



**Evaluación de microorganismos antagonistas para el control biológico in vitro de
Ralstonia solanacearum.**

Bedón Endara, Cristian Francisco

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo

Quiroga Lozano, Cristina Alexandra M.Sc

Sangolquí, 01 de septiembre del 2023

Ultimo_Metodología_Introduccion_M...

Scan details

Scan time:
August 30th, 2023 at 1:56 UTC

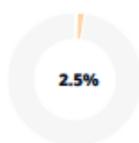
Total Pages:
67

Total Words:
16651



CRISTINA ALEXANDRA
QUIROGA LOZANO

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	0.6%	97
Minor Changes	0%	1
Paraphrased	1.9%	316
Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage

- AI text
- Human text

🔍 Plagiarism Results: (15)

🌐 upl_6054e85d48c47.pdf 0.7%

<https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/...>

B0210605 B0210606 Lisina Hierro Agar USO Medio de cultivo utilizado para diferenciar microorganismos, especialmente Salmonella spp., ba...

🌐 Controles-de-calidad-de-algunas-cepas-de-la-famili... 0.6%

<https://es.studenta.com/content/111132044/controles-de-ca...>

Aprendiendo Biología

Logo Studenta Iniciar sesión Volver Compartir Ver el material completo
Controles-de-calidad-de-algunas-cepas-de-la-familia-enterb...

🌐 medios de cultivo - Trabajos de investigación - 1634 ... 0.5%

Cristina Quiroga M.Sc



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: "Evaluación de microorganismos antagonistas para el control biológico *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*." fue realizado en su totalidad por el señor Bedón Endara Cristian Francisco; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 30 de agosto de 2023



CRISTINA ALEXANDRA
QUIROGA LIZANO

Quiroga Cristina M.Sc.

CI. 1721055109



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Bedón Endara Cristian Francisco**, con cédula de ciudadanía n° 0503004020, declaro que el contenido, ideas y criterios de trabajo de integración curricular: **"Evaluación de microorganismos antagonistas para el control biológico *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*."** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 01 de septiembre del 2023



Bedón Endara Cristian Francisco
C.C.: 0503004020

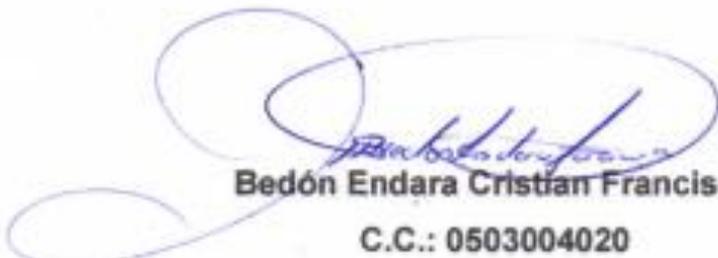


Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Bedón Endara Cristian Francisco**, con cédula de ciudadanía n° 0503004020, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: "**Evaluación de microorganismos antagonistas para el control biológico *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*.**" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 01 de septiembre del 2023



Bedón Endara Cristian Francisco
C.C.: 0503004020

Índice de contenidos

Contenido

Capítulo I: Introducción	13
Formulación del problema.....	15
Justificación del Problema.....	18
Objetivos del trabajo	20
Objetivo general	20
Objetivos específicos	20
Hipótesis	20
Capitulo II: Marco teórico.....	20
Agente causal marchitez bacteriana (<i>Ralstonia solanacearum</i>)	20
Clasificación Taxonómica.....	21
Nombre común	21
Clasificación intraespecífica de <i>R. solanacearum</i>	21
Morfología de <i>Ralstonia solanacearum</i>	22
Distribución geográfica.....	23
Distribución en el Ecuador	24
Medios de dispersión	25
Proceso de Infección.....	26
Sintomatología y daños.....	27
Hojas.....	27
Pseudotallo	28

Raquis.....	29
Racimo y frutos	30
Cormo (Rizoma).....	31
Control	31
Controlador biológico (Biocontrolador)	32
Antagonismo	33
Pruebas fenotípicas y bioquímicas para identificación de <i>Ralstonia solanacearum</i>	33
Métodos de detección y diagnóstico.....	33
Tinción diferencial	34
Prueba de flujo bacteriano.....	35
Test de hidróxido de potasio (KOH)	36
Test de catalasa	36
Test de Oxidasa	37
Prueba Simmons Citrato Agar	38
Prueba de Lisina hierro Agar	38
Test de Ureasa Agar Base	40
Prueba Motilidad-Indol-Ornitina descarboxilasa (MIO Medio)	40
Prueba Superficie/profundidad-Producción de gas-Producción de SH ₂ (TSI Agar).....	41
Prueba Producción de SH ₂ -Indol-Motilidad (SIM Medio)	42
Medios de cultivos diferenciales y selectivos.....	43
Agar nutritivo (AN).....	43
Agar Rosa Bengala + Cloranfenicol + Dichlorán (DRBC)	44
Patata Dextrosa Agar (PDA)	44

