al del BSV (Thomas *et al.*, 2018b), así como al BBrMV (Iskra-Caruana *et al.*, 2008). Ha sido informado en asociaciones con CMV causando estrías necróticas en Guadalupe (Iskra-Caruana y Galzi, 1998). Reichel *et al.* (2003), informaron la presencia del virus en Colombia en plátano Hartón (AAB), causando un rayado clorótico suave.

El impacto económico del virus no ha sido cuantificado pero las observaciones sugieren que puede afectar el rendimiento tanto en bananos como en plátanos en América Latina (Thomas *et al.* 2018b).

Todos los clones aparentemente son susceptibles al virus. La enfermedad se transmite mediante material de propagación tanto convencional como por cultivo de tejidos y es uno de los virus más comunes encontrados en las colecciones internacionales de germoplasma, probablemente, por la frecuente ausencia de síntomas de la infección (De Clerck *et al.*, 1997). No ha sido posible transmitirlo mecánicamente de banano a banano con savia de plantas infectadas, por el áfido *P. nigronevosa*, el pseudocóccido *Planococcus citri*, ni al plantar plantas sanas en suelo donde previamente hubo plantas de Pisang Awak infectadas o a través del contacto de raíces entre plantas sanas e infectadas. Iskra-Caruana y Galzi (1998), informaron, sin embargo, que plantas de cultivo de tejidos de Cavendish libres de virus plantadas al campo, mostraron infecciones de CMV y BanMMV en infecciones mixtas y que la infección se incrementa con los ciclos de cultivo, indicativo de que el virus se transmite simultáneamente por áfidos con el CMV.

Se han producido antisueros y el diagnóstico puede ser llevado a cabo por microscopia electrónica y inmuno-absorción (ISEM). Los antisueros para ELISA son muy específicos del aislado utilizado en la inmunización. Se han desarrollado cebadores para PCR y IC-RT-PCR (ver acápite 8).

5.1.6. Mosaico del abacá causado por el Sugarcane mosaic virus (SCMV-Ab).

El mosaico del abacá es causado por el *Sugarcane mosaic virus* (SCMV-Ab) el cual es una raza distinta del virus del mosaico de la caña de azúcar, perteneciente al género *Potyvirus* y a la familia *Potyviridae* (Eloja y Tinsley, 1963; Thomas *et al.*, 1997; Gambley *et al.*, 2004; Thomas y Magnaye, 2019). El virus tiene partículas flexuosas filamentosas de alrededor de 680 nm (Eloja y Tinsley, 1963). El SCMV-Ab, muestra relaciones serológicas con el SCMV y los virus del grupo del SCMV, el *Maize dwarf mosaic virus*, el *Sorghum mosaic virus* y el *Johnsongrass mosaic virus*, así como una débil reacción con el BBrMV (Thomas y Magnaye, 2019).

El virus hasta el presente ha sido solo identificado en abacá en Las Filipinas donde afecta el rendimiento de fibra y la calidad de esta (Diekmann & Putter, 1996; Kumar *et al.*, 1915). Las infecciones hacen las plantas improductivas y sin valor; la infección reduce la fortaleza para la tensión, la biomasa, el rendimiento de fibra, la altura de la planta y el diámetro del tallo (Thomas y Magnaye, 2019). Los hospedantes naturales identificados hasta el momento son *M. textilis*, *Maranta arundinacea*, y *Canna indica*. En las musáceas *Ensete glaucum*, todas

las variedades de abacá y los cultivares de bananos Lakatan (AAA), Umalag y Gran enano (subgrupo Cavendish, AAA) y el Latundan (AAB, subgrupo Silk) (Thomas y Magnaye, 2019).

Las hojas muestran rayas amarillentas o verde claras. Los síntomas en los peciolo y nervaduras de las hojas son moteados con rayas verde oscura y amarillentas y pueden no aparecer en las hojas (Diekmann y Putter, 1996). Según Thomas y Magnaye (2019), los síntomas en plantas inoculadas de abacá aparecen entre 7-21 días después de la infección. Pequeños puntos blanquecinos que posteriormente se alargan y se vuelven rayas cloróticas largas, aparecen paralelamente a las venas secundarias, los que según se expanden presentan color pardo ferruginoso y se extienden de la nervadura central a los márgenes. Las hojas subsecuentes pueden mostrar bandas extensas amarillas o verde pálido a través de la lámina de la hoja. Según Stover (1972), en las infecciones viejas las rayas verde cloróticas, naranjas o verde oscuro, pueden aparecer en la nervadura central y los peciolo aun cuando no aparezcan en las láminas de las hojas. El diagnóstico de la enfermedad basado en síntomas debe ser visto con precaución porque el BBrMV y el SCMV-Ab producen síntomas similares en abacá y el abacá está también sujeto a un rango de infecciones mezcladas de virus (Thomas *et al.*, 1997; Sharman *et al.*, 2000).

El virus es transmitido mediante la propagación vegetativa y también por áfidos de forma no persistente (Diekmann y Putter, 1996), principalmente *R. maidis* and *A. gossypii*, aunque también por *R. nymphae*, *Schizaphis cyperi*, *S. graminum*, *Toxoptera citricidus*. No hay transmisión por la semilla botánica, pero si por material vegetativo. Una vez inoculado en Poáceas se hace transmisible rápidamente al abacá por savia (Thomas y Magnaye, 2019). La transmisión mecánica es difícil.

La detección puede realizarse por ensayos por ELISA y RT-PCR (Gambley *et al.*, 2004) utilizando anticuerpos del virus del mosaico de la caña (Eloja y Tinsley 1963).

5.2. Procariotes patógenos transmisibles en material de propagación de musáceas.

Las bananos y plátanos, el abacá y el Enset, son afectados por procariotes patógenos (bacterias y fitoplasmas) que se transmiten eficientemente a través de los materiales de propagación vegetativa, eventualmente por cultivo de tejidos (si no hay adecuadas prácticas de diagnóstico y saneamiento) y una vez introducidas, a través de agua de escurrimiento, herramientas e insectos, etc. (Bloome *et al.*, 2017). La mayoría de estos patógenos pueden tener un impacto significativo en la producción de bananos y plátanos y también por lo costoso de los métodos de manejo.

Los síntomas que causan pueden resumirse como marchiteces, caída de

plantas, pudriciones húmedas de rizomas, tallos y frutos y pueden diferenciarse en tres grupos principales (Bloome *et al.*, 2017): 1) las enfermedades asociadas al complejo de especies asociados a *Ralstonia* (Moko/Bugtok causado por *R. solanacearum* y Blood disease causado por *Ralstonia zyzygii* s.sp. *celebesensis*); 2) la marchitez de las musáceas por *Xanthomonas vasicola* pv. *Musacearum* (previamente *X. campestris* pv. *musacearum*; Aritua *et al.*, 2008; Tripathi *et al.*, 2009; Karamura *et al.*, 2015) y 3) las bacterias asociadas a las pudriciones húmedas del pseudotallo y del rizoma, *Pectobacterium carotovorum* (previamente *Erwinia carotovora* s.sp. *carotovora*) y *Dickeya paradisiaca* (previamente, *Erwinia chrysanthemi*). A continuación, se describen las enfermedades causadas por procariotes transmitidos a través del material de plantación:

5.2.1. Marchitez bacteriana por *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* (Xvm) [*Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* (Yirgou and Bradbury 1968) Dye 1978]

La marchitez bacteriana por *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* (Xvm), es en la actualidad la enfermedad más nociva de los bananos, plátanos y el Enset en África Central y del Este (Bloome y Ocimati, 2018). La distribución actual de la enfermedad es: Etiopía desde 1968 en Enset y desde 1974 en bananos (Yirgou y Bradbury, 1968 y 1974; Handoro, 2006; Bloome *et al.*, 2014); Uganda desde el 2001 (Tushemereirwe *et al.* 2003; Tushermereirwe, 2006); R. D. del Congo desde el 2001 (Ndungo *et al.* 2004; Vigheri y Lubanga, 2006); Rwanda, Tanzania y Kenia desde el 2010 (Mgenzi *et al.* en el 2006 citado por Bloome *et al.*, 2014; Carter *et al.* 2010).

Las pérdidas informadas son cuantiosas y relativas a todas las variedades de Enset y los cultivares de bananos comestibles en África Central y del Este (Yirgou y Bradbury, 1974). Según Seekiwoko *et al.*, (2006), de las plantas afectadas no se obtiene producción; los frutos se maduran prematuramente o se pudren y las plantas se marchitan y mueren. Las pérdidas en las fincas afectadas pueden alcanzar el 100% cuando se retrasan las medidas de control, especialmente en el caso de los clones ABB (Bloome y Ocimati, 2018), lo que afecta las condiciones de vida de los agricultores. Las pérdidas económicas han sido estimadas en 200-295 millones USD/año en Uganda (Kalyebara, *et al.*, 2006; Abele y Pillay, 2007). Las pérdidas informadas de plantas afectadas por la enfermedad/finca en Burundi y Rwanda, son entre el 33-75%, con pérdidas de producción en valores estimadas en 10.2 y 2.5 millones de USD, respectivamente (Nkuba *et al.*, 2015).

Los síntomas de la marchitez por *Xanthomonas* (figura 7), no difieren marcadamente de los del Moko causado por *R. solanacearum*. Xvm infecta el banano y el Enset a través de las partes vegetativas de la planta (raíces, cormo, las vainas del pseudotallo, peciolos, lámina foliar) y en el caso de los bananos, a través de la inflorescencia. La infección a través del cormo, raíces, pseudotallo y hojas, producen un

amarillamiento y marchitez progresiva de las hojas (Ssekiwoko *et al.*, 2006; Ocimati *et al.*, 2013; Nakato *et al.*, 2014). La bacteria después de la infección es sistémica (Ocimati *et al.*, 2013) y los síntomas aparecen en todas las partes de la planta, los cuales se producen debido al bloqueo del tejido vascular que incapacita el transporte por el apoplasto de la planta. Los síntomas externos son el plegamiento de las hojas sobre el pseudotallo, la marchitez de toda la planta, y la pudrición eventual del tallo completo (Karamura *et al.*, 2008). Los síntomas de marchitez se desarrollan cuando hay una cantidad suficiente de bacteria en el sistema xilemático, que impide el flujo de agua similarmente a como ocurre con el Moko. Hay una momificación de la yema masculina, caracterizada por un desvanecimiento del color de la bráctea de púrpura intenso a pardo oscuro a gris, el arrugamiento de las brácteas, la eventual pudrición de todo el tallo del racimo y la exudación de la bacteria. Este es el síntoma típico de la transmisión natural de Xvm mediada por insectos (Karamura *et al.*, 2008) y de los síntomas florales tardíos (cuando el racimo está fisiológicamente maduro), debido a las infecciones mediadas por herramientas. Cuando Xvm es transmitido por herramientas, causa primeramente un amarillamiento progresivo, la marchitez de las hojas y entra al pseudotallo, cormo y raíces (Tushemereirwe *et al.*, 2004; Ssekiwoko *et al.*, 2006b; Ocimati *et al.*, 2013b; Nakato *et al.*, 2014). La infección de la yema masculina en variedades muy susceptibles como el Pisang Awak (ABB, el cual es muy susceptible), se desarrolla a través del raquis, por el pseudotallo hacia abajo hasta el cormo, de donde se disemina a las raíces (Ocimati *et al.*, 2013a) y los hijos presentes alrededor de la planta madre, resultando en la muerte del plantón entero (Mudonyi *et al.*, 2019). Otros cultivares como el Bluggoe (ABB), Sukali Ndizi (AAB), los bananos de altura del Este de África (AAA), que tienen flores más secas arrugadas y marchitas, no muestran estos síntomas. Los frutos infectados se endurecen y desarrollan coloraciones pardo oscura en la pulpa. Las secciones internas del tallo floral muestran las exudaciones bacterianas amarillas desde los haces vasculares, mientras que en los frutos parecen coloraciones pardo oscuras de la pulpa (Tushemereirwe *et al.*, 2003; Biruma *et al.*, 2007; Ocimati *et al.*, 2013a, Mudonyi *et al.*, 2019). La presencia de brotes nuevos, lejos de fuentes conocidas de infección, sugiere el movimiento por aves y murciélagos. Igualmente, ha sido sugerido el movimiento por rumiantes domesticados (vacas y ovejos), así como por puerco espín y otros animales que pueden alimentarse en rizomas infectados, aunque no está clara su contribución.

Las *Xanthomonas* pertenecen a las gamma-proteobacterias, que cubren 420 especies y cientos de patovares (pv.), de especies económicamente importantes a las plantas (Vauterin *et al.*, 1995). Históricamente la taxonomía de las *Xanthomonas*, han estado ligadas al hospedante donde fueron aisladas (Studholme *et al.*, 2019) y el género fue dividido en mu-

chas especies aisladas por sus características fenotípicas (Dye, 1962). Se propuso unirlas en una sola especie y designarla como nomenespecie (*X. campestris*), al no poder ser diferenciada por las características morfológicas y fisiológicas y para mantener la unidad, cada aislamiento procedente de un cultivo, en patovares. El agente causal de la marchitez del banano y Enset por *Xanthomonas*, fue identificado por primera vez por Yargou y Bradbury (1968, 1974) como *Xanthomonas musacearum* sp. n.; posteriormente, Young *et al.* (1978), propusieron el nombre de *X. campestris* pv. *musacearum*, hasta la propuesta de su reclasificación debido a su similitud genotípica con *X. vasicola* pv. *vasculorum* y *X. vasicola* pv. *holcicola* como *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* (Aritua *et al.*, 2008). Debido a la falta de suficientes estudios con diferentes aislados y hospedantes de acuerdo a las Normas Internacionales para Nombrar Patovares del Comité de Taxonomía de Bacterias Fitopatógenas de la Sociedad Internacional de Fitopatología no hubo consenso en relación al cambio de taxonomía y no se incluyó en las listas de cambios de nombre (Lapage *et al.*, 1992; Bull *et al.*, 2010; Bull *et al.*, 2012). Karamura *et al.* (2015), estudiaron un número grande de plantas de maíz, bananos y caña de azúcar lo que permitió demostrar que los aislamientos de *X. vasicola* pv. *vasculorum* de maíz y caña de azúcar, no fueron patógenos a bananos y un aislamiento (NCBBP4381) de Xvm, no mostró patogenicidad en caña de azúcar (Lang *et al.*, 2017). Studholme *et al.*, (2019), determinaron que el patovar de *X. campestris* pv. *musacearum* es monofilético y está junto a la especie propuesta como tipo *X. vasicola* pv. *holcicola* dentro de un clado bien soportado como *X. vasicola* genomoespecie y ratificó la proposición del cambio a la especie *X. vasicola*. Sin embargo, no había sido oficialmente listado en los cambios de taxones de las bacterias fitopatógenas (Lang *et al.*, 2017; Bloome y Ocimati, 2018) hasta recientemente (<https://lpsn.dsmz.de/species/xanthomonas-vasicola>).

La bacteria es un bacilo móvil, Gram negativo, con un solo flagelo polar (Vauterin *et al.*, 1995); es oxidasa y tirosinasa negativo; no reduce el nitrato, o hidroliza el almidón o la gelatina y no acumula ácido poli-β-hidroxibutírico (Yargou y Bradbury, 1968, 1974). Es no fluorescente en medio King B y produce colonias típicas amarillas, convexas, mucoides en agar nutriente y otros medios (Bloome y Ocimati, 2018). En medios ricos en glucosa, produce copiosamente xanthan y al ser inoculado en plantas, coloniza el xilema; la producción abundante de xanthan en este, impide la absorción y translocación de agua y nutrientes.

El patógeno entra al sistema vascular mediante heridas naturales o por herramientas (Bloome y Ocimati, 2018). Las fuentes de inóculo de Xvm, lo constituyen los residuos y partes de plantas de banano y el agua y suelos contaminados. Se transmite fácilmente por cualquier objeto o herramienta en contacto con la savia de plantas contaminadas. Como en otras marchiteces bacterianas, la principal vía de transmisión son los insectos contaminados con las exudaciones bacterianas (Yargou

y Bradbury, 1974; Buddenhagen, 2006; Bloome *et al.*, 2017). La transmisión por insectos ocurre desde las yemas masculinas de plantas infectadas a otras de plantas sanas, a través de los tejidos frescos expuestos dejados por las brácteas florales que en muchos cultivares se desprenden cada día. Ha sido demostrada la transmisión local dentro de una plantación por picudos de Xvm y la bacteria ha sido aislada de material fecal de insectos trampeados en campos infectados (Bloome y Ocimati, 2018). Se ha transmitido de insectos alimentados en cormos infectados con exudación e introducidos a plantas sanas cultivadas en contenedores. La transmisión por hijuelos de plantación sin síntomas, movidos dentro de la plantación, es común y es una forma importante de diseminar la enfermedad aún a largas distancias. Aunque la diseminación por el suelo es limitada, ha sido demostrada la infección por las raíces heridas por el ataque de nematodos y herramientas en bananos (Ocimati *et al.*, 2013a). Ha sido además informada la muerte de plantas en suelos contaminados con las exudaciones de Xvm. La bacteria tiene una pobre sobrevivencia en el suelo en ausencia de tejidos de bananos vivos y no sobrevive más de 35 días en residuos de plantas en la superficie o bajo el suelo, lo que sugiere que no posee una fase saprofítica (Bloome and Ocimati, 2018).

El período de incubación es de alrededor de tres semanas y similarmente al caso del Moko, dependen del cultivar, modo de transmisión y sitio de la infección (a través de la inflorescencia masculina, del pseudotallo o de las hojas) y de las condiciones ambientales (Ssekiwoko *et al.*, 2006; Tripathi y Tripathi, 2009; Addis *et al.*, 2010; Ocimati *et al.*, 2013a). En los bananos de altura (AAA) del Este de África, el período de incubación es más corto que en Pisang Awak (ABB) y los síntomas son evidentes entre las 2-22 semanas posteriores a la infección (Blomme and Ocimati, 2018). En general, la progresión de la enfermedad es más rápida en plantas jóvenes que en las maduras, en la estación húmeda que en la seca (Tripathi *et al.*, 2009) y en las infecciones a través de la inflorescencia, en comparación con las que ocurren en otras partes de la planta. Ocimati *et al.* (2013), informaron periodos de incubación largos que varían entre 11 y 110 semanas en hijos de banano que se desarrollan a partir de las infecciones de las plantas madres. Las infecciones latentes son comunes y con incidencia variable de entre 33 y hasta 53% (Bloome y Ocimati, 2018).

No se han informado clones de Enset y bananos con resistencia a la enfermedad después de la infección por heridas, aunque hay diferentes niveles de respuesta a la infección (Bloome and Ocimati, 2018). La resistencia y tolerancia ha sido relacionada principalmente a la susceptibilidad de los bananos a la transmisión por insectos. El Pisang Awak y el Blugoe son altamente susceptibles a la infección y desarrollo de la enfermedad debido a su característica de tener brácteas y flores dehiscentes que dejan expuestos los tejidos para la infección por la bacteria. Los clones que

tienen brácteas persistentes escapan a la infección por insectos, aunque posterior a la infección desarrollen la enfermedad. Pisang Awak ha sido considerado responsable de la diseminación a grandes distancias en África.

El diagnóstico de la bacteria es factible mediante aislamiento, pruebas bioquímicas, serología y diferentes variantes de PCR (ver acápite 8.)

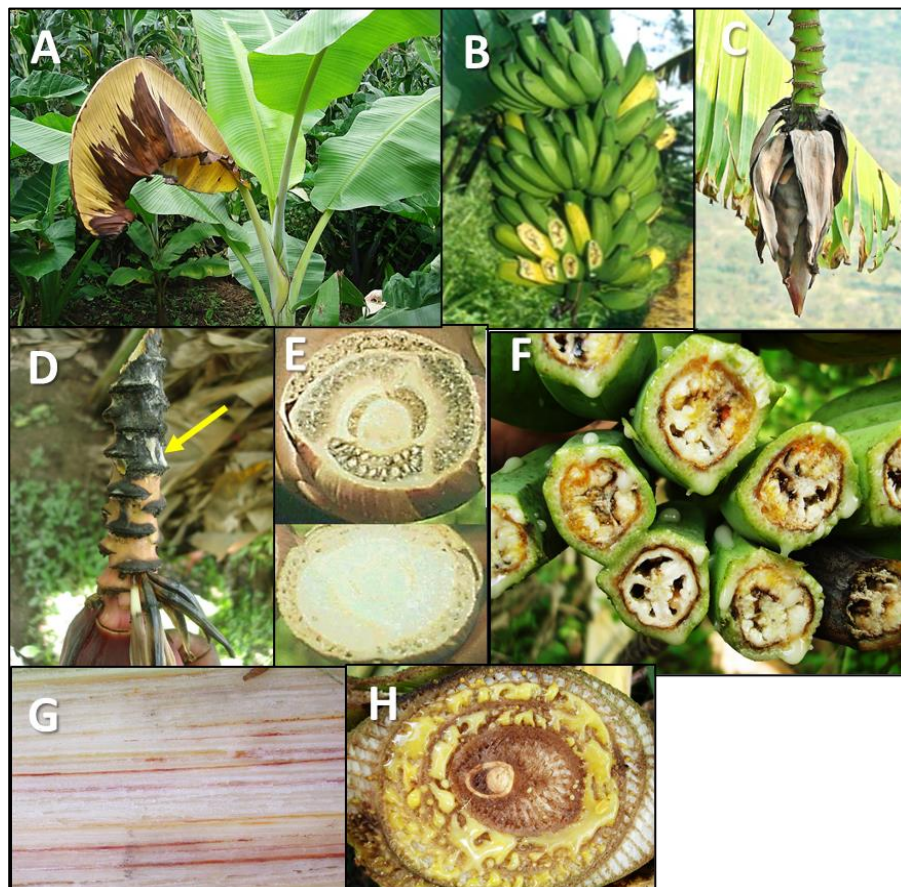


Figura 7. Marchitez por *X. vasicola* pv *musacearum*; A) plantas infectadas con síntomas de marchitez; B) frutos con madurez prematura y pudriciones interna; C) yema floral con síntomas de marchitez y cambio de color (síntoma primario); D) necrosis del extremo del raquis del racimo y exudación bacteriana desde los cojinetes florales; E) sección transversal de la yema del racimo afectada (arriba) y sana (debajo); F) frutos con pudriciones y exudaciones bacterianas; G) coloraciones rojizas de los vasos del pseudotallo; H) exudaciones bacterianas en los vasos del pseudotallo. [Fotos: A, D, F y H, Dr. G. Bloome; B, C, E, Dr. W. Tushermereirwe.

El complejo de especies de R. solanacearum (CERS).

5.2.2. Moko y Bugtok causadas por Ralstonia solanacearum (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1996.

La marchitez bacteriana o Moko causada por la raza 2 de *R. solanacearum*, es endémica de América Central y del Sur y en Las Antillas, se encuentra presente en Granada, Guadalupe, Jamaica (restringida), St. Vicente y Las Granadinas y Trinidad y Tobago. El nombre de Moko lo recibió del cultivar “Moko” (sin. Bluggoe, ABB) el cual eliminó virtualmente

en Trinidad y Tobago (Eden-Green, 2018). En Las Filipinas, Moko y Bugtok son dos nombres que describen diferentes síntomas de la misma enfermedad, causado por las mismas razas de *R. solanacearum*. Los síntomas son diferentes debido a las diferencias en epidemiología en los diferentes sistemas de cultivo y variedades (Molina, 1999): Moko es el término utilizado para los síntomas de marchitez y amarillamiento observados en plantaciones a gran y media escala de Cavendish, mientras que Bugtok describe los síntomas de pudrición de frutos observados principalmente en cultivos balbisiana (ej. Saba, banano de cocción BBB cultivado para mercados locales; Molina, 2006). La notoriedad y la importancia económica la adquirió después de la Segunda Guerra Mundial con el desarrollo de las grandes plantaciones de Cavendish en América Central.

R. solanacearum es uno de los fitopatógenos más destructivos a la agricultura a nivel mundial, debido a su letalidad, amplia distribución geográfica y amplio rango de hospedantes (Elphinstone, 2005; Mansfield *et al.*, 2012). Es un patógeno heterogéneo, evidenciado por su gran rango de hospedantes, su especialización patogénica y cultural y sus propiedades fisiológicas y filogenia (Pérez-Vicente *et al.*, 2020). De acuerdo a Belalcázar *et al.* (2004), se informan más de 250 hospedantes del patógeno. Buddenhagen (1986), en referencia a la amplia distribución geográfica y diversidad patogénica de las especies, consideró que hay muchas marchiteces bacterianas y muchas *Pseudomonas solanacearum* (sin. *R. solanácearum*). Se han originado y evolucionado en muchos lugares diferentes (flora nativa, hospedantes introducidos, diferentes suelos y condiciones ambientales) que han dado lugar a expresiones y potencial de enfermedad variables, para cada interacción hospedante/patógeno (Buddenhagen, 1986, 2009). La raza 2 de *R. solanacearum* que afecta los bananos ha sido recordada de *Heliconia* spp. de los bosques vírgenes húmedos y por estos es considerada endémica de la costa del Caribe de Centro América (Sequeira y Avere, 1961).

Los síntomas comunes del CERS incluyen la marchitez del follaje, el pardeamiento de los vasos y el enanismo de la planta (Hayward, 1994), que da lugar finalmente a la muerte de la planta. *R. solanacearum* es patógeno sistémico letal y los linajes que afectan *Musa* spp., están definidos por su expresión en las plantas, las características culturales y si son diceminados principalmente por insectos o mediante transmisión mecánica o el suelo.

Los síntomas típicos de la enfermedad del Moko aparecen usualmente una vez que ha infectado sistémicamente la planta y colonizado el pseudotallo y el rizoma (figura 8). Los bananos de postres exhiben un amarillamiento rápido y marchitez de hojas y marchitez, deformación y necrosis de las yemas e hijuelos, coloración pardo rojizas en el interior del pseudotallo, madurez prematura, detención del desarrollo de los frutos y oscurecimiento y pudrición seca de la pulpa de estos. Los síntomas de marchitez, ocurren principalmente de infecciones iniciadas de la base de la planta con herramientas contaminadas usadas para podar y deshijar,

lo cual es práctica común en las plantaciones de Cavendish. La marchitez es evidente cuando la densidad de la población del patógeno se incrementa, causando una disfunción del sistema que previene que suficiente agua alcance las hojas (Buddenhagen y Kelman, 1964; Denny *et al.*, 1990; Bloome *et al.* 2017). En los tejidos internos, se observa fácilmente una exudación bacteriana de cualquier parte de la planta expuesta al aire. El proceso mediante el cual la marchitez bacteriana reduce el flujo de agua, no está completamente claro. No hay evidencias de transpiración excesiva ligada a la pérdida de control estomatal, como posiblemente resultara de una toxina sistémica (Buddenhagen y Kelman, 1964; Van Alfen, 1989). El factor primario parece ser el taponamiento de las membranas de los peciolo y hojas por un polisacárido de alto peso molecular extracelular (Van Alfen, 1989) y también la contribución de las altas densidades de células, la producción de tilos y goma por la planta y los subproductos de la degradación de la pared celular (Denny, 2006).

Las variedades derivadas de *M. balbisiana*, exponen una amplia abertura en las brácteas de las flores masculinas que atraen a un gran número de insectos a las inflorescencias. Cuando la infección es consecuencia de la inoculación de las flores masculinas por insectos vectores, los síntomas de pudrición se desarrollan primeramente en los frutos cuyos pedúnculos se ennegrecen, secan y deforman y la pulpa de la fruta se colorea de negro grisáceo a amarillo rojizo y posteriormente se endurece. La coloración parda rojiza alcanza el sistema vascular del tejido del pedúnculo y el pseudotallo, pero raramente se extiende al rizoma.

En ocasiones, las coloraciones internas del pseudotallo causadas por el Moko, pueden confundirse con las de la marchitez por *Fusarium* o mal de Panamá. Pueden ser distinguidas rápidamente, porque en el caso de esta última, no se observa nunca necrosis, deformaciones o marchitez de las yemas e hijuelos, síntomas en frutos y exudaciones bacterianas. Los síntomas de marchitez en los seguidores, se presentan usualmente después de un largo período de latencia en las plantas enfermas, casi siempre coincidente o cercana a la diferenciación internamente en estos de la yema vegetativa en floral (Pérez-Vicente, 2004; Dita y Pérez-Vicente, 2015).

El género *Ralstonia* pertenece a la clase β Proteobacteria, Orden *Burkholderiales*, familia de las *Ralstonaceae*, que incluye nueve géneros, muchas especies patógenas humanas y fitopatógenas y varios simbiontes. *Ralstonia* es un bacilo aeróbico, gran negativo no fluorescente, con un flagelo polar en forma de penacho. Es oxidasa positiva, arginina hidrolasa negativa y acumula intercelularmente poli-hidroxibutirato (PHB), que puede ser detectado mediante tinción con Negro Sudán en medio nutriente rico, o con el test de Blue Nile (EPPO, 2004). No produce levana de la glucosa; hidrólisis de la gelatina leve o débil; casi todas las razas reducen el nitrato. El crecimiento es débil a pH 8 y no crece a pH 4 y 9; es arginina dihidrolasa, lecitinasa y lipasa (Tween 80) negativa. La mayoría de las líneas (secuevares) desnitrifican y producen un pigmento rojo difusible en

medio rico. No crecen debajo de 4 °C y por encima de 40 °C y crecen poco o no crecen en NaCl al 2% (Baharuddin *et al.*, 1994; Taghavi *et al.*, 1996; Coenye and Vandamme, 2003; Villa *et al.*, 2005). Es rápidamente distinguida del resto de los miembros del grupo porque no crece a 40 °C (EPPO, 2004). La mayoría de los aislados producen tirosinasa con la excepción de los que afectan la familia *Musaceae*.

Los aislamientos de *R. solanacearum* se clasifican en biovares de acuerdo al uso de los azúcares. En el cuadro 6 se muestra la clasificación en biovares de acuerdo a la utilización de azúcares.

Hay revisiones recientes de la diversidad patogénica y filogenética de *R. solanacearum* (Fegan, 2005; Fegan y Prior, 2006; Bloome *et al.*, 2017; Eden-Green, 2018). Las relaciones filogenéticas han sido establecidas en base a: i) las secuencias de la región 16s-23s rDNA, que han permitido definir cuatro grupos (filotipos), que se corresponden grandemente con las distribuciones geográficas y aparentemente, los orígenes evolutivos de las diferentes líneas (Fegan, 2005; Fegan y Prior, 2006); ii) grupos de líneas (sequevares), cuyo gen que codifica la endoglucanasa (*egl*), difiere en menos de 1% (Remenant *et al.*, 2011). Los aislados de Moko y Bugtok, se agrupan en cuatro grupos del filotipo II (sequevares IIA-6, IIA-24, II B-3, IIB-4), mientras que el filotipo IV, contiene la especie íntimamente relacionada *R. zyzygii* pv *celebesensis* causante de la enfermedad roja bacteriana o Blood disease, (Eden-Green, 2018). Aunque algunas relaciones requieren aún dilucidarse, los aislamientos de banano (B) y *Heliconia* (H), se agrupan con los de Bugtok en el sequevar HB-3, mientras que los aislamientos SFR (colonias pequeñas, fluidas, redondas) y A (Amazonas) se agrupan en dos grupos más distantes HB-4 y II-A-6). Estas relaciones determinaron considerar un complejo de especies de *R. solanácearum* (CERS), el cual se propuso estar compuesto por tres especies (Gillings y Fahy, 1994; Safnii *et al.* 2014): los filotipos IIA y IIB que incluyen todos los aislamientos de Moko y de Bugtok, se designaron como *R. solaná-cearum*; las bacterias en el filotipo IV se designan como *R. zyzygii* y comprenden tres subespecies: ssp. *zyzyguii*; s.sp. *celebesensis* (causante de la enfermedad roja bacteriana) y la s. sp *indonesiensis*. Se propuso el nuevo nombre de *Ralstonia pseudosolanacearum*, para los aislamientos en los filotipos I y III.

Cuadro 6.
Ensayos para la determinación de los biovares de *Ralstonia solanacearum*

Utilización de:	Biovar				
Maltosa					
Lactosa					
Celobiosa					
Manitol					
Sorbitol					
Dulcitol					

El patógeno puede diseminarse mediante materiales de propagación incluido cultivo de tejidos, hijos asintomáticos de plantas infectadas, herramientas, agua de escorrentía, e insectos como son avispas, abejas, etc. que visitan las flores y las exudaciones de los tallos del racimo con tejidos expuestos después de la caída de las brácteas de las flores masculinas.

Puede ser diagnosticada, mediante síntomas visuales, presencia de las exudaciones, aislamientos y pruebas bioquímicas, serología y diferentes variantes de PCR (ver acápite 8).

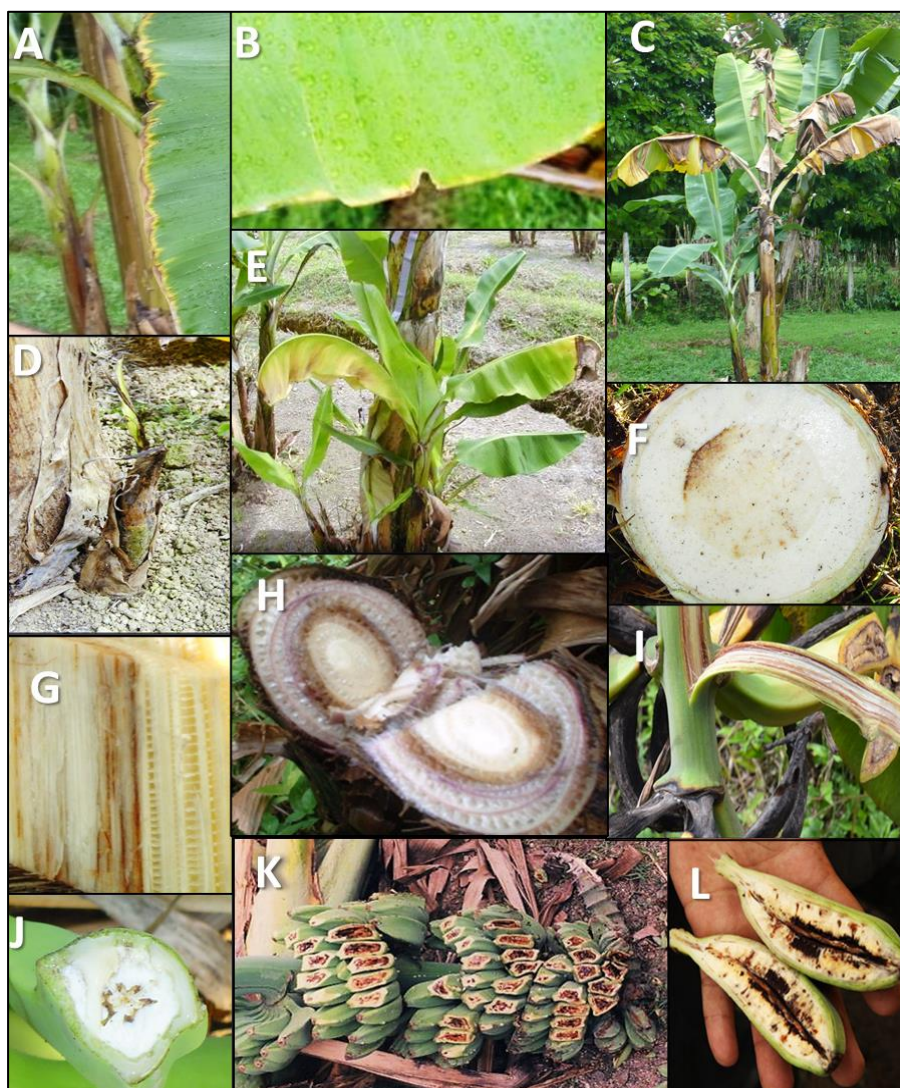


Figura 8. Marchitez bacteriana (Moko y Bugtok) por *R. solanacearum* en bananos y plátanos. A) y B) síntomas incipientes de clorosis en bordes de las hojas; C) planta de Gran enano afectada de Moko; D) yema axilar con deformaciones y E) marchitez; F) necrosis de haces vasculares y exudación bacteriana en rizoma (corte transversal); G) H) coloraciones de vasos en pseudotallo; I) coloraciones de vasos en raquis del racimo; J) exudación bacteriana en frutos de plátano Hartón (AAB); K) y L) pudriciones de frutos en Saba (ABB) en Filipinas. [Fotos: A-E) y J): L. Pérez-Vicente; F y G) H. Bornacelly; I) ICA, Colombia; K y L) V. Sinohin y G. Molina].

5.2.3. Marchitez roja bacteriana o Blood disease del banano (BDB) por *Ralstonia zyzygii* ssp. *celebesensis* ssp. nov. (Rzc; Salfi et al., 2014).

La historia y biología del BDB en el sudeste de Asia, es similar a la del Moko en América Central y del Sur. Fue informado cuando comenzó el cultivo intensivo de banano en la isla de Sulawesi (anteriormente islas Célebes en Indonesia) a principios del siglo XX, en donde algunos agricultores informaban oleadas de la enfermedad esporádicas desde muchos años antes y a la cual llamaron marchitez roja bacteriana (Blood disease), debido al exudado rojizo que emerge del tejido vascular cortado y expuesto (Eden-Green, 2018). Desde entonces, se ha distribuido en Indonesia desde Sulawesi en el oeste, hasta Papua-Nueva Guinea en el este. Ha sido informada su presencia confirmada desde el 2009 en Malasia, donde afectó el 68% aproximadamente, de 3212 ha en Johor, debido a su distribución aparentemente por lluvias intensas durante diciembre 2006-enero 2007 (Timin et al., 2014). La BDB ha devastado las áreas de producción en muchas islas del archipiélago de Indonesia, donde ha causado el abandono de las plantaciones de bananos de postre. Su aparición en Asia continental amenaza el cultivo de bananos en países vecinos como Tailandia y Myanmar.