Agar 2-3-5-Trifenil-2H tetrazolio (TTC)	44
Métodos de evaluación de microorganismos antagonistas.....	45
Cultivos duales:.....	45
Placa de agar perforado:.....	46
Capítulo III: Metodología.....	46
Ubicación del área de investigación	46
Ubicación Ecológica.....	47
Recolección de muestras.....	47
Medio de cultivo – diferencial.....	48
Pruebas fenotípicas para identificación de <i>Ralstonia solanacearum</i>	48
Tinción diferencial.....	48
Test de hidróxido de potasio (KOH)	49
Test de catalasa.....	49
Test de oxidasa.....	50
Aislamiento y multiplicación de las bacterias antagonistas.....	51
Evaluación de potenciales microorganismos antagonistas.....	51
Cultivos Duales (Cruza) para bacterias.....	51
Placa de Agar Perforado	52
Cultivos Duales (Cruza) para hongos.....	53
Crecimiento Radial.....	54
Tasa de extensión radial:	54
Evaluación de viabilidad de <i>R. solanacearum</i>	55
Capítulo IV: Resultados y Discusión.....	56

Resultados	56
Curva de crecimiento del microorganismo del patógeno	56
Identificación de <i>Ralstonia solanacearum</i> mediante pruebas fenotípicas y bioquímicas.	57
Aislamiento de microorganismos potencialmente antagonistas	59
Evaluación la respuesta antagonista	60
Viabilidad in vitro de la cepa de <i>Ralstonia solanacearum</i>	76
Caracterización de microorganismos antagonistas efectivos contra <i>Ralstonia Solanacearum</i>	76
Discusión	84
Capítulo V: Conclusiones	88
Capitulo VI: Recomendaciones	88
Bibliografía	89

Índice de tablas

Tabla 1.	<i>Escala para evaluación de la viabilidad de R. solanacearum.....</i>	56
Tabla 2.	<i>Identificación de Ralstonia solanacearum mediante pruebas fenotípicas y bioquímicas.....</i>	58
Tabla 3.	<i>Caracterización fenotípica y bioquímica de Bacillus spp.....</i>	76
Tabla 4.	<i>Caracterización fenotípica y bioquímica de Bacillus spp.....</i>	77
Tabla 5.	<i>Caracterización fenotípica y bioquímica de Bacillus spp.....</i>	77
Tabla 6.	<i>Caracterización fenotípica y bioquímica de Actinomicete spp.....</i>	78
Tabla 7.	<i>Caracterización fenotípica y bioquímica de Pseudomona spp.....</i>	79
Tabla 8.	<i>Caracterización fenotípica y bioquímica de Pseudomona spp.....</i>	80
Tabla 9.	<i>Caracterización fenotípica y bioquímica de Pseudomona spp.....</i>	81
Tabla 10.	<i>Caracterización fenotípica y bioquímica de Tricoderma spp.</i>	81
Tabla 11.	<i>Caracterización fenotípica y bioquímica de Tricoderma spp.</i>	82
Tabla 12.	<i>Caracterización fenotípica y bioquímica de Penicillium spp.</i>	82
Tabla 13.	<i>Caracterización fenotípica y bioquímica de Metharizium spp.....</i>	83
Tabla 14.	<i>Caracterización fenotípica y bioquímica de Beauveria spp.</i>	83

Índice de figuras

Figura 1.	Morfología virulenta y avirulenta en cultivo de <i>R. solanacearum</i>	23
Figura 2.	Prevalencia de <i>R. solanacearum</i> en el mundo.....	24
Figura 3.	Hoja candela afecta por <i>R. solanacearum</i> en Musa AAA y Musa AAB	28
Figura 4.	Síntomas de moko en pseudotallo en Musa AAA y Musa AAB	29
Figura 5.	Síntomas de moko en raquis en Musa AAA y Musa AAB	30
Figura 6.	Enfermedad del Moko tanto en los racimos como en los frutos en Musa AAA y Musa AAB.....	30
Figura 7.	Síntomas de moko en cormo (Rizoma) en <i>Musa AAA</i> y <i>Musa AAB</i>	31
Figura 8.	Prueba de flujo bacteriano	36
Figura 9.	Cepa de <i>R. solanacearum</i> en medio selectivo TTC	45
Figura 10.	Cepa CA01, Tiempo vs porcentaje de colonización.....	61
Figura 11.	Cepa CA02, Tiempo vs porcentaje de colonización.....	62
Figura 12.	Cepa CA03, Tiempo vs porcentaje de colonización.....	63
Figura 13.	Cepa CA05, Tiempo vs porcentaje de colonización.....	64
Figura 14.	Cepa CA06, Tiempo vs porcentaje de colonización.....	65
Figura 15.	Cepa CA04, Tiempo vs porcentaje de colonización.....	66
Figura 16.	Cepa CA09, Tiempo vs porcentaje de colonización.....	67
Figura 17.	Cepa CA10, Tiempo vs porcentaje de colonización.....	68
Figura 18.	Cepa CA11, Tiempo vs porcentaje de colonización.....	69
Figura 19.	Cepa CA13, Tiempo vs porcentaje de colonización.....	70
Figura 20.	Cepa CA08, Tiempo vs porcentaje de colonización.....	71
Figura 21.	Cepa CA12, Tiempo vs porcentaje de colonización.....	72

- Figura 22.** Comparación porcentajes de Colonización mediante la prueba de Kruskal - Wallis **73**
- Figura 23.** Respuesta antagonista - Colonización (%) vs. Cepas Antagonista **74**
- Figura 24.** Comparación porcentajes de Colonización mediante la prueba de Kruskal - Wallis de las cepas CA02, CA04, CA10..... **75**

Resumen

La bacteria *Ralstonia solanacearum*, conocida como Moko, es un patógeno devastador que causa la marchitez bacteriana en plantas, con un alto impacto en cultivos económicos como las musáceas y plantas ornamentales. Su distribución global y resistencia a métodos de control químico tradicionales representan una amenaza significativa para la economía agrícola de todos los países productores de las especies vegetales que afecta este fitopatógeno.

Ecuador es un destacado exportador de musáceas, y la enfermedad del Moko ha comenzado a afectar la producción y comercialización en el país. La erradicación total de las plantas afectadas es la medida recomendada por el organismo gubernamental AGROCALIDAD, pero su eficacia, sin embargo, se ve limitada por la resistencia bacteriana a tratamientos químicos y restricciones ambientales.

Esta tesis se centra en la búsqueda de soluciones sostenibles mediante el control biológico de *R. solanacearum*. Se aislaron doce cepas de microorganismos potencialmente antagonistas de diversas fuentes y se evaluó su capacidad de inhibición in vitro mediante técnicas de inhibición como cultivos duales y placa de agar perforado. Tres cepas (CA02, CA04 y CA10) demostraron una respuesta antagonista significativa.

La tasa de extensión radial y el porcentaje de colonización se utilizaron como indicadores clave de la capacidad antagonista de estas cepas. CA10 mostró la mayor capacidad de inhibición, seguida por CA04 y CA02.

Este estudio contribuye al desarrollo de estrategias de manejo más sostenibles de la enfermedad del Moko en los cultivos de musáceas en Ecuador y ofrece una alternativa prometedora a los métodos químicos tradicionales.

Palabras clave: *R. solanacearum*, *Ralstonia*, Moko, antagonismo.

Abstract

The bacterium *Ralstonia solanacearum*, known as Moko, is a devastating pathogen causing bacterial wilt in plants, with a significant impact on economically important crops such as bananas and ornamental plants. Its global distribution and resistance to traditional chemical control methods pose a substantial threat to the agricultural economies of all countries producing the plant species affected by this phytopathogen.

Ecuador is a prominent exporter of bananas, and the Moko disease has begun to impact production and trade in the country. The recommended measure by the governmental body AGROCALIDAD is the complete eradication of affected plants. However, its effectiveness is hampered by bacterial resistance to chemical treatments and environmental restrictions.

This thesis focuses on seeking sustainable solutions through the biological control of *R. solanacearum*. Twelve strains of potentially antagonistic microorganisms were isolated from various sources, and their inhibitory capacity was assessed in vitro using techniques such as dual cultures and perforated agar plates. Three strains (CA02, CA04, and CA10) demonstrated a significant antagonistic response.