El patógeno causante del BDB pertenece al CERS y fue llamado originalmente *Pseudomonas celebensis* y más recientemente como ha sido explicado en el acápite 8.1, *R. zyzygii* ssp. *celebesensis* ssp. nov (Safni et al., 2014). La bacteria pertenece al filotipo/sequevar IV 10 (Fegan y Prior, 2006; Bloome et al., 2017), que contiene el rango más diverso de linajes; *R. zyzygii*, la *R. zyzygii* ssp. *celebesensis* y los linajes de *R. solanacearum*, pertenecen a este filotipo (Fegan y Prior, 2005).

Los linajes de Rzc que causan BSB, son estrictamente relacionados al banano (y algunas *Heliconias*) y no a hospedantes pertenecientes a solanáceas, a diferencia de los linajes de *R. solanacearum* que causan Moko/Bugtok.

No se conocen clones resistentes al patógeno. Los síntomas de BDB comparten muchas características de los linajes “A” y “SFR transmitidos por insectos” de *R. solanacearum* que causan el Moko, como son el ennegrecimiento y marchitamiento de la yema de la flor masculina. Internamente, los frutos de todos los racimos presentan coloraciones internas del pedúnculo y el raquis del racimo, así como la pudrición roja seca de la pulpa del fruto y la coloración rojiza del tejido vascular completo de las plantas, que emiten una exudación bacteriana rojo-parda cuando se cortan (Bloome et al., 2017). Este ennegrecimiento algunas veces se extiende a los frutos localizados en la parte baja de los racimos, que en su exterior se ven saludables.

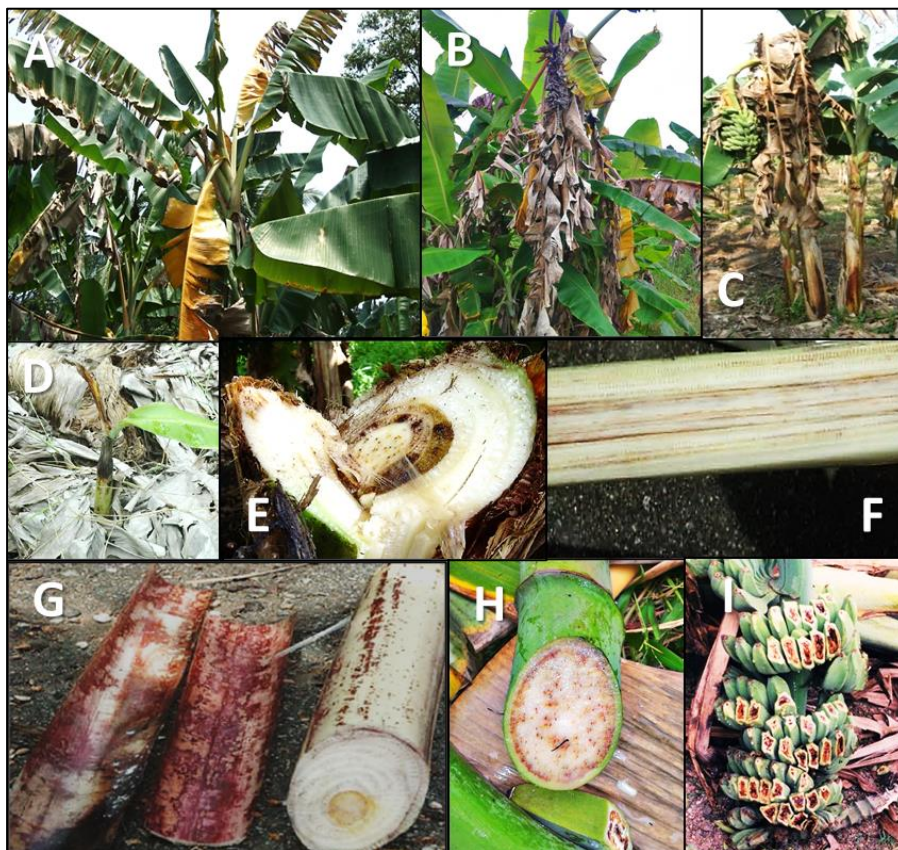


Figura 9. Marchitez roja bacteriana o Blood disease del banano (BDB) por *Ralstonia zyzygii* ssp. *celebesensis*. A), B) y C) plantas afectadas de BDB; D) rebrote con deformaciones y necrosis; E) y F) vasos enrojecidos afectados del pseudotallo; G) coloración rojiza de las vainas del pseudotallo; H) vasos rojizos del raquis del racimo; I) frutos afectados con pudriciones pardo rojizas. (Fotos: Dr. G. Molina y Dr. D. Jatil Aliah Timin.

Las hojas de cualquier edad muestran amarillamiento de los márgenes, un amarillamiento transitorio conspicuo del limbo, seguido de pérdida de turgencia, desecación y colapso (figura 9). En plantas maduras, la base del peciolo se colapsa, y las hojas marchitas penden alrededor del pseudotallo. Las hojas más jóvenes no terminan de emerger, desarrollan manchas blancuzcas en la lámina, se tornan amarillo brillante antes de volverse necróticas y secarse. Los hijuelos (o retoños), pueden mostrar un marchitamiento general; sin embargo, la infección no es siempre sistémica y algunas veces se producen hijuelos saludables. Los haces vasculares muestran en su interior, una decoloración café-rojiza, la cual, dependiendo del tipo de infección, se puede extender a toda la planta o localizarse en el raquis. Si los cortes de tejido vascular se mantienen húmedos, se observan gotas de exudado bacteriano, cuyo color puede variar de blanco a café-rojizo o negro. Ocurre en plantas adultas y se puede observar las coloraciones pardo rojizas dentro del pedúnculo y a través del raquis.

La transmisión por medio de insectos, murciélagos y aves, es la causa principal de la rápida diseminación de esta enfermedad. La enfermedad también se puede transmitir mediante material de siembra infectado, pues el patógeno puede permanecer en el suelo o en los desechos de la planta. Los frutos de las plantas infectadas también pueden convertirse en fuente de infección, cuando los racimos infectados asintomáticos, son comercializados y desechados por el consumidor en la proximidad de los huertos.

5.2.4. Pudriciones suaves por *Dickeya paradisiaca* Dickey and Victoria, 1980; Samson *et al.*, 2004 y *Pectobacterium carotovorum* s. sp. *carotovorum*. (Jones, 1901, Haubent *et al.*, 1999)

El grupo de las pudriciones suaves bacterianas por *Dickeya paradisiaca* Dickey and Victoria, 1980; Samson *et al.*, 2004 [sinónimo *Erwinia chrysanthemi* pv. *chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Dye 1969; *Erwinia chrysanthemi* pv. *paradisiaca* (Victoria & Barros 1969) Dickey & Victoria 1980] y *Pectobacterium carotovorum* s. sp. *carotovorum* (sinónimo *Erwinia carotovora*), pertenecen a las γ Proteobacterias y a la familia *Enterobacteriaceae*. Estas, están ampliamente distribuidas en todos los países productores de musáceas. Su importancia económica está vinculada a las prácticas de cultivo y las condiciones ambientales y de suelo de las fincas. Ambas bacterias se pueden distribuir en material de plantación incluido el cultivo de tejidos, si no se tienen buenas prácticas sanitarias y de producción.

Ambas bacterias (particularmente *D. paradisiaca*), se encuentra frecuentemente asociada a las plantas afectadas por *F. oxysporum* f. sp. *cubense* agente causal de la marchitez por Fusarium.

5.2.5. Pudrición acuosa del pseudotallo y necrosis del rizoma por *Dickeya paradisiaca* Dickey and Victoria, 1980; Samson *et al.*, 2004.

La pudrición acuosa del pseudotallo fue primeramente informada en el valle del Cauca de Colombia, (Llanos, 1967; Fernández y López, 1970), donde causó pérdidas severas en casi 2000 ha de plátanos. En los 1970s, la enfermedad causó serios daños en plátanos en Cuba, con incidencia en algunos campos de hasta un 75% (Rivera, 1978; Bloome *et al.*, 2017).

Está ampliamente distribuida en las plantaciones de musáceas a nivel mundial. Su diseminación a cortas distancias e incidencia está íntimamente ligada a la transmisión por las herramientas contaminadas desde plantas enfermas a sanas, durante las prácticas culturales de poda y deshijes, unido a las heridas causadas durante las mismas. La transmisión a larga distancia se debe al movimiento de material de plantación y partes de plantas infectadas. La contaminación de plantas de cultivo de tejidos ha sido causa de preocupación a los laboratorios de cultivo de tejidos (Jones, 2018a).

D. paradisiaca es un bacilo aeróbico, Gram negativo, con flagelo peritricos, que aparece en pares o solos y que no forman esporas. La bacteria es protopectinasa, amilasa, nitrato reductasa, lecitinasa y catalasa positiva; ureasa, oxidasa y gelatinasa negativa y produce gas a partir de la glucosa. No crece en NaCl al 5%, pero puede crecer a 40 °C (Rivera, 1978; Rivera y Ezavin, 1980). Las colonias en agar nutriente después de 48 h, son blancas a ligeramente grises, con bordes irregulares, con crecimiento fino granulado y después de 4 días, muestran un centro elevado bien definido. En medio YDC (extracto de levaduras-dextrosa-y carbonato de calcio), algunos aislados pueden producir un pigmento azul no difusible (Dye, 1969). En medio King B (King *et al.*, 1954), produce un pigmento pardo difusible. El patógeno puede ser aislado selectivamente en el medio de cultivo MNL (Hevesi *et al.*, 1981).

Los síntomas iniciales, aparecen como manchas translúcidas en las vainas en diferentes partes del pseudotallo o en la base de las hojas. La pudrición avanza hacia abajo en el pseudotallo y hacia el interior de las vainas y se detiene cuando alcanza el tallo del racimo (Figura 10). Cuando se realiza presión sobre los tejidos afectados, emerge un líquido fétido de color ámbar. Las plantas afectadas severamente pueden desarrollar hojas jóvenes cloróticas con márgenes necróticos y yemas pequeñas. Las plantas desarrolladas de rizomas infectados, muestran un crecimiento lento, hojas cloróticas y flácidas, así como una pudrición que se disemina hacia arriba desde la base de la planta al resto del pseudotallo (Rivera y Ezavin, 1980). Estas plantas pueden eventualmente colapsar y morir (Figura 11). Las plantas jóvenes afectadas, frecuentemente no florecen (Rivera, 1978). Un síntoma adicional es una pudrición de la vaina de un color crema a pardo oscura a nivel del suelo que luego evoluciona en una necrosis cavernosa en el rizoma que se asemeja las causadas por *Cosmopolites sordidus*. Las plantas que se desarrollan de rizomas infectados muestran crecimiento lento, hojas flácidas y una pudrición que se disemina de la base al resto del pseudotallo (Rivera y Ezavin, 1980). Los síntomas son más frecuentes e intensos en suelos secos y calientes.

Las fuentes de infección son plantas de bananos infectados y un número de hospedantes sintomáticos y asintomáticos. La enfermedad tuvo gran prevalencia en Cuba en plátanos (AAB), debido a la transmisión de material de plantación infectado y herramientas (Rivera, 1978; Pérez-Vicente, 2003).

Los datos de la diversidad genética de *D. paradisiaca* son extremadamente escasos y se requiere conducir más estudios debido al incremento de la enfermedad. Rivera y Ezavin (1980) y Rivera *et al.* (1980), encontraron que los aislados de *D. paradisiaca* obtenidos de rizomas necróticos y de la pudrición húmeda, diferían en patogenicidad y agresividad. Los aislamientos de los rizomas necróticos pueden infectar y causar lesiones en la corteza del rizoma y el pseudotallo. Los

aislamientos de las pudriciones húmedas del pseudotallo, sólo fueron capaces de afectar las vainas de las hojas, pero no de la corteza del rizoma.

La bacteria crece bien en los medios de cultivo de tejidos más usuales y estar presente en las plantas de cultivo de tejidos. Se deben indexar las plantas donantes previo al establecimiento in vitro de los meristemos para descartar plantas infectadas. Una vez establecidos se deben inspeccionar los cultivos establecidos y eliminar aquellos que muestren desarrollo de las colonias en la superficie del medio de cultivo. mantener un sistema de eliminación de los que muestren contaminación. Después de 6 pases de los meristemos y saneamiento, se ha obtenido materiales de cultivo de tejidos libres del patógeno (Hernández *et al.*, 1994).

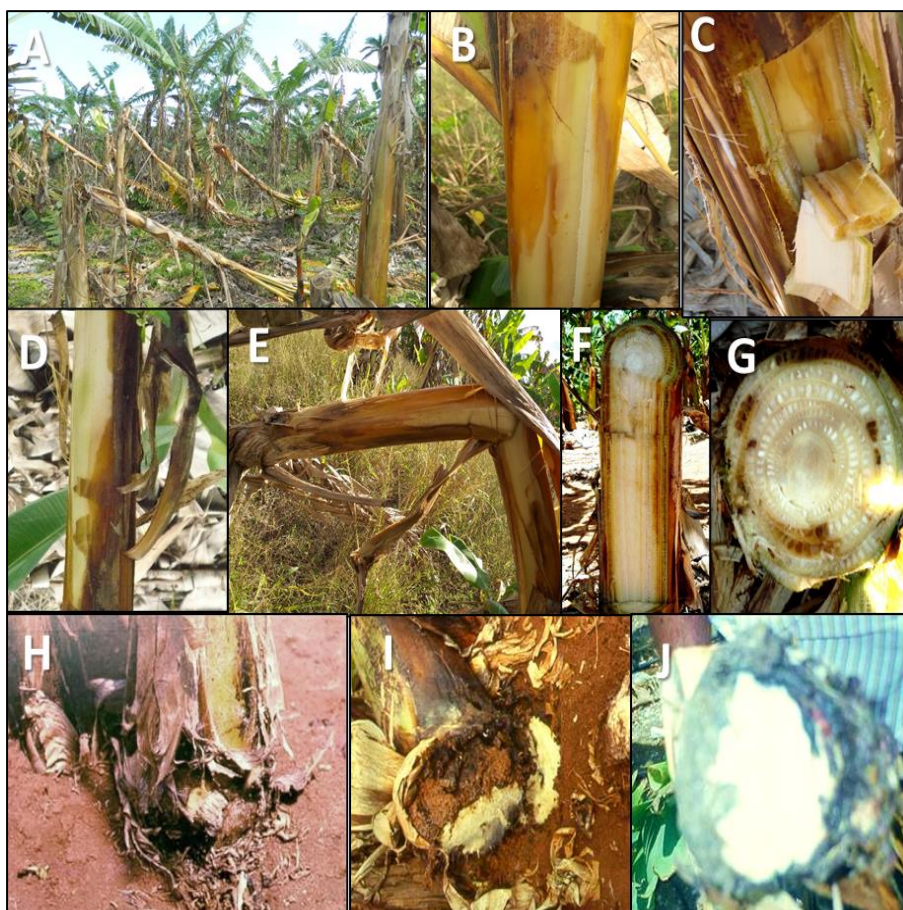


Figura 10. Pudrición acuosa del pseudotallo y del rizoma por *D. paradisiaca*: A) campo de Burro CEMSA (ABB); B), C) y D) lesiones de pudrición acuosa en pseudotallo; E) planta caída por la lesión; F y G) necrosis internas en sección longitudinal y transversal respectivamente; H) lesión externa en el rizoma a nivel del suelo en plátano AAB; I) y J) necrosis del rizoma en plátanos (AAB) y Cavendish (AAA) respectivamente. (Fotos: L. Pérez-Vicente).

5.2.6. Pudrición blanda del rizoma por *Pectobacterium carotovorum* s. sp. *carotovorum*. (Jones, 1901, Haubent et al., 1999)

La pudrición blanda del rizoma es más frecuente en suelos húmedos con drenaje pobre y pH alto y después de tormentas prolongadas de lluvia. Es más frecuente en el tiempo caliente y húmedo y durante la estación lluviosa después de 3-5 meses de plantado.

Pectobacterium carotovorum s. sp. *carotovorum*, pertenece al grupo conocido como erwinias causantes de pudrición blanda. En general el grupo de las erwinias de las pudriciones blandas, causan la maceración general del tejido afectado debido a la producción de enzimas que degradan la pared celular (Toht et al., 2003). La enfermedad es más pronunciada en hijos jóvenes los que desarrollan pudriciones y emiten un olor intenso desagradable (figura 11). Las plantas afectadas muestran una emergencia pobre de los brotes, enanismo, amarilla-miento y marchitez de las hojas y un crecimiento retardado, así como la caída de las plantas maduras y los frutos (Stover, 1972). La corteza del rizoma muestra parches de tejidos húmedos suaves, de color crema a pardo que crecen hasta cubrir todo el rizoma y emite un olor fétido. Estas áreas pueden posteriormente volverse cavidades que se asemejan a las causadas por el picudo negro (*Cosmopolites sordidus* Gemar). La podredumbre del cuello del rizoma es un síntoma característico a lo que sigue la epinastia de las hojas, que se secan repentinamente. En los estadios avanzados de la infección, es común encontrar la rajadura del pseudotallo a nivel del cuello en los cultivares Robusta, Gran enano. Las plantas afectadas pueden caerse con relativa facilidad al empujarlas o por la acción del viento, debido a la ruptura del rizoma por las partes afectadas y podridas. La caída de plantas afectadas por *P. carotovorum* se diferencia de las debido al ataque de nematodos, en que estas últimas al caer, extraen y exponen el rizoma completo y las raíces necrosadas debido al ataque de los nematodos.

En general, la diseminación ocurre por rizomas utilizados como material de plantación, contacto entre raíces, los residuos de cosecha, las herramientas de poda y deshijes, así como por insectos que se mueven entre tejidos infectados y las plantas sanas. La pudrición de los rizomas recién plantados y el fallo de su emergencia, el enanismo y el amarillamiento de las plantas, es el principal síntoma de la enfermedad.

Sobre la base del análisis de la secuencia del 16S rDNA Hauben et al. (1998), propusieron que las erwinias de la pudrición blanda fueran renombradas como *Pectobacterium carotovorum* ssp. *atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* y *Pectobacterium chrysanthemi*. *Pectobacterium carotovorum* (anteriormente, *E. carotovora*), pertenece a la clase *Gamma proteobacterias*, familia *Enterobacteriaceae*. Es un organismo oportunista, invasor de heridas, ampliamente distribuido geográficamente, e incluido en el grupo de las

10 bacterias fitopatógenas científicamente más económicamente importantes (Mansfield *et al.*, 2012). Es un bacilo aeróbico, Gram negativo, pectolítico, con flage-los peritricos, no forman esporas y produce colonias blanco grisáceas en agar nutriente.

La bacteria puede ser diagnosticada mediante métodos microbiológicos con pruebas bioquímicas y métodos moleculares, por inmunofluorescencia indirecta (IFI), ELISA con anticuerpos monoclonales y policlonales y diferentes variantes de PCR.

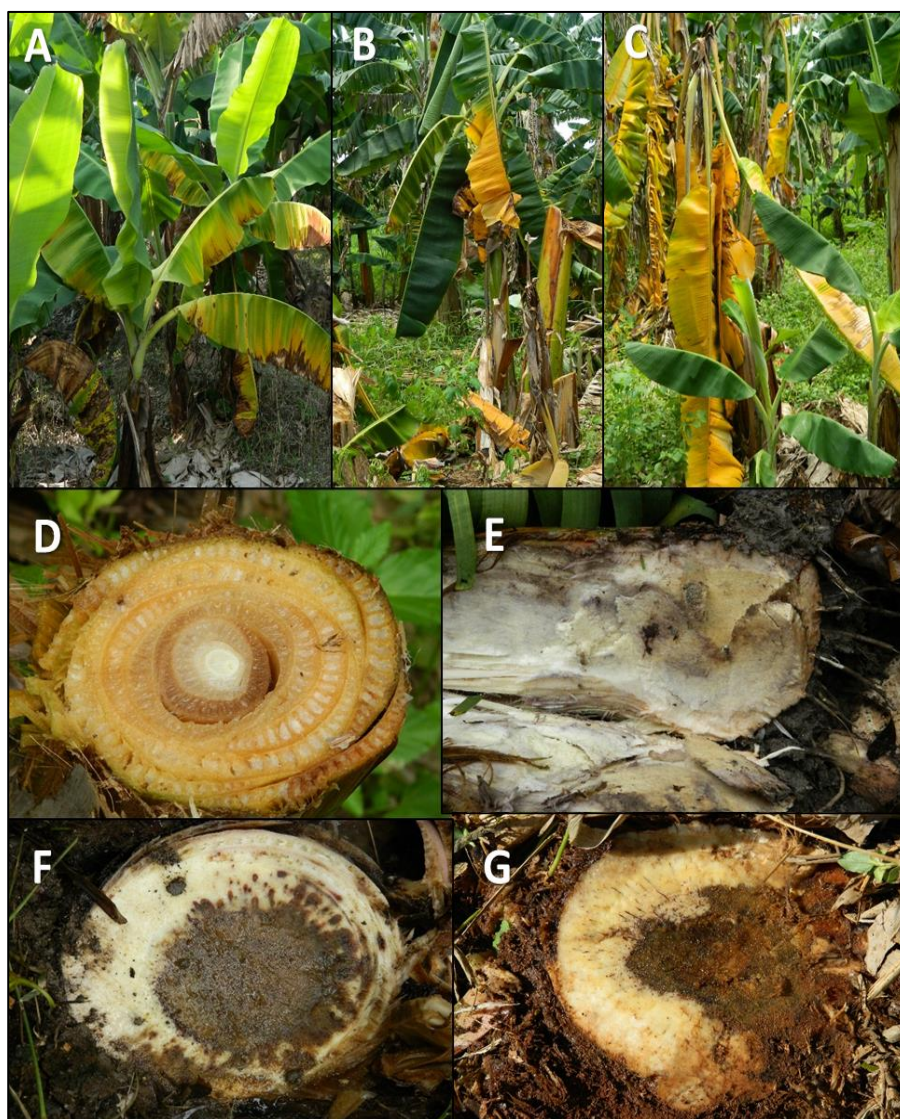


Figura 11. Pudrición húmeda del rizoma por *Pectobacterium carotovorum* s. sp. *carotovorum*: A) síntomas de inicio de marchitez en hojas del clon Gran enano en suelos húmedos; B) y C) síntomas avanzados de marchitez y pudrición del rizoma en suelos húmedos bajos, en el clon Burro CEMSA (Bluggoe, ABB); D) y E) pudrición húmeda avanzada en los pseudotallos de los clones Burro CEMSA y Gran enano respectivamente; F) y G) pudriciones húmedas pulposas en el clon Gran enano (AAA) y Burro CEMSA (Bluggoe ABB) respectivamente. (Fotos: L. Pérez-Vicente).

5.2.7. Fitoplasmas asociados a musáceas transmisibles en material de plantación.

Introducción

Los fitoplasmas son bacterias causantes de enfermedades en un rango de especies de plantas, que se diseminan por vectores. (Lee *et al.*, 2000 ; Bertaccini *et al.*, 2014 ; Marcone, 2014 ; Liu *et al.*, 2017). Estas contrastan con otras bacterias limitadas al floema (proteobacterias Gram- negativas como son los liberobacters y phlomobacters que son transmitidos por los mismos tipos de insectos, Bove y Garnier, 2003), en que carecen de pared celular y tienen un genoma de tamaño mucho más reducido (0.53–1.2 kb; Streten y Gibb, 2006). Los spiroplasmas (otro grupo de microbios transmitidos por vectores que carecen de pared celular), difieren de los fitoplasmas en que pueden ser cultivados.

Los fitoplasmas han sido nombrados en la literatura inicial usando nombres comunes basados en síntomas (ej., little leaf, yellows, big bud, phyllody, stunting, dwarfism, proliferation witches' broom, etc.) apareado al nombre de la planta. A partir del desarrollo de los métodos moleculares (RFLP, basado en la secuenciación de una porción amplificada del gen 16S rRNA y un set de enzimas de restricción), fue posible agrupar y clasificar fenéticamente los fitoplasmas en grupos. Los perfiles generados de diferentes germoplasmas son generalmente consistentes con los análisis del gen 16S rRNA, particularmente en la co-identificación y agrupamiento de los strains relacionados. Cada uno de los 33 grupos 16 Sr definidos actualmente, tienen una similitud <85% comparado con cualquier otro grupo de 16 Sr establecido (Zhao y Davis, 2016). Finalmente, los fitoplasmas han sido clasificados provisionalmente en el género "*Candidatus Phytoplasma*" (IRPCM, 2004) y están formalmente descritas 42 especies y 10 nuevas especies potenciales (Davis *et al.*, 2015). De acuerdo al Grupo de Trabajo de Taxonomía Phytoplasma/Spiroplasma una descripción de nueva especie "Ca. Phytoplasma", debe referirse a una sola única secuencia del gen 16S rRNA (<1200 pb) y un aislado reconocido como nueva especie "Ca. Phytoplasma", si su 16S sRNA tiene una secuencia genética con <97.5% de similitud con cualquier otra especie previamente "Ca. Phytoplasma" descrita (Duduk and Bertaccini, 2011; Liu *et al.*, 2017).

La falta de suficiente investigación sobre los vectores, limita las posibilidades de manejo de las enfermedades producidas por fitoplasmas. Como los fitoplasmas están limitados al floema, son transmitidos por insectos hemípteros, especialmente saltahojas (Weintraub and Beanland, 2006) aunque también pueden ser psílidos responsables en algunos patosistemas (Carraro *et al.*, 1998). La identificación de los vectores potenciales implica el muestreo de campo de hemipteros asociados y la utilización de PCR para detectar el DNA del fitoplasma. Sin embargo, la detección por PCR del DNA del fitoplasma no

garantiza su calidad de vector debido a que los insectos pueden tener el DNA en su aparato bucal por haberse contaminado en plantas enfermas sin que la bacteria haya colonizado sus glándulas salivales. Se requiere que plantas sanas sean infectadas dentro de jaulas a prueba de insectos, con insectos alimentados en plantas infectadas y desarrollen síntomas.

5.2.8. Marchitez por fitoplasma del banano (BWAP), asociada al “*Candidatus Phytoplasma Asteris*” y marchitez del banano y síndrome Borgia del cocotero (Banana wilt and Borgia coconut syndrome) asociada al “*Candidatus Phytoplasma novoguineense*”.

En 2012, se informó una marchitez de bananos de cocción (ABB) de Papua-Nueva Guinea (PNG), asociada a un fitoplasma del grupo 16Sr IV (Davies *et al.*, 2012), el cual nombró Banana wilt associated phytoplasma (BWAP).

Los síntomas descritos en las plantas afectadas son la aparición de un amarillo intenso con un tono naranja y muerte de hojas, acompañado de síntomas internos en el pseudotallo consistentes en un rayado discontinuo, junto a pequeñas regiones de tejido vascular pardo o negro, usualmente acompañadas de áreas más grandes con bolsas necróticas húmedas (figura 12) y el no llenado de los racimos de las plantas afectadas (Davies *et al.*, 2012; Miyazaki *et al.*, 2018). Estos diferentes síntomas aparecen independientes o en conjunto en las plantas afectadas. La enfermedad fue posteriormente informada en las Islas Salomon (Davies *et al.*, 2015). El BWAP en el este de PNG y las Islas Solomon son similares a la especie previamente encontrada, pero suficientemente diferente para que no sea incluida en el mismo ‘*Candidatus*’ especie y mucho menos se conocen sus vectores (Dr. R. Davies Plant Pathologist at Northern Australia Quarantine Strategy; comunicación personal, setiembre 2020).

El síndrome en coCôteros informado en el 2008, ha sido solo encontrado en el distrito Borgia en la provincia Madang en Papua Nueva Guinea (Jackson, 2017).

En un primer reporte Davies *et al.*, (2012), informaron que las secuencias de los productos de la amplificación de la región 16Sr, presentan una alta similitud con las del fitoplasma del grupo 16SrIV, asociado a la marchitez letal del coCôtero, informada en Papua-Nueva Guinea (Kelly *et al.*, 2011), por lo que sugirieron que el banano debía ser investigado como un posible huésped secundario en una nueva epidemia del fitoplasma de la marchitez letal en Papua Nueva Guinea. En otras plantas infectadas aparecieron fitoplasmas asociados al grupo 16SrVIII.

En estudio posterior, se reportó que el BWAP, Borgia coconut phytoplasma, (BCo) y el Areca (*Areca catechu*) yellow leaf phytoplasma compartían secuencias 16S rRNA casi idénticas y con menos de un 97.5% de si-

militud con la de los demás grupos y propusieron una nueva especie de fitoplasma “*Candidatus Phytoplasma noviguineense*” (Miyazaki *et al.*, 2018).

Se considera que los fitoplasmas de bananos y coCôteros, en esas islas se derivaron de un ancestro común (Davies *et al.*, 2015) Se conoce muy poco y no está totalmente definido las especies de insectos que dicen minan el fitoplasma y los estudios están en progreso (Dr. R. Davies Plant Pathologist at Northern Australia Quarantine Strategy (NAQS); comunicación personal, setiembre 2020). Se han encontrado en encuestas de campo especies de las familias *Delphacidae*, *Derbidae*, *Flatidae*, *Lophopidae*, *Pentatomidae* y *Ricaniidae* que portan esos fitoplasmas (Miyazaki *et al.*, 2018). El interés se ha centrado en *Zophiuma pupillata* (Hemiptera: Lophopidae) que se alimenta comúnmente en coCôteros y palmas *Areca*, aunque menos en bananos, especie en la que el fitoplasma ha sido encontrado tanto en adultos como en ninfas. Esto implica, que los fitoplasmas encontrados en Nueva Guinea tienen un ciclo de vida complejo que involucra al menos tres especies diferentes (coCôteros, bananos y palma de areca; Miyazaki *et al.*, 2018). En la India hay especies del género *Prouisia* que diseminan fitoplasmas en coCôteros y caña de azúcar (Jackson, 2017).

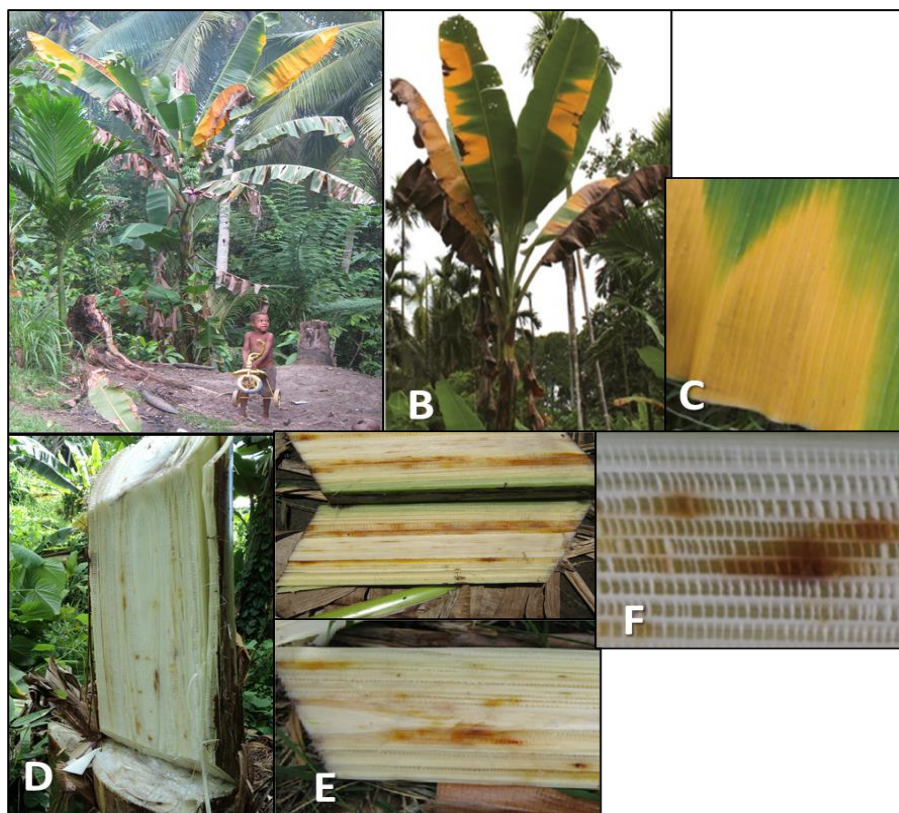


Figura 12. Marchitez del banano asociada a los fitoplasmas BWAP y “*Candidatus Phytoplasma noviguineense*”: A) y B) Plantas con síntomas de hojas amarillas intenso; C) fragmento de hojas mostrando síntomas amarillo brillante intensos desde el borde hacia la nervadura central. E) síntomas internos en pseudotallo de líneas discontinuas y pudriciones húmedas pardo oscuro; E) Detalle de los paquetes de pudriciones pardo oscuro. (Fotos del BWAP del Dr. Richard Davies).

5.2.9. Elefantiasis del banano y el plátano asociada a *Candidatus Phytoplasma asteris*'

La elefantiasis es una rara anomalía que afecta las musáceas en forma de brotes localizados que han sido informados en Surinam, Colombia, República Dominicana, Costa Rica, Panamá y Honduras (Stover, 1972; Jones 2018b) y cuya etiología ha sido relacionada a especies de *Fusarium* (Jones, 2018b), contenido de materia orgánica del suelo y mas recientemente asociada al fitoplasma "*Candidatus Phytoplasma asteris*" (Alvarez y Aliaga, 2018; Aliaga *et al.*, 2018).

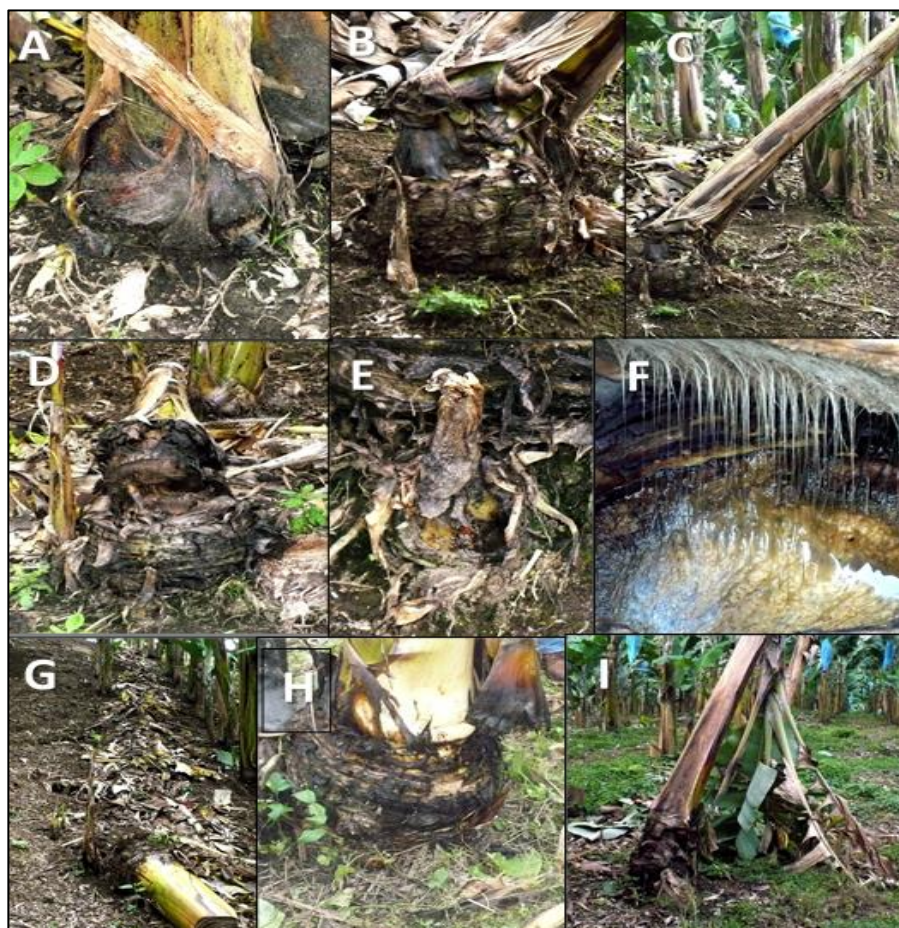


Figura 13. Síntomas de Elefantiasis en los clones Gros Michel (AAA) y Hartón (AAB) Colombia: A-G) Síntomas en banano Gros Michel en Pereira: A - B) aumento del volumen de la base del pseudotallo y ruptura de las vainas en la unión con rizoma; C-D) partidura del pseudotallo; E) hijo necrosado con pudrición; F) necrosis y pudrición del rizoma en la unión con el pseudotallo; G) hilera de plantas afectadas muertas en Gros Michel en el mismo sentido de la pendiente; H e I) síntomas de elefantiasis en plátano Hartón en finca en Armenia, Colombia. (Fotos L. Pérez-Vicente).

Los síntomas consisten en un crecimiento desproporcionado en la unión del seudotallo con el rizoma a consecuencia del cual se produce una ruptura de las vainas del seudotallo justo arriba del rizoma (figura 13). Esta

ruptura continua hacia adentro del seudotallo hasta que este se dobla y cae, dejando un tocón cónico. Este está asociado frecuentemente a una zona estrecha de pudrición que puede estar relacionada a otras bacterias fitopatógenas. Los hijos pueden aparecer normales o deformados y pueden desprenderse fácilmente al nivel del suelo. No se observan síntomas internos en el rizoma. Alliaga *et al* (2018), describen una necrosis del extremo que limita el desarrollo de la planta, la apariencia arracimada del desarrollo de los hijos debido a que los peciolos permanecen rígidos. El tamaño de los frutos, se reduce y el rizoma se desarrolla tomando una apariencia cónica.

La enfermedad ha sido encontrada afectando los clones Gros Michel (AAA) y Hartón (plátano; AAB) en el eje cafetero en Armenia, Pereira y en el valle del Cauca con incidencias de 6-30% y reducciones de rendimiento entre 9 y 71.6% (Alvarez y Alliaga, 2017).