Key indicators of antagonistic capacity, such as radial extension rate and colonization percentage, were employed. CA10 exhibited the highest inhibitory capability, followed by CA04 and CA02.

This study contributes to the development of more sustainable management strategies for Moko disease in banana crops in Ecuador, providing a promising alternative to traditional chemical methods.

Keywords: *R. solanacearum*, *Ralstonia*, Moko, antagonism.

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

Ralstonia solanacearum, comúnmente conocida como Moko, es un agente patógeno que ha sido identificado como la causa principal de la marchitez bacteriana en plantas. Esta devastadora enfermedad tiene la capacidad de diezmar hasta el 100% de una plantación infectada (Bull, 2010). Esta bacteria Gram-negativa tiene un impacto directo en varios cultivos de importancia económica, como las Musáceas, Solanáceas y ciertas plantas ornamentales (Sánchez, 2021). Se ha documentado su capacidad para infectar más de 200 hospederos pertenecientes a 50 familias botánicas distintas (Denny, 2007), convirtiéndola en la segunda bacteria fitopatógena más destructiva a nivel mundial y generando graves consecuencias para la economía agrícola (Mansfield, 2012).

Durante las últimas tres décadas, esta enfermedad fitosanitaria ha sido detectada en más de 40 países en todo el mundo, abarcando casi todos los continentes, incluyendo América del Norte, América del Sur, África y Asia (Pradhanang, 2003). Esta amplia distribución se debe a la adaptabilidad de *R. solanacearum* a climas templados y regiones tropicales y subtropicales. Cabe destacar que *R. solanacearum* es un organismo biotrófico, lo que significa que puede sobrevivir tanto en plantas hospederas como en ausencia de estas, adaptando su actividad metabólica para prolongar su supervivencia (Overbeek, 2002). Además, presenta resistencia a varios de los métodos de control químico tradicionalmente utilizados para frenar su propagación (Umrao, 2021).

En Ecuador, la producción y exportación de musáceas desempeñan un papel fundamental tanto a nivel regional en Latinoamérica como en la economía mundial. Según datos recientes del MAGAP (2021), se ha registrado una cosecha de 554,212 toneladas procedentes de una extensión de 144,272 hectáreas dedicadas a este cultivo. Dentro de estas áreas, 90,101 hectáreas se destinan exclusivamente al cultivo de plátanos, mientras que 54,171 hectáreas se utilizan para prácticas de cultivo intercalado con otras especies

(MAGAP, 2021). Esto genera un ingreso anual de casi USD 3.000.000.000 (MAG, 2018).

Las principales áreas de producción se encuentran en la región costera del país, en particular en las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas (10,253 hectáreas), Los Ríos (10,809 hectáreas) y Manabí (47,869 hectáreas), como señala (Gutiérrez, 2023).

Dentro del sector de exportación de banano ecuatoriano, se destaca la producción de banano orgánico, un segmento en constante crecimiento en respuesta a la creciente demanda de estos productos por parte de los países desarrollados, quienes siguen prácticas de consumo más sostenibles (Villanueva, 2020) (Estrada Martínez, 2017). A nivel nacional, la producción orgánica de bananos (*Musa AAA*) y plátanos (*Musa AAB*) abarca aproximadamente el 9% de la superficie total del territorio, lo que equivale a unas 15,399.06 hectáreas y cuenta con la participación de 807 agricultores, según el informe del INIAP de 2022.

Es importante destacar que existen diversas variedades de musáceas comestibles que se comercializan a nivel mundial, y estas se clasifican en grupos genómicos diferentes, como AAA, AA, AAB, AB, ABB, AAAA, BB, AAAB y AB BB, como lo señaló Aguirre en 2006. Esta designación, que incluye letras como "AA" o "ABB", se refiere a la ploidía de las plantas, es decir, al número de juegos de cromosomas presentes en sus células (Giraldo, 2011).

El cultivo de banano (*Musa AAA*) desempeña un papel agrícola de vital relevancia en la economía nacional. Ecuador, reconocido como líder mundial en la exportación de banano, contribuye significativamente al mercado global con alrededor del 30% de la oferta total (Camino, 2018). Este sector tiene un peso significativo en la economía del país, representando aproximadamente el 15% del valor total de las exportaciones y posicionándose como el segundo rubro más relevante en los envíos internacionales de Ecuador. Este logro se debe a la demanda constante de consumidores en mercados altamente exigentes y a la presencia cotidiana de estos productos en la alimentación de millones de personas en todo el mundo (PROECUADOR, 2022).

Según los datos del Observatorio Estadístico del Banano (OEB), parte de la Asociación de Exportadores de Banano de Ecuador (AEBE) en 2022, las exportaciones de banano desde Ecuador alcanzaron un total de 354.60 millones de cajas durante ese año, como se reportó en el informe de la AEBE (2022). Esto representó una disminución del 6.57% en comparación con el año anterior, cuando se exportaron 379.54 millones de cajas (EFEagro, 2023). En términos de ingresos generados por estas exportaciones, según estadísticas de Pulso Bananero, las ventas de banano en 2022 ascendieron a 2,662 millones de dólares FOB para el país (Handelskammer, 2023). Los beneficios derivados de la industria del banano representan el 3.84% del Producto Interno Bruto total, contribuyendo con el 50% del Producto Interno Bruto agrícola y conformando el 20% de las exportaciones privadas nacionales (AEBE, 2022).

El cultivo de plátano (*Musa AAB*) es de gran relevancia a nivel mundial. Clasificado como el quinto cultivo más importante en el mundo, se ubica después del arroz, el trigo, el maíz y la papa en términos de importancia (Giraldo, 2011). Es una fuente fundamental de alimento en naciones tropicales en desarrollo, desempeñando un papel crucial en las economías locales e internacionales. Además, representa una fuente significativa de empleo y generación de ingresos (Camino, 2018). Es evidente que el enfoque en el crecimiento sostenible de la producción de plátanos y bananas radica en la utilización de variedades resistentes (Portal, 2011)

Ecuador ocupa el segundo lugar en la lista de naciones exportadoras de plátano, contribuyendo con aproximadamente el 17% de las importaciones globales de esta fruta. El plátano desempeña un papel fundamental en el respaldo socioeconómico y la seguridad alimentaria del país. Este sector es responsable de brindar empleos tanto permanentes como temporales (PROECUADOR, 2022).

En Ecuador, la enfermedad del Moko está presente desde la década de los 70 (Intriago, 1988). Aunque inicialmente estaba principalmente confinada a la región amazónica, su aparición en la provincia de Manabí, en la región costera del país, ha convertido esta enfermedad en una preocupación creciente para los actores de la cadena de producción, incluyendo a los productores y exportadores (Delgado, 2014). Es imperativo investigar opciones de manejo antes de que la enfermedad se expanda aún más, como la consideración de clones que muestren resistencia o tolerancia a esta bacteria.

Justificación del Problema

La medida recomendada para controlar la enfermedad del Moko causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum* en los cultivos de plátano y banano es la erradicación total de las plantas afectadas, según lo indicado por AGROCALIDAD en 2021. Esta práctica sigue la Norma Internacional sobre Medidas Fitosanitarias No. 4 de la FAO para la eliminación de plagas en un área (FAO, 1995). Implica delimitar un área de 25 m² alrededor de la o las plantas que presenten síntomas de la enfermedad del Moko y proceder a la erradicación y desinfección de toda esa zona delimitada, conforme a las directrices de AGROCALIDAD (2021).

Para la erradicación de las plantas infectadas, se administra una solución helicoidal de glifosato al 20% (con una concentración del producto de 480 g/l) en el pseudotallo utilizando una jeringa graduada. La cantidad a aplicar se determina según la edad y altura de la planta, variando entre 50 ml para ejemplares adultos y 30 ml para plántulas, de acuerdo con las pautas de la FAO (1995). Si se detectan rebrotes de plántulas filiales en esta área, es necesario aplicar la solución de glifosato al 20% en la cantidad recomendada, según lo indicado por ICA (2013). Además, la zona donde se identificó la enfermedad debe permanecer sin cultivo durante un período recomendado que varía de seis meses a un año antes de proceder a la resiembra de musáceas (Camino, 2018). Según Veloz (2015), las cepas de *Ralstonia solanacearum* pueden sobrevivir en el suelo de 6 a 18 meses debido a

mecanismos como la producción de polisacáridos extracelulares (EPS), enzimas extracelulares y variabilidad genética que ralentizan su metabolismo, lo que les permite persistir en un hospedero durante varios meses sin mostrar síntomas.