5.3. Patógenos fúngicos regulados que se diseminan en el material de propagación

5.3.1. La marchitez por *Fusarium* de las musáceas por *Fusarium odoratissimum* N. Maryani, L. Lombard, Kema & Crous, sp. nov. (sin. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Sm.) W.C. Snyder & H.N. Hansen, raza 4 tropical).

La marchitez por *Fusarium* conocida también popularmente y en la literatura como mal de Panamá (Panamá disease), por su impacto en este país en el pasado siglo, sobre la producción bananera basada en el clon Gros Michel, es una de las enfermedades más nocivas de las musáceas y en general de la agricultura a nivel mundial y a la cual se ha dedicado numerosos recursos en la investigación, prevención, manejo y atención en reuniones técnicas y científicas. A partir del reemplazo del Gros Michel por los Cavendish resistentes a la raza 1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubensis* en América, la enfermedad fue relegada a un segundo plano, hasta la aparición a finales del siglo XX primero en Taiwán y después en Indonesia y Malasia, de las poblaciones denominadas inicialmente como raza 4 tropical.

La descripción de la enfermedad, impacto, ecología e interacciones en el suelo, interacción patógeno-hospedante, resistencia de los clones, métodos de prevención, factores de prevalencia, sistemas diagnóstico y medidas de manejo, han sido informados en numerosos documentos desde mediados de los 50's del pasado siglo hasta el presente (Stover, 1962; Stover, 1970; Wardlaw, 1970; Ploetz, 1990; Ploetz and Pegg, 1997; Pérez-Vicente, 2004, Dita *et al.*; 2013; Pérez-Vicente *et al.*; 2014; Ploetz *et al.*, 2015; Dita *et al.*; 2018; Ploetz, 2018). El OIRSA publicó un Plan de Contingencia para la prevención y manejo de la enfermedad (Dita *et al.*, 2013), del cual existe una segunda edición en revisión) donde se hace una exhaustiva exposición de la historia de la enfermedad y de los estudios realizados. Para los fines del presente

protocolo sólo se discutirá los cambios taxonómicos y se reproducirán los síntomas, las características morfológicas y los aspectos relacionados al diagnóstico molecular y aunque se establece una relación de los ensayos de diagnóstico moleculares que han sido documentados, solo se reproducirán los detalles de aquellos que han sido recomendados para ser utilizados en la región del OIRSA.

La enfermedad se caracteriza por ser una marchitez letal, cuyos síntomas externos son el amarillamiento de las hojas más viejas de la planta, una rajadura longitudinal de la base de las hojas externas en el pseudotallo, seguida del colapso de las hojas por la base del peciolo que quedan colgantes alrededor del pseudotallo (ver síntomas en figura 14). Se han distinguido dos síndromes, uno llamado de hojas amarillas caracterizado por una amarillez brillante conspicua y efímera de las hojas, que persiste unos pocos días, seguido de la caída y necrosis de las mismas y un síndrome de hojas verdes y colapso de estas (Stover, 1972). Aparecen hojas adicionales más jóvenes afectadas y un racimo usualmente de frutos pequeños sin ningún valor comercial. Los hijos raramente muestran síntomas en las primeras etapas de desarrollo hasta tanto la planta madre haya emitido racimo y se independicen, aunque presenten coloraciones internas de los vasos del xilema, a nivel de la unión del rizoma con la planta madre (período de latencia largo). Esto ha contribuido grandemente a la dispersión de la enfermedad por la utilización de hijos de siembra asintomáticos provenientes de plantas afectadas. Las plantas que mueren por la infección quedan erectas.

Los síntomas internos son la presencia en el pseudotallo, el rizoma y raíces de los vasos del xilema, con coloraciones rojizas y pardas. Estas comienzan por las raicillas secundarias donde ocurre la infección inicial, progresan al rizoma (más pronunciadamente en la unión de la corteza con el cilindro central) y ascienden por el pseudotallo y según la susceptibilidad de las plantas, pueden alcanzar los peciolo de las hojas como pueden apreciarse en los clones Manzano (Silk, AAB; Gros Michel AAA; Lakatan AAA; etc.). En el interior de las vainas del pseudotallo, pueden observarse rayas pardas progresando.

Los síntomas de las marchiteces bacterianas son parecidos, pero en el caso de la marchitez por *Fusarium* los síntomas no son visibles en hijos de al menos cuatro meses, no hay exudaciones bacterianas, ni los frutos muestran síntomas.

En plantas inoculadas artificialmente o en yemas plantadas en suelos con alta concentración de inóculo, los síntomas visibles pueden aparecer en 40 a 50 días en forma de amarillamiento de los bordes de las hojas, marchitez y muerte de las plantas. Los rizomas desarrollan las necrosis características internamente, cuya extensión depende de la susceptibilidad del cultivar.

No hay diferencias en la expresión de los síntomas producidos por las diferentes razas y poblaciones pertenecientes a diferentes grupos de

compatibilidad vegetativa (VCG's) (Pérez-Vicente, 2004, Dita *et al.*; 2013; Pérez-Vicente *et al.*; 2014). Por otro lado, es imposible distinguir morfológicamente las estructuras fúngicas de las poblaciones de R4T de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* de las de otras razas de Foc y de otros *F. oxysporum*.

Debido a que no existen diferencias marcadas en cuanto morfología y síntomas, solo los estudios filogenéticos han permitido en primer lugar establecer la variabilidad del taxón, concluir que *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* está constituido por un complejo de especies (O'Donnell *et al.*, 1998; Ploetz, 2006; Fourie *et al.*, 2009, Ordóñez, *et al.*, 2015), resultado de diferentes procesos evolutivos y cuyo centro de origen se encuentra en la región Indo-malaya y finalmente, disponer de sistemas de diagnóstico sensibles y específicos en base a la PCR. Estudios más recientes de la variabilidad morfológica junto a marcadores moleculares, han originado una propuesta de nuevas especies hasta el momento crípticas, vinculadas al síndrome de marchitez por *Fusarium*. Entre estas diferentes especies han sido encontradas varias afectando Gros Michel y, por tanto, pueden clasificarse como pertenecientes a la raza 1 de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* según la clasificación de Stover (1962). Se ha considerado (Stover, 1972), que lo que se ha conocido hasta el momento como raza 1, entró en América en el clon Silk (Manzano AAB, aunque la mayor parte de los informes iniciales han sido en Gros Michel, probablemente debido, a que el desarrollo de la industria de exportación en Centro América y el Caribe se basaba en este último clon, del cual existían grandes extensiones y una mayor atención técnico-económica). Las introducciones del patógeno en América desde su centro de origen, pudo dar lugar a un cuello de botella genético, que, junto a un evento de fundación, haya determinado la variabilidad filogenética y estructura actual de las poblaciones distribuidas en Latinoamérica y el Caribe. Las relaciones filogenéticas entre las poblaciones actuales en América y las especies *F. grosmicheli*; *F. purpurascens*; *F. phialophorum*; *F. duoseptatum*; *F. tardichlamydosporum*; *F. hexaseptatum*; *F. tardicrescens* de patogenicidad débil en Cavendish y Gros Michel, ahora definidas por Maryani *et al.* (2019) afectando Gros Michel (Foc R1) en Indonesia, deben ser determinadas, porque la mayor parte de los estudios filogenéticos realizados hasta el momento, han incluido mayormente, poblaciones originadas en Asia y Oceanía que cubre el centro de origen de las musáceas y de la enfermedad. La raza 4 tropical/VCG 01213, pertenece a un único genotipo de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, que ha sido distribuido clonalmente alrededor del mundo (Ordoñez *et al.*, 2015).

Se ha recomendado (Summerell, 2019), que el estatus de formae specialis en *Fusarium*, se restrinja a líneas dentro de *F. oxysporum* o del complejo de especies de *F. oxysporum*, cuya identidad se haya confirmado mediante: i) diagnóstico de DNA [translocation elongation factor-1 α (TEF1 α) y la ARN polimerasa 1 y 2 (RPB1/RPB2)]; ii) se haya com-

probado mediante test de patogenicidad, los postulados de Koch y iii) su variabilidad se haya evaluado mediante un ensayo de Grupos de Compatibilidad Vegetativa o mediante técnicas de genética de poblaciones, basadas preferiblemente en la confirmación de la presencia de un gen(es) efector(es). Algunos de las formae especiales de *F. oxysporum* han sido propuesta elevarlas a especies, como, por ejemplo, la propuesta por Maryani *et al.* (2019), de elevar a rango de especie a la actualmente reconocida raza 4 tropical de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, como *F. odoratissimum*. Estas propuestas pueden ser controversiales y potencialmente confusas para practicantes y legisladores y posiblemente determinen que esos cambios para bien o para mal, sean ignorados y no sean totalmente asumidas por todos los grupos académicos en bases taxonómicas y por todos los servicios de Sanidad vegetal, por las implicaciones de diferente naturaleza que pueden tener en la práctica (Summerell, 2019).

En el documento nos referimos a R4T o *F. odoratissimum* indistintamente, partiendo de que hemos establecido la sinonimia entre ambos nombres.

Los miembros del complejo de especies de *Fusarium oxysporum* (FOCS), crecen rápido radialmente (4-7 mm/día) a 24°C en PDA, produciendo un micelio aéreo abundante, con una pigmentación salmón, rosa, blanca, o púrpura (Leslie y Summerell, 2006). Los microconidios y macroconidios se desarrollan en monofiálides ramificadas y no ramificadas (Dita *et al.*, 2013). Los microconidios son de una o dos células, ovales o arriñonados, de 5-16 x 2.4-3.5 µm y nacen formando falsas cabezas. Los macroconidios 27-55 x 3.3-5.5 µm tienen de 4 -8 células, son falcados, de pared delgada y delicados, con una célula basal en forma de pie y una apical atenuada. Las clamidosporas son de 7-11 µm de diámetro, usualmente globosas, aislados o en cadenas.

Maryani *et al.*, (2019), realizaron la siguiente descripción de *F. odoratissimum* de las poblaciones estudiadas en Indonesia: macroconidios abundantes formados en esporodoquios en agar hojas de clavel (CLA) y menos abundantes en conidióforos aéreos en PDA y SNA (Agar Spezieller-Nährstoffarmer); son falcados, de 44–79 µm, (más frecuentemente de 59–75 µm) × 6–8 µm, (promedio 67 × 7 µm), con 0–6 septos; célula apical papilada y célula basal en forma de pie. Las células conidiógenas mono o polifiálidicas en esporodoquios o formadas directamente sobre hifas (fiálides laterales) 12-28 x 4-8 µm. Microconidios abundante en PDA y SNA, menos frecuentes en CLA. ovales a elipsoides de 6-23 x 4-8 µm más frecuentemente 8-16 x 6 µm (12 x 5 µm promedio); 0-3 septos, agrupadas en falsas cabezas en fiálides laterales. Los conidióforos aéreos son raros en CLA y SNA, pero se forman abundantemente en PDA, ramificados o formados lateralmente. Las clamidosporas son globosas a subglobosas, formadas intercaladamente o terminalmente, aisladas o en pares de 7-14 x 7-12 µm, más frecuentemente 9-13 x 8-11 µm, raramente producidas en SNA después de 7 días,

de paredes rugosas. Las clamidosporas se forman abundantemente en los tejidos infectados y pueden permanecer en el suelo por muchos años.

El patógeno se disemina por múltiples vías como son los tejidos infectados de plantas o partes de plantas, el arrastre en partículas de suelo por agua de escorrentía, insectos, herramientas, zapatos, equipos y todo lo que mueva el suelo. Las actividades humanas han sido el principal agente diseminador del patógeno.

El movimiento de material agámico infectado ha sido una vía principal de distribución a grandes distancias. Debido a que el patógeno está restringido al xilema de las plantas, las plantas producidas por cultivo de tejidos son poco probable de estar infectadas amén de que Foc crece bien en la mayoría de los medios utilizados en el cultivo de tejido vegetal rico en nutrientes y factores de crecimiento por lo que es fácil la detección eventual del patógeno producto de donantes infectados y la eliminación de los cultivos contaminados.

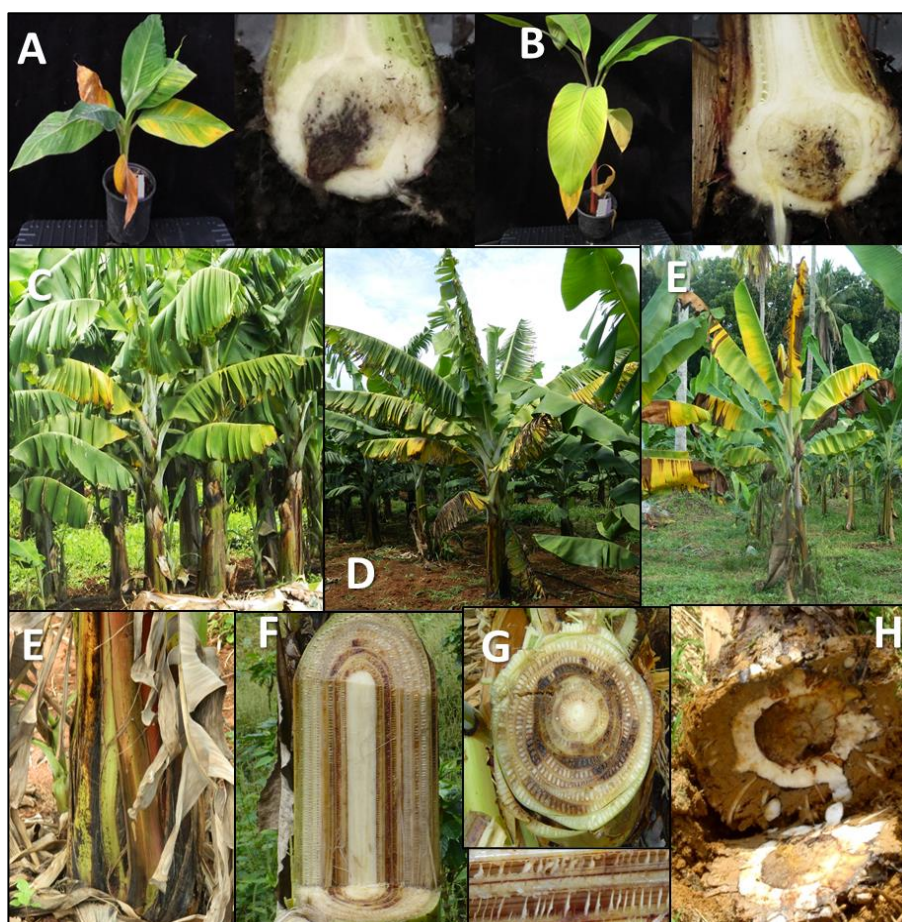


Figura 14. Marchitez por *Fusarium* de las musáceas: A) y B), plantas de 45 días de edad infectadas de R4T con síntomas foliares y necrosis del rizoma en SH 3640 y Pisang ceylan respectivamente; C) y D) síntomas iniciales externos causados por R4T en Formosana y Williams respectivamente, en Mozambique; E) síntomas de R4T en Lakatan (AAA), en Davao; E) rajadura del pseudotallo; F) y G) necrosis de los vasos de xilema; H) síntomas en rizoma. [Fotos: A) y B) E. Martínez de la Parte; C a H.) L. Pérez-Vicente].

5.3.2. Recomendaciones para el diagnóstico

El presente acápite incluye una recopilación y descripción de los métodos de diagnóstico para la información de todos los grupos de interés que consultan el presente documento.

Para la ejecución de todos los protocolos, se deben mantener las mejores prácticas de bioseguridad como son el uso de materiales estériles, batas sanitarias y guantes desechables, CAB Internationals de bioseguridad para el aislamiento de patógenos, ácidos nucleicos, operaciones de cultivo y técnicas de biología molecular, instalaciones y dispositivos para la inactivación y destrucción de los desechos, así como estrictas restricciones de acceso a las instalaciones donde se realizan las operaciones.

Toma de muestras

En la descripción de los métodos de diagnóstico de cada patógeno, se especifica la muestra a tomar en cada caso, si hay particularidades a mencionar de acuerdo a las características biológicas y la experiencia acumulada para el diagnóstico por diferentes procedimientos.

En todos los casos, se deben mantener las mejores prácticas de bioseguridad para la toma, manipulación y transporte de las muestras. Para la toma de muestras durante el proceso de post entrada, debe disponerse de los materiales incluidos en el Cuadro 7. En este mismo cuadro, se relacionan materiales que se necesitarán no solo dentro de los laboratorios y las casas de crecimiento, sino también en la inspección para la vigilancia de las áreas alrededor de las instalaciones de contención para detectar plantas infectadas con síntomas debido a escapes eventuales del confinamiento.

Cuadro 7.

Lista de materiales y equipos recomendados para la colecta de muestras de plantas sospechosas de estar infectadas por patógenos cuarentenarios de las musáceas

Material	Verificación
Bolsas autoclavables	
Bolsas de plástico para la recolección y descarte de material	
Bolsas tipo Ziploc para la colecta de muestras	
Botas de hule	
Cubre-zapatos (impermeables) desechables	
Cámara fotográfica o teléfono con capacidad de tomar fotos	
Cinta adhesiva resistente al agua Cinta amarilla para delimitar el radio (5 m) de la planta sospechosa	
Desinfectantes [alcohol (70-95%); productos a base de amonio cuaternario (hasta 10.000 ppm); hipoclorito de sodio (≥ 3.000 ppm)]	
Encendedor o cerillos	

Equipo de georeferenciación (GPS)	
Escalpelos (Bisturios)	
Etiquetas adhesivas	
Formulario para toma de datos en campo	
Guantes quirúrgicos (látex)	
Cubre bocas	
Hielera o Geles refrigerantes (en caso de optar por enviar muestras refrigeradas)	
Insecticida de amplio espectro	
Láminas o bolsas de plástico para colocar las muestras en el campo	
Lupa	
Machetes, cuchillo, cuchillas, tijeras	
Marcadores (spray/aerosol fluorescente)	
Marcadores indelebiles	
Overol o ropa desechable	
Pediluvio portátil (Tapete, Baden)	
Pinzas	
Sobres de papel con protección interna impermeable	
Toallas de papel absorbente	
Tubos de ensayo con sus respectivas tapas	

5.3.3. Protocolo *Banana virus indexing ring test 2017* mediante inmuno captura y reverso transcripción, PCR múltiple [Multiplex IC-(RT)-PCR para la detección de BBTv, CMV, BBrMV y BanMMV, basado en el protocolo de Sharman et al. (2000b)].

Inmunocaptura

- Cubrir los tubos con 25 µL de una mezcla de anticuerpos combinados en tampón carbonato por 1 h a 37°C, o 3 h a temperatura ambiente, o una noche a 5°C.
 - BBTv PC IgG (1 mg/mL) at 1 µg/mL dilución 1/1000
 - CMV (Sediag) dilución 1/1000
 - BBrMV IgG (1 mg/mL) at 5 µg/mL dilución 1/200
 - BanMMV (Ducasse) (1 mg/mL) at 5 µg/mL dilución 1/200
- Lavar los tubos por 3 x 3 minutos con PBS-T.
- Añadir 25 µL del tejido de la hoja macerado en tampón de extracción de CMV a razón de 1/10 (p/v), clarificado e incubar por 2 h a 37 °C, o 4 h a temperatura ambiente, o durante una noche a 5 °C.
- Lavar los tubos 3 veces por 3 minutos con PBS-T y enjuagar con agua destilada estéril.
Asegurarse que los tubos están vacíos de líquido.

Síntesis de cDNA y PCR

- Añadir la mezcla de reacción subtotal de cDNA a cada tubo e

- incubar siguiendo el protocolo del cuadro 8.
6. Prepare la mezcla de reacción de PCR, prepare alícuotas, y distribúyalas en tubos de PCR limpios en tubos limpios de PCR.
 7. Añada los productos de la reacción de síntesis del cDNA (incluye el DNA de BBTV) a la mezcla de reacción de la PCR y corra el programa de la PCR en el termociclador. En el cuadro 8, se muestra la composición de las mezclas para las reacciones.

Cuadro 8.

Composición de las mezclas de los componentes para las reacciones de PCR.

Mezclas de reacción de cDNA para ____ reacciones.			Mezclas de reacción de PCR para _ reacciones.		
Reactivo	Cálculo	Volumen x _ reacciones.	Reactivo	Cálculo	Volumen x _ reacciones.
H ₂ O destilada estéril	11.0 μl	μl	H ₂ O destilada estéril	13.96 μl	μl
20 μM de cebador Poty1	0.75 μl	μl	Tampón PCR 10 × (Invitrogen)	2.0 μl	μl
20 μM de cebador CMV3'	0.75 μl	μl	MgCl ₂ 50 mM (Invitrogen)	0.7 μl	μl
<i>SUBTOTAL</i>	12.5 μl	μl	Mezcla de dNTP 10mM	0.4 μl	μl
Incubar a 80°C luego poner en hielo por 10 min,			Cebador BBT1 10 μM	0.4 μl	μl
			Cebador BBT2 10 μM	0.4 μl	μl
			Cebador CMV3' 20 μM	0.34 μl	μl
Tampón de síntesis de la primera cadena 5X	4.0 μl	μl	Cebador CMV5' 20 μM	0.4 μl	μl
0.1 M DTT	2.0 μl	μl	Cebador Poty1 20μM	0.4 μl	μl
10 mM dNTP mix	1.0 μl	μl	Cebador Bract 1 20 μM	0.4 μl	μl
<i>RNaseOUT</i> (40U/μl)	0.25 μl	μl	Cebador Bract 2 20 μM	0.4 μl	μl
<i>Superscript III</i> (200U/μl)	0.25 μl	μl	<i>Taq</i> (Invitrogen)	0.2 μl	μl
<i>SUBTOTAL</i>	7.5 μl	μl	<i>SUBTOTAL</i>	18.0 μl	μl
Incubar a 50°C por 45 min			<i>cDNA molde</i>	2.0 μl	

Incubar a 70 °C por 15 min, hielo			TOTAL	20.0 µl	
--------------------------------------	--	--	-------	---------	--

Tamaño de los productos de PCR:

BBT1 / BBT2: 349 pb
 CMV3' / CMV 5': 500 pb
 Bract 1 / Bract 2: 604 pb
 Poty1 / Bract 1: 700 pb

Programa de PCR

1. Desnaturalización inicial a 94 °C por 1 minuto
 2. 35 ciclos de desnaturalización:
 - 94°C por 20 segundos
 - 60°C por 20 segundos
 - 72°C por 40 segundos
 3. Paso final de elongación de la cadena 72°C por 3 min.
8. Electroforesis de 8 µL del producto de la PCR en gel de agarosa-TBE 1.5%.
 9. Teñir, visualizar y fotografiar el gel.
 10. Preparar y correr la PCR de BanMMV usando el producto de esta reacción de cDNA como molde.

5.3.4. Protocolos de detección de Banana bunchy top virus (BBTV).

Toma de muestra para el diagnóstico de BBTV.

Según Thomas (2015), para el diagnóstico del BBTV, el tejido óptimo a tomar, es la nervadura central de las hojas más jóvenes, aunque el virus puede también ser detectado de la lámina de la hoja, el pseudotallo, los meristemos durmientes, el tallo del racimo, las brácteas y la piel del fruto. El virus puede también ser detectado en la hoja precedente a la primera hoja sintomática.

Diagnóstico serológico con anticuerpos específicos.

El virus puede ser detectado por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) en muestras de plantas, plántulas de cultivo de tejidos y en áfidos infectados. (Thomas and Dietzgen 1991; Thomas, 1991). Existen anticuerpos monoclonales y policlonales (Dietzgen and Thomas 1991; Wu and Su, 1990). Agdia produce un juego de reactivos para diagnosticar el BBTV por ELISA (SRA 24700/0096 para 96 pocillos). La reacción se ejecuta de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Los análisis mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Hu *et al.* 1996; Mansoor *et al.* 2005; Sharman *et al.* 2000b), son una alternativa sensible para la detección y existen cebadores para los componentes 1 al 6 del DNA del BBTV (Burns *et al.* 1995; Stainton *et al.* 2012).

Recientemente se han descrito para la detección de BBTV, la PCR

en tiempo real (Chen and Hu, 2013), la amplificación isotérmica mediada por lazo (loop mediated isothermal amplification; LAMP; Peng *et al.* 2012b), y la espectroscopía de impedancia (Majumder *et al.*, 2013). Sin embargo, estos métodos no han sido aún probados contra un rango diverso de aislados de BBTv para probar su aplicabilidad.

La detección mediante Multiplex PCR ha sido también informado por Sharman *et al.* (2000b) y Liu *et al.* (2012), la cual fue adaptada por el grupo temático de conservación de MusaNet en 2017 para ensayos inter laboratorios incluida en el protocolo 1 de este anexo.

El tiempo mínimo después de la infección para el diagnóstico de BBTv usando PCR, es de 15 días (Hooks *et al.*, 2008).

En plantas inoculadas el virus puede ser detectado después de 12–25 días dependiendo del genotipo y el estado de la infección (Hooks *et al.*, 2008) en cualquier parte de la planta infectada; sin embargo, la detección más sensible es en muestras de nervadura central de la hoja más joven.

5.3.5. Protocolos de detección de las especies de *Banana streak virus* (BSV).

El diagnóstico del complejo de virus del BSV debido a la coexistencia de secuencias episomales e integradas (activables bajo condiciones de estrés), es complejo y no es en general eficiente y confiable mediante métodos serológicos. Existen antisueros de Agdia que no detectan todas las variantes del virus.

Thomas (2015), propuso la utilización del anticuerpo para *Sugar cane bacilliform virus*, SCBV, que comercializa la firma AGDIA en la M-IC-PCR, por ser este un badnavirus serológicamente relacionado con BSV. Este anticuerpo combinado con uno desarrollado contra la especie BSMYV aseguraría la detección de una amplia diversidad de especies del virus por IC-PCR. Este último puede ser el de SEDIAG o Anticuerpos anti BSMYV desarrollado por Thomas y su equipo.

La detección del complejo viral se basa en diferentes variantes de PCR entre ellas la PCR inmunocaptura y la PCR múltiple [Multiplex-Immunocapture- PCR (M-IC-PCR); Le Provost *et al.*, 2006] con un paso adicional de tratamiento con DNase I para evitar que el genoma de *Musa* sp. esté presente como contaminante de la PCR (Thomas, 2015).

Detección de BSV por PCR inmunocaptura [Le Provost *et al.* (2006), modificado].

Javer *et al.*, (2009; 2014) estudiaron la variabilidad del complejo de BSV en Cuba utilizando un protocolo de PCR múltiple con inmunocaptura según Le Provost *et al.* (2006). Se detalla a continuación, el protocolo que ha sido modificado con la reducción el tiempo de inmunocaptura y la adición de un paso de DNase I para eliminar las contaminaciones con DNA genómico:

Inmunocaptura:

1. Recubrir las placas de PCR de 96 pocillos o tubos de polipropileno de 0,5 o 0,2 µL con 25 µL de antisuero policlonal a 2µg/ml en tampón carbonato-hidrogeno carbonato de sodio pH 9,6. (El antisuero utilizado puede ser el policlonal producido por Lockhart, pero no es comercial, el cual puede sustituirse por el antisuero policlonal producido por Agdia para la detección del *Sugarcane bacilliform virus* para la detección de todas las especies excepto el BSMYV). Para el diagnóstico de BSMYV se puede utilizar el antisuero que comercializa la firma francesa SEDIAG.
2. Incubar a 4 °C durante 16 horas.
3. Lavar placas o tubos tres veces con 100 µL de tampón PBS-T pH 7.4. Escurrir después de cada lavado sobre papel de filtro.
4. Macerar moderadamente 0,5 g de hoja fresca en 5 ml de tampón de extracción.
5. Clarificar el extracto por centrifugación a 8000 g por 5 minutos.
6. Adicionar 25 µL de extractos de plantas en el fondo del pocillo de las placas o tubos de PCR e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Lavar cuatro veces con 100 µL de tampón PBS-T 1X y dos veces con 100µL de H₂O desionizada estéril. Escurrir después de cada lavado sobre papel de filtro.
8. Adicionar 2U de DNasa I /pocillo, disuelta en 30 µl tampón de digestión.
9. Incubar 30 minutos a 37°C en termociclador.
10. Lavar cuatro veces con 100 µL de tampón PBS-T 1X y dos veces con 100µL de H₂O desionizada estéril. Escurrir sobre papel de filtro.

PCR:

Para la reacción de Multiplex-IC-PCR se utilizarán por separado los pares de cebadores específicos para detectar las especies *Goldfinger* (BSGFV), *Obino L' Ewai* (BSOLV), Mysore (BSMYV) e Imové (BSIMV), junto a los cebadores que detectan secuencias del retro transposón Monkey (Gambley, 2008). En el cuadro 9 aparecen las secuencias de los cebadores utilizados en M-IC-PCR para detectar BSV.

Cuadro 9.
Secuencia de nucleótidos de los cebadores utilizados en M-IC-PCR
para detectar BSV.

Especie objetivo del virus.	Cebador	Secuencia (5'-3')	Talla del fragmento en pb
BSOLV	RD-F1 ^a	ATCTGAAGGTGTGTTGATCAATGC	522
	RD-R1 ^a	GCTCACTCCGCATCTTATCAGTC	
BSGFV	GF-F1 ^a	ACGAAGTATCACGACTTGTTC AAGC	476
	GF-R1 ^a	TCGGTGGAATAGTCCTGAGTCTTC	
BSIMV	IM- F1 ^a	CACCCAGACTTTTCTTTCTAGC	384
	IM- R1 ^a	TGCCAACGAATACTACATCAAC	
BSMYV	Mys-F ^a	TAAAAGCACAGCTCAGAACAAACC	589
	Mys-R1 ^a	CTCCGTGATTTCTTCGTGGTC	
Monkey	MonR ^b	GCTGACACATGGGAGGACTT	300
	MonF ^b	CTTGTGGGTCTTCAGAGGAA	

^aGeering *et al.* (2000); ^bGambley *et al.* (2008).

La reacción de PCR se realizará en 25 µL y va a contener:

- *Detección de la especie BSOLV (Banana streak OL virus)*

Componente	Concentración
cebador específico F	0,12µM
cebador específico R	0,12µM
MonF2	0,08µM
MonR2	0,08µM
Tp Taq	1x
MgCl2	1,5mM
dNTP	0,1mM
Taq polimerasa	1U
H2O	csp 25µL

- *Detección de la especie BSGFV (Banana streak GF virus).*

Componente	Concentración
cebador específico F	0,08µM
cebador específico R	0,08µM
MonF2	0,08µM
MonR2	0,08µM
Tp Taq	1x
MgCl2	1,5mM
dNTP	0,1mM

Taq polimerasa	1U
H2O	csp 25µL

- *Detección de la especie BSMYV (Banana streak Mysore virus)*

Componente	Concentración
cebador específico F	0,16µM
cebador específico R	0,16µM
MonF2	0,08µM
MonR2	0,08µM
Tp Taq	1x
MgCl2	1,5mM
dNTP	0,1mM
Taq polimerasa	1U
H2O	csp 25µL

- *Detección de la especie BSIMV (Banana streak I virus)*

Componente	Concentración
cebador específico F	0,02µM
cebador específico R	0,02µM
MonF2	0,08µM
MonR2	0,08µM
Tp Taq	1x
MgCl2	1,5mM
dNTP	0,1mM
Taq polimerasa	1U
H2O	csp 25µL

Programa de la reacción de PCR.

1. Desnaturalización inicial de 94°C por 5 min,
2. Seguido por 35 ciclos de desnaturalización:
 - 94°C - 30 segundos,
 - 58°C - 30 segundos,
 - 72°C - 30 segundos
3. Paso final de elongación de la cadena de a 72 °C por 10 min.

Al finalizar la reacción de PCR, tomar 10 µL del producto de PCR más 2 µL de tampón de carga 1x y analizarlos en electroforesis en gel de agarosa al 1% en 0,5x TBE. Utilizar el marcador de 100 pares de bases. Visualizar los geles teñidos con 0,5 µg/mL bromuro de etidio con transiluminación ultravioleta. Tirar foto.

Tampones.

Tampón Carbonato-Hidrogeno Carbonato

- Na₂CO₃ 15 mM
- NaHCO₃ 34 mM

Ajustar pH a 9.7, autoclavar a 121 °C y 0.7 atm

Tampón PBS-T

- NaCl, 136mM,
- KH₂PO₄, 1.4mM
- KCl, 2.6mM
- Na₂HPO₄ 8mM

Ajustar a pH 7,4 con NaOH, autoclavar o esterilizar a 121°C y 0.7 atm.

Añadir Tween-20 hasta una concentración final de 0.05%.

Tampón de extracción de muestras

- Polyvinylpyrrolidona-40, 2% (p/v)
- Sulfito de sodio, 0.2%, (p/v)
- Albúmina bovina, 0.2% (p/v)
- Preparados en PBS-T

Mezcla de reacción DNasa I (Promega)

- Tampón Dnasa 10x 3 µL
- Dnasa Promega 1U/µL 2 µL
- H₂O csp 30 µL

Tampón de carga

- Xileno cianol 0.25% (p/v)
- glicerol 30% (v/v)
- H₂O

5.3.6. Diagnóstico de BSV a través de PCR múltiple con inmunocaptura según Grupo temático de conservación de MusaNet en 2017 para ensayos Inter laboratorios

Inmunocaptura:

1. Recubrir los tubos con 25 µL de una solución de los anticuerpos anti SCBV de AGDIA diluido 1/200 y una IgG anti BSMYV (1mg/ml) diluida a una concentración de 5 µg/mL (1/200) en tampón carbonato de recubrimiento por 1h a 37°C o 3 h a temperatura ambiente o toda la noche a 5 °C.
2. Lavar los tubos tres veces por 3 minutos con PBS-T.

3. Macerar el tejido de la hoja en tampón de extracción de CMV a razón de 1/10 (p/v), clarificar, añadir 25 µL a los tubos e incubar 2h a 37°C o 4h a temperatura ambiente o toda la noche a 5°C. Lavar los tubos tres veces por 3 minutos con PBS-T y enjuagar con agua destilada estéril.
 - Asegurarse que los tubos están vacíos de líquido.
 - Tratamiento de DNaseI
4. Añadir 3 unidades de DNaseI (el stock de Invitrogen es de 300 U/µL), en 300 µL de tampón 1× por pocito. El tampón 1× se hace fresco como sigue:
 - Tris pH 7.5 1M 99.64 µL
 - MgCl₂ 1 M 25.00 µL
 - CaCl₂ 1M 5.00 µL
 - Agua 9,870.36 µL
5. Incubar a temperatura ambiente por 3 h.
6. Lavar los tubos 3 veces por 3 min con PBS-T y enjuagar con agua destilada estéril
7. Asegurarse que los tubos están vacíos de líquido.

PCR

Añadir 25 µL de la mezcla maestra de PCR a cada pozo y programar el termociclador.

<i>Mezcla de la reacción de PCR</i>	<i>1×</i>	<i>x reacciones</i>
• H ₂ O destilada estéril	18.55µL	µL
• PCR tampón (Invitrogen) 10 ×	2.5µL	µL
• MgCl ₂ (Invitrogen) 50 mM	0.75 µL	µL
• Mezcla de dNTP 10 mM	0.5 µL	µL
• Mezcla de 12 cebadores	2.5 µL	µL
• Taq (Invitrogen) (5U/µl)	0.2 µL	µL
• Total:	25.0µL	µL

Mezcla de cebadores:

Agua		88µL
Red Dacca F	100 µM	1µL
Red Dacca R	100 µM	1µL
Cavendish F	100 µM	1µL
Cavendish R	100 µM	1µL
IRFA F	100 µM	1µL
IRFA R	100 µM	1µL
Goldfinger F	100 µM	1µL
Goldfinger R	100 µM	1µL
Mysore F	100 µM	2 µL
Mysore R	100 µM	2 µL

Programa de la PCR:

1. Desnaturalización inicial de 94°C por 30 segundos
2. 35 ciclos de desnaturalización:
 - 94°C por 10 seg.
 - 60°C por 30 seg.
 - 72°C por 1 min.
3. Paso final de elongación de la cadena de a 72°C por 10 min.
Electroforesis: 8 µL del producto de la PCR en 1.5% agarosa-TBE.
Teñir, visualizar y fotografiar el gel.

Tamaños de los productos de la PCR

<i>Especies de BSV</i>	<i>Pares de cebadores</i>	<i>Tamaño del producto</i>
BSCAV	Cavendish F / Cavendish R	782 pb
BSMYV	Mysore F / Mysore R	589 pb
BSOLV	Red Dacca F / Red Dacca R	522 pb
BSGFV	Goldfinger F / Goldfinger R	476 pb
BSIMV	IRFA F / IRFA R	400 pb

5.3.7. Protocolos de diagnóstico del mosaico del banano por CMV

El CMV puede ser detectado por diferentes técnicas, tales como inoculación mecánica de plantas indicadoras, microscopía electrónica, NASH, ELISA y RT-PCR (Hu *et al.*, 1995; Kiranmai *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2012; Sharmann *et al.*, 2000; Thomas, 2015). Los dos últimos procedimientos son recomendables y sensibles para detección de rutina de CMV.

Diagnóstico serológico con anticuerpos específicos.

Se disponen comercialmente antisueros específicos y sensibles para la detección de CMV por ELISA de las firmas AGDIA (Juego de reactivos para el CMV de 96 pocillos, SRA 44501/0096) y SEDIAG (www.sediag.com). El protocolo de detección es suministrado por el fabricante siguiendo los requisitos generales para el ELISA.

Protocolos de diagnóstico de CMV por PCR

Protocolo mediante inmuno captura, reverso transcripción, PCR múltiple [Multiplex IC-(RT)-PCR (Sharman et al., 2000b) modificado].

Ver procedimiento descrito en el punto 1 de este anexo.

Protocolo de diagnóstico de CMV por RT-PCR de Hu et al., (1995). (Plant Disease 79, 902–906. 1995).

Toma de muestras.

El título de CMV es mayor en la nervadura de las hojas jóvenes. La mejor detección se realiza utilizando muestras de la nervadura central de las hojas jóvenes.

Extracción de ácidos nucleicos.

1. Homogenizar aproximadamente 0.1 g de tejidos en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL con unas varillas de vidrio en 0.5 mL de tampón de extracción [(glicina-NaOH, pH 9.0, 0.1M; NaCl, 50 mM; EDTA, 10mM; dodecil sulfato de sodio (SDS), 0.2%; dietilditiocarbamato de sodio (DIECA-Na), 0.2%; sodio lauril sarcosina, 1%)]
2. Los homogenizados se emulsifican en fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1).
3. Los ácidos nucleicos totales se recobran por precipitación en etanol y se disuelven en 100 µL de TE (Tris-HCl, 10 mM; EDTA, 1 mM; pH 8.0).

Amplificación del gen de la proteína de la cápside:

1. Se utilizan los siguientes cebadores:
Cebador 93-309 forward 5' CATCGACCATGGACAAATCT GAATCAAC, 3'
Cebador 93-359 reverso 5'CTCTCCATGGCGTTTAGTGACT TCAGCAG,3'
2. Se incluye un *Nico* sitio de restricción, en el extremo 5' de ambos cebadores para facilitar el clonaje de los plásmidos vectores.
3. Se utiliza una *rTth DNA polimerase* (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Conn.) para la RT-PCR. Para la transcripción reversa, se utilizan 75 pmoles del cebador reverso (93-359) y 7.6 µL de la mezcla de reacción (la mezcla de reacción contiene: 2µL de 10X Buffer Reverse Transcription (Perkin Elmer Cetus); 2 µL de una solución 10 mM MnCl₂; 0.4 µL de cada 10mM dNTP y se añaden 2µL de la rTH DNA polimerasa para 1µL (~200 ng) de los ácidos nucleicos del banano.
4. Añadir agua desionizada ultrafiltrada, hasta un volumen final de 20 µL.
5. La mezcla se incuba en un termociclador a:
 - 70 °C por 5 min.
 - 60 °C por 15 min.
 - 50 °C por 10 min.

6. Para la PCR, los 20 μL de la mezcla RT se transfieren a un tubo con 15 pmoles del cebador forward (93-909); 8 μL de 0.25 mM de MgCl_2 ; 8 μL de 10X de Chelating Buffer (Perkin Elmer Cetus) y agua desionizada ultrafiltrada hasta completar 100 μL .
7. La reacción consiste en:
 - a. Desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min.
 - b. 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min.
 - c. Alineamiento a 50 °C por 1 min
 - d. Extensión final a 50 °C por 7 min
8. Los productos de la RT-PCR son cargados directamente y separados en un gel de 1.25% de agarosa en tampón Tris-acetato-EDTA (TAE).
9. El producto de la RT-PCR es un fragmento de DNA de 750 pb. La reacción brindó resultados positivos con plantas infectadas de CMV del grupo I y de Hawai (que no fueron detectados por ELISA (Hu *et al.*, 1995).

Protocolo de diagnóstico de CMV mediante RT-PCR (Srivastava et al., 2019).

Aislamiento del ARN viral.

1. El ARN viral muestras 100 mg/ planta de banano, se puede aislar utilizando el RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Valencia, CA), siguiendo el protocolo del fabricante.
2. El ARN total de cada muestra se diluye en 35 μL de agua libre de RNasa; su calidad y cantidad se determina mediante un espectrofotómetro NanoDropTMOne y se almacena a -80 °C hasta su uso posterior. La presencia de infección por CMV, se puede confirmar mediante una RT-PCR usando los cebadores específicos para CMV.
3. A partir de 500 ng del RNA purificado, se sintetiza la primera hebra del cDNA utilizando el cebador CMVr (específico rever-so) y la transcriptasa reversa Improm-II (Promega, Madison, USA).
4. Realizar la amplificación del gen de la proteína de la cápside (CP) a partir del cDNA, usando los cebadores específicos CMV f (5'-GGATCCATGGACAAATCTGAATCA-3') y el CMVr (5'-GAGCTCTCAAACCTGGGAG CAC-3').
5. La mezcla de la reacción para un volumen total de 25 μL es:
 - 0.25 μM de cada uno de los cebadores f y r
 - 1.25 mM de Mg Cl_2
 - 0.5 mM de la mezcla de dNTP
 - 1X de tampón de reacción

- 4 µL del cDNA
 - 1U de DyNAzyme II DNA polimerasa (Thermo Fischer Scientific, MA, USA)
6. Las condiciones de la PCR son:
 - a. Ciclo inicial de desnaturalización de 94 °C por 4 min
 - b. 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 min.
 - c. alineamiento a 58 °C por 30 s
 - d. extensión at 72 °C por 1 min
 - e. ciclo final de extensión a 72 °C por 10 min.
 7. Se puede también realizar la RT PCR utilizando extractos crudos de plantas de bananos (2 µl por reacción. Los extractos se pueden preparar macerando 100 mg aprox. de hojas frescas/planta en 500 µL de tampón de extracción (General Extraction Buffer (GEB3), Agdia, Elkhart, USA), conteniendo 2% de Tween 20, seguido de centrifugación a 12000 rpm por 2 min a temperatura ambiente.
 8. Los amplicones resultantes de la RT-PCR (10 µl), se corren en electroforesis en 1.8% de gel de agarosa con bromuro de etidio y se visualizan bajo iluminación UV.
 9. El amplicón que se produce es de 657 pb.

5.3.8. Protocolos de diagnóstico del *Banana bract mosaic virus* (BBrMV).

El patógeno puede diagnosticarse mediante diferentes reacciones de ELISA (Espino *et al.*, 1989; Espino, *et al.*, 1990, Thomas *et al.*, 1997), RT-PCR (Bateson y Dale, 1995; Ha *et al.*, 2008; Kiranmai *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 1997), e IC-RT-PCR solo (Iskra-Caruana, Galzi, & Laboureau, 2008), en combinación con otros virus de las musáceas en un ensayo de diagnóstico multiplex (Liu *et al.*, 2012; Sharman, *et al.*, 2000).

Diagnóstico serológico con anticuerpos específicos.

El virus puede ser detectado en extractos de la lámina foliar, la nervadura central y las brácteas florales por ELISA usando antisueros específicos monoclonales y policlonales. Los síntomas en las hojas pueden ser erráticos y en las brácteas son evidentes solamente durante la floración. Las vainas muertas deben ser eliminadas para revelar el mosaico y el rayado en el pseudotallo.

El virus puede ser detectado por ensayos ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) en muestras de plantas, plántulas de cultivo de tejidos y en áfidos infectados, utilizando anticuerpos mono y policlonales.

Se comercializan: 1) un anticuerpo policlonal de conejo por SEDIAG (www.sediag.com de Francia) para un test de ELISA con

fosfatasa alcalina (batches: Ab 00098; AP-Conjugado-Ab 00086) y 2) Agdia Banana bract mosaic virus test de ELISA con fosfatasa alcalina (Reagent Set SRA 24600/1000).

En estudios mediante ELISA han sido demostradas relaciones serológicas entre el BBrMV y otros miembros de la familia *Potyviridae*, incluyendo los virus *Abaca mosaic virus* (AbaMV), *Dasheen mosaic virus*, *Maize dwarf mosaic virus*, *Sorghum mosaic virus*, *Sugarcane mosaic virus*, y *Wheat streak mosaic*. En independencia de las similitudes en los síntomas causados por los dos virus, AbaMV es serológicamente distinto del BBrMV y reacciona solo débilmente o no reacciona en absoluto con anticuerpos de BBrMV en ELISA (DAS) sándwich de doble anticuerpo.

Diagnósticos por PCR.

Protocolo mediante inmuno captura, reverso transcriptasa, PCR múltiple [Multiplex IC-(RT)-PCR (Sharman et al., 2000b) modificado]

Ver procedimiento descrito en el punto 1 de este acápite.

RT-PCR, (Thomas et al, 1997).

Extracción de ácidos nucleicos totales mediante extractos de hojas (Thomson and Dietzgen, 1995; Thomas et al., 1997).

1. Los tejidos congelados (1-2 mm³) se maceran en 30 µl de tampón Tris-HCl, pH 8.4 100 mM, que contiene 1.0 M de KCl y 10 mM de EDTA, y se calientan a 95°C por 5 a 10 min.
2. La transcripción reversa y la PCR se realizan separadamente o combinadas en un solo tubo. En el primer método:
 - a. 0.2 µl de TNAE se diluyen en 8 µl de agua tratada con diethylpyrocarbonato (DEPC), se calienta a 65°C por 10 min y entonces se colocan inmediatamente en hielo.
 - b. El contenido de los tubos se colecta mediante una centrifugación breve.
3. Se añaden:
 - 5 µl de la mezcla de la primera cadena de cDNA incluyendo la reverso transcriptasa del Moloney murine leukemia virus (Pharmacia Biotechnology Inc., Uppsala, Sweden),
 - 1 µl de la solución de DTT (200 pmoles),
 - 1 µl (20 pmoles) del cebador primer D341 (informado por Langveld et al., 1991)
4. Incubación a 37°C por 1 h.
5. Se usan los cebadores degenerados de la proteína central (core) en la PCR (Thomson and Dietzgen, 1995):

Un volumen 25 µl de la reacción de PCR contiene:

- 2 µl de la primera cadena de cDNA,
- 5 pmoles de cada uno de los cebadores U341 y D341,
- 2 unidades de Taq polimerasa (Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD),
- 25 nmoles de cada trifosfato deoxinucleótido,
- mM de MgCl₂, y
- µl de 10× PCR tampón (1× = 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, and 50 mM KCl; Gibco BRL, Life Technologies).
- Los tubos son completados con agua de osmosis reversa (OR) y cubiertos con 20 µl de aceite mineral.

6. La reacción de PCR se realizan mediante 33 ciclos de reacción con el siguiente programa:

- 94°C/30 s,
- 56°C/3 min,
- 72°C/1 min.

7. Tomar 8 µL del producto de PCR y analizar en una electroforesis en gel de agarosa en 0.5× o 1× Tris-borato-EDTA (TBE), seguido de tinción con bromuro de etidio (Según Sambrook *et al.*, 1989).

Para el método de un solo tubo, el molde de ARN fue:

1. 2 µL del extracto humedecido de hoja diluido 1:10 en agua de OR
2. 2 µL de ácidos nucleicos totales sin diluir.

8. La mezcla de la RT-PCR y los parámetros de la reacción, fueron los mismos descritos que para la PCR, excepto, que se le añadió también 20 unidades de la transcriptasa reversa (Superscript I; Gibco BRL, Life Technologies) y previo a comenzar los parámetros de la reacción de PCR, se incubó a 37°C durante 60-min seguido de un paso de desnaturalización a 94°C por 90 s.

9. Los productos de la PCR son de aproximadamente 340 pb que han sido obtenidos tanto de bananos infectados de BBrMV como de ABaMV.

Las mayores cantidades de cDNA específico se amplifican con la dilución 1:10 de los extractos de absorción, pero se han obtenido productos detectables hasta la dilución 1:1,600. El BBrMV ha sido detectado después de almacenar el extracto de las hojas a -20°C durante 34 días y de dos ciclos de descongelación.

Inmunocaptura por PCR (IC-PCR) y IC-RT-PCR (reproducido de Danasayake, 2001).

Extracción de ácidos nucleicos. (Protocolo de Su, 1999)

1. La extracción se realiza a partir de 0.5 g de muestras de hojas, en 0.3 mL de tampón de extracción de DNA (Tris HCl, 100 mM; EDTA 100 mM; NaCl pH 8.0, 250 mM) + 1% de Sarcocyl (N-Lauroyl sarcocyne) (2.7 mL de tampón de extracción y 0.3 mL de sarcocyne).
2. Una suspensión del tejido en polvo, se transfiere a tubos Eppendorf de 1.5 mL y se incuba a 55°C por 1 h en un baño de agua.
3. Los tubos se centrifugan a 6000 rpm por 5 min.
4. Después de la centrifugación, se colecta 800 µl del sobrenadante. Se añaden 100 µl de 5 M NaCl y 100 µl de CTAB (bromuro de hexa decil trimetil amonio/ NaCl (10% CTAB en NaCl 0.7 M) y se incuban a 65°C por 10 min.
5. Se añaden 600 mL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se mezclan completamente y centrifugan a 11,000 rpm por 10 min. El sobrenadante se colecta, se añaden 600 mL de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcla completamente.
6. Los tubos se centrifugan a 11,000 rpm por 10 min. Se colecta el sobrenadante y se añaden 360 µL de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos.
7. Los tubos se incuban a 20°C por una noche y se centrifugan a 12000 rpm por 15 min.
8. Los pellets se lavan con CTAB para separar residuos. Se secan brevemente y se suspenden en 100 µL de tampón TE.
9. 3 µL de este extracto se utilizó para la reverso transcripción.
10. *Cebadores* (Descritos por Rodney *et al.* 1999, según Danasayake, 2001).

Bract 1. 5' GAC ATC ACC AAA TTT GAA TGC CAC ATGG 3'

Bract 2. 5' CCA TTA TCA CTC GAT CAA TAC CTC ACAG 3'

Par adicional de secuencias de BBrMV del Gene bank accession AJ 071586

F: 5' AAC GCT CAG CCT ACT TTT CG 3'

R: 5' CAT ATC ACG CTT CAC ATC TTC A 3'

En la IC-PCR se utilizan cebadores oligo dT (5'-P (Dt₁₂) -dx-dy-oH-3' para la síntesis del cDNA a partir del ARN viral con cola de poliA.

Reacción de la RT PCR

Mezcla de la reacción de PCR.

La mezcla de reacción (25µL) contiene:

1. Tampón RT 5X 5 µL
2. DTT 100mM 1.25 µL
3. Transcriptasa reversa (Gibco BRL Life technologies, 200 unidades/ml) 0.25 µL
dNTPs (10mM) 2 µL
4. Mezcla de los cebadores:
 - F1 y R 50 mg/ c 2 µL, o
 - Bract 1 y Bract 2 (34 pmol cada uno) 2 µL
5. RNA molde 3 µL
6. Agua DD 11.5 µL

La reacción de PCR:

- a. Un ciclo 50 °C por 35 min.
- b. 35 ciclos a 94°C por 30 seg
- c. Un ciclo 50°C por 30 seg
- d. Un ciclo 68 °C por 45 seg
- e. Un ciclo de 68°C por 7 min y remojo a 4°C

Reacción de Inmunocaptura PCR (IC-PCR)

1. Se cubren tubos de microcentrífuga de paredes delgadas con un antisuero específico de BBrMV diluido 1:200, en tampón carbonato de sodio pH 9.6, 0.05M y se incuban por tres horas a temperatura ambiente.
2. Después de la incubación, los tubos se lavan con tampón fosfato salino (PBS-T) {(Na₄PO₂/KH₂PO₄) 0.1M + cloruro de sodio 0.15M + cloruro de potasio pH 7.4, 0.003 M} y 0.05 mL de Tween 20 (Sigma Ltd.), 3 veces por 3 min cada vez.
3. Se someten a extracción a la proporción 0.5 g de hojas en 2.5 mL de tampón de extracción de virus (fosfato de potasio pH 7.0, 0.5M; EDTA 15 mM; PEG 2%; NA₂SO₃, 0.5%).
4. Se añaden 50 mL del extracto, a los tubos y se incuban por una noche a 5°C. Después de la incubación los tubos se someten a un paso de lavado estándar utilizando tampón PBS-T.
5. Los tubos se secan a temperatura ambiente y se centrifugan a 3000 rpm por 3 min. Se añade a los tubos de inmuno-captura un 1µL de un cebador Oligo dT (0.5 g/µl) y 23µL de agua destilada.
6. Los tubos se calientan a 80°C en un baño de agua, se enfrían en hielo y se centrifugan brevemente. Se les añade la siguiente mezcla: 8 µL del tampón de síntesis de la primera cadena 5x; 4µL de DTT 0.1M; 1µL de la transcriptasa reversa (M-MLV; 25U/mL); 2 µL de dNTP (10mM) y 1µL de un inhibidor de RNasa (5 unidades/µL).

Los tubos se calientan entonces a 45 °C por una hora, 75°C durante 15 min, y se enfrían en hielo o a -20°C.

7. Se utilizan 3µL del cDNA para la amplificación por PCR.

Mezcla de la reacción de PCR.

La mezcla de reacción (25µL) contiene:

- Tampón PCR 2,5 µL 10X
- MgCl₂ 25 mM
- dNTP (10mM) 1.0 µL
- mezcla de cebadores 2.0 µL (ya sean Bract 1/2 o F1/R; Con., como se utilizó en la RT-PCR)
- Taq (2units/mL) 0.25 µL
- cDNA 3 µL
- agua destilada hasta 14.25 µL

Parámetros de la reacción de PCR

1. un ciclo a 94°C por 1 min.
2. 33 ciclos a 94°C por 30 seg.
3. 56°C por 1 min
4. 72°C por 1min
5. 72°C por 3 min

Los tubos son sumergidos en agua a 4°C por 2 horas antes de la electroforesis.

Análisis de los productos de la PCR por electroforesis

Analizar los productos de la PCR por electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 70°V por 90 min en un tampón TAE (40mM de Tris HCl, 5mM de acetato de sodio y 1mL de EDTA pH 7.0 por litro) en presencia de bromuro de etidio y fotografiar bajo luz ultravioleta. Utilizar un marcador del tamaño de las bandas.

5.3.9. Protocolos de diagnóstico de *Banana mild mosaic virus* (BanMMV).

Se han producido antisueros policlonales de BanMMV (Teycheney *et al.*, 2007); pero no hay antisueros comerciales. Estos pueden utilizarse para el diagnóstico por ISEM o por IC-RT-PCR (Thomas, 2015).

El virus tiene un alto grado de diversidad genética (Teycheney *et al.*, 2005a; ver acápite relativo al BanMMV en acápite 7).

Teycheney *et al.* (2007) describieron una inmunocaptura transcrita reversa con PCR anidada (nested immunocapture RT PCR), para la

detección del virus, que utiliza los cebadores de Foissac *et al.*, (2005), como blanco la región RdRp en el genoma de flexivirus. El test no es específico para BanMMV, pero no detecta Banana virus X (Teycheney, *et al.*, 2007).

Thomas (2015), describe el siguiente protocolo:

Protocolo de IC-PCR para diagnosticar BanMMV (M Sharman, no publicado).

Cebadores:

- Poty1: 5' GGATCCCGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT3'
- BanMMV CP2: 5'TGCCAACTGAYGARGAGCTRAATGC3'

El producto de la PCR es de 250 pb.

La RT-PCR puede ser llevada a cabo usando un paso de Inmunocaptura como se describe debajo.

Alternativamente se puede utilizar una extracción total de ácidos nucleicos para utilizarla en la RT-PCR obviando el paso de la inmunocaptura, o como se describe a continuación:

Pasos de la Inmunocaptura:

1. Cubrir tubos de pared delgada con 2.5 µg/ml de la IgG de BanMMV diluido en tampón carbonato de cobertura (50µl por tubo). Incubar por ~2–3 h a temperatura ambiente.
2. Lavar tres veces por 3 min con PBS-T.
3. Añadir 50 µL del extracto 1:10 hecho con tampón de extracción (citrato de sodio, 0.05 M; EDTA, 0.5 mM; Tween 20, 0.05%; leche descremada al 1%; monotioglicerol pH 8.0, 0.5%). Incubar una noche a 5°C por 4–5 h a temperatura ambiente.
4. Lavar tres veces por 3 min con PBS-T, lavar brevemente con ddH2O y centrifugar

La síntesis de cDNA.

1. A los tubos de la IC añadir:
 - cebador Poty1 20µM 1.5 µL
 - ddH2O 23 µL
2. Calentar a 80°C por 10 min, enfriar en hielo y centrifugar.
3. A los tubos de IC en hielo añadir:

<i>Componente</i>	<i>Volumen (µL)</i>
• Tampón 5× de la 1era. cadena,	8
• DTT 0.1 M,	4
• dNTPs, 10 mM,	2
• SuperScript III (Invitrogen) 200 U/µL,	0.5

- BSA 0.6 µg/µL, 0.5
- RNase guard (Amersham) ~40 U/µL, 0.5

4. Incubar a 50°C por 45 min y entonces a 70°C por 15 min, enfriar y centrifugar. Almacenar a -20°C.

PCR con Poty1- BanMMCP2

Usar la siguiente mezcla de la reacción de PCR por tubo:

Componente	Volumen (µL)
PCR tampón 10 ×	2.5
MgCl ₂ (50 mM)	1.0
dNTPs (10 mM)	0.5
Poty1 (10 µM)	1.0
BanMMCP2 (20 µM)	1.0
Taq (Gibco) 5 U/µl	0.3
ddH ₂ O	16.7
molde de cDNA	2.0
Volumen Total	25 µL

Colocar los tubos de reacción en un termociclador y fijar los siguientes pasos de reacción:

1. Un ciclo a 94°C por 1 min.
2. 35 ciclos a:
 - 94°C por 20 s,
 - 55°C por 30 s
 - 72°C por 1 min
3. Un ciclo a 72°C por 3 min.

Electroforesis de 8 µL del producto en gel de agarosa al 1% y teñir con bromuro de etidio.

5.3.10. Protocolos de diagnóstico de la marchitez bacteriana por *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* 1978 [*Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* (Yirgou and Bradbury 1968) Dye].

Diagnóstico visual: La observación de síntomas de amarillamiento en las hojas, marchitez y colapso de los peciolo, de las vainas de las hojas y pedúnculos, de las brácteas y yemas masculinas, coloración de la pulpa y una exudación bacteriana amarillo pálido, así como posteriormente un amarillamiento general y marchitez hasta la muerte de la planta, indica la presencia de la enfermedad.

Diagnóstico microbiológico.

Medios para el cultivo selectivo desde tejidos de plantas, suelo y agua para el diagnóstico de Xvm:

1. *Medio YTSA-CC (Tripathi et al., 2007).*

- Medio YTSA (extracto de levadura, 1%; tryptona, 1%; sacarosa, 1%; agar 1.5%).
- Cefalexina, 50 mg. L⁻¹
- Cicloheximida, 150 mg. L⁻¹
- Ajustar pH a 7.0

Los antibióticos se esterilizan por filtración y se añaden antes de verter el medio en las placas.

El medio YTSA es apropiado para el mantenimiento de los cultivos.

Después de 48 horas de incubación aparecen colonias mucoides, circulares, amarillo brillantes, lustrosas, abultadas, que son aproximadamente del mismo tamaño en YTSA-CC y en YTSA. La eficiencia de YTSA-CC es de un 98%.

2. *Medio celobiosa cefalexina agar (CCA; Mwangi et al., 2007).*

Contiene para 1 L de medio:

- | | |
|--|--------|
| • Extracto de levadura. | 1 g |
| • Glucosa | 1 g |
| • Peptona | 1 g |
| • NH ₄ Cl | 1g |
| • MgSO ₄ ·7H ₂ O | 1 g |
| • K ₂ HPO ₄ | 3 g |
| • Extracto de carne | 1 g |
| • G celobiosa | 10 g |
| • Agar | 14 g |
| • Cefalexina | 40 mg |
| • 5 -fluoruracil | 10 mg |
| • cicloheximida | 120 mg |

La eficiencia de recobrado es menor que en YPGA, pero su selectividad es superior entre un 60-82% cuando se realizan aislamientos de frutos enfermos y suelo respectivamente (Mwangi et al., 2007).

Colecta y procedimiento de extracción y aislamiento de la bacteria de tejidos vegetales y suelo (Tripathi et al., 2007)

1. *Extracción de la Xvm de tejidos de plantas infectadas.* Dos métodos pueden ser utilizados. dependiendo de la parte de la planta utilizado:

a) *Colecta de exudado bacteriano desde el tejido de la planta infectado.*

- El pseudotallo es cortado en lascas diagonalmente con un cuchillo afectado en el sitio y se colecta el exudado.
- En el caso de frutos, se llevan al laboratorio, y se lavan con agua estéril y alcohol 70%. El fruto se corta diagonalmente con una cuchilla afilada y se colecta el exudado.
- La yema masculina se lava en el laboratorio con agua estéril, se levantan las brácteas y se separan las flores masculinas por debajo y se colecta el exudado bacteriano en el punto de separación en el cojinete floral.
- En todos los casos, se colectan 100 μ L del exudado que emana de la superficie cortada y se suspende en 400 μ L de agua estéril. Se diluye en varias concentraciones y se siembra en placas con medio YTSA-CC

b) Aislamiento a partir de tejidos infectados de las plantas:

- Las hojas, pedúnculos, raíces y frutos son colectados en las plantas infectadas y se lavan en el laboratorio con agua estéril. Del nervio central de las hojas o de lascas de los pedúnculos, raíces y frutos.
- Con la ayuda de una pequeña varilla de vidrio, se maceran las piezas de tejido vegetal en 500 μ L de medio líquido YTS (sin agar) en tubos Eppendorf de 1.5 mL.
- El macerado se agita a 100 rpm por cuatro horas a temperatura ambiente.
- El macerado se diluye seriadamente y 100 μ L de las suspensiones se dispersan en dos placas con YTSA-CC por cada dilución.
- Se identifican colonias circulares amarillas similares a las Xvm después de la incubación por 48 horas a 28 °C.

2. Aislamiento de X. vasicola pv. musacearum del suelo (Tripathi et al., 2007).

- Se toman dos muestras de la superficie del suelo o del sustrato alrededor de las plantas infectadas.
- Un gramo de suelo se suspende en 5 mL de agua estéril y se agitan a 100 rpm por 4 h a temperatura ambiente.
- La suspensión se diluye en series y 100 μ L de esta suspensión se dispersan en placas con medio YTS-CC.
- Se incuban a 28°C por 48 horas y se identifican las colonias circulares y amarillas que se asemejan a las de Xvm.

Identificación de patogenicidad de X. vasicola pv. musacearum mediante pruebas de patogenicidad utilizando inoculación artificial. (Tripathi et al., 2007).

El procedimiento es el siguiente:

1. Las colonias sospechosas de Xvm aisladas en medio YTSA-CC se transfieren a medio YTSA para la identificación en base a las características de las colonias.
2. La identidad del patógeno aislado se comprueba en una prueba de patogenicidad utilizando plantas de cultivo de tejidos de Pisang Awak de 3-4 hojas con raíces funcionales.
3. El cultivo de Xvm se desarrolla inoculando una sola colonia en caldo YTS y se incuba a 28°C agitándolas a 150 rpm hasta que la DO a 600 nm alcance un valor 1.0.
4. Se centrifugan 10 mL del caldo de cultivo a 5000 rpm por 5 min. Como inóculo se utilizará el pellet el cual se suspende en 10 mL de agua esterilizada dos veces.
5. Se inyectan 100 µL del inóculo fresco preparado en el pseudotallo de cada planta in vitro.
6. Las plantas se incuban en condiciones de laboratorio y se observan para la aparición de síntomas.

Identificación X. vasicola pv. musacearum mediante PCR (Adikini et al., 2011).

Adikini *et al.* (2011), obtuvieron siete juegos de cebadores (Xvm12, Xvm35, Xvm36, Xvm38, Xvm44, Xvm47 and Xvm48) muy específicos para el diagnóstico de *X. vasicola pv. musacearum* por PCR.

Extracción de DNA (Adikini *et al.*, 2011).

El DNA genómico se extrae según el protocolo de Mahuku (2004), a partir de células de Xvm de cultivos en YPGA incubados durante 48 horas a 28 °C. El procedimiento es como sigue:

1. Colonias aisladas de células bacterianas, se suspenden en 500 mL de NaCl, 1 M, seguido de un vortex vigoroso y centrifugación a 313 g por 10 min.
2. El sobrenadante se descarta y las células se lavan dos veces en agua destilada para reducir la concentración de sal.
3. Los pellets se suspenden entonces en 500 µL de tampón de extracción TES (0.2 M de Tris-HCL, pH 8; 10 mM de EDTA pH 8; 0.5 M de NaCl; 1% de SDS) que contiene 50 mg. mL⁻¹ de proteinasa K seguido de completa agitación para mezclar.
4. Las muestras se colocan en baño de agua a 65 °C por 30 min. Se añaden 250 µL de acetato de amonio y se agita suavemente. Las muestras se colocan en hielo por 10 min y se centrifugan por 16 min a 13226 g.

5. El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo y se le añade un volumen igual de isopropanol. Se incuban por 2h a -20°C seguido de una centrifugación a 13 226 g por 12 min.
6. El sobrenadante se desecha y el pellet de DNA se lava con etanol al 70%. El pellet se seca al aire y entonces se re-suspende en tampón TE (10 mM de Tris-HCl pH 8; 1 mM de EDTA).
7. El DNA aislado se chequea en electroforesis en gel de agarosa (1%) a 80 V. Se cuantifica entonces el DNA en un equipo NanoDrop ND 1000 (NanoDrop technologies, USA) y se diluye a 5 ng. L⁻¹, para su uso en PCR.

Las secuencias de los juegos de cebadores para el diagnóstico por Xvm, se presentan en el cuadro 10.

Cuadro 10.
Secuencias de siete juegos de cebadores usados para la
amplificación específica por PCR de *X. vasicola* pv. *musacearum*
(Adikini *et al.*, 2011).

Cebadores		Secuencia	Tamaño esperado del producto de la amplificación (pb)
Xvm12	Xvm12_F	5'GCCGGCGTGCGCAACTATCTG3'	360
	Xvm12_R	5'GCCATCCGCAAACAATCGCAACCT3'	
Xvm35	Xvm35_F	5'GAGCGCGAGGAAACGGGGAAGT3'	480
	Xvm35_R	5'TTGTGTTGCGCCCAACCCTCTCAGT3'	
Xvm36	Xvm36_F	5'GCTTCGGCGGAGGCGTGCTAAT3'	420
	Xvm36_R	5'TCGGCCGGGCGAGAACTTGAA3'	
Xvm38	Xvm38_F	5'CCGCCGGTCGCAATGTGGGTAAAT3'	650
	Xvm38_R	5'CAGCGGCGCCGGTGTATTGAGTG3'	
Xvm44	Xvm44_F	5'AATAGCCC GG GTGATTGTCC3'	350
	Xvm44_R	5'AGCCGGCAGCTACGATGAG3'	
Xvm47	Xvm47_F	5'GCTGCGTAATGGGCGAGATGATGC3'	370
	Xvm47_R	5GCTGCCCGCGGTTTGGTTTGT3'	
Xvm48	Xvm48_F	5'CCGCGATCACTTCCAACAAACAC3'	450
	Xvm48_R	5'GCTCAATCGCCGAGGGAGAATC3'	

Mezcla de reacción.

La mezcla de la PCR para un volumen de 20 µL contiene:

- Tampón de reacción 1x
- dMgCl₂ 1.5 mM
- dNTP 250 mM
- Taq polimerasa (Qiagen) 1 U de
- cebadores 5 pm µL⁻¹
- DNA 2 µL (5 ng µL⁻¹)

Programa de la reacción de PCR para los juegos de cebadores Xvm 12 y del 35 al 48:

1. Desnaturalización inicial a 94°C por 5 min.
2. 40 ciclos:
 - 94 °C por 20 s
 - 60° por 20 s;
 - 72 °C por 1 min
3. 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 10 min.

La sensibilidad de la reacción se corresponde a 10^3 UFC mL⁻¹, que representa un límite de detección de aproximadamente 4 células por reacción de PCR. La PCR se ha utilizado para detectar Xvm en raquis, pseudotallo y tejidos del rizoma en plantas que tenían síntomas en las partes florales (Adikini *et al.*, 2011). En plantas asintomáticas inoculadas artificialmente y muestreadas de los rizomas y pseudotallos semanalmente, dieron resultados positivos inclusive una semana después de la inoculación sin presencia de síntomas. Las plantas mostraron los primeros síntomas 21 días después de la inoculación. En hojas se obtienen resultados positivos entre 2-5 semanas después de la inoculación.

5.3.11. Protocolos de diagnóstico del complejo de especies de *R. solanacearum* (CERS)

El CERS incluye las especies *R. solanacearum*, *R. zyzygii* y *R. pseudosolanacearum* como se ha descrito en el acápite 7. En la figura 15, se describe el flujo de diagnóstico recomendado para el complejo de especies de *R. solanacearum* (EPPO, 2018).

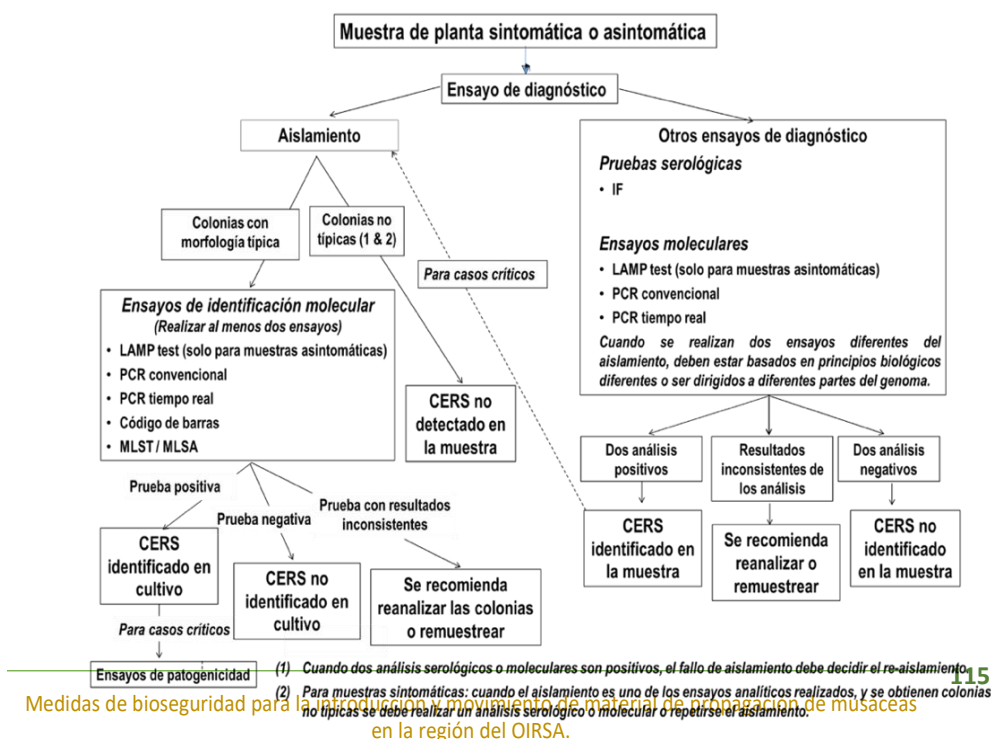


Figura 15. Diagrama de flujo para el diagnóstico de *R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum*, y *R. zyzygii* en plantas sintomáticas y asintomáticas (adaptado de EPPO, 2018).

Protocolos de diagnóstico de Ralstonia solanacearum (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1996, agente causal del Moko y Bugtok

Los procesos que se describen a continuación son derivados de la Norma EPPO 2018, para el diagnóstico del complejo de especies de *R. solanacearum*, a menos que se especifique lo contrario.

Identificación en campo en material de plantas sintomáticas

Para un diagnóstico rápido de *R. solanacearum* y para distinguir la marchitez bacteriana de la marchitez vascular causada por hongos, puede utilizarse el exudado bacteriano del material infectado. Se corta una sección de la planta con coloraciones vasculares usando una cuchilla afilada y se coloca contra la pared de un beaker o tubo de ensayo lleno de agua de forma que el extremo de la sección toque la superficie del agua (figura 16). Se podrá observar los cordones blanco lechosos de los polisacáridos extracelulares que salen de los extremos del xilema. Pueden hacerse con estos ensayos serológicos rápidos para la detección del patógeno.

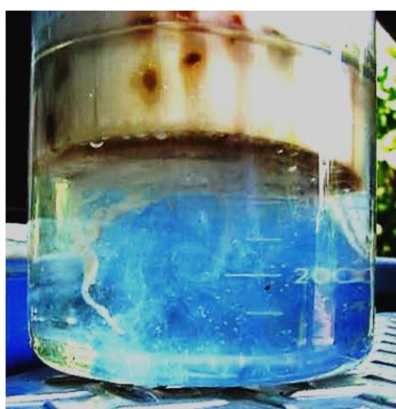


Figura 16. Exudado bacteriano lechoso blanco al colocar tejidos afectados en agua.

Aislamientos de tejidos sintomáticos.

Preparación de las muestras para el aislamiento.

El aislamiento puede incluir la exudación de las secciones coloreadas de los vasos vasculares de los tallos o rizomas de plantas con marchitez. La muestra debe entonces ser suspendida en pequeños

volúmenes de agua destilada estéril, o tampón fosfato (PB; 0.05 M) por 5–10 min.

Aislamiento

El aislamiento puede ser llevado a cabo utilizando un medio no selectivo general como el caldo nutriente (NA), la peptona glucosa agar (YPGA), la sacarosa peptona agar (SPA) (Lelliot y Stead, 1987), o el medio Kelman tetrazolium (Kelman, 1954). Algunos linajes producen un pigmento pardo difusible.

Puede ser necesario el aislamiento en medios semi-selectivos, debido a la presencia de bacterias saprofíticas. Para aislar del material sintomático han sido ampliamente utilizados el medio semi-selectivo (SMSA), modificado por Elphinstone *et al.* (1996), o el medio de Sequeira (Granada y Sequeira, 1983; Poussier *et al.*, 1999). Si se sospecha la presencia de razas de Moko, el medio debe ser enriquecido con 1 gr de extracto de levaduras porque de otra forma el crecimiento será pobre.

Se prepararán suspensiones y se transferirán alícuotas de (50– 100 μ L) a placas con el medio nutriente general (NA, YPGA o SPA; Lelliott y Stead, 1987) y/o el medio TZC (Kelman, 1954), o el medio semiselectivo SMSA/Sequeira, mediante estriado o dilución, usando una dilución apropiada con la técnica de plaqueo. Las placas deben incubarse por 2-6 días a 28°C.

Las características de las colonias son: en medio nutriente general, los aislamientos virulentos desarrollan colonias fluidas, crema-blancas, perladas, planas, irregulares con espirales (whorls) en el centro. En esos medios, las formas no virulentas de *Ralstonia* forman colonias redondeadas, no fluidas enteramente crema-blancas. En el medio tetrazolium (TZC) de Kelman y en SMSA, los espirales son de color rojo sangre (figura 17). En estos medios, las colonias avirulentas de *R. solanacearum*, son pequeñas, no fluidas, redondeadas y enteramente rojas intenso y difíciles de distinguir de otras bacterias saprofíticas que pueden ser coaisladas.

Los aislamientos de *R. solanacearum* pierden rápidamente la virulencia cuando son mantenidos en laboratorio. Sin embargo, puede ser fácilmente mantenido por años en agua destilada o en cuñas de agar cubiertas con aceite mineral estéril y almacenadas a temperatura de laboratorio cuya patogenicidad puede ser verificada mediante la morfología en el medio TZC (Kelman, 1983).

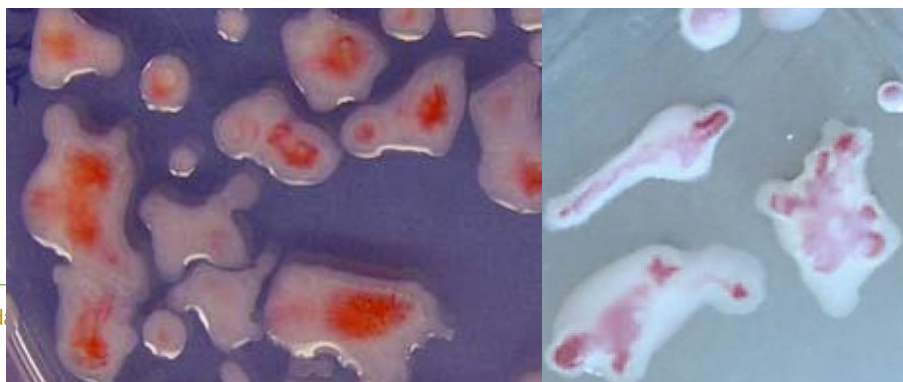


Figura 17. Morfología de las colonias de *R. solanacearum* en medio TCZ de Kelman.

Medios genéricos

- *Agar Nutriente (NA) (Lelliott y Stead, 1987)*
- Peptona 5.0 g
- Extracto de levaduras 3.0 g
- NaCl 0.5 g
- Agar grado microbiológico 15.0 g
- Agua destilada 1.0 L
- Ajustar pH a 7.2.

Agar sacarosa peptona (SPA) (Lelliott and Stead, 1987)

- Sacarosa 20.0 g
- Peptona 5.0 g
- K₂HPO₄ 7.0 g
- Agar grado microbiológico 12.0 g
- Agua destilada 1.0 L
- pH es ajustado a 7.2.

Agar levadura peptona glucosa (YPGA) (Lelliott and Stead, 1987)

- Extracto de levaduras 7.0 g
- Bacto peptona 7.0 g
- Glucosa 7.0 g
- Agar grado microbiológico 18.0 g
- Agua destilada 1.0 L
- pH es ajustado a 7.2.

Medios semi-selectivo para aislamientos.

Medio SMSA (Englebrecht, 1994, modificado por Elphinstone et al., 1996)

- Bacto peptona (BD*) 10.0 g
- Glicerol 5 mL
- Bacto Agar (BD*) 15.0 g
- Casamino acids (BD*) 1.0 g
- Extracto de levaduras (BD*) 1.0 g
- Agua desionizada 1 L

Después de autoclavar, enfriar a 45–50°C y adicionar soluciones acuosas filtradas esterilizadas de los siguientes ingredientes a las concentraciones especificadas:

- 2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium cloruro (Sigma-Aldrich T8877) 0.050 g

- Violeta cristal (Sigma-Aldrich C0775) 0.005 g
 - Cloranfenicol (soluble en agua; Sigma-Aldrich C3175) 0.005 g
 - Penicilina G (sal sódica de la bencilpenicilina; Sigma-Aldrich P8431) 825 U
 - Polimixina B (sal sulfato; Sigma-Aldrich P1004) 600 000 U
 - Bacitracina (Sigma-Aldrich B0125) 1250 U
 - El pH final es usualmente alrededor de 6.5 y no necesita ajuste.
- *BD, Becton, Dickinson and Company. 50 Diagnostics

Ensayos de patogenicidad.

La patogenicidad puede determinarse mediante inoculación en 5–10 plantas, preferiblemente de tres hojas abiertas o ligeramente más viejas, con una suspensión (10^6 células mL⁻¹) de un cultivo en agar nutriente/YPGA. La incubación puede tomar hasta dos semanas a 25–28 °C, bajo condiciones de alta humedad relativa. La aparición de los síntomas en *M. acuminata* puede tomar más de 2 semanas. Los síntomas que se desarrollan son marchitez, y/o epinastia, clorosis y algunas veces solo enanismo. En el cuadro 11 aparecen las plantas indicadoras para determinar las razas de *R. solanacearum*.

Cuadro 11.
Determinación de las razas de *Ralstonia solanacearum (Janse, 1991).**

Reacción en:	Raza		
	1	2	3
Tomate/berenjena	Marchitez	Sin reacción	Marchitez
Tabaco cv. White Burley (inoculación en tallo)	Marchitez	Sin reacción	Sin reacción
Tabaco cv. White Burley (ensayo de hipersensibilidad)	Necrosis (48 h) y marchitez (7-8 días)	HR (12–24 h)	Clorosis (2–8 días)
<i>Musa acuminata</i>	Sin reacción	Marchitez	Sin reacción

*No se incluyen la raza 4, patogénica a jengibre y otros pocos hospedantes y la raza 5 solo patogénica en la morera (*Morus alba* L.).

La bacteria puede ser re-aislada de las plantas, tomando el peciolo encima del sitio de inoculación y colocándolo en un pequeño volumen de agua destilada o en 50 mM de tampón fosfato, sembrándolo en medios YPGA y/o SMSA y observando las colonias típicas. Las colonias pueden ser utilizadas para confirmación por IF, PCR o FISH.

Test de Inmunofluorescencia (IF).

Las instrucciones para desarrollar un ensayo de inmunofluorescencia pueden ser consultadas en la norma EPPO Standard PM 7/97

(Indirect immunofluorescence test for plant pathogenic bacteria). El IF se desarrolla usualmente con extractos de plantas no diluidos o concentrados y con una dilución 1/10 de estos, en 10mM de tampón fosfato.

Los anticuerpos monoclonales existentes están sujetos a resultados de falsos positivos. Las fuentes de anticuerpos validados por la EPPO aparecen en el apéndice 1 de la norma EPPO PM 7/97 antes mencionada.

Procesamiento de las muestras y extracción del patógeno para la prueba de inmunofluorescencia:

1. Colocar los fragmentos de tejido vascular en un recipiente con tapa adecuado y añadir tampón PB 0,05M estéril hasta que los cubra (generalmente unos 45-50 mL).
2. Colocar los recipientes en refrigeración a 4-7 °C durante 15-18h.
3. Decantar el líquido de maceración en un tubo de centrifuga y centrifugar a 4 °C a 10,000G durante 10min.
4. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1,5 mL de tampón PB 0,01M estéril.
5. Hacer dos diluciones decimales seriadas (1:10, 1:100) de cada uno de los pellets resuspendidos por muestra.
6. Colocar en pocillos replicados (2) de 15-20 µl de cada dilución y del pellet por cada muestra.
7. Colocar los portaobjetos en una estufa y secar a 50 °C.
8. Colocar en cada pocillo una gota de etanol absoluto y dejar por 10 min. (hasta que se seque), para fijar las células bacterianas.
9. Colocar en cada pocillo de 15-20 µl de antisuero a la dilución de trabajo recomendada por el proveedor.
10. Colocar los portaobjetos en cámara húmeda (ej: una placa Petri con papel de filtro humedecido en el fondo) e incubar por 30 min a 37 °C.
11. Lavar suavemente con un frasco lavador con agua destilada cada fila de pocillos de cada portaobjetos durante 30 seg.
12. Secar de nuevo en estufa a 50 °C, o suavemente con papel de filtro.
13. Colocar en cada pocillo de 15-20 µl de conjugado FITC a la dilución de trabajo recomendada por el proveedor.
14. Incubar durante 30 min igual que en paso 11, pero en condiciones de oscuridad, ya que la luz puede afectar al conjugado.
15. Lavar de la misma forma que en 11; secar de nuevo igual que en 12.
16. Colocar en cada pocillo una gota de glicerina tamponada y observar en microscopio de fluorescencia con luz episcópica con

objetivo de 63 X ó 100 X en inmersión.

Preparación de los controles:

1. Como controles positivos se deben utilizar diluciones de una cepa del patógeno. Preparar una suspensión en PBS estéril de aproximadamente 10^6 ufc/mL y realizar la técnica IFI como se describió anteriormente.
2. Los controles negativos deben prepararse al menos la primera vez que se use cada lote de conjugado para estar seguros que no existen reacciones inespecíficas con el patógeno y dar lugar a lecturas falsas.
3. Se preparan igual que los controles positivos sólo que al realizar la técnica IFI no se echa en los pocillos antisuero específico de las bacterias sino PBS.

Observación de las muestras:

1. Una vez realizada la tinción de las muestras, éstas deben observarse inmediatamente o en un plazo no mayor de 24 h guardando los portaobjetos en la oscuridad. Si existiera algún problema, sólo fije las muestras a los portaobjetos (ya que así se conservan durante largo tiempo) y posteriormente continúe con la tinción.
2. Ponga una pequeña gota (aproximadamente 20 μ l) de glicerina tamponada en cada pocillo del portaobjetos.
3. Revise las circunferencias de los pocillos con objetivo de inmersión y aumento de 63X o 100X. Cuente las células bacterianas fluorescentes (comparándolas con la forma y tamaño de los controles positivos) en 30 campos microscópicos por pocillo del portaobjetos.
4. Haga las lecturas en los diámetros del pocillo (15 lecturas/diámetro) en ángulo recto uno con otro.
5. Cuatro de las lecturas se harán en los márgenes exteriores de los pocillos al comienzo y término de cada diámetro, ya que las células tienden a agruparse en estos sitios.

Cálculo e interpretación:

1. Si en los portaobjetos con controles negativos se observan células fluorescentes, repita la tinción. Si de nuevo sucediera, cambiar el lote de conjugado ya que están produciéndose reacciones inespecíficas con el mismo y repetir todo el ensayo.
2. Si en los portaobjetos con controles positivos no se observan células fluorescentes, puede deberse a que se hayan echado a perder los antisueros, o el conjugado, o ambos. Repetir la tinción

de los controles positivos con lotes nuevos y viejos del antisuero y el conjugado. Cambiar el que se encuentre en mal estado y repetir todo el ensayo.

3. El ensayo IFI se considera positivo si en los conteos de células se obtienen promedios de concentración de 10^3 células /mL o más según la fórmula para determinar la concentración de células /ml mediante las observaciones del ensayo IFI:

- 3.1 Calcular la media del número de células fluorescentes típicas contadas en los campos microscópicos (c).

- 3.2 Calcule el número de células fluorescentes típicas por pocillo del portaobjetos (C):

$C = c \times S/s$, donde:

S= área del pocillo del portaobjetos (πr^2);

r = radio del pocillo; s= área del campo del objetivo microscópico ($s = \pi i^2 / 4G^2 K^2$), donde:

i= coeficiente del campo (varía entre 8-24 dependiendo del tipo de ocular);

K= coeficiente del tubo del microscopio (1 o 1.25);

G= aumento del objetivo (100x, 40x, etc.)

- 3.3 Calcule el número de células típicas fluorescentes por ml del pellet resuspendido (N):

$N = C \times 1000/y \times F$, donde;

y = volumen del pellet resuspendido en cada pocillo y

F = factor de dilución del pellet resuspendido

- 3.4 Muestras con promedios entre 10^2 células/mL pueden considerarse muy sospechosas, por lo que debe repetirse el ensayo IFI con una segunda muestra.

- 3.5 Si la segunda muestra diera resultados similares inocule 500 μ l del pellet resuspendido en 500 μ l de caldo SMSA y póngalo en agitación durante 48 h a 28-30 °C. Esto permitirá que, si hay células del patógeno, su nivel poblacional se incremente a 10^6 - 10^8 células/mL.

- 3.6 Repita el ensayo IFI. Si resultara negativo considere la muestra negativa.

- 3.7 Todas las muestras positivas deben ser sembradas en medio SMSA. A las colonias sospechosas deberán hacerse las pruebas confirmatorias explicadas anteriormente.

- 3.8 La muestra se considerará infectada con *R. solanacearum* siempre que el ensayo IFI sea positivo y se aísle y confirme el patógeno.

5.3.12. Protocolo de diagnóstico de Moko, Bugtok por *R. solanacearum* raza 2.

Los análisis por PCR que se describen, están diseñados para detectar/identificar *R. solanacearum* raza 2/biovar 1 que causan el Moko del banano. El complejo de *R. solanacearum* comprende cuatro grupos genéticos como previamente fue explicado, designados como sequevar 3 (MLG 24), sequevar 4 (MLG 25), sequevar 6 (MLG 28) y sequevar 24. Se han identificado cuatro pares separados de oligonucleótidos para identificar cada uno de los grupos genéticos de *R. solanacearum* raza 2/biovar1 que causan el Moko.

Protocolos de muestreo

Esterilización de escalpelos y pinzas para eliminar todos los ADN antes y entre muestras.

- Colocar los escalpelos en solución de hipoclorito al menos por 5 min antes de usar para degradar cualquier ADN presente en el escalpelo.
- Lavar el hipoclorito del escalpelo colocándolo sucesivamente en tres vasos de precipitado con agua destilada.
- Colocar el escalpelo en solución de etanol al 95-100% y flamear con un mechero Bunsen.

Muestrear el tejido vascular del material de plantas

1. Cortar una porción suficiente del tejido vascular de una planta infectada, para un tubo de microcentrífuga de 2 mL. Añadir la cantidad mínima de agua necesaria para cubrir el extremo del tejido.
2. Dejarlo por 10-20 min para permitir la exudación de la bacteria fuera del tejido.
3. Esterilizar un par de pinzas mediante flameo con alcohol y usarlo para extraer del tubo el tejido de la planta.
4. Centrifugar la muestra y eliminar el sobrenadante.

Un método alternativo a los pasos 1 a 4 es:

- a. Tomar una muestra pequeña de tejido vascular de la planta enferma y colocarla en una placa de Petri.
- b. Añadir una pequeña cantidad de agua estéril a la muestra de forma que quede cubierta por el agua y suavemente macerar el tejido utilizando un escalpelo estéril. Dejarlo por 10 min.
- c. Eliminar el agua utilizando una micropipeta y colocarlo en el tubo de la microcentrífuga.
- d. Complete el volumen a 1 ml con agua destilada estéril y centrifuga.

- e. Resuspender el pellet de la bacteria en 1 mL de agua destilada, centrifugar, y decantar el sobrenadante dejando aproximadamente de 50-100 μL y resuspender el pellet en el volumen de agua remanente.
- f. Usar la suspensión bacteriana como molde y utilizarlo directamente en la reacción de PCR.
- g. Alternativamente, la suspensión puede ser colocada en un baño de agua hirviendo por 10 min, seguido de una centrifugación para eliminar los residuos celulares; el sobrenadante puede ser utilizado en la reacción de PCR. Previo a la hervidura (si se realiza), tomar un asa de la suspensión y plaquearla (dilución de 16 estrías) en SPA y SMSA modificado. Colocar las placas a 28 °C por 48-72 h.

Análisis a partir de cultivos

1. De las placas con el SMSA modificado o el SPA hacer una suspensión de la bacteria en 1 mL de agua destilada.
2. Centrifugar la suspensión bacteriana y resuspenderla en 1 mL de agua destilada. Centrifugar de nuevo, eliminar el sobrenadante y añadir suficiente agua estéril para hacer una suspensión densa de la bacteria.
3. Usar esta suspensión directamente como molde para la PCR.

Protocolo de PCR para detectar *R. solanacearum* raza 2/biovar 1

Soluciones requeridas:

Solución	Concentración madre
dNTP 's	1.25 mM de cada dNT
MgCl ₂	25 mM (suministrado con la polimerasa)
Tampón PCR	10X (Suministrado con la polimerasa)
Tampón Tris-Acetato-EDTA*	50X
Colorante de carga**	6X
Bromuro de etidio (EtBr)	10 mg mL ⁻¹

Tampón Tris-Acetate-EDTA– (solución madre 50X)

- Tris base 242 g/L
- Ácido Acético Glacial 57.1 mL/L
- 0.5M EDTA (ph8.0) 100 mL/L

*Tampón de carga 6X **:*

- Xileno Cyanol FF 0.25%
- Ficoll (Tipo 400; Pharmacia) 15%

Almacenar a temperatura ambiente

Reacciones individuales de PCR para detectar *R. solanacearum* raza 2/biovar1

Para minimizar el riesgo de contaminaciones de la PCR utilizar siempre guantes. Todas las reacciones de PCR se realizan en un volumen total de 25 µL. Cada concentración consiste de:

Solución	Concentración madre	Concentración Final	Volumen a utilizar
Agua destilada estéril	-	-	12.8 µL
dNTP's	1.25 mM	200 µM	4 µL
Tampón PCR *	10X	1X	2.5 µL
MgCl ₂ *	25 mM	1.5µM	1.5 µL
Cebador Forward(s) (Ver Cuadro 12)	6 mM	24 µM	1 µL
Cebador reverso (s) (Ver Cuadro 12)	6 mM	24 µM	1 µL
Polimerasa*	5U/µL	1U/reacción	0.2 µL
Molde muestra (suspensión celular como se preparó arriba)	-	-	2 µL

* Se recomienda utilizar Amplitaq Gold DNA Polymerase para estos protocolos de PCR. La concentración y volúmenes utilizados en la PCR indicadas en el cuadro anterior es para la Amplitaq Gold DNA Polymerase. El PCR tampón y el MgCl₂ son suministrados con la polimerasa.

En el cuadro 12, aparecen los cebadores y la especificidad de la reacción de PCR.

Cuadro 12.
Cebadores y especificidad de la reacción de PCR.

Cebador	Secuencia	Especificidad
SI28F	CGTTCTCCTTGTCAGCGATGG	Sequevar 6 (MLG 28)
SI28R	CCCGTGTGACCCCGATAGC	
MUS20F	CGGGTGGCTGAGACGAATATC	Sequevar 4 (MLG 25)
MUS20R	GCCTTGTCAGAATCCGAATG	
IS24F	TCGGGCGTAAGAGGCAGAC	Sequevar 3 (MLG 24)
IS24R	GGAGGTGTGCGCCATCAACTG	
VC46F	CTCCTGGGAGTCGGTTGGGTC	Sequevar 24
VC46R	AGGGAACCTAGGCGTGACTG	
759	GTCGCCGTCAACTCACTTTCC	<i>R. solanacearum</i>

760	GTCGCCGTCAGCAATGCGGAATCG	
-----	--------------------------	--

En el cuadro 13 aparece la mezcla de cebadores 10X para la identificación de los sequevares de *R. solanacearum* por PCR.

Cuadro 13.
Preparación de la mezcla de cebadores 10X para PCR para identificar sequevares de *R. solanacearum* (conteniendo 2 µM de cada cebador)

Concentración del stock de cebadores	50 µM (50 mol/µl)	100 µM (100 pmol/µl)
Cada cebador (SI28F, SI28R, MUS20F, MUS20R, IS24F, IS24R, VC46F, VC46R)	20 µl	10 µl
Cebadores 759, 760	10 µl	5 µl
TE tampón	Variable	Variable
Volumen total	500 µl	500 µl

Preparación de la mezcla de reacción

Es esencial siempre incluir controles positivos y negativos para cada PCR. Así debe siempre prepararse un mínimo de 3 reacciones de PCR. Es más conveniente y más preciso hacer una mezcla de reacción que incluya todos los componentes para el número total de muestras requeridos en un tubo y entonces, subsecuentemente hacer alícuotas de la mezcla de reacción para los tubos de PCR para el termociclador. Por ejemplo, si tiene 2 muestras de planta, haga la mezcla para 2 + 2 controles. En este caso, debe de preparar una mezcla de reacción para 5 muestras para asegurar la cantidad suficiente de la mezcla de reacción para el número requerido de muestras (según sea el número de muestras a analizar mayor la cantidad de mezcla de reacción extra a preparar.

Para una mezcla de reacción de 6 muestras + 2 controles – prepare una mezcla de reacción para 10 reacciones de PCR

Solución	Volumen para una reacción	Volumen para 10 reacciones
Agua destilada estéril	12.8 µL	128 µL
dNTP's	4 µL	40 µL
PCR Tampón*	2.5 µL	25 µL
MgCl ₂ *	1.5 µL	15 µL
Cebador Forward (ver cuadro 12)	1 µL	10µL

Cebador reverso (ver cuadro 12)	1 µL	10 µL
Polimerasa*	0.2 µL	2 µL

* Se recomienda utilizar Amplitaq Gold DNA Polymerase para estos protocolos de PCR. La concentración y volúmenes utilizados en la PCR indicadas en el cuadro anterior son para la Amplitaq Gold DNA Polymerase. El PCR tampón y el MgCl₂ son suministrados con la polimerasa.

Todas las soluciones se almacenan a -20 °C; por tanto, debe asegurarse que todas estén fundidas completamente y ser agitadas y mezcladas suavemente antes de utilizarse. Mezclar juntos todos los ingredientes usando un juego de micropipetas que son solo utilizados para la preparación de las PCR (esto minimiza el riesgo de la contaminación de la mezcla de la reacción con la muestra). Asegurarse que al adicionar la polimerasa quede bien mezclada mediante una agitación rápida del tubo. (Nota: algunos tampones de PCR incluyen detergentes; si se observa mucha espuma, rápidamente centrifuge la mezcla antes de tomar las alícuotas).

Haga alícuotas de 23 µL de la mezcla de reacción en cada uno de 8 tubos de PCR. Añadir 2 µL del molde de la muestra y colóquelo en un termociclador programable con el siguiente protocolo de PCR.

Protocolo de PCR

1. Desnaturalización inicial, 96°C, 10 min*, 1 ciclo
2. Desnaturalización 30 ciclos 92 °C, 15 s,
3. Alineamiento, 59 °C, 15 s,
4. Extensión, 72 °C, 30 s,
5. Extensión final, 72 °C, 10 min, 1 ciclo
6. Mantenimiento, 11°C,

* reducir a 5 min si no utiliza AmpliTaq Gold

Electroforesis en gel

1. Después que finaliza la PCR se sacan los tubos del termociclador y se añade 5 µL del colorante de carga con una pipeta.
2. Se cargan 5 µL de la mezcla con el producto de la PCR, en los pozos del gel de agarosa al 2% preparado. Siempre utilizar un marcador de peso molecular en algunos de los carriles del gel. Debe elegirse un marcador de un peso molecular entre 600 y 100 pb.
4. Correr el gel a 10V/cm (dividir el número de volts entre la distancia entre los electrodos. Ej. para electrodos a una distancia de 10 cm en el tanque de electroforesis, aplicar un voltaje de 100 V por 20-30 min.
5. Teñir el gel con 0.5 µg mL⁻¹ de la solución de EtBr por 10-15 min. Alternativamente, añadir directamente 1 µL de 10 mg mL⁻¹

de EtBr para 100 mL de TAE gel de agarosa 2% al gel previo a la electroforesis.

6. Los tamaños de los amplicones esperados para cada raza 2/biovar 1 sequevar de *R. solanacearum*, se muestran en el cuadro 14.

Cuadro 14.
Pares de cebadores, especificidades y tamaño de los productos esperados.

Cebador	Especificidad	Tamaño de los amplicones
SI28F	Sequevar 6 (MLG 28)	220pb
SI28R		
MUS20F	Sequevar 4 (MLG 25)	351pb
MUS20R		
IS24F	Sequevar 3 (MLG 24)	490pb
IS24R		
VC46F	Sequevar 24	100pb
VC46R		
759	<i>R. solanacearum</i>	282pb
760		

Reacción de PCR multiplex para identificar sequevares de R. solanacearum raza 2/biovar 1 en una sola reacción.

Secuencias de los cebadores:

Nombre del cebador	Secuencia del cebador
Nmult:21:1F	CGTTGATGAGGCGCGCAATTT
Nmult:21:2F	AAGTTATGGACGGTGAAGTC
Nmult:22:1nF	ATTGCCAAGACGAGAGAAGTA
Nmult:23:AF	ATTACSAGAGCAATCGAA
Nmult:22:RR	TCGCTTGACCCTATAACGAGTA
759	GTCGCCGTCAACTCACTTTCC
760	GTCGCCGTGAGCAATGCGGAATCG

Preparación de la mezcla de cebadores 10 X

Concentración del stock de los cebadores	50 µM (50 pmol/µl)	100 µM (100 pmol/µl)
--	--------------------	----------------------

cada cebador (Nmult: 21:1F, Nmult:21:2F, Nmult: 22:InF, Nmult:23:AF, Nmult:22:RR)	20 µl	10 µl
Cebadores 759, 760	10 µl	5 µl
Tampón TE	Variable	Variable
Volumen total	500 µl	500 µl

Mezcla de la reacción

Solución	Concentración madre	Concentración final	Volumen para una reacción
Agua estéril destilada	-	-	10.55 µL
dNTP's	1.25 mM	200 µM	4.0 µL
PCR Tampón*	10X	1X	2.5 µL
Mezcla de cebadores	10X	1X	2.5 µl
MgCl ₂ *	25 mM	2µM	2.0 µL
DMSO	100%	5%	1.25 µl
Polimerasa*	5U/µL	1U/reacción	0.2 µL

*Se recomienda la Amplitaq Gold DNA Polymerase para su uso en estos protocolos. La concentración y volúmenes utilizados en la PCR indicadas en la Cuadro son para la Amplitaq Gold DNA Polymerase. EL tampón PCR y el MgCl₂ son suministrados con la polimerasa.

Condiciones de la PCR:

1. Desnaturalización inicial 96 °C, 10 min* 1 ciclo
2. Desnaturalización 30 ciclos 94 °C, 30 s
3. Alineamiento 59 °C, 90 s
4. Extensión 72 °C, 90 s
5. Extensión final 72 °C, 20 min, 1 ciclo
6. Mantenimiento 11 °C

* reducir a 5 min si no se utiliza AmpliTaq Gold

Tamaño de los amplicones esperados de las PCR

Cebador	Especificidad	Tamaño del amplicón cuando se aparece con Nmult:22: RR
Nmult: 21:1F	Filotipo I	144 pb
Nmult: 21:2F	Filotipo II	372 pb
Nmult:23:AF	Filotipo III Filotipo IV	91 pb
Nmult:22: InF	Todos los Filotipos	213 pb
Nmult:22: RR		NA ^a
759 760	<i>R. solanacearum</i>	182pb

5.3.13. Protocolos de diagnóstico de *R. zyzygii* spp *celebesensis* (Rzc) agente causal de la marchitez roja bacteriana del banano (Safni et al., 2014).

Aislamiento

Ha sido demostrada una baja variabilidad entre los aislamientos de *R. zyzygii* ssp. *celebesensis* (Eden-Green, 2018). Los aislamientos examinados utilizan galactosa, pero no glucosa, fructuosa o sacarosa, en el primer aislamiento. Así, la bacteria de la marchitez roja bacteriana, crece mejor en cultivo si se sustituye la glucosa o la fructosa por el glicerol. La inclusión de violeta cristal 2.5 µg/mL y polimixina B (100 µg/mL), inhiben muchos contaminantes de crecimiento rápido y es útil en el medio selectivo para el aislamiento inicial. En el medio TZC, Rzc produce colonias no fluidas, mayormente de crecimiento lento con márgenes lisos, y centros rojo oscuro. Las colonias son no fluorescentes en medio King B y no producen pigmento pardo en el medio tirosina, aunque se vuelven pardas cuando se incuban. Crecen a 37 °C, pero no a 41 °C, o en presencia de NaCl al 2%. Los aislamientos de BDB son arginina dihidrolasa negativa, oxidasa positiva y no reducen nitratos o la gelatina, el almidón, o la lecitina.

Pruebas de patogenicidad

Ninguno de los aislamientos de Rzc estudiados por Eden-Green en 2014 (Eden-Green, 2018), produjeron síntomas al inocularlos en tomate, pimientos, maní, tabaco, berenjenas, aunque se produce una reacción de sensibilidad en hojas de tabaco. Se produce una marchitez rápida en jengibre (*Zingiber officinalis* Roscoe) (Eden-Green, 2018). Esto contrasta con los aislamientos de plantas afectadas de Moko y Bugtok (*R. solanacearum*), que producen síntomas de marchitez en tomate y bananos. En relación al resto de los caracteres fenotípicos, hay muchas similitudes entre *R. solanacearum*, *R. zyzygii* ssp. *celebesensis* y *R. zyzygii* de clavo [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry].

Las plantas de banano después de la inoculación en la base del pseudotallo, si se mantienen entre 25 - 30 °C, muestran marchitez en 4 días (Davies y Liberato, 2006). Cuando se inoculan aislamientos en el cormo de plantas jóvenes, se produce marchitez en un período de 7-14 días después de la inoculación y se muestra una reacción de hipersensibilidad después de la inoculación de hojas de tabaco con el BDB (Thwaites *et al.* 2000).

Diagnóstico molecular

Según Fegan y Prior (2006), Rzc es el único patógeno conocido de los bananos, perteneciente al filotipo IV; por tanto, la identificación de un cultivo de bacteria obtenida de un banano con marchitez como perteneciente al filotipo IV con el test de PCR filotipo específico descrito por Fegan y Prior (2005; ver acápite 8.1.5.4.), en combinación con las características culturales de la misma en medio TCZ (Kelman

1954), es una fuerte evidencia circunstancial de que esta el agente causante del BDB. En la PCR multiplex descrita y los cebadores, Nmult:22: InF el amplicón debe tener 213 pb; con los cebadores 759 y 760 debe dar una banda común a todas los filotipos del complejo de *R. solanacearum* de 282 pb y una específica para el filotipo IV de 213 pb (Fegan y Prior, 2005; Timin *et al.*, 2014).

5.3.14. Detección de *Ralstonia zyzygii ssp celebensis* por PCR (Plant Health Australia 2006 y Timin *et al.*, 2014)

Secuencias de los cebadores

121F – 5’ CGT ATT GGA TGC CGT AAT GGA 3’

121R – 5’ AAG TTC ATT GGT GCC GAA TCA 3’

Amplifica un amplicón de 317 pb de los aislamientos de BDB.

Mezcla de la reacción

Solución	Concentración madre	Concentración final	Volumen adicionado por reacción
Agua destilada estéril	-	-	12.8 µL
dNTP’s	1.25 mM	200 µM	4 µL
PCR Tampón*	10X	1X	2.5 µL
MgCl ₂ *	25 mM	1.5µM	1.5 µL
121F	6 mM	24 µM	1 µL
121R	6 mM	24 µM	1 µL
Polymerase*	5U/µL	1U/reaction	0.2 µL
Muestra de suspensión celular como se describió previamente	-	-	2 µL

*Se recomienda la Amplitaq Gold DNA Polymerase para su uso en estos protocolos. La concentración y volúmenes utilizados en la PCR indicadas en el Cuadro son para la Amplitaq Gold DNA Polymerase. EL tampón PCR y el MgCl2 son suministrados con la polimerasa.

Condiciones de la reacción de PCR

1. Desnaturalización inicial, 96 °C, 10 min*, 1 ciclo
2. Desnaturalización, 30 ciclos 94 °C, 15 s.
3. Alineamiento, 59 °C, 30 s.
4. Extensión, 72 °C, 30 s.
5. Extensión Final, 72 °C, 10 min, 1 ciclo
6. Mantenimiento, 11 °C

* reducir a 5 min si no se utiliza AmpliTaq Gold

Al visualizar mediante electroforesis en agarosa de acuerdo al protocolo descrito en la pág. 94, se produce un amplicón de 317 pb si se trata de Rzc (Plant Health Australia, 2006; Timin, 2014).

Supriadi (2005), propuso un método a través de la producción de bacteriófagos, para distinguir los aislamientos de Rzc de los de la raza 2 de *R. solanacearum* causante del Moko.

5.3.15. Protocolos de diagnóstico de bacterias del grupo de las pudriciones blandas (*Dickeya paradisiaca* Dickey and Victoria, 1980; Samson et al., 2004. y *Pectobacterium carotovorum* s. sp. *carotovorum* (Jones, 1901, Haubent et al., 1999).

Las pudriciones suaves bacterianas por *D. paradisiaca* y *P. carotovorum* pueden ser diagnosticadas mediante métodos microbiológicos con pruebas bioquímicas y métodos moleculares, por inmunofluorescencia indirecta (IFI), ELISA con anticuerpos monoclonales y policlonales y diferentes variantes de PCR.

a. Protocolo microbiológico para aislar y diferenciar *P. carotovorum* s.sp. *carotovorum* y *D. paradisiaca*

Aislamiento a partir de tejidos infectados de las plantas:

- Las vainas y pedúnculos de las hojas, rizomas y raíces son colectados en las plantas infectadas y se lavan en el laboratorio con agua estéril.
- Con la ayuda de una pequeña varilla de vidrio, se maceran en agua estéril en un tubo de ensayo o un recipiente estéril y se sigue el proceso indicado en el siguiente esquema (figura 18):

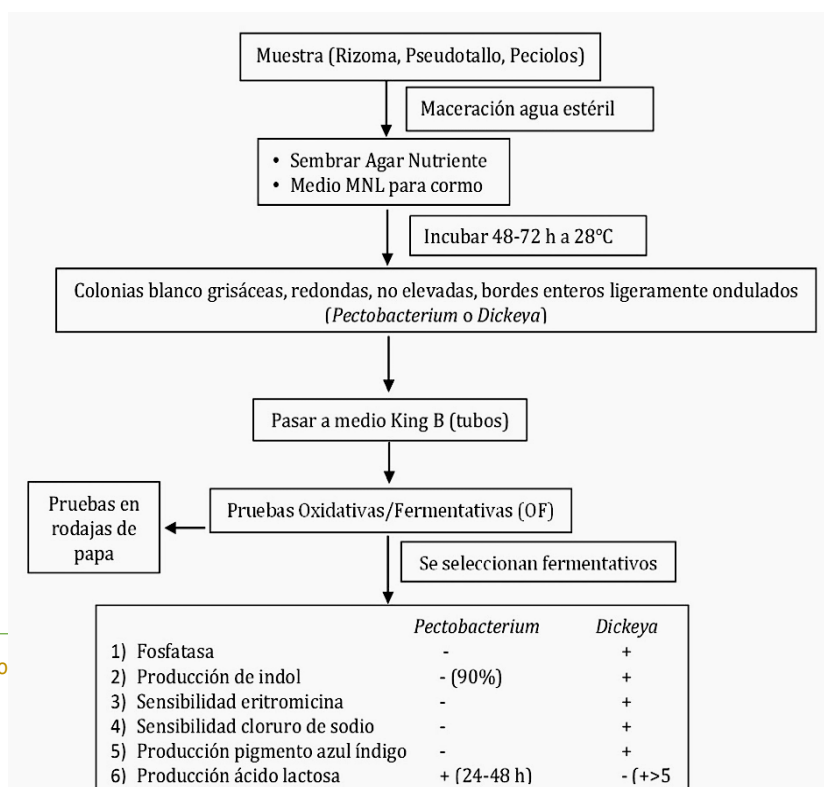


Figura 18. Esquema del flujo de aislamiento, y diagnóstico de identificación de *P. carotovorum* y *D. paradisiaca*.

Para la determinación de las *Dickeya* ssp. se puede utilizar el ensayo de determinación de los fenotipos en base a la utilización de los azúcares de acuerdo al cuadro 15.

Cuadro 15.

Ensayo para la determinación de los fenotipos para diferenciar *D. chrysanthemi* de *D. paradisiaca* (NPC Seed Certification Sub-Committee 2017).

Nombre de la especie	D. chrysanthemi	D. paradisiaca	D. solani	D. zeae
Ref.	Samson <i>et al.</i> (2005)	Samson <i>et al.</i> (2005)	van der Wolf <i>et al.</i> (2016)	Samson <i>et al.</i> (2005)
Crec. a 39°C °	+	+	Débil	+
D-Arabinosa	-	+	+	+
Melibiosa	+	Variable	+	+
Rafinosa	+	Variable	+	+
Manitol	+	-	+	+
β -Gentiobiosa	-	+	Débil	-

Medios de cultivos y soluciones utilizados en el aislamiento y ensayos diagnóstico de *Dickeya paradisiaca* y *P. carotovorum*:

Medio MNL (Hevesi *et al.*, 1981)

- Peptona bacteriológica 4.0 g
- Extracto de carne 4.0 g
- Extracto de levadura 1.0 g
- NaCl 2.5 g
- Dextrosa 2.5 g
- Agar 20.0 g
- Agua destilada 1000 mL

Añadir los ingredientes al agua (primero las sales), agitando continuamente hasta que se disuelvan. Calentar en corriente de vapor hasta que tenga consistencia viscosa. Colocar en los envases destinados y esterilizar. Antes de extender las placas, añadir asépticamente 1,5 mL de solución cristal violeta y 10 ml de solución de sodio novobiocina a 100 ml de medio licuado estéril y enfriado a 45 – 50 °C.

Solución cristal violeta

Preparar una solución acuosa al 0,4%. (0,4 g de cristal violeta disueltos en 100 ml de agua destilada).

Solución de Sodio novobiocina

Preparar una solución a 100 ppm utilizando 10 mg del antibiótico disuelto en 100 ml de agua destilada estéril.

Agar nutriente (NA)

- Extracto de carne 3.0 g
- Peptona 5.0 g
- Agar 15 g
- Agua destilada 1000 mL

Agar King B

- Proteosa Peptona 20,0 g
- Glicerol 10,0 g
- K₂HPO₄ 1,5 g
- MgSO₄. 7H₂O 1,5 g
- Agar 20,0 g
- Agua destilada 1000 mL

Medio O/F de Hayward (metabolismo oxidativo - fermentativo de los carbohidratos)

Solución basal

- NH₄H₂PO₄ 1,0 g
- KCl 0,2 g
- MgSO₄.7H₂O 0,2 g
- Peptona bacteriológica 1,0 g
- Agar 3,0 g
- Solución de bromotimol azul 3,0 ml
- Agua destilada 1000 ml

Disolver las sales primeramente en una parte del agua (siempre en primer lugar el MgSO₄.7H₂O). En el resto del agua disolver la peptona y a continuación agregar las sales disueltas. Posteriormente añadir 10 g de glucosa y disolver completamente.

Ajustar el pH a 7.1 con NaOH al 40 % y añadir el indicador. Después añadir el agar y disuélvalo todo mediante calor. Agregar a los tubos de ensayo de 3 a 5 ml, esterilice y deje solidificar en posición vertical

Solución de bromotimol azul (para medio O/F)

Disolver 0,1 g de bromotimol azul en 8 ml OHNa 0,1N y agregar 2 mL de agua destilada.

Solución basal para prueba de azúcares (Erwinia)

- Peptona bacteriológica 1.0 g
- NaCl 0.5 g
- Agua destilada 100 ml

Añadir los ingredientes al agua agitando continuamente hasta que se disuelvan. Ajustar el pH a 7,0 y agregar 0,7 ml de una solución alcohólica al 1,5 % de bromocresol púrpura. Reactivos y soluciones empleadas en Bacteriología). Llene los tubos con 3 ml de esta solución basal. Preparar soluciones madres al 10% de los azúcares separadamente añadiendo 0,3 ml a cada tubo. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C.

Solución de púrpura de bromocresol al 0,4% (para leche)

Disolver 0,1g de púrpura de bromocresol en 9,2 ml NaOH 0,02 N y diluya a 250 mL con agua destilada.

Actividad fosfatasa (Schaad et al., 2001)

Preparar agar nutriente, autoclavarlo y cuando se encuentre parcialmente frío, añadir una solución esterilizada de sal fenolftaleína-difosfato de sodio para dar una concentración final de 0.05% (p/v) y verterla en las placas. Sembrar los aislados de una suspensión acuosa bacteriana densa, e incubar por 48 -72 h a 23 -27 °C. Colocar una gota (ca. 0.1 mL) de amonio concentrado en la tapa de la placa Petri e invertir en medio sobre esta. Las colonias que tienen actividad fosfatasa se tornan de color rosa brillante casi inmediatamente. Deben usarse placas Petri de vidrio porque el amonio ablanda las placas plásticas.

Sensibilidad a la eritromicina (Schaad et al., 2001)

Sembrar la bacteria en placas con agar nutriente, vertiendo 6 mL del medio fundido a 50°C, e inocular con 1 mL de una suspensión densa de la bacteria en estudio en la placa base sobre el medio. Después que el agar se haya solidificado, colocar un disco impregnado con 15 µL de eritromicina por disco, en la superficie del medio. Incubar 48 horas a 23-24°C. La aparición de

una zona de inhibición alrededor del disco es registrado como positivo al test de sensibilidad.

Producción de Indol (Schaad et al., 2001)

- Preparar un medio que contiene 10 g de triptona, 1 g/L de triptofano, y 15 g de agar/L. Inocular los aislados de una suspensión densa e incubar por 48 h. a 23-27 °C.
- Cuando estén listos para el ensayo, pipetear dos-tres gotas de p-dimetil-amino-cinamaldehído (solución de 1g/100 mL de ácido hidroclicórico al 10%) sobre papel de filtro en una placa Petri.
- Coloque un asa de una colonia de la bacteria en el papel de filtro tratado. La aparición de una coloración azul-verdosa en el área tratada en un período de 10 seg. es considerado un resultado positivo. Se considera una reacción negativa cuando el área tratada permanece incolora o aparece una ligera coloración rosada.

Producción de azul índigo en medio GYCA

Siembre las cepas sospechosas en tubos (al menos 2 /cepa) con medio GYCA en cuña inclinada. Incube a 28°C. Las cepas de *Dickeya* tienen un crecimiento vigoroso en este medio y entre 5-10 días posteriores a la siembra pueden producir un pigmento insoluble de color azul índigo oscuro que es característico y diferencial para este género. Sin embargo, se han encontrado aislamientos que no lo producen por lo que un resultado negativo en esta prueba no es excluyente.

Medio GYCA (Lelliot y Stead, 1987).

- Extracto de levadura 5,0g;
- D-glucosa 10g; CaCo3 30g;
- Agar 20g;
- Agua desmineralizada 1000ml.
- pH 7,0.

Añadir unos 5mL por tubo. Esterilizar a 121°C por 15 min. Una vez esterilizado y todavía caliente el medio (50-60 °C). Homogenizar el medio en los tubos con ayuda de un Vortex, para que no precipite el carbonato y poner a solidificar en forma inclinada.

b. Protocolo mediante PCR de *P. carotovorum* s.sp. *carotovorum* y *D. paradisiaca*

Protocolo de PCR Multiplex (Potrykus et al., 2014 ; NPC Seed Certification Sub-Committee, 2017).

Se utilizan 3 juegos de cebadores para detectar *Dickeya* spp. y *Pectobacterium* spp.

Especie	Cebadores	Secuencia
<i>Dickeya</i> sp.	Df forward	5'-AGAGTCAAAAGCGTCTTG-3'
	Dr reverse	5'-TTTCACCCACCGTCAGTC-3'
<i>P. carotovorum atrosepticum</i>	Y45 forward	5'-TCACCGGACGCCGAAGTGTGGCGT-3'
	Y46 reverse	5'-TCGCCAACGTTTCAGCAGAACAAAGT-3'
<i>P. carotovorum</i>	ExpccF forward	5'-GAACTTCGCACCGCCGACCTTCTA-3'
	ExpccR reverse	5'-GCCGTAATTGCCTACCTGCTTAAG-3'

Utilizar controles positivos y negativos cuando se realice la PCR.

Componentes de la mezcla de reacción

Componentes de la mezcla de reacción	Volumen por Rxn
Promega 2X Master Mix	12.5 µl
10 µM Pcc Forward Primer (ExpF)	3.0 µl
10 µM Pcc Reverse Primer (ExpR)	3.0 µl
10 µM Pca forward (Y45)	0.8 µl
10 µM Pca Reverse Primer (Y46)	0.8 µl
10 µM Dsp. Forward Primer (Df)	0.8 µl
10 µM Dsp Reverse Primer (Dr)	0.8 µl
Agua (grado molecular)	2.4 µl
DNA extraído de la muestra	2.0 µl
Volumen Total Rxn	25.0 µl

Parámetros de la reacción de PCR

1. Precalentamiento 105.5 °C
2. Desnaturalización 95°C por 4 min
3. Desnaturalización 30 ciclos:
 - 94°C por 45s,

- 62 °C por 90s
 - 72 °C por 90s
4. Extensión final 72 °C por 5 min

Correr una electroforesis en agarosa como se ha explicado previamente:

- Los cebadores Dsp (Df y Dr) distinguen *Dickeya* sp., con una banda de aproximadamente a 130 pb;
- Pba (Y45 and Y46) distinguen *Pectobacterium atrosepticum* con una banda aproximadamente de 420 bp;
- Pcc (ExpccF y ExpccR) distinguen *P. carotovorum* con una banda de aproximadamente 550 pbs.

5.3.16. Protocolo de diagnóstico de la marchitez del banano causada por BWAP y ‘Candidatus Phytoplasma noviguineense’

Los estudios filogenéticos de los fitoplasmas asociados a la marchitez de bananos (ABB) de PNG y del este de PNG e Islas Salomón, aunque ambos pertenecen al mismo grupo relacionados a la marchitez letal del coco, pertenecen a diferentes especies (Davies *et al.*, 2012; Miyazaki *et al.*, 2018).

Muestreo:

Se identifican las plantas con síntomas en hojas de marchitez en forma amarillamiento intenso con tonalidades naranja y con hojas muertas, que avanzan del borde a la nervadura central en sectores del limbo y con parches pardo necróticos discontinuos en el pseudotallo. Se toman muestras de tejidos de la nervadura central de las hojas afectadas y de los vasos que incluyan las lesiones del interior pseudotallo. Se toman aproximadamente 0.5-1 g del tejido vascular inmediatamente por encima o por debajo de los parches de necrosis cuando estén presentes. El tejido se fragmenta finamente y se seca rápidamente en el campo sobre cloruro de calcio anhidro. Las muestras se almacenan a 4°C hasta que se encuentren totalmente secas y posteriormente a -20°C.

a. Protocolo de diagnóstico del Banana Wilt Associated Phytoplasma (BWAP) utilizado por Davis *et al.* (2012).

- Protocolo de extracción de DNA

Se utiliza el Qiagen DNeasy plant minikits siguiendo las instrucciones del fabricante con las siguientes modificaciones:

1. Las cantidades iniciales de material vegetal y los correspondientes volúmenes de los buffers AP1 y AP2 se incrementan en 150 % (ej: 50 mg de peso seco de la muestra en vez de 20 mg).
2. El período de incubación en el buffer AP1 a 65 °C, se aumenta de 10 minutos a 30 minutos.
3. Se usa un paso extra con buffer AW.

Para los cebadores y la reacción de PCR consultar Deng y Hiruki, (1991); Schneider *et al.* (1995); Gundersen & Lee (1966); Padovan *et al.*, (1995); Hodgetts *et al.*, (2008); Davies *et al.*, 2015. Estos cebadores son específicos para la región del DNA nuclear de los genes 16S rRNA y 23S rRNA conocidos en todos los fitoplasmas.

b. Protocolo de diagnóstico de “*Candidatus Phytoplasma noviguineense*” (Miyazaki *et al.*, (2017)

La composición del buffer de extracción de DNA utilizado en este protocolo es:

- Tris-HCl (pH 8.0) 0.1 M
 - NaCl/ polyvinylpyrrolidone 1% (p/v) 1.4 M
 - cetyl trimethyl ammonium bromide 2% (p/v),
 - EDTA (pH 8.0) 20mM
 - a-thioglycerol. 0.3% (v/v)
1. Después de la extracción con un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), precipitar con 0.7 volumen de isopropanol.
 2. Lavar con etanol 70% (v/v)
 3. El pellet resultante se disuelve en 100 µl de agua destilada y se incuba con 10 µg RNase A (Nippon Gene) a 37°C por 2.5 h.
 4. Cada muestra se purifica utilizando NucleoSpin gDNA Cleanup kit (Takara Bio).

Se amplifican mediante PCR el gen Phytoplasma 16S rRNA, y el operon rp mediante el juego de cebadores siguientes:

Cebador	(region de Secuencia (5'-3') Propósito de la referencia. alineamiento)		
SN910601F	16S-23S rRNA gene (16S rRNA gene)	gtttgatcctggctcaggatt [3]	PCR, secuenciación
SN011119R	16S-23S rRNA gene (23S rRNA gene)	tcgccgttaattgcgtcctt [4]	PCR, secuenciación
L15F1	spc operon (rpl15)	cctgtagtggyamtggwaaac [5]	PCR, PCR anidada*, secuenciación
MapR1	spc operon (map)	attarraatatargytcctcrtg [5]	PCR, nested PCR*, sequencing
IVsecYFn	spc operon (secY)	tccattgggatgcaattgttcgc [7]	PCR anidada*, secuenciación
IVsecYRn	spc operon (secY)	ataatatcaggagtagcggc [7]	PCR anidada*, secuenciación
rpL2F3 rp	operon (rpl2)	wccttgggyaaaaagctc [6]	PCR, PCR anidada*, secuenciación
rp(l)R1A rp	operon (rps3 / rpl16)	gttcttttgcattaacat [6]	PCR, PCR anidada*, secuenciación
rpF1C rp	operon (rps19)	atggtddggdcayaarttagg [6]	PCR, PCR anidada*, secuenciación
IVrpRn rp	operon (rps3)	caggaccttgtaacacatttc [7]	PCR anidada*, secuenciación

* Para cada amplicón de los operones spc y rp de la PCR se realiza una PCR anidada utilizando dos juegos de cebadores: para el operón spc se utilizan los cebadores rpl2F3/IVrpRn y para el operón rp se utilizan los cebadores rpF1C/rp(I)R1A.

[3] Namba *et al.*, (1993); [4] Jung *et al.*, (2003); [5] Lee *et al.*, (2010); [6] Martini *et al.*, (2007) ; [7] Miyazaki *et al.*, (2017).

Se utiliza la DNA polimerasa KOD FX (TOYOBO) y seguir el protocolo de acuerdo al fabricante, con las siguientes modificaciones:

- Mezcla de reacción total 25 µl
- DNA molde de cada amplificación 10 ng.
- Para las secY y rp, se realiza una PCR anidada utilizando como molde 1 µl del producto de PCR diluido (1/50).
- Se secuencia cada amplicón.

5.3.17. Diagnóstico de ‘Candidatus Phytoplasma asteris’ asociado a la elefantiasis del banano (adaptado de Aliaga *et al.*, 2018; Smart *et al.*, 1996; Lorenz *et al.*, 1995; Christensen *et al.*, 2004).

- *Protocolo de extracción de DNA*

Se toman tejidos del rizoma de plantas con síntomas de elefantiasis. El DNA total puede ser extraído utilizando el protocolo CTAB (Daire *et al.*, 1997): 507-514.

Protocolo CTAB

Los cebadores para la amplificación y secuenciación son P1/Tint (Aliaga *et al.*, 2018):

Cebador	Región	Secuencia	Referencia
P1	16S	5'AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT3'	(Smart <i>et al.</i> , 1996)
Tint	SR	5'TCAGGCGTGTGCTCTAACCAGC3'	(Smart <i>et al.</i> , 1996)

Mezcla de reacción (Smart *et al.*, 1996) para un volumen total de 30 µl:

- DNA molde 50 ng
- Cebadores 0.5 mM de cada cebador
- dNTP (de cada uno dATP, dCTP, dGTP, y dTTP) 150 mM
- AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer) 1U.

Reacción de amplificación por PCR

La reacción consiste en 30 ciclos con los siguientes pasos

- Desnaturalización 94°C por 1 min
- Alineamiento 48°C por 1 min 56°C
- Extensión por 2 min at 72°C.

Electroforesis: 8 ml de la mezcla de reaccion en 1% de agarosa, tinción con bromuro de etidio y visualización por transiluminación UV

El producto de la amplificación es una banda de 1600 pb.

Los cebadores para la PCR anidada son forward U5/reverse U3 (Lorenz *et al.*, 1995)

Cebador	Región	Secuencia	Referencia
fU5	16SrDNA	CGGCAATGGAGGAACT	Lorenz <i>et al.</i> , 1995
rU3	16SrDNA	TTCAGCTACTCTTTGTAACA	Lorenz <i>et al.</i> , 1995

La PCR anidada se desarrolla en un volumen de 40 µl con:

- DNA molde 100 to 200 ng
- Cebadores 0.5 µM de cada cebador
- dNTP's 100 µM de los cuatro
- Goldstar polymerase 0.2 units of (Eurogentec, Seraing, Belgium)
- polymerasa buffer 1 X (Eurogentec).
- La mezcla se cubre con 40 µL de aceite mineral.

Reacción de PCR anidada (Lorenz et al., 1995)

Se desarrolla con un total de 35 ciclos con el siguiente programa:

- desnaturalización a 95°C 30 s
- alineación a 55°C (52°C para el primer par Pl/P7) por 75 s.
- extensión at 72°C. 90 S.

Los productos de la amplificacion se analizan directamente en electroforesis en agarosa o también por digestión con enzimas de restricción seguida de la electroforesis en poliacrilamida o agarosa.

La reacción de PCR en tiempo real (qPCR) (Christensen et al., 2004),

Esta puede realizarse mediante el procedimiento seguido con cebadores univesales para fitoplasmas:

Cebador	Región	Secuencia
Cebador forward	16S rDNA	5'CGTACGCAAGTATGAAAGGA3'
Sonda fluorogenica		5'TGACGGGACTCCGCACAAGCG
Cebador reverse	16S rDNA	5'TCTTCGAATTAAACAACATGATCCA3'

La mezcla de reacción para la qPCR (tiempo real):

- Cebador forward 300 µM
- Cebador reverso 900 µM
- Sonda 200 µM

- TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) 1X
- DNA molde 1μL
- Agua MilliQ hasta 25μL

La reaccion de qPCR:

- 50°C 2 min
- 95°C 10 min
- 40 ciclos de amplificación a:
 - 95°C 15 seg
 - 60° C 1 min.

Los amplicones una vez secuenciados y comparados con bases de datos mediante análisis Blast, deben dar un 99% de identidad con 16SrI ‘Candidatus Phytoplasma asteris’ de elefantiasis depositadas en GenBank Accesions No. MF 629790 y MF 662673 (Aliaga *et al.*, 2018)

5.3.18. Protocolo para la detección de la raza 4 tropical (R4T) de *F. oxysporum f. sp. cubense* agente causal de la marchitez por *Fusarium del banano* (*Fusarium odoratissimum*).

En los últimos años la dispersión e impacto de la R4T, ha impulsado el desarrollo de numerosos estudios de la variabilidad genética del patógeno que han permitido desarrollar sistemas de diagnóstico a base de la PCR, basados en el polimorfismo de nucleótidos de diferentes sitios en el genoma del patógeno. En el cuadro 16 se listan un número de informes de protocolos de diagnóstico para la detección de R4T existentes en la actualidad.

Cuadro 16.
Lista de diferentes informes de protocolos de diagnóstico de R4T por PCR.

Referencia	Cebadores desarrollados del polimorfismo de nucleótidos (SNPs) de:
Lin <i>et al.</i> , 2008	PCR. Random primer OP-A02 nucleotide sequence
Dita <i>et al.</i> , 2010	PCR. IGS of mitochondrial DNA
Zhang <i>et al.</i> 2013	Real-Time Fluorescence Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay (LAMP)
Li <i>et al.</i> , 2013	PCR from SNPs of a “putative virulence gene”
Li <i>et al.</i> , 2013	IGS region of mitochondrial DNA
Pérez-Vicente <i>et al.</i> , (2013)	qPCR SybrGreen with primers from IGS sequences of mitochondrial DNA
Fraser-Smith (2014)	PCR with primers from SIX 8 (secreted in xylem gen) presence (R4 unspecific).

TR4 ClearDetection kit (Holland)	qPCR and PCR assay
Aguayo <i>et al.</i> (2017)	A putative virulence gene described by Li <i>et al.</i> , 2013 (detect also VCG 0121)
Carvalhais <i>et al.</i> (2019)	PCR for SIX1 gen presence
Ordoñez <i>et al.</i> , (2019)	Lamp TR4 assay based in diversity arrays technology sequencing (DARtseq).

Dita *et al.*, (2013), desarrollaron un Plan de Contingencia para los países miembros de OIRSA (<http://www.oirsa.org/aplicaciones/subido/archivos/BibliotecaVirtual/PlandecontingenciacontraFocR4TOIRSA.pdf>), en el cual se describe el protocolo desarrollado por Dita *et al.* (2010), el cual junto al kit de ClearDetection de la Universidad de Wageningen, han sido ampliamente utilizados para la detección de la raza 4 tropical de la marchitez por *Fusarium*. Este protocolo se reproduce a continuación.

a. Protocolos para la extracción de ácido desoxirribonucleico (DNA) de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense

Existen innumerables protocolos y kits que pueden ser utilizados para la extracción de DNA de Foc. Estos protocolos bien utilizados no deberían causar problemas para el uso del diagnóstico molecular de R4T. A continuación, se detallan varios protocolos de extracción de DNA empleados en estudios de *Fusarium oxysporum*.

Protocolo de extracción utilizado por Bentley *et al.* (1998).

Reactivos y soluciones

- Fenol (almacenado a 4°C)
- Cloroformo (almacenado a -20°)
- Acetato de sodio (pH 5.4) 3M
- Etanol (glacial) 100%
- Etanol 70%
- TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0)

Tampón de extracción

- Dodecilsulfato sódico (SDS) 2%
- EDTA 40mM
- NaCl 40mM
- Tris-HCl (pH 8.0) 100mM
- Ácido dietilditiocarbámico 25mM

Nota: El buffer de extracción debe almacenarse a 4 °C, pero debe estar a temperatura ambiente antes de usarse (el SDS debe estar completamente disuelto antes de usarse).

Operaciones preliminares

- ii. Cultivar los aislados de *Fusarium oxysporum* a partir de cultivos monospóricos, crecidos en PDA (¼ de riqueza) por 3-5 días, transferir 3-4 discos de micelio (0.5 cm) a un erlenmeyer de 200 ml con medio de cultivo de caldo papa dextrosa e incubar por 4-5 días a temperatura ambiente.
- iii. Filtrar el cultivo y almacenar el micelio filtrado a -20°C hasta que se vaya a realizar la extracción de DNA. Liofilizar y almacenar a -70°C para conservar por largos períodos de tiempo.

Método

1. Macerar el micelio en nitrógeno líquido con ayuda de un mortero hasta obtener un polvo fino;
2. Transferir el micelio macerado a tubos de 2 ml rotulados con el nombre de la muestra, llene los tubos (0.8 g).
3. Adicione 1 ml del buffer de extracción. Mezclar hasta que el micelio macerado quede completamente humedecido por el buffer de extracción.
4. Incubar a 37°C (baño de María) por 2 horas.
5. Adicione 1 ml (1 vol.) de fenol y centrifugue a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C.
6. Cuidadosamente, transferir el sobrenadante a tubo nuevo y repita el paso e.
7. Transfiera el sobrenadante a tubo nuevo y adicione 1 ml (1 vol.) de cloroformo frío.
8. Centrifugue a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C.
9. Transferir el sobrenadante a tubo nuevo y adicione 1.2 ml (2 vol.) de etanol absoluto glacial y 60µl (0.1 vol.) de acetato de sodio 3 M. Incubar a 20°C por 2 horas o por toda la noche (durante una noche).
10. Precipitar el DNA por centrifugación a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C.
11. Lavar el precipitado (*pellet*) con etanol 70% por 10 min.
12. Centrifugue a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C.
13. Secar el precipitado
14. Resuspender el precipitado en 500µl de buffer TE, durante una noche.
15. La calidad del DNA extraído se verifica por electroforesis en gel de agarosa.

Protocolo de extracción utilizado por Groenewald et al. (2006)

Este protocolo constituye una modificación del protocolo descrito por Raeder y Broda en 1985 y fue empleado por Groenewald *et al.* (2006), en el estudio de la diversidad genética en poblaciones de Foc mediante AFLP.

Reactivos y soluciones

- Fenol-Cloroformo (1:1; v: v)
- Acetato de sodio (pH 5.4) 3M (NaAc o NaHCO₃)
- Etanol absoluto (glacial)
- Etanol 70%
- Buffer de extracción
 - Dodecilsulfato sódico (SDS) 0.5%
 - EDTA pH-8 25mM
 - NaCl 50mM
 - Tris-HCl (pH 8.0) 200mM

Operaciones preliminares

- a) Cultivar el aislado de Foc en Agar Papa Dextrosa mitad de riqueza (*half strength potato dextrose agar*) por 5-7 días.
- b) Preparar el buffer de extracción

Método

1. Raspar micelio y transferir a tubo de 1.5 ml.
2. Adicionar 300 µl de buffer de extracción. El micelio es homogenizado con el empleo de un micropistilo
3. Congelar los tubos en nitrógeno líquido y posteriormente incubarlos 5 minutos en agua hirviendo.
4. Adicionar 300 µl de una solución de fenol-cloroformo (1:1). Mezclar por inversión del tubo.
5. Centrifugar a 14000 rpm por 7 minutos a 4°C.
6. Transferir fase superior acuosa a tubo nuevo.
7. Adicionar 0.1 volumen de una solución de NaAc 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto glacial. Mezclar invirtiendo el tubo 5 veces.
8. Centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C.
9. Lavar con etanol 70%.
10. Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos a 4 °C.

11. Decantar el sobrenadante con cuidado para no perder el precipitado.
12. Secar el precipitado.
13. Resuspender en 200 µl de agua.

Nota: debe realizarse un tratamiento con RNAsa

La calidad del DNA extraído se verifica por electroforesis en gel de agarosa

Protocolo de extracción utilizando el kit de extracción “Wizard Genomic DNA Purification” de Promega

Este protocolo es para extraer DNA con el empleo del kit “Wizard Genomic DNA purification” de Promega (www.promega.com).

1. Macerar con nitrógeno líquido 0.8 g de la muestra. Pasar a tubos de 1,5 ml.
2. Adicionar 600 µl de la solución de lisis de ácido nucleico. Agitar con vórtex 3 seg.
3. Incubar a 65 °C por 15 min.
4. Añadir 3µl de RNAsa, invertir tubo de 3-5 veces, incubar a 37°C por 15 min. Dejar la muestra 5 min a temperatura ambiente antes de proseguir.
5. Adicionar 200 µl de la solución de precipitación de proteínas. Agitar con vórtex vigorosamente a alta velocidad por 20 seg.
6. Centrifugar por 3 minutos a 13000-16000 rpm.
7. Transferir el sobrenadante a tubo limpio. Añadir 600 µl de isopropanol.
8. Mezclar, por inversión de los tubos, la solución hasta que precipite el DNA.
9. Centrifugar por 1 minuto a 13000-16000 rpm.
10. Cuidadosamente botar el sobrenadante. Añadir 600 µl de etanol 70% e invertir el tubo varias veces para lavar el precipitado. Centrifugar por 1 min. a 13000-16000 rpm.
11. Cuidadosamente extraer el etanol. Secar el precipitado.
12. Adicionar 30 µl de la solución de rehidratación del DNA. Incubar la solución una noche a temperatura ambiente o a 4°C.

13. La calidad del DNA extraído se verifica por electroforesis en gel de agarosa.
14. Guardar el DNA extraído a –20°C.

Para mayor información sobre este método consulte los manuales en: <http://www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol/>

Equipos, reactivos y materiales necesarios que demandan los protocolos de extracción y purificación del DNA

En el siguiente cuadro (17) se relacionan los equipos, reactivos y utensilios que se requieren en los protocolos de extracción y purificación de DNA que se han descrito.

Cuadro 17.
Relación de equipos reactivos y utensilios que se requieren en los protocolos descritos de extracción y purificación de DNA (reproducido de Dita *et al.*, 2013)

Baño de María	Acetato de sodio (pH 5.4)
Centrífuga de rotor fijo de 30000 rpm	Ácido dietilditiocarbámico
Incubadora refrigerada	Alcohol isoamílico
Refrigerador doméstico	Bromuro de etidio
Tanque para N líquido	<i>Tampón-de extracción TNE</i>
Congelador -35°C	β-mercaptoetanol
Cámara y fuente de electroforesis	Cloroformo
Transiluminador	Etanol (glacial) 100%
Sistema de documentación de geles	Etanol 70%
Erlenmeyers	EDTA
Tubos de cultivo de 10 x 150 mm	Fenol Isopropanol
Tubos Eppendorf de 1.5 ml y 2 ml	Kit de extracción “Wizard Genomic” DNA Purification de Promega
Mangos porta agujas y agujas	Colorante de carga
Micropipetas de 0.1-2.5 µl	Na ₂ EDTA
Micropipetas de 2-20 µl	NaCl
Micropipetas 20-200 µl	Nitrógeno líquido
Micropipetas 200 – 1000 µl	RNasa
Puntas de pipetas (10-200 µl)	Dodecilsulfato sódico (SDS)
Puntas de pipetas (100-1000 µl)	TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0)
Agarosa	Tris-HCl (pH 8.0)
Acetato de potasio	

b. Reacción de PCR (Dita et al., 2010)

Después de la extracción y la purificación del DNA, la reacción de amplificación se realizará siguiendo las etapas y condiciones de temperatura y tiempo que se describen a continuación:

Dita *et al.* (2010), a partir de análisis de secuencias de DNA de la región IGS y del gen TEF, diseñaron una combinación de cebadores (Foc TR4-F/FocTR4-R). En este caso y en otros similares más adelante, se usan las siglas en inglés de la raza 4 tropical de Foc por tratarse de nombres) para la detección molecular de Foc R4T. Estos autores demostraron la especificidad de esta combinación de cebadores para la detección de aislados pertenecientes al grupo de compatibilidad vegetativa 01213, que son representantes de Foc R4T.

Los cebadores utilizados para esta reacción (Dita *et al.*, 2011) son:

- Foc TR4 F: 5’CACGTTTAAGGTGCCATGAGAG 3’
- Foc TR4 R: 5’GCCAGGACTGCCTCGTGA 3’

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)	Ciclos
1. Desnaturalización inicial	95	5	
2. Desnaturalización	95	1	30
3. Anillamiento	60	1	
4. Elongación de la cadena	72	3	
5. Extensión final	72	10	

Electroforesis

Los productos de PCR serán sometidos a una electroforesis en gel de agarosa. Con el empleo de los cebadores FocTR4-F/FocTR4-R, se obtiene un producto de amplificación de 463 pb específico para Foc R4T.

Equipos, reactivos y materiales necesarios para la PCR

• Termociclador • Cámara y fuente de electroforesis • Transiluminador • Sistema de documentación de geles • Tubos Eppendorf de 1.5 ml • Tubos para PCR	• Puntas de pipetas (10-200 µL) • Puntas de pipetas (100-1000 µL) • Agua ultra pura o miliQ • MgCl2 • Buffer PCR 10X • Buffer TE • Cebadores específicos:
--	---

• Cubetas para hielo • Micropipetas de 0.1-2.5 µl • Micropipetas de 2-20 µl • Micropipetas 20-200 µl • Microtubos para PCR (200 µl)	• Foc TR4 F:5'cacgtttaaggtgccatgagag 3' • Foc TR4 R: 5'gccaggactgcctcgtga 3' • dNTPs (deoxiribonucleótidos) • Taq Polimerasa
---	---

Para la identificación de Foc R4T, ya sea directamente de tejidos de plantas afectados o de cultivos puros mediante PCR y con el empleo de FocTR4-F/FocTR4-R, se debe seguir el esquema con el flujo de trabajo ilustrado en la figura 17.

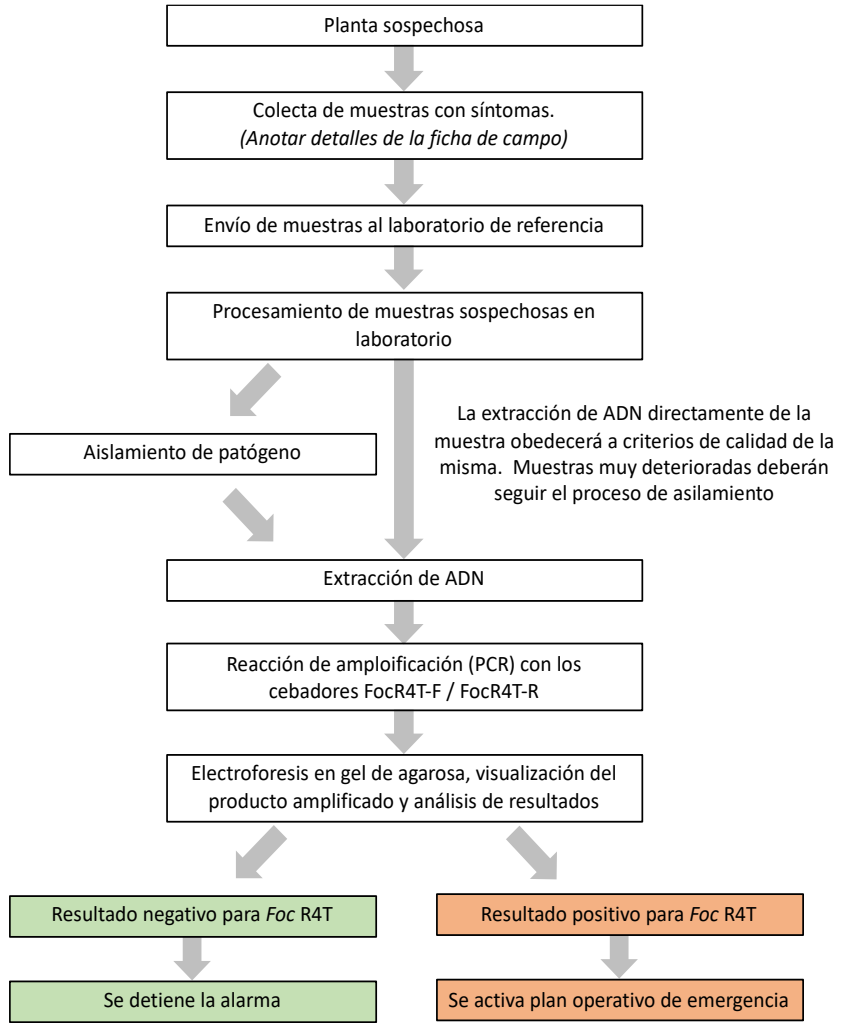


Figura 19. Flujo para el diagnóstico molecular de la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

6. Términos y definiciones

ARP. Análisis de riesgo de plagas. [NIMF 2, 1995; revisado CIMF, 2001]. Procedimiento técnico, que se utiliza para determinar las medidas fitosanitarias apropiadas. El ARP podrá utilizarse para organismos no reconocidos previamente como plagas (sean estos, plantas, agentes de control biológico u otros organismos benéficos u organismos vivos modificados), plagas reconocidas, vías de ingreso o dispersión, y para el examen de las políticas fitosanitarias. Consiste en tres etapas: 1) Inicio; 2) Evaluación del riesgo de plagas; y 3) Manejo del riesgo de plagas.

Anticuerpos monoclonales. Anticuerpos que reaccionan con un epítopo específico del blanco.

Anticuerpos policlonales. Anticuerpos que reaccionan con varios epítopos específicos del blanco.

Bioseguridad: La bioseguridad en agricultura, química, medicina, exobiología etc., requiere la aplicación del principio de precaución y una nueva definición más enfocada en la naturaleza biológica del organismo amenazado que en la de la naturaleza de la amenaza. El concepto ha se ha expandido últimamente en el área fitosanidad como un conjunto de medidas a nivel de los países y propiedades (fincas), para el manejo de los riesgos de daños por la entrada, establecimiento y diseminación de plagas, a la economía, el ambiente, la comunidad (formas y estilos de vida). Debe ser una prioridad nacional y permite mantener el mejor sentido de los negocios. Asegura que el estatus fitosanitario es mantenido para retener las oportunidades de producción, negocio y acceso a los nuevos mercados. La bioseguridad involucra: acciones de los gobiernos en pre-frontera en otros países; restricciones en frontera, regiones, e interestatales; respuestas de emergencia y a nivel de sitios de producción y a cada persona que visita y trabaja a nivel de países y empresas y fincas productoras. (Plant Health Australia: planthealthaustralia.com.au). La FAO utiliza el término Bioseguridad como un enfoque estratégico e integrado que engloba los marcos reguladores y normativos (incluyendo instrumentos y actividades) que analizan y gestionan los riesgos en los sectores de la inocuidad de los alimentos, la vida y la sanidad animal y vegetal, incluidos los riesgos ambientales conexos. La bioseguridad abarca las medidas sanitarias, fitosanitarias y zoonosanitarias aplicadas a los sistemas de regulación de la introducción de plagas de las plantas, plagas y enfermedades de los animales, zoonosis, la introducción y liberación de organismos modificados genéticamente (OMG) y sus productos, y la introducción y gestión de especies y genotipos exóticos invasivos

Centros de indexación de virus de *Musa*. Operados en Unidades de Investigación de Virología con expertos en virus de *Musa* tales como: CIRAD-FLHOR, Montpellier, France (Oficial a cargo: Dr. Marie-Line Iskra-

Caruana); QDPI, Brisbane, Australia (Oficial a cargo: Dr. John Thomas); TBRI, Pingtung, Taiwán (Oficial a cargo: Dr. Sin-Wan Lee); Universidad de Liege (ULg), Gembloux, Agro-Biotech, Gembloux, Bélgica (Oficial a cargo: Dr. Sébastien Massart) (actualmente Centro para el Indexado de Virus y Saneamiento de Bioversity Internacional (VISC); el Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA), Ibadan, Nigeria (oficial a Cargo: Dr. Lava Kumar).

Centro de tránsito. Operado por Bioversity International en la Universidad Católica de Lovaina en Bélgica (Katholieke Universiteit Leuven, Belgium) para facilitar el intercambio seguro de germoplasma de Musa, la cual contiene la mayor colección de germoplasma in vitro del mundo.

Certificación fitosanitaria. Uso de procedimientos fitosanitarios conducentes a la expedición de un certificado fitosanitario [FAO, 1990].

Certificado fitosanitario Documento oficial en papel o su equivalente electrónico oficial, acorde con los modelos de certificados de la CIPF, el cual avala que un envío cumple con los requisitos fitosanitarios de importación [FAO, 1990; revisado CMF, 2012].

CIPP. Convención Internacional de Protección de Plantas de FAO.

Confinamiento (de un artículo reglamentado). Aplicación de medidas fitosanitarias a un artículo reglamentado para prevenir el escape de plagas [CMF, 2012].

Cosmopolita. Esta expresión es utilizada para describir la distribución de patógenos que están reportados presentes en todos los continentes y en muchos países de estos continentes.

Cuarentena. Confinamiento oficial de artículos reglamentados, plagas u organismos benéficos para inspección, prueba, tratamiento, observación o investigación [FAO, 1990; revisado NIMF 3, 1995; CEMF, 1999; CMF, 2018]. La cuarentena se ocupa de la prevención de la introducción y establecimiento de plagas y enfermedades dentro de una nueva área geográfica (Navaratnam y Catley, 1986; Hopper 1991; Broadbent, 1995).

Cuarentena intermedia. Cuarentena en un país que no es el país de origen o destino [CEMF, 1996].

Cuarentena postentrada. Cuarentena aplicada a un envío, después de su entrada [FAO, 1995].

Cuarentena vegetal. Todas las actividades destinadas a prevenir la introducción o dispersión de plagas cuarentenarias o asegurar su control oficial [FAO, 1990; revisado FAO, 1995].

Declaración adicional. Declaración requerida por un país importador que se ha de incluir en el certificado fitosanitario y que contiene información adicional específica sobre un envío en relación con las plagas reglamentadas

o los artículos reglamentados [FAO, 1990; revisado CIMF, 2005; CMF, 2016].

Diagnóstico de plaga. Proceso de detección e identificación de una plaga [NIMF 27, 2006].

ELISA. Ensayo colorimétrico inmuno-enzimático de gran sensibilidad, que cuenta con anticuerpos específicos contra proteínas específicas del patógeno.

Embalaje. Material utilizado para sujetar, proteger o transportar un producto [NIMF 20, 2004].

Encontrar libre. Inspeccionar un envío, campo o lugar de producción y considerarlo libre de una plaga específica [FAO, 1990].

Envío. Cantidad de plantas, productos vegetales u otros artículos que se movilizan de un país a otro, y que están amparados, en caso necesario, por un solo certificado fitosanitario (un envío puede estar compuesto por uno o más productos o lotes) [FAO, 1990; revisado CIMF, 2001].

Erradicación. Aplicación de medidas fitosanitarias para eliminar una plaga de un área [FAO, 1990; revisado FAO, 1995; anteriormente “erradicar”].

Estación cuarentenaria. Estación oficial para mantener en cuarentena plantas, productos vegetales u otros artículos reglamentados, incluidos los organismos benéficos [FAO, 1990; revisado FAO, 1995; anteriormente “estación” o “instalación de cuarentena”; revisado CMF, 2015].

Evaluación del riesgo de plagas (para plagas cuarentenarias). Evaluación de la probabilidad de introducción y dispersión de una plaga y de la magnitud de las posibles consecuencias económicas asociadas [NIMF 2, 1995; revisado NIMF 11, 2001; NIMF 2, 2007].

Examen visual. Examen utilizando solo la vista, una lupa, un estereoscopio u otro microscopio óptico [NIMF 23, 2005; revisado CMF, 2018].

Germoplasma. Plantas destinadas al uso en programas de mejoramiento o conservación [FAO, 1990].

Indexing/Indexación: se refiere al análisis de plantas para demostrar que están libre de patógenos. Término particularmente empleado para el análisis virológico para establecer colecciones de germoplasma sanos utilizados como donantes en sistemas de multiplicación. Se debe distinguir entre indexing y diagnóstico de enfermedad. Este último se refiere a si la plaga está presente y a su investigación, purificación, identificación y caracterización. El indexing de rutina es la detección de la plaga (mayormente virus) que involucra usualmente un número importante de muestras. Los métodos de indexing de rutina deben ser rápidos, baratos, fácil de realizar, pero al mismo tiempo confiables, sensibles y específicos.

Inspección. Examen visual oficial de plantas, productos vegetales u otros artículos reglamentados para determinar si hay plagas o determinar el

cumplimiento con las reglamentaciones fitosanitarias [FAO, 1990; revisado FAO, 1995; anteriormente “inspeccionar”].

Inspector. Persona autorizada por una organización nacional de protección fitosanitaria para desempeñar sus funciones [FAO, 1990].

Integridad (de un envío). Composición de un envío tal como lo describe su certificado fitosanitario u otro documento oficialmente aceptable, mantenido sin pérdidas, adiciones ni sustituciones [CMF, 2007].

Intercepción (de un envío). Rechazo o entrada controlada de un envío importado debido a incumplimiento de las reglamentaciones fitosanitarias [FAO, 1990; revisado FAO, 1995].

Intercepción (de una plaga). Detección de una plaga durante la inspección o pruebas de un envío importado [FAO, 1990; revisado CEMF, 1996].

Introducción (de una plaga). Entrada de una plaga que resulta en su establecimiento [FAO, 1990; revisado NIMF 2, 1995; CIPF, 1997].

ISMC. Método de diagnóstico por microscopía electrónica mediante marcaje de partículas virales por inmuno-absorción con anticuerpos específicos.

Legislación fitosanitaria. Leyes básicas que conceden la autoridad legal a la organización nacional de protección fitosanitaria a partir de las cuales podrán elaborarse las reglamentaciones fitosanitarias [FAO, 1990; revisado FAO, 1995].

Liberación (de un envío). Autorización para la entrada luego de su aprobación [FAO, 1995].

Libre de (referente a un envío, campo o lugar de producción). Sin plagas (o una plaga específica) en números o cantidades que puedan detectarse mediante la aplicación de procedimientos fitosanitarios [FAO, 1990; revisado FAO, 1995; CEMF, 1999].

Lote. Conjunto de unidades de un solo producto, identificable por su composición homogénea, origen, etc., que forma parte de un envío [FAO, 1990].

Nivel de tolerancia (de una plaga). Incidencia de una plaga especificada como umbral de acción para controlar dicha plaga o prevenir su dispersión o introducción [CMF, 2009].

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa

Plaga. Cualquier especie, raza o biotipo vegetal o animal o agente patógeno dañino para las plantas o productos vegetales. Comprende todos los agentes dañinos bióticos desde viroides hasta malezas. Nota: En la CIPF, el término “plaga de plantas” en ocasiones se utiliza en lugar del término “plaga” [FAO 1990; revisado NIMF 2, 1995; CIPF, 1997; revisado CMF, 2012].

Plaga cuarentenaria. Es una plaga de importancia económica **potencial** al área en riesgo la cual no está aún presente en la misma, o presente pero no ampliamente distribuida y está siendo oficialmente controlada.

Plaga no cuarentenaria reglamentada. Plaga no cuarentenaria cuya presencia en las plantas para plantar afecta el uso previsto para esas plantas con repercusiones económicamente inaceptables y que, por lo tanto, está reglamentada en el territorio de la parte contratante importadora [CIPF, 1997].

Plaga reglamentada. Plaga cuarentenaria o plaga no cuarentenaria reglamentada [CIPF, 1997].

Plantar (incluye replantar). Toda operación para la colocación de plantas en un medio de crecimiento o por medio de injerto u operaciones similares para asegurar su posterior crecimiento, reproducción o propagación [FAO, 1990; revisado CEMF, 1999].

Plantas. Plantas vivas y partes de ellas, incluidas las semillas y el germoplasma [FAO, 1990; revisado CIPF, 1997; aclaración, 2005].

Plantas in vitro (como clase de producto)*. Plantas que crecen en un medio aséptico y en un recipiente cerrado [FAO, 1990; revisado CEMF, 1999; CIMF, 2002 anteriormente “plantas en cultivo de tejidos”]

Plantas para plantar. Plantas destinadas a permanecer plantadas, a ser plantadas o replantadas [FAO, 1990].

Prácticamente libre (referente a un envío, campo o lugar de producción). Sin plagas (o una plaga específica) en números o cantidades superiores a aquellas que se espera que resulten y estén de acuerdo con las buenas prácticas de cultivo y de manipulación empleadas en la producción y comercialización del producto [FAO, 1990; revisado FAO, 1995].

Procedimiento de verificación de cumplimiento (para un envío). Procedimiento oficial usado para verificar que un envío cumple con los requisitos fitosanitarios de importación o las medidas fitosanitarias relacionadas con el tránsito [CEMF, 1999; revisado CMF, 2009].

Procedimiento fitosanitario. Cualquier método oficial para la aplicación de medidas fitosanitarias, incluida la realización de inspecciones, pruebas, vigilancia o tratamientos en relación con las plagas reglamentadas [FAO, 1990; revisado FAO, 1995; revisado CEMF, 1999; revisado CIMF, 2001; revisado CIMF, 2005].

Producto. Tipo de planta, producto vegetal u otro artículo que se moviliza con fines comerciales u otros propósitos [FAO, 1990; revisado CIMF, 2001; anteriormente “producto básico”; revisado CMF, 2009].

Prohibición. Reglamentación fitosanitaria que prohíbe la importación o movilización de plagas o productos especificados [FAO, 1990; revisado FAO, 1995].

Prueba. Examen oficial, no visual, de plantas, productos vegetales u otros artículos reglamentados para determinar la presencia de plagas, identificar tales plagas o determinar el cumplimiento de requisitos fitosanitarios específicos [FAO, 1990; revisado CMF, 2018].

qPCR. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o PCR en tiempo real, que permite determinar la concentración de las secuencias positivas objeto de la reacción, mediante un fluorocromo.

RT-PCR. (Del inglés, *Reverse transcription polymerase chain reaction*). Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa o también reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa. En esta PCR se retro transcribe una hebra de ARN, en su DNA complementario (DNAc), utilizando una enzima llamada transcriptasa reversa y el resultado se amplifica, mediante una PCR tradicional. El término RT-PCR no debe confundirse con PCR en tiempo real debido a su incorrecta traducción del inglés (RT-PCR por Real Time-PCR).

Seguridad fitosanitaria (de un envío). Mantenimiento de la integridad de un envío y prevención de su infestación y contaminación por plagas reglamentadas, mediante la aplicación de medidas fitosanitarias apropiadas [CMF, 2009].

Sitio de producción. Una parte definida de un lugar de producción que es manejada como una unidad separada para propósitos fitosanitarios [CMF, 2015].

Sitio de producción libre de plagas. Un sitio de producción en el cual una plaga específica está ausente, tal y como se ha demostrado por evidencia científica y en el cual, cuando sea apropiado, esta condición se esté manteniendo oficialmente por un período definido [NIMF 10, 1999; revisado CMF, 2015].

Supresión. Aplicación de medidas fitosanitarias dentro de un área infestada para disminuir poblaciones de plagas [FAO, 1995; revisado CEMF, 1999].

Transcriptasa reversa. Transcriptasa reversa. Enzima de tipo DNA polimerasa que tiene como función sintetizar DNA de doble cadena utilizando como molde ARN monocatenario, es decir, catalizar la transcripción inversa o retrotranscripción.

Tratamiento con calor. Proceso mediante el cual un producto es sometido al calor hasta alcanzar una temperatura mínima, durante un período mínimo, conforme a una especificación técnica oficial [NIMF 15, 2002; revisado CIMF, 2005].

Verificación. Véase monitoreo.

Vigilancia. Un proceso oficial para recopilar y registrar información sobre la presencia o ausencia de una plaga mediante el uso de encuestas, monitoreo u otros procedimientos [CEMF, 1996; revisado CMF, 2015]

Zona tampón. Área adyacente o que circunda otra área delimitada oficialmente para propósitos fitosanitarios con objeto de minimizar la probabilidad de dispersión de la plaga objetivo dentro o fuera del área delimitada, y a la que se aplican, según proceda, medidas fitosanitarias u otras medidas de control [NIMF 10, 1999; NIMF 22 revisada, 2005].

7. Referencias

- Abele, S. and Pillay, M., 2007. Bacterial wilt and drought stresses in banana production and their impact on economic welfare in Uganda: implications for banana research in East African highlands. *Journal of Crop Improvement* 19: 173-191.
- Adams, M. J., Antoniw, J. F., Bar-Joseph, M. *et al.*, 2004. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Arch Virol* 149: 1045–1060.
- Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., King, A.M., Bamford, D.H., Breitbart, M., Davison, A.J., Ghabrial, S.A. *et al.* 2015. "Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses." *Archives of Virology* 160 (7): 1837-1845.
- Addis, T., Handoro, F. and, Blomme, G. 2004. Bacterial wilt (*Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*) on enset and banana in Ethiopia. *InfoMusa* 13(2): 38-41.
- Adikini, S., Tripathi, L., Beed, F., Tusiimeb, G., Magembec, E.M., and Kim, D. J. 2011. Development of a specific molecular tool for detecting *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. *Plant Pathology* Doi: 10.1111/j.1365-3059.2010.02419.x.
- Aguayo, J., Mostert, D., Fourrier-Jeandel, C., Cerf-Wendling, I., Hostachy, B., Viljoen, A., *et al.* 2017. Development of a hydrolysis probe-based real-time assay for the detection of tropical strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. *PLoS ONE* 12(2): e0171767. doi:10.1371/journal.pone.0171767.
- Aliaga, F., Hopp, E., Alvarez, E., Becerra Lopez-Lavalle, L.A. 2018. First report of a 'Candidatus Phytoplasma asteris' isolate associated with banana elephantiasis disease in Colombia. *New Disease Reports* 37: 12. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2018.037.012>
- Alvarez, E. and Aliaga, F. 2018. Molecular Identification of Candidatus Phytoplasma associated with Plantain and Banana Elephantiasis Disease in Colombia. I Congreso Latinoamericano y del V Caribe de Plátanos y Bananos y XVIII Congreso Nacional Mexicano de Productores de Plátano. Tecomán, Colima, México 27 al 30 de noviembre del 2017.
- Anderson, P.K., Cunningham, A.A., Patel, N.G., Morales, F.J., Epstein, P.R., and Daszak, P. 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *TRENDS in Ecology and Evolution* 19 (10): 535-544.

- Aritua, V., Parkinson, N., Thwaites, R., Heeney, J. V., Jones, D. R., Tushemereirwe, W., Crozier, J., Reeder, R., Stead, D. E., and Smith, J. 2008. Characterization of the *Xanthomonas* sp. causing wilt of enset and banana and its proposed reclassification as a strain of *X. vasicola*. *Plant Pathol.* 57:170-177.
- Bateson, M.F., and Dale, J.L. 1995. Banana bract mosaic virus: Characterization using potyvirus specific degenerate PCR primers. *Arch. Virol* 140: 515-527.
- Belalcázar, S.C., Rosales, F.E., and Pocasangre, L.E. 2004. El Moko del banano y el plátano y el rol de las plantas hospederas en su epidemiología. En: Orozco-Santos, M., Orozco-Romero, J., Robles-Gonzalez, M., Velázquez-Monreal, J. Medina-Urrutia, V. and Hernández-Bautista, J. A. (eds.), Proceedings of the XVI International ACORBAT Meeting, September 26 – October 1, (Oaxaca: Artturi), 16–35.
- Bentley, S., Pegg, K.G., Moore, NY., Davis, R.D., Buddenhagen, I.W. 1998. Genetic variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense analysed by DNA fingerprinting. *Phytopath* 88: 1283–1293.
- Bertaccini, A., Duduk, B., Paltrinieri, S., and Contaldo, N. 2014. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. *Am. J. Plant Sci.* 5: 1763–1788.
- Bhat, A.I., Hohn, T. and Selvarajan, R. 2016. "Badnaviruses: The Current Global Scenario." *Viruses* 8:177.
- Baharuddin, B., Rudolph, K., and Niepold, F. 1994. Production of monospecific antiserum against the blood disease bacterium affecting banana and plantain. *Phytopathology* 84, 570–575. doi: 10.1094/Phyto-84-570
- Biruma, M., Pillay, M., Tripathi, L., Blomme, G., Abele, S., Mwangi, M., *et al.* 2007. Banana *Xanthomonas* wilt : a review of the disease, management strategies and future research directions. *Afr. J. Biotechnol.* 6, 953–962. doi: 10.4314/ajb.v6i8.56989
- Blomme, G. and Ocimati, W. 2018. *Xanthomonas* bacterial wilt. In: Jones, D.R. (ed.) Handbook of diseases of banana, abaca and enset. CAB International, Wallingford, UK. Pp 296-314. ISBN 13-9781780647197
- Blomme, G., Dita, M., Jacobsen, K.S., Pérez, Vicente, L., Molina, A., Ocimati, W., Poussier, S. and Prior, P. 2017. Bacterial Diseases of Bananas and Enset: Current State of Knowledge and Integrated Approaches Toward Sustainable Management. *Front. Plant Sci.* 8 : 1290. Doi : 10.3389/fpls.2017.01290.

- Blomme, G., Ploetz, R., Jones, D., De Langhe, E., Price, N., Gold, C., *et al.* 2013. A historical overview of the appearance and spread of *Musa* pests and pathogens on the African continent : Highlighting the importance of clean *Musa* planting materials and quarantine measures. *The Annals of Applied Biology* 162: 4–26.
- Blomme, G., Jacobsen, K., Ocimati, W., Beed, F., Ntamwira, J., Sivirihauma, C.S., Ssekiwoko, F., Nakato, V., Kubiriba, J., Tripathi, L., Tinzaara, W., Mbolela, F., Lutete, L. and Karamura, E. 2014. Fine-tuning banana *Xanthomonas* wilt control options over the past decade in East and Central Africa. *Eur J Plant Pathol.* 139: 265–281.
- Bouhida, M., and Lockhart, B. E. L. 1990. Increase in importance of cucumber mosaic virus infection in greenhouse grown bananas in Morocco. *Phytopathology* 80: 981.
- Bove, J., and Garnier, M. 2003. Phloem-and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. *Plant Sci.* 164: 423–438.
- Broadbent P. 1995. Quarantine in relation to Australian citrus imports and exports. *Australasian Plant Pathology* 24: 145-156.
- Buddenhagen, I.W. 1994. Banana diseases caused by bacteria. In: Ploetz, R.C., Zentmyer, G.A., Nishijima, W.T., Rohrbach, K.G. and Ohr, H.D. (eds.), *Compendium of Tropical Fruit Diseases*. APS.
- Buddenhagen, I.W. 2006. Managing banana bacterial wilts in Latin America. In: Karamura E.B., Osiru, M., Blomme, G., Lusty, C., and Picq, C. (eds). *Developing a regional Strategy to address the outbreak of Banana Xanthomonas wilt in East and Central Africa: Proceedings of the Banana Xanthomonas wilt regional preparedness and strategy development workshop held in Kampala, Uganda - 14-18 February 2005*. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France, pp. 23-25
- Buddenhagen, I.W. and Kelman, A. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Ann. Rev. of Phytoph.* 2: 203-230.
- Bull, C.T., De Boer, S.H., Denny, T.P., Firrao, G., Saux, M.F.-L., Saddler, G.S., Scortichini, M. Stead, D.E., and Takikawa, Y. 2008. Demystifying the nomenclature of bacterial plant pathogens. *J. Plant Pathol.* 90:403-417.
- Bull, C.T. (Convener), De Boer, S.H., Denny, T.P., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M., Saddler, G.S., Scortichini, M., Stead, D.E and Takikawa, Y. 2012. Letter to the editor. List of new names of plant pathogenic bacteria (2008-2010). *Journal of Plant Pathology* 94 (1): 21-27.

- Burns, T. M., Harding, R. M., & Dale, J. L. 1995. The genome organization of banana bunchy top virus: Analysis of six ssDNA components. *The Journal of General Virology* 76: 1471–1482.
- CAB International, 2007. Crop Protection Compendium. Wallingford, UK:.
- Carraro, L., Osler, R., Loi, N., Ermacora, P. and Refatti, E. 1998. Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni*. *J. Plant Pathol.* 80, 233–239.
- Carter, B. A., Reeder, R., Mgenzi, S. R., Kinyua, Z.M., Mbaka, J. N., Doyle, K., Nakato, V., Mwangi, M., Beed, F., Aritua, V., Lewis Ivey, M. L., Miller, S. A., and Smith, J. J. 2010. Identification of *Xanthomonas vasicola* (formerly *X. campestris* pv. *musacearum*), causative organism of banana Xanthomonas wilt, in Tanzania, Kenya and Burundi. *Plant Pathology*, 59: 403.
- Carvalhais, L.C., Henderson, J., Rincon-Florez, V.A., O'Dwyer, C., Czulowski, E., Aitken, E.A.B. and Drenth, A. 2019. molecular diagnostics of banana fusarium wilt targeting secreted-in-xylem genes. *Front. Plant Sci.* 10:547. doi: 10.3389/fpls.2019.00547.
- Chabannes, M., Baurens, F.C., Duroy, P.O., Bocs, S., Vernerey, M.S., Rodier-Goud, M., Barbe, V., *et al.* 2013. Three infectious viral species lying in wait in the banana genome. *Journal of Virology* 87: 8624 - 8637.
- Chabannes, M., Galzi, S., Laboureau, N., Gayral, P., Noumbissie, G., Pierre Duroy, O., and Iskra-Caruana, M-L. 2018. Development of molecular markers against endogenous banana streak virus sequences (eBSV), to secure both banana germplasm exchange and the use of *M. balbisiana* genome in banana and plantain breeding programs. *Proceedings of the 18th Triennial Symposium of International Society for Tuber Root Crops (ISCRT)* Cali, Colombia, 22-25 Oct. 2018.
- Chen, Y. and Hu, X. 2013. High-throughput detection of banana bunchy top virus in banana plants and aphids using real-time TaqMan®PCR. *Journal of Virological Methods*, 193: 177–183.
- Cherian, A.K., Menon, R., Suma, A., Nair, S., and Sudheesh, M.V. 2002. Impact of banana bract mosaic diseases on the yield of commercial banana varieties of Kerala. In Global conference on banana and plantain, Bangalore, 28–31 October, 2002, Abstract pp. 155.
- Coenye, T. and Vandamme, P. 2003. Simple sequence repeats and compositional bias in the bipartite *Ralstonia solanacearum* GM11000 genome. *BMC Genomics* 4: 10. doi: 10.1186/1471-2164-4-10.
- Côte, F.X., Tomepke, K., Staver, C., Depigny, S., Lescot, T. and Markhan, R. 2010a. Agro-ecological intensification of banana and plantain (*Musa* spp.): an approach to develop more sustainable production

systems for both small holder farmers and large-scale commercial producers. Proceeding of an international Conference in Banana and Plantain in Africa. Pp 457-463

- Côte, F.X., Galzi, S., Folliot, M., Lamagnere, Y., Teycheney, P.Y. and Iskra-Caruana, M.L. 2010b. Micropropagation by tissue culture triggers differential expression of infectious endogenous banana streak virus sequences (eBSV) present in the B genome of natural and synthetic interspecific banana plantains. *Molecular Plant Pathology* 11:137–144.
- Constable, F.E., Gibb, K.S. and Symons, R.H. 2003. Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines. *Plant Pathology* 52: 267–276.
- Christensen, N.M., Nicolaisen, M., Hansen, M. and Schulz, A. 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 1175-1184.
- Crew K.S. and Thomas, J.E. 2018. Banana virus X. In: Jones, D.R. (ed.) Handbook of diseases of banana, abaca and enset. CAB International, Wallingford, UK. Pp 412-413. ISBN 13-9781780647197.
- Cubillo-Sánchez, D. 2013. Manejo integrado de plagas en el cultivo del banano. Concepto y aplicaciones. Chemplast. San José. Costa Rica. 105 pp
- Dahal, G., Hughes, J., Thottappilly, G., and Lockhart, B. E. L. 1998. Effect of temperature on symptom expression and reliability of banana streak badnavirus detection in naturally infected plantain banana (*Musa* spp.). *Plant Disease* 82 (1):16-21.
- Daire, X., Claire, D., Reinert, W., Boudion-Padieu, E. 1997. Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellow groups and the stolbur subgroup by PCR amplification of non -ribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology* 103: 507-594.
- Dasanayake, E.M. 2001. Detection of Banana bract mosaic potyvirus by immunocapture polymerase chain reaction (IC-PCR). *Annals of the Sri Lanka Department of Agriculture* 3: 19-25.
- Davis, R.I., Kokoa, P., Jones, L.M., Mackie, J., Constable, F.E., Rodoni, B.C., Gunua, T.G., Rossel J.B. 2012. A new banana wilt disease associated with phytoplasmas in Papua New Guinea. *Australas Plant Dis Notes* 7:91–97.
- Davis, R.I., Henderson, J., Jones, A.R., McTaggart, L.M., O'Dwyer, C., Tsatsia, F., Fanai, C. and Rossel, J.B. 2015. First record of a wilt disease of banana plants associated with phytoplasmas in Solomon Islands. *Australasian Plant Dis. Notes* 10:14

- Davis R.I. and Liberato, J.R. 2006. Banana blood disease (Blood disease bacterium) Pest and Diseases Image Library. Updated on 20/09/2006 9:22:25 AM. Available online: <http://www.padil.gov.au>. (Consulted Oct. 6, 2007).
- De Clerck, C., Crew, K., Ven den Houwe, L., Mc Michael, L., Berthal, C. *et al.*, 2017. Lessons learned from the virus indexing of Musa germplasm: insights from a multiyear collaboration. *Annals of Applied Biology* 171: 15-27.
- Deng, S. and Hiruki, C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14:53–61.
- Denny, T.P., Carney, B.F., and Schell, M.A. 1990. Inactivation of multiple virulence genes reduces the ability of *Pseudomonas solanacearum* to cause wilt symptoms. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3, 293–300. doi: 10.1094/MPMI-3-293.
- Denny, T.P. 2006. Plant pathogenic Ralstonia species. in Plant-Associated Bacteria, ed. S. S. Gnanamanickam (Dordrecht: Springer), 573–644. doi: 10.1007/978-1-4020-4538-7_16
- Dickey, R. and Victoria, J.L. 1980. Taxonomy and Emended Description of Strains of Erwinia Isolated from *Musa paradisiaca* Linnaeus. *International Journal of Systematic Bacteriology* 30(1): 129-134.
- Diekmann, M. and Putter. C.A.J. 1996. FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. No. 15. Musa. 2nd edition. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Plant Genetic Resources Institute, Rome. 29pp.
- Dita, M.A., Waalwijk, C., Buddenhagen, I.W., Souza, M.T. and Kema, G.H.J. 2010. A molecular diagnosis for tropical race 4 of the banana Fusarium wilt pathogen. *Plant Pathology* 59: 348–357.
- Dita, MA. 2011. Corrigendum. *Plant Pathology* 60: 384.
- Dita, M.A., Echegoyen, P.E. y Pérez-Vicente, L. 2013. Plan de contingencia ante un brote de la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense en un país de la región del OIRSA. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria – OIRSA. 155pp. San Salvador, El Salvador, julio del 2013. [Http://www.oirsa.org/aplicaciones/subidoarchivos/BibliotecaVirtual/PlandecontingenciacontraFocR4TOIRSA.pdf](http://www.oirsa.org/aplicaciones/subidoarchivos/BibliotecaVirtual/PlandecontingenciacontraFocR4TOIRSA.pdf).
- Dita, M.A., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E.S.G., and Staver, C.P. 2018. Fusarium Wilt of Banana: current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Front. Plant Sci.* 9:1468. doi: 10.3389/fpls.2018.01468

- Drew, R.A., Moisaner, J.A. and Smith, M.K. 1989. The transmission of banana bunchy-top virus in micropropagated bananas. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 16(3): 187-193. DOI: 10.1007/BF00043744
- Dye, D.W. 1962. The inadequacy of the usual determinative tests for the determination of *Xanthomonas* spp. *New Zeal. J. of Sci.* 5: 393-416.
- Duduk, B. and Bertaccini, A. 2011. Phytoplasma classification: taxonomy based on 16S ribosomal gene, is it enough? *Phytopathogenic Mollicutes* 1: 3–13.
- Eden-Green, S.J. 2018. Moko bacterial wilt and Bugtok. In: Jones, D.R. (ed.) Handbook of diseases of banana, abaca and enset. CAB International, Wallingford, UK. Pp 314-323. ISBN 13-9781780647197.
- Eden-Green, S.J. 2018. Blood bacterial wilt. In: Jones, D.R. (ed.) Handbook of diseases of banana, abaca and enset. CAB International, Wallingford, UK. Pp 323 - 328. ISBN 13-9781780647197.
- Eloja, A.L. and Tinsley, T.W. 1963. Abaca mosaic virus and its relationship to sugarcane mosaic. *The Annals of Applied Biology*, 51: 253–258.
- Elphinstone, J. G. 2005. The current bacterial wilt situation: a global view. In: Allen, C., Prior, P. and Hayward, A.C. (eds.) Bacterial wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex, eds (St. Paul, MN: APS Press): 9–28.
- Elphinstone J.G., Hennessey J.K., Wilson J.K. & Stead D.E. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* in potato tuber extracts. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 26: 663–678.
- EPPO 2004. Diagnostic protocols for regulated pests. *Ralstonia solanacearum*. PM 7/21(1). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 34: 173 – 178
- EPPO 2016. PQR-database on quarantine pests (available on line. <http://www.eppo.int>.)
- EPPO. 2018. Diagnostic standard PM 7/21 (2) *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* and *R. syzygii* (*Ralstonia solanacearum* species complex). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 48 (1): 32–63. ISSN 0250-8052. DOI: 10.1111/epp.12454.
- Espino, T.M. 1990. Banana bract mosaic, a new disease of banana. II. Isolation and purification for monoclonal antibody production. *Philippine Agriculturist* (Phl.) 73(1): 61-68
- Espino, R.C., Johns, A.P., Juanillo, C.P. and Magnaye, L.V. 1993. Evaluation of Philippines banana cultivars for resistance to bunchy-top and fusarium wilt. In: Valmayor, R.V., Hwang, S.C., Ploetz, R.C., Lee, S.C. and Roa, N.V. (eds.), Proceedings of recent developments in

banana cultivation technology, Taiwan Banana Research Institute, Chiuju, Pingtung, Taiwan, 14-18 December, 1992. INIBAP/ASPNET, Los Baños, Philippines, pp. 89 -102.

- FAO 2018. División Estadística. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>. (Consultado Oct 4 2020).
- Fegan, M. 2005. Bacterial wilt diseases of banana: evolution and ecology. In: Allen, C., Prior, P. and Hayward A.C. (eds.) *Bacterial wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. St. Paul,
- Fegan, M. and Prior, P. 2006. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana. *Aust. Plant Pathol.* 35: 93–101. doi: 10.1186/s12864-016-2413-zMN, APS Press: 379–386.
- Fernández, B.D. y López, D.G. 1970. Pudrición acuosa del pseudotallo del plátano (*Musa paradisiaca*) causada por *Erwinia chrysanthemi* N. sp. *Cenicafe* 21:1–44.
- Foissac, X., Svanella-Dumas, L., Gentit, P., Dulucq, M.J., Marais, A., Candresse, T. 2005. Polyvalent degenerate oligonucleotides reverse transcription-polymerase chain reaction: A polyvalent detection and characterization tool for trichoviruses, capilloviruses, and foveaviruses. *Phytopathology* 95: 617–625.
- Fraser-Smith, S., Czislawski, E., Meldrum, R.A., Zander, M., O'Neill, W., Balali, G.R. and. Aitken, E.A.B. 2014. Sequence variation in the putative effector gene SIX8 facilitates molecular differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Plant Pathology* 63: 1044–1052.
- Fourie, G., Steenkamp, E.T., Gordon, T.R., and Viljoen, A. 2009. Evolutionary relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* vegetative compatibility groups. *Applied Environmental Microbiology* 75: 4770-4781.
- Gafny, R., Wexler, A., Mawassi, M., Israeli, Y. and Bar-Joseph, M. 1996. Natural Infection of banana by a satellite-containing strain of Cucumber Mosaic Virus: nucleotide sequence of the coat protein gene and the satellite RNA. *Phytoparasitica* 24(1): 49-56
- Gambley, C.F., Geering, A.D.W., Steele, V. and Thomas, J. E. 2008. Identification of viral and non-viral reverse transcribing elements in pineapple (*Ananas comosus*), including members of two new Badnavirus species. *Archives of Virology* 153: 1599-1604
- Gambley, C.F., & Thomas, J.E. 2001. Molecular characterization of banana mild mosaic virus, a new filamentous virus in *Musa* spp. *Archives of Virology*, 146, 1369–1379.

- Gambley, C.F., Thomas, J. E., Magnaye, L. V., & Herradura, L. 2004. Abaca mosaic virus: A distinct strain of sugarcane mosaic virus. *Australasian Plant Pathology* 33: 475–484.
- Geering, A.D.W. and Thomas, J.E. 2002. Banana streak virus. *Descriptions of Plant Viruses* NO. 390. Association of Plant Biologists. Warwick Enterprise Park, Wellesbourne, UK.
- Geering, A. D.W., McMichael, L.A., Dietzgen, R.G., Thomas, J.E. 2000. Genetic diversity among Banana streak virus isolates from Australia. *Phytopathology* 90: 921-927
- Gillings, M.R. and Fahy, P. 1994. Genomic Fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. In: Hayward, A.C. and Hartman, G.L. (eds), *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. pp. 95–112. CAB International: Wallingford
- González, G., Font, C., Miranda, E. 2002: *Planococcus minor* (Markell), vector del virus del estriado del plátano (BSV). *Fitosanidad* 6 (2):47-48
- Granada G. A. and Sequeira, L. 1983. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil, rhizosphere, and plant roots. *Canadian Journal of Microbiology* 29(4): 433- 440
- Groenewald, S., Van Den Berg, N., Marasas, W.F.O. and Viljoen, A. 2006. The application of high-throughput AFLPs in assessing genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Mycological Research* 110: 297–305.
- Gundersen D.E. and Lee I-M, 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35: 144–5.
- Harper, G. and Hull, R. 1998. Cloning and sequence analysis of banana streak virus DNA. *Virus Genes*, 17: 271–278.
- Handoro, F. 2006. Importance of banana Xanthomonas wilt in Ethiopia. In: Karamura E.B., Osiru, M., Blomme, G., Lusty, C., and Picq C. (eds). *Developing a regional Strategy to address the outbreak of Banana Xanthomonas wilt in East and Central Africa: Proceedings of the Banana Xanthomonas wilt regional preparedness and strategy development workshop held in Kampala, Uganda - 14-18 February 2005*. INIBAP, Montpellier, France. Pp 19-22.
- Harper, G. and Hull, R. 1998. Cloning and sequence analysis of banana streak virus DNA. *Virus Genes*, 17: 271–278.

- Harper, G., Hart, D., Moulton, S., and Hull, R. 2002. Detection of Banana streak virus in field samples of bananas from Uganda. *Annals of Applied Biology*, 141: 247–257.
- Hayward, A.C. 1994. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: Hayward, A.C. and Hartman, G.L. (eds.) *Bacterial Wilt: The Disease and its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB International, 413 Wallingford, UK. Pages 9-24.
- Hernández, R., Herrera, L., Pichardo, T., and Alvarado, Y. 1994. Diagnóstico de *Erwinia chrysanthemi* Burk *et al.* en el proceso de micropropagación in vitro del plátano (*Musa* spp.). *Centro Agrícola* 21 62–67.
- Hauben, L., Moore, E.R., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L. and Swings, J. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Syst. Appl. Microbiol.* 21, 384–397.
- Hamill, S.D., Sharrock, S.L., and Smith, M.K. 1993. Comparison of decontamination methods used in initiation of banana tissue cultures from field-collected suckers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 343–346.
- Hevesi, M., Rivera, N. y Perez, L. 1981. Medio selectivo para aislar y conservar a *Erwinia chrysanthemi*. *Ciencia y Técnica en la Agricultura. Ser. Prot. Plant.* 4: 61–70.
- Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R., Harrison, N. and Dickinson M. 2008. Phytoplasma phylogenetics based on analysis of secA and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of ‘Candidatus Phytoplasma. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 1826–1837.
- Hooper B.E. 1991. Ecological aspects of pest risk assessment. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 21: 587-594.
- Hooks, C.R.R., Wright, M.G., Kabasawa, D.S., Manandhar, R., & Almeida, R.P.P. 2008. Effect of banana bunchy top virus infection on morphology and growth characteristics of banana. *The Annals of Applied Biology*, 153: 1–9.
- Hu, J.S., Li, H.P., Barry, K., Wang, M. and Jordan, R. 1995. Comparison of dot blot, ELISA, and RT-PCR assays for detection of two cucumber mosaic virus isolates infecting banana in Hawaii. *Plant Disease*, 79, 902–906.
- IRPCM. 2004. “Candidatus Phytoplasma,” a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1243–1255.

- Iskra-Caruana, M.L. and Galzi, S. 1998. Identification of un characterized filamentous viral particles on banana plants. *Acta Horticulturae* 490: 323-335.
- Iskra-Caruana, M.L., Galzi, S., Laboureau, N. 2008. A reliable IC One-step RT-PCR method for the detection of BBrMV to ensure safe exchange of *Musa* germplasm. *Journal of Virological Methods* 153: 223–231.
- Iskra-Caruana, M.L., Thomas, J.E. and Chabannes, M. 2018. Banana streak. In: Jones, D.R. (ed.) Handbook of diseases of banana, abaca and enset. CAB International, Wallingford, UK. Pp 393-408. ISBN 13-9781780647197.
- Jackson, G. 2017. Coconut Bogia disease (229). Pacific Pests and Pathogens - Fact Sheets. Pestnet
- Janse, J.D. 1991. Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains, using whole cell fatty acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14: 335–345.
- Javer, E., Acina-Mambole, I. Quiala, I., Font, C., González, G., Echemendía A.L., Muller, E. and Teycheney, P.Y. 2009. First report of Banana streak virus species Goldfinger, Imové, Mysore and Obinol'Ewaï in *Musa* spp. in Cuba. *Plant Pathology* 58: 787.
- Javer-Higginson, E., Acina-Mambole, I., Efrain, J., Font, C., González, G., Echemendía, A.L., Muller, E., Teycheney, P.Y. 2014. Occurrence, prevalence and molecular diversity of banana streak viruses in Cuba. *European Journal of Plant Pathology*. 138 (1): 157–166.
- Javer-Higginson, E., Font, C., Quiala, I., González, G., Fonseca, M.A., Echemendía A.L., Teycheney, P.Y. 2016. Presence of Banana streak viruses on the cultivar FHIA 23 in Cuba. *Fitosanidad* 20 (2): 93- 94.
- Jones, D.R. 2002. Risk of spread of banana diseases in international trade and germplasm exchange. In: Memorias de la XV Reunión de ACORBAT Cartagena de Indias, Colombia. 27 oct – 2 de nov. Medellín, Colombia. AUGURA. Pp. 105-113.
- Jones, D.R. 2018a. Rhizome and pseudostem bacterial rots. In: Jones, D.R. (ed.) Handbook of diseases of banana, abaca and enset. CAB International, Wallingford, UK. Pp 329-338. ISBN 13-9781780647197Pp. Pp 329-341.
- Jones, D.R. 2018b. Phytoplasma diseases. In: Jones, D.R. (ed.) Handbook of diseases of banana, abaca and enset. CAB International, Wallingford, UK. Pp 329-338. ISBN 13-9781780647197. Pp 342-346.
- Jones D.R. and Daniells, J.W. 2018. Introduction to banana, Abacá and Enset. In: Jones, D.R. (ed.) Handbook of diseases of banana, abaca and enset. CAB International, Wallingford, UK. Pp: 1-40

- Jung, H.Y., Sawayanagi, T., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Wei, W. *et al.* 2003. 'Candidatus Phytoplasma ziziphi', a novel phytoplasma taxon associated with jujube witches'-broom disease. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 1037–1041.
- Kalyebara, M.R., Ragama, P.E., Kagezi, G.H., Kubiriba, J., Bagamba, F., Nankinga, K.C., Tushermereirwe, W., 2006. Economic importance of banana bacterial wilt in Uganda. *Africa Crop Science Journal* 14 (2): 93-103.
- Karamura, G., Smith, J., Studholme, D., Kubiriba, J. and Karamura, E. 2015. Comparative pathogenicity studies of the *Xanthomonas vasicola* species on maize, sugarcane and banana. *Afr. J. Plant Sci.* 9:385-400.
- Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium chloride medium. *Phytopathology* 44: 693–695.
- Kelman, A. 1983. Citation classic. *Current Contents* 9:20.
- Kelly, P.L., Reeder, R., Kokoa, P., Arocha, Y., Nixon, T., Fox, A. 2011. First report of a phytoplasmas identified in coconut palms (*Cocos nucifera*) with lethal yellowing-like symptoms in Papua New Guinea. *New Dis Rep* 23:9
- King, A., Lefkowitz, E., Adams, M., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. 2012. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. In *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruse*. San Diego.
- Kiranmai, G., Sreenivasulu, P., and Nayudu, M.V. 1996. Comparison of three different tests for detection of cucumber mosaic cucumovirus in banana (*Musa paradisiaca*). *Current Science* 71: 764–767.
- Kumar, P.L. 2013. Virus indexing and certification in clonal crops: the case of banana. In: Mugoya, C., Baguma, Y., Kawuki, R., Otim, M., Wachira, F., and Masiga, C.W. (Eds.), *Tissue Culture, Conservation Biotechnology, Virus Indexing, and Seed Systems for Vegetative Crops - A Training Manual*. ASARECA. Publication, Uganda: pp33-39 [ISBN 978-92-95070-40-0].
- Kumar, P.L., Selvarajan, R., Iskra-Caruana, M.L. and Chabannes, R.H. and Hanna, R. 2015. Biology etiology and control of virus diseases of banana and plantain. In: Gad L. and Nikolaus, E. (eds.). *Advances in Virus Research* vol. 91. Academic Press. Waltham, Massachusetts. Pp 265-289. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.10.006>.
- Lang, J.M., DuCharme, E., Ibarra Caballero, J., Luna, E., Hartman, T., Ortiz-Castro, M., Korus, K., Rascoe, J., Jackson-Ziems, T.A., Broders, K. and Leach J.E.[†]. 2017. Detection and characterization of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb 1894) comb. nov.

- causing bacterial leaf streak of corn in the United States. *Phytopathology* 107: 1313-1321.
- Langeveld, S.A., Dore, J.M., Memelink, J., Derks, A.F.L.M., van der Vlugt, C.I.M., Asjes, C.J., and Bol, J.F. 1991. Identification of potyviruses. using the polymerase chain reaction with degenerate primers. *J. Gen. Virol.* 72: 1531-1541.
- Lapage, S., Sneath, P., Lessel, E., Skerman, V., Seeliger, H., and Clark, W. 1992. International Code of Nomenclature of Bacteria. ASM Press, Washington, D.C.
- Lee, I.M., Bottner-Parker, K.D., Zhao, Y., Davis, R.E., Harrison, N.A. 2010. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on secY gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 2887–2897.
- Lee, I.M., Davis, R.E., and Gundersen-Rindal, D.E. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 221–255. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.221
- Lelliott, R.A. and Stead D.E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell Scientific, Oxford (GB).
- Le Provost, G., Iskra-Caruana, M.L., Acina, I. and Teycheney, P.Y. 2006. Improved detection of episomal banana streak viruses by multiplex immunocapture PCR. *Journal of Virological Methods* 37: 7-13.
- Lenarčič, R., Morisset, D., Pirc, M., Llop, P., Ravnikar, M. & Dreo, T. 2014. Loop-mediated isothermal amplification of specific endoglucanase gene sequence for detection of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. PLoS ONE 9(4), e96027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096027>.
- Leslie, J.F. and Summerell, B.A. 2006. The Fusarium laboratory manual. Blackwell Publishing Co. Iowa, USA. 388 pp.
- Lheureux, F., Carreel, F., Jenny, C., Lockhart, B.E.L., and Iskra-Caruana, M.L. 2003. Identification of genetic markers linked to banana streak disease expression in interspecific *Musa* hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 594–598 Li, M., Shi, J., Xie, X., Leng, Y., Wang, H., Xi, P., Zhou, J., Zhong S. and Jiang, Z., 2013. Identification and application of a unique genetic locus in diagnosis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4, *Canadian Journal of Plant Pathology*: 1-12 DOI:10.1080/07060661.2013.828321.
- Liu, J., Gopurenko, D., Fletcher, M. J., Johnson, A.C. and Gurr G.F. 2017. Phytoplasmas–The “Crouching Tiger” Threat of Australian Plant Pathology. *Front. Plant Sci.* 8:599. doi: 10.3389/fpls.2017.00599.

- Liu, F., Feng, L., Chen, X., Han, Y., Li, W., Xu, W., Cai, B. and Lin, M. 2012. Simultaneous detection of four banana viruses by multiplex PCR. *Journal of Phytopathology* 160: 622-627.
- Lin Y. H., Chang, J.Y., Liu, E.T., Chao, C.P., Huang, J.W., Chang, P. F.L. 2008. Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. *Eur J Plant Pathol*. DOI 10.1007/s10658-008-9372-4
- Lin, Y.H., Lin, Y.J., Chang, T.D., Hong, L.L., Chen, T.Y., Chang, P.F.L., *et al.* 2016. Development of a TaqMan Probe-Based *Insulated Isothermal Polymerase Chain Reaction (iiPCR)* assay for detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. PLoS ONE. 11:e0159681. doi: 10.1371/journal.pone.0159681
- Llanos, C. 1967. Una nueva enfermedad del plátano en el Valle del Cauca: la bacteriosis. *Agric. Trop.* 23, 806–812.
- Lockhart, B.E.L. 1986. Purification and serology of a bacilliform virus associated with a streak disease of banana. *Phytopathology* 76: 995-999.
- Lockhart, B.E.L. 2011. Viruses that threaten banana and plantain production in the Caribbean. *Proceedings of the Caribbean Food Crops Society* 47: 109-120.
- Lockhart, B.E.L. and Jones, D.R. 1999. Banana mosaic. In D. R. Jones (Ed.), *Diseases of banana, abaca and enset*. Wallingford, UK: CAB International. pp. 256–263.
- Lockhart, B.E.L., Jones, D.R. and Thomas, J.E. 2018. Banana Mosaic. In: Jones, D.R. (ed.) *Handbook of diseases of banana, abaca and enset*. CAB International, Wallingford, UK. Pp 384-390. ISBN 13-9781780647197.
- Lockhart, B.E.L. and Jones, D.R. 1999. Banana streak. In D. R. Jones (Ed.), *Diseases of banana, abaca and enset*. Wallingford, UK: CAB International pp. 263-274
- Lorenz K-H, Schneider B, Ahrens U, Seemüller E, 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85, 771-776. <http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-85-771>
- Magee, C.J.P. 1948. Transmission of banana bunchy top to banana varieties. *The Journal of the Australian Institute of Agriculture Science* 14: 18-24.
- Magnaye, L.V. and Espino, R.R.C. 1990. Banana bract mosaic, a new disease of banana. I. Symptomatology. *Philippine Agriculturist (Phl.)* 73(1): 55-59.

- Mahuku, S.G. 2004. A simple extraction method suitable for PCR based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter* 22, 71–81.
- Majumder, S., Batthacharya, B., Singh, P.K., and Johnari, S. 2013. Detection of banana bunchy top virus using impedance spectroscopy. *Sensor Letters*, 11: 2055-2059.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., *et al.* 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13: 614–629.
- Mansoor, S., Qazi, J., Amin, L., Khatri, A., Khan, I. A., Raza, S., *et al.* 2005. A PCR based method, with internal control for the detection of banana bunchy top virus in banana. *Molecular Biotechnology*, 30: 167–170.
- Marcone, C. 2014. Molecular biology and pathogenicity of phytoplasmas. *Annals of Applied Biology* 165:199–221.
- Martini, M., Lee, I.M., Bottner, K.D., Zhao, Y., Botti, S. *et al.* 2007. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 2037–2051.
- Maryani, N., Lombard L., Poerba, Y.S., Subandiyah, S., Crous, P.W. and Kema, G.H.J. 2019. Phylogeny and genetic diversity of the banana Fusarium wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. *Studies in Mycology* 92: 155–194. available online at www.studiesinmycology.org
- Meyer, J.B. 2005. Banana streak Badnavirus, incidence, transmission and the development of a serologically based detection method. M.Sc. Thesis, University of Pretoria, South Africa.
- Molina, A.B. 1999. Fruit rot diseases of cooking banana in Southeast Asia. *Infomusa* 8, 29–30.
- Molina, A.B. 2006. Managing bacterial wilt/fruit rot disease of banana in Southeast Asia. In: Karamura, E., Osiru, M., Blomme, G., Lusty, C., and Picq, C. (eds) *Proceedings of the Banana Xanthomonas wilt Regional Preparedness and Strategy Development Workshop Held in Kampala: Developing A Regional Strategy to Address the Outbreak of Banana Xanthomonas wilt in East and Central Africa*, (Montpellier: INIBAP): 26–31.
- Mudonyi, B., Vanhaelewyn, L., Tusiime, G., Ssekiwoko, F., Kubiriba, J., Tushemereirwe, W.K. and Changa, C.M. 2019. Banana field resistance to insect-vector transmission of bacterial wilt caused by *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. *African Journal of Agricultural Research* 14(1): 24- 33.

- Musanet, Bioversity international, 2017. Protocolo Banana virus indexing ring test, basado en el protocolo de Sharman *et al.* (2000b), modificado para la detección de BBTV, CMV, BBrMV BanMMV, elaborado por el grupo temático de conservación de Musanet en 2017 para la realización de ensayos inter-laboratorios de detección de virus de bananos.
- Miyazaki, A., Shigaki, T., Koinuma, H., Iwabuchi, N., Rauka, G.B., Kembu, A., Saul, J., Watanabe, K., Nijo, T., Maejima, K., Yamaji, Y., Namba, S. 2018. 'Candidatus Phytoplasma noviguineense', a novel taxon associated with Bogia coconut syndrome and banana wilt disease on the island of New Guinea. *Int J Syst Evol Microbiol.* 68: 170-175.
- Mwangi, M., Mwebase, M., Bandyopadhyay, R., Aritau, A., Eden-Green, S., Tushemereirwe, W., and Smith, J. 2007. Development of a semi-selective media for the isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* from insect vectors, infected plant material and soil. *Plant Pathol.* 56: 383-390.
- Nakato, G.V., Ocimati, W., Bloome, G., Fiaboe, K.K.M. and Beed, F. 2014. Comparative importance of infection routes for banana *Xanthomonas* wilt and implications on disease epidemiology and management. *Canadian Journal of Plant Pathology* 36: 418-427
- Nakato, G.V., Wicker, E., Coutinho, T.A. Mahuku, G., Studholme, D.J. 2018. A highly specific tool for identification of *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* based on five Xvm-specific coding sequences. *Heliyon* 4. e01080. doi: 10.1016/j.heliyon.2018. e01080.
- Namba, S., Kato, S., Iwanami, S., Oyaizu, H., Shiozawa, H. *et al.* 1993. Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology* 83: 786–791.
- Navaratnam, S. J. and Catley, A. 1986. Quarantine measure to exclude plant pests. In: Groves, R.H. and Burdon J.J., (eds.) *Ecology of Biological Invasions: An Australian Perspective*. Australian Academy of Science, Canberra. Pp 106-112
- Nkuba, J., Tinzaara, W. Night, G., Niko, N., Jogo, W., *et al.*, 2015. Adverse impact of banana *Xanthomonas* wilt on farmers livelihoods in Eastern and Central Africa. *African Journal of Plant Science.* 9: 279-286.
- Ndungo, V., Bakelana, K., Eden-Green, S., & Blomme, G. (2004). An outbreak of banana *Xanthomonas* wilt (*Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*) in the Democratic Republic of Congo. *InfoMusa*, 13, 43–44.
- Niblett, C.L., Pappu, S.S., Bird, J., and Lastra, R. 1994. Infectious chlorosis, mosaic and heart rot. In: Ploetz, R.C., Zentmyer, G.A., Nishijima,

- W.T., Rohrbach, K.G., and Ohr, H.D. (eds.) Compendium of Tropical Fruit Diseases. American Phytopathological Society Press, Minnesota, pp 18-19.
- NIMF 5. 2018. Glosario de términos fitosanitarios. CIPF FAO. <https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms>.
- NIMF 12. 2017. Certificados fitosanitarios. <https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms>.
- NPC Seed Certification Sub-Committee 2017. Protocol for Detection of *Dickeya* and *Pectobacterium* in Potato Tubers, Stems, or Irrigation Water. 16 pp.
- Ocimati, W., Ssekiwoko, F., Buttibwa, M., Karamura, E., Tinzara, W., Eden-Green, S., and Blomme, G. 2013a. Systemicity and speed of movement of *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* in the banana plant in the garden tool-mediated infection. In: Blomme, G., Vanlauwe, B., and Van Asten P. (eds.) *Banana systems on the humid high land of Sub-Saharan Africa: enhancing Resilience and Productivity*. CAB International, Wallingford, UK pp 101-108.
- Ocimati, W., Ssekiwoko, F., Karamura, E., Tinzaara, W. and Blomme G. 2013b. Does *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* Colonize Banana Cord Root Tissue? Proceedings of International ISHS-Promusa Symposium on Banana and Plantains Towards a Global Sustainable Banana Production and Improved Uses. *Acta Horticulturae* 986. (Available from www.musalit.org).
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., Ploetz, R.C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *PNAS* 95:2044–49.
- Ordóñez, N., Seidl, M.C., Waalwijk, C., Drenth, A., Kilian, A., Thommas B.P.H.J., Ploetz, R.C. and Kema, G.H.J. 2015. Worse Comes to Worst: Bananas and Panama Disease-When Plant and Pathogen Clones Meet. *PLOS Pathogens*. DOI:10.1371/journal.ppat.1005197.
- Ordóñez, N., Salacinas, M., Mendes, O., Seidl, M.F.H.J., Meijer, G., Schoen, C.D. and Kema, G.H.J. 2019. A loop-mediated isothermal amplification assay based on unique markers derived from genotyping by sequencing data for rapid in-plant diagnosis of Panama disease caused by tropical race 4 in banana. *Plant Pathology* 68: 1682–1693.
- Peng, J., Zhang, J., Xia, Z., Li, Y., Huang, J. and Fan, Z. 2012. Rapid and sensitive detection of banana bunchy top virus by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods* 185: 254–258.

- Padovan, A.C., Gibb, K.S., Bertaccini, A., Vibio, M., Bonfiglioli, R.E., Magarey, P.A., Sears, B.B. 1995. Molecular detection of the Australian grapevine yellows phytoplasma and comparison with grapevine yellows phytoplasmas from Italy. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1: 25–31.
- Pérez-Vicente, L. 2003. Manejo integrado de plagas y enfermedades en banano y plátano en Cuba. En: Rivas, G. y Rosales, F. (eds.) *Memorias del Taller “Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de musáceas*. Agosto 11-13. Guayaquil, Ecuador, Pp 37-54.
- Pérez-Vicente, L. 2004. Fusarium wilt (Panama disease) of bananas: an updating review of the current knowledge on the disease and its causal agent. *Memorias XV ACORBAT*, Oaxaca, México. Oct 2004. Pp. 1-14.
- Pérez-Vicente, L. 2012. Report of the mission to Barbados and St. Vincent and The Grenadines. First Mission Report, Black Sigatoka Expert Consultant. 12-22 July 2012. AGP: TCP/SLC/3402.
- Pérez-Vicente, L., Dita, M.A, and Martinez de La Parte, E., 2014. Technical Manual: Prevention and diagnostic of Fusarium Wilt (Panama disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Tropical Race 4 (TR4). Prepared for the FAO/CARDI Regional Workshop on the Diagnosis of Fusarium Wilt (Panama disease) caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4: Mitigating the Threat and Preventing it Spread in the Caribbean. University of West Indies, Trinidad and Tobago, 5-9 May 2014. 75 pp. <http://www.fao.org/agriculture/crops/news-events-bulletins/detail/en/item/235419> ; http://www.fao.org/agriculture/crops/news-events-sulletins/detail/en/item/235419/icode/?no_cache=1
- Pérez-Vicente, L., Martínez-de la Parte, E., Borrás-Hidalgo, O. 2013. Diagnóstico mediante qPCR de las razas 1, 2 y 4 Tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubensis* agente causal del mal de Panamá de las musáceas. II Congreso Latinoamericano y del Caribe de plátanos y bananos. Bioversity International/Musalac/Corpoica, 2-4 Junio, Armenia, Colombia.
- Pérez-Vicente, L. 2015. Las mejores prácticas para la prevención de la raza 4 tropical de la marchitez por Fusarium y otras enfermedades exóticas en fincas bananeras. *Fitosanidad* 19(3): 243-250.
- Pérez-Vicente, L., Fernández-González, E. and Javer-Higgison, E. 2020. Banana and plantain diseases of Cuba and Caribbean basin: impact, epidemiology and management advances. Chapter 35 In: (Uma, S., Vaganan, M.M. and Agrawal, A. (eds.), *Bananas and Plantains*:

- Leading-Edge Research and Development. Vol. 1: Diversity, Improvement and Protection. ICAR-National Research Centre for Banana, Tiruchirappalli, India. (in Press).
- Potrykus, M., Sledz, W., Golanowska, A., Slawiak, M., Binek, A., Motyka, A., Zoledowska, S., Czajkowski, R., Lojkowska, E. 2014. Simultaneous detection of major blackleg and soft rot bacterial pathogens in potato by multiplex polymerase chain reaction. *Annals of Applied Biology* 165:474-487.
- Poussier, S., Vandewalle, P. & Luisetti, J. 1999. Genetic diversity of African and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of the *hrp* gene region. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2184–2194.
- Poussier, S. and Luisetti, J. 2000. Specific detection of biovars of *Ralstonia solanacearum* in plant tissues by Nested-PCR-RFLP. *European Journal of Plant Pathology* **106**: 255–265.
- Plant Health Australia/Cooperative Research Centre for Tropical Plant Protection. 2006. Bacterial Wilt of Banana Diagnostics Manual. 61pp.
- Ploetz, R.C., 1990. Population biology of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. In: *Fusarium wilt of banana*. Ploetz, R.C. (Ed.) APS Press St Paul, pp 63-76.
- Ploetz, R.C. 2006. Fusarium wilt is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum*, f. sp., *cubense*. *Phytopath.* 96: 653-656
- Ploetz, R.C. 2015. Fusarium wilt of banana. *Phytopath.* 105:1512-1521.
- Ploetz, R.C., Kema, G.H.J. and Ma, L.J. 2015. Impact of diseases on export and smallholder production of banana. *Annual Review of Phytopathology* 53: 269-283.
- Ploetz, R.C. 2018. Fusarium wilt. In: Jones, D.R. (ed.) *Handbook of diseases of banana, abaca and enset*. CAB International, Wallingford, UK. Pp 207-228. ISBN 13-9781780647197.
- Quito-Avila, D.R., Ibarra, M.A., Alvarez, R.A., Ratti, M.F., Espinoza, L. Cevallos-Cevallos, J.M and Peralta, E.L. 2013. First record of banana bract mosaic virus in Cavendish banana in Ecuador. *Plant Disease*, 97: 1003.
- Reichel, H., Martínez, A.K., Arroyave, J.A. Sedano, R. and Morales, F. J., Duterme, O., Kummert, J. and Lepoivre, P. 2003. First Report of Banana mild mosaic virus Isolated from Plantains (*Musa* AAB) in Colombia. *Plant Disease* 87(9): 1150.

- Revilla, W.U. y Vargas, L.A. 1967. La enfermedad de Moko del plátano en el Perú. Technical Bulletin of the Ministry of Agriculture, Lima, Perú 70. 24 pp.
- Remenant, B., de Cambiaire, J.C., Cellier, G., Jacobs, J.M., Mangenot, S., Barbe, V., *et al.* 2011. *Ralstonia syzygii*, the blood disease bacterium and some Asian *R. solanacearum* strains form a single genomic species despite divergent lifestyles. PLoS ONE 6: e24356. doi: 10.1371/journal.pone.0024356.
- Rivera, N. 1978. Estudio comparativo de dos nuevas enfermedades bacterianas en áreas plataneras de Cuba. *Agrotecnia de Cuba*, 10: 35–44.
- Rivera, N. and Ezavin, M. 1980. Necrosis del cormo del plátano causada por *Erwinia chrysanthemi*. *Ciencia Técnica Agric. Ser. Prot. Plantas* 18: 59–69.
- Rivera, N., García, A., and Gil, C. 1980. Caracterización patotípica de aislamientos de *Erwinia chrysanthemi* procedentes de plátano y maíz. *Ciencia Técn. Agric. Ser. Prot. Plantas* 3: 47–60.
- Rodoni, B.C., Ahlawat, Y.S., Varma, A., Dale, J.L., and Harding, R.M. 1997. Identification and characterization of banana bract mosaic virus in India. *Plant Disease*, 81, 669–672.
- 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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 3087–3103. doi: 10.1099/ijls.0.066712-0
- Samson, R., Legendre, J.B., Christen, R., Fischer-Le Saux, M., Achouak, W. and Gardan, L. 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov and *Dickeya paradisiaca* comb. nov and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp nov., *Dickeya dianthicola* sp nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp nov and *Dickeya zeae* sp nov. *Intern J Syst and Evol Microbiol* 55:1415-1427.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

- Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of plant pathogenic bacteria. Third Edition. For the Bacteriology Committee of The American Phytopathological Society. APS Press. 381 pp.
- Schmutterer, H., Rowland Cruz, R y Cicero, J. 1990. Plagas de las plantas cultivadas en el Caribe. GTZ, Eschborn, DE. 640 pp
- Schneider, B. Gibb, K.S. 1997. Detection of phytoplasmas in declining pears in southern Australia. *Plant Disease* 81: 254-258.
- Seekiwoko, F., Tushermereirwe, W., Batte, M., Ragama, P.E. and Kumarech, A. 2006. Reaction of banana germplasm to inoculation with *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. *African Crop Science Journal* 14: 151-155.
- Selvarajan, R., and Jeyabaskaran, K.J. 2006. Effect of banana bract mosaic virus (BBBrMV) on growth and yield of cultivar Nendran (plantain, AAB). *Indian Phytopathology* 59: 496–500.
- Sequeira, L., and Averre, C. 1961. Distribution and pathogenicity of strains of *Pseudomonas solanacearum* from virgin soils in Costa Rica. *Plant Dis. Rep.* 45: 435–440.
- Sharman, M., Gambley, C.F., Oloteo, E.O., Abgona, R.V.J. and Thomas, J. 2000a. First record of natural infection of abaca (*Musa textilis*) with abaca bract mosaic potyvirus in the Philippines. *Australasian Plant Pathology* 29: 69.
- Sharman, M., Thomas, J.E. and Dietzgen, R.G. 2000b. Development of a multiplex immunocapture PCR with colourimetric detection for viruses of banana. *Journal of Virological Methods* 89: 75–88.
- Sharman, M., Thomas, J.E., Skabo, S. and Holton, T.A. 2008. Abacá bunchy top virus, a new member of the genus *Babuvirus* (family *Nanoviridae*). *Archives of Virology* 153: 135-147.
- Sivaprasad, Y., Karla, M., Patricia, G., Sandy S. and Ana, G. 2016. Serological and molecular identification of *Cucumber mosaic virus* (CMV) infecting banana crops in Ecuador. *Revista Científica Ecuatoriana* 3:17-22.
- Smart, C.D., Schneider, B., Blomquist, C.L., Guerra, L.J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K.-H., Seemüller, E., Kirkpatrick, B.C. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2988-2993.
- Smith, J.J., Jones, D.R., Karamura, E., Blomme, G. and Turyagyenda, F.L. 2008. An analysis of the risk from *Xanthomonas campestris* pv.

- musacearum* to banana cultivation in Eastern, Central and Southern Africa. Bioversity International, Montpellier, France.
- Srivastava, N., Kapoor, R., Kumar, R., Kumar, S., Saritha R.K., Kumar, S., Baranwal, V.K. 2019. Rapid diagnosis of *Cucumber mosaic virus* in banana plants using a fluorescence-based real-time isothermal reverse transcription-recombinase polymerase amplification assay. *Journal of Virological Methods* 270: 52–58.
- Ssekiwoko, F., Taligoola, H.K., and Tushemereirwe, W.K. 2006. *Xanthomonas campestris* pv *musacearum* host range in Uganda. *Afr. Crop Sci. J.* 14:111-120.
- Stainton, D., Kraberger, S., Walters, M., Wiltshire, E.J., Rosario, K., Halafihi, M., *et al.* 2012. Evidence of inter-component recombination, intra-component recombination and reassortment in banana bunchy top virus. *The Journal of General Virology*, 93: 1103–1119.
- Stover, R.H. 1962. Fusarial wilt (Panama disease) of bananas and other *Musa* species. Commonwealth Mycological Inst., Kew, UK. Mycological Institute, Kew, UK.
- Stover, R.H. 1972. Banana, plantain and abaca diseases. CMI. Kew, UK.
- Streten, C., and Gibb, K. S. (2006). Phytoplasma diseases in sub-tropical and tropical Australia. *Australas. Plant Pathol.* 35, 129–146.
- Strosse, H., van der Houwe, I., Panis, B. 2004. Banana Cell and Tissue Culture Review. *Science Publishers, Inc.*, Enfield, UK.
- Studholme, D., Wicker, E., Muzemil, S., Aspin, A., Bogdanove, A., Broders, K., Dubrow, Z., Grant, M., Jones, J., Karamura, G., Lang, J., Leach, J., Mahuku, G., Nakato, G., Coutinho, T., Smith, J. and Bull, C. 2019. Transfer of *Xanthomonas campestris* pv. *arecae*, and *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* to *Xanthomonas vasicola* (Vauterin) as *Xanthomonas vasicola* pv. *arecae* comb. nov., and *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* comb. nov. and description of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* pv. nov. *Phytopathology* 29. <https://doi.org/10.1101/57/1166>
- Su, H.J. 1999. Development and application of molecular diagnostic probes for detection, characterization and management of banana virus. INIBAP/ASNET (RAC) Meeting, Guangzhou, China. November 2-5. PP
- Su, H.J., Tsao, L.Y., Wu, M.L. and Hung, T.H. 2003. Biological and molecular categorization of strains of *Banana bunchy top virus*. *Journal of Phytopathology* 151, 290-296.
- Supriadi, 2005. Present status of Blood Disease in Indonesia. In: Allen C, Prior P, Hayward A, eds. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia*

- species complex. APS Press, The American Phytopathological Society, Minnesota, USA, 395-404.
- Summerell, B.A. 2019. Resolving *Fusarium*: Current Status of the Genus. *Annu. Rev. Phytopathol.* 57: 15.1–15.17. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100204>. Downloaded from www.annualreviews.org.
- Teycheney, P.Y., Marais, A., Svanella-Dumas L., Dulucq, M.J. Candresse, T. 2005. Molecular characterization of banana virus X (BVX), a novel member of the *Flexiviridae* family. *Archives of Virology* 150: 1715–1727.
- Teycheney, P.Y., Laboureau, N., Iskra-Caruana, Marie-L. and Candresse, T. 2005. High genetic variability and evidence for plant-to-plant transfer of *Banana mild mosaic virus*. *Journal of General Virology* 86: 3179–3187.
- Teycheney, P.Y., Acina, I., Lockhart, B.E.L., and Candresse, T. 2007. Detection of Banana mild mosaic virusX by polyvalent degenerate oligonucleotide RT-PCR (PDO-RT-PCR). *Journal of Virological Methods* 142: 41-49.
- Thangavelu, R., Selvarajan, R., and Singh, H.P. 2000. Status of banana streak virus and banana bract mosaic virus diseases in India. In Singh, H.P. & Chadha, K.L. (Eds.), *Banana: Improvement, production and utilization. Proceedings of the conference on challenges for banana production and utilization in 21st century* (pp. 364–376). Trichy, India: AIPUB, NRCB.
- Thomas, J.E. 1991. Virus indexing procedures for banana in Australia. In: Valmayor, V.V., Umali, B.E. and Besjosano, C.P. (eds.) *Banana diseases in Asia and Pacific: Proceedings of a Technical Meeting on diseases affecting banana and plantain in Asia and Pacific*, Brisbane, Australia, 15-18 April 1991. INIBAP, Montpellier, France. Pp 144-157.
- Thomas, J.E. 2015. *MusaNet. Technical Guidelines for the Safe Movement of Musa Germplasm*. 3rd Edition. Bioversity International, Rome. ISBN 978-92-9255-034-9. 60 pp.
- Thomas, J.E. 2018. Banana bunchy top. In: Jones, D.R. (ed.) *Handbook of diseases of banana, abaca and enset*. CAB International, Wallingford, UK. Pp 362-376.
- Thomas, J.E. and Dietzgen, R.G. 1991. Purification, characterization and serological detection of virus like particles associated with banana bunchy top disease in Australia. *Journal of General Virology* 72: 217-224.

- Thomas, J.E., Geering, A.D.W., Gambley, C.F., Kessling, A.F. and White, M. 1997. Purification, properties and diagnosis of banana bract mosaic potyvirus and its distinction from abaca mosaic potyvirus. *Phytopathology* 87: 698–705.
- Thomas, J.E., Lockhart, B.E.L., Iskra-Caruana, M.L., Crew, K.S. and Sharman, M. 2018b. Banana mild mosaic In: Jones, D.R. (ed.) Handbook of diseases of banana, abaca and enset. CAB International, Wallingford, UK. Pp 410-412.
- Thomas, J.E. and Magnaye, L.V. 2019. Abacá mosaic. In: Jones, D.R. (ed.) Handbook of diseases of banana, abaca and enset. CAB International, Wallingford, UK. Pp 391-393.
- Thomas, J.E., Selvarajan, R., Iskra-Karuana, M.L., Magnaye, L.V., and Jones, D.R. 2018a. Bract Mosaic. In: Jones, D.R. (ed.) Handbook of diseases of banana, abaca and enset. CAB International, Wallingford, UK. Pp 378-384
- Thomson, D. and Dietzgen, R.G. 1995. Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using a rapid virus release protocol without tissue homogenization. *J. Virol. Methods* 54: 85-95.
- Thomas, J.E., Vo, J. and Geering, A.D.W. 2013. Banana virus diseases in Australia. Current strategies. Proceedings of the XX International ACORBAT Meeting. September 9 – 13, 2013, Fortaleza – Ceará – Brazil. Pp 144-149
- Thomson D. and Dietzgen, R.G. 1985. Detection of DNA and RNA plant virus by PCR and RT PCR using a rapid virus release protocol without tissue homogenization. *Journal of Virological Methods* 54: 85-95.
- Timin, D.J.A., Lah, I. and Mutalib, S.B.A. 2014. Occurrence of banana blood disease in Malaysia. 8th. ICPPT 8-10 April, 2014. Kuala Lumpur, Malaysia. Available at: https://www.academia.edu/7925956/Occurrence_of_Banana_Blood_Disease_in_Malaysia_Presentation (Accessed 20 April 2015).
- Traynor, P., Dain, A. and Irwin, R. 2001. A practical guide to containment. Greenhouse research with transgenic plants and microbes. Information systems for Biotechnology. Blackburg, Virginia. <http://www.isb.vt.edu>.
- Tripathi, L. and Tripathi, J.N. 2009. Relative susceptibility of banana cultivars to *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. *African Journal of Biotechnology* 8: 5343-5360.
- Tripathi, L., Mwangi, M., Abele, S., Aritua, V. and Tushemereirwe, W. K., and Bandyopadhyay, R. 2009. *Xanthomonas* wilt. A threat to banana production for Central and West Africa. *Plant Disease* 93(5): 440-451.

- Tripathi, L., Tripathi, J.N., Tushemereirwe, W.K. and Bandyopadhyay, R. 2007. Development of a semi-selective medium for isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* from banana plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 117:177–186.
- Tsai, Y.P., Hwang, M.T., Chen, S.P., and Liu, S.S. 1986. An ecological study of banana mosaic. *Plant Protection Bulletin* (Taiwan, ROC) 28: 383–387.
- Toht, I.K., Bell, K.S., Holeva, M.C. and Birch, P.R.J. 2003. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Molecular Plant Pathology* 4 (1): 17–30.
- Tushemereirwe, W. 2006. The national strategy for the management of BXW in Uganda. In: Karamura, E.B., Osiru, M., Blomme, G., Lusty, C. and Picq, C. (eds). Developing a regional Strategy to address the outbreak of Banana *Xanthomonas* wilt in East and Central Africa: Proceedings of the Banana *Xanthomonas* wilt regional preparedness and strategy development workshop held in Kampala, Uganda - 14-18 February 2005. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France. Pp: 13-15.
- Tushemereirwe, W., Kangire, A., Smith, J., Ssesiwoko, F., Nakyanzi, M., Kataama, D., Musiitwa, C., and Karyeija, R. 2003. An outbreak of bacterial wilt on banana in Uganda. *InfoMusa*, 12: 6–8.
- Tushemereirwe W., Kangire, A., Ssesiwoko, F., Offord, L.C., Crozier, J., *et al.*, 2004. First report of *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* in Uganda. *Plant Pathology* 53: 802.
- USDA/APHIS. 2010a. Containment Guidelines for Plant Pathogenic Bacteria (Includes Mycoplasmas, Spiroplasmas). 14 pp.
- USDA-APHIS. 2010b. Containment Guidelines for Viral Plant Pathogenic and its vectors. 17 pp.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. and Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 472-489.
- Van Alfen, N.K. 1989. Reassessment of plant wilt toxins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27: 533–550. doi: 10.1146/annurev.py.27.090189.002533.
- Van den Houwe, I. and Swennen, R. 2000. Characterization and control of bacterial contaminants in vitro cultivars of banana (*Musa* spp.). *Acta Horticulturae* 530: 69.
- Van der Wolf, J.M., Nijhuis E.H., Kowalewska, M.J., Saddler, G.S., Parkinson, N., Elphinstone, J.G., Pritchard, L., Toth I.K., Lojkowska, E., Potrykus, M., Waleron, M., de Vos, P., Cleenwerck, I., Pirhonen, M., Garlant, L., Helias, V., Pothier, J.F., Pfluger, V., Duffy, B., Tsror,

- L. and Manulis, S. 2014. *Dickeya solani* sp nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Vigheri, N. and Lubanga, D.L. 2006. Banana Xanthomonas wilt in DR-Congo. In: Karamura, E.B., Osiru, M., Blomme, G., Lusty, C. and Picq, C. (eds). Developing a regional Strategy to address the outbreak of Banana Xanthomonas wilt in East and Central Africa: Proceedings of the Banana Xanthomonas wilt regional preparedness and strategy development workshop held in Kampala, Uganda - 14-18 February 2005. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France. Pp: 13-15.
- Villa, J.E., Tsuchiya, K., Horita, M., Opina, N., and Hyakumachi, M. 2005. Phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* species complex strains from Asia and other continents based on 16S rDNA, endoglucanase, and hrpB gene sequences. *J. Gen. Plant Pathol.* 71, 39–46. doi: 10.1007/s10327-004-0156-1.
- Vuytsteke, D.R. 1989. Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.
- Wardlaw, C.W. 1972. Banana diseases: including Plantain and Abaca. London, UK. Longman. 878 pp.
- Wambulwa, F.N., Karanja, L.S., Kiarie, S.M. and Muturi. S.M. 2013. The influence of host and pathogen genotypes on symptom severity in banana streak disease. *African Journal of Biotechnology* 12(1): 27-31.
- Weintraub, P. G., and Beanland, L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 91–111.
- Wong, W.C. 1986. *In vitro* propagation of banana (*Musa* spp.): initiation, proliferation and development of shoot-tip cultures on defined media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 6: 159–166.
- Wu, R.Y. and Su, H.J. 1990. Production of monoclonal antibodies against banana bunchy top virus and their use in enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Phytopathology* 128: 203-208.
- Wylie, S., Wilson, C.R., Jones, R.A.C. and Jones, M.G.K. 1993. A polymerase chain reaction assay for cucumber mosaic virus in lupin seeds. *Australian Journal of Agricultural Research* 44: 41–51.
- Yirgou, D. and Bradbury, J.F. 1968. Bacterial wilt of Enset (*Ensete ventricosum* L.) incited by *Xanthomonas musacearum* sp. *Phytopathology* 59:111-115.

- Yirgou, D. and Bradbury J.F. 1974. A note on wilt of banana caused by ensset wilt *Xanthomonas musacearum*. *East African Agriculture and Forest Journal* 40:111-114.
- Young, J.M., Dye, D.W. Bradbury, J.F., Panagopoulos, C.G., and Robs, C.F. 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria New Zeal. J. Agrc. Res. 21:153-177.
- Zhao, Y. and Davis, R.E. 2016. Criteria for phytoplasma 16Sr group/subgroup delineation and the need of a platform for proper registration of new groups and subgroups. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 2121–2123.
- Zhang, X., Zhang, H., Pu, J., Qi, Y., Yu, Q., *et al.* 2013. Development of a Real-Time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and quantitative detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 in soil. *PLoS ONE* 8(12): e82841. doi: 10.1371/journal.pone.0082841.