Lamentablemente, en los últimos 10 años, se ha observado que el uso de tratamientos químicos como pesticidas y antibióticos para controlar la enfermedad y la bacteria ha llevado al desarrollo de poblaciones bacterianas resistentes, lo que resulta en tratamientos ineficaces y pérdidas significativas de dinero, como informan Saquicela et al. (2023). Además, muchos de los productos químicos utilizados para el control del Moko tienen restricciones gubernamentales, como los compuestos de cobre, debido a su impacto ambiental y sus efectos adversos en la salud humana, que incluyen problemas respiratorios, inflamación y riesgos graves con exposiciones prolongadas (Umrao, 2021).

Desde 2017, en Ecuador, la producción de alimentos orgánicos se rige por normativas especiales que aseguran que estos productos no contienen productos químicos agrícolas como pesticidas o agroquímicos, lo que promueve la sostenibilidad ambiental y fomenta una cadena de producción ética y responsable, como establece AGROCALIDAD (2023). Por lo tanto, tratar la enfermedad del Moko en este tipo de cultivos con los métodos convencionales y recomendados no es una solución adecuada.

Los mecanismos de control biológico son herramientas ideales para manejar fitopatógenos y las enfermedades que causan, de manera eficiente, sostenible y respetuosa con el medio ambiente, mediante el uso de microorganismos vivos conocidos como antagonistas (Companioni González, 2019). Por esta razón, este estudio se centró en la evaluación de microorganismos antagonistas para el control de esta bacteria causante de la enfermedad del Moko, debido a su impacto en los cultivos de mayor importancia económica en el país, como son los cultivos de musáceas.

Objetivos del trabajo

Objetivo general

Evaluar microorganismos antagonistas para el control biológico *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*.

Objetivos específicos

Identificar *Ralstonia solanacearum* mediante pruebas fenotípicas y bioquímicas.

Aislar microorganismos potencialmente antagonistas a partir de muestras de suelo, compostaje y material vegetal utilizando medios de cultivo selectivos y diferenciales.

Evaluar la respuesta antagonista de los microorganismos seleccionados para el control biológico *in vitro* de *Ralstonia solanacearum* mediante técnicas de inhibición.

Hipótesis

Al menos uno de los microorganismos aislados a partir de muestras de suelo, compostaje y material vegetal presentan una respuesta antagonista significativamente mayor para el control biológico *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*.

Capítulo II: Marco teórico

Agente causal marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*)

La enfermedad conocida como marchitez bacteriana es causada por una bacteria llamada *Ralstonia solanacearum* (González I. A., 2009). Los primeros registros de esta enfermedad en el banano se atribuyen a (Schomburgk R. , 1840), mientras que fue Edwin F. Smith quien, en 1896, describió por primera vez la enfermedad y reconoció a la bacteria fitopatógena como su causante (Smith, 1914).

Debido a las diferencias en su material genético, *R. solanacearum* se considera una especie diversa que se agrupa en diferentes aislamientos relacionados entre sí (Perea Soto,

2011). Esto significa que, dentro de la misma especie, existen variaciones genéticas significativas entre los diferentes aislamientos o cepas que pertenecen a ella.

Perea y sus colaboradores (2023) mencionan que esta especie se ha subdividido en cinco razas, basadas en sus hospederos: raza 1, raza 2, raza 3, raza 4 y raza 5 (R1, R2, R3, R4, R5), y en seis biovars, relacionados con el metabolismo utilizado para aprovechar diferentes fuentes de carbono: Biovar 1, Biovar 2, Biovar 3, Biovar 4, Biovar 5 y Biovar 6 (Bv1, Bv2, Bv3, Bv4, Bv5 y Bv6). Esta subclasificación se conoce como clasificación intraespecífica (Perea Soto, 2011).

Clasificación Taxonómica

En 2016, Obrador realizó una clasificación taxonómica de *R. solanacearum*, ubicándola en el mundo de las bacterias, en el grupo Proteobacteria, en la categoría Betaproteobacteria. Además, la situó en el orden Burkholderiales, bajo el género *Ralstonia* y la especie *Ralstonia solanacearum* (Obrador, 2016).

Nombre común

A nivel mundial se conoce a *R. solanacearum* con el nombre común de Enfermedad del Moko, Moko del plátano o simplemente Moko por el aspecto mucoso de la colonia cuando infecta tejido vegetal. En inglés se la conoce como Moko disease of banana y en francés Maladie du moko (Lwin, 2006).

Clasificación intraespecífica de *R. solanacearum*

La clasificación intraespecífica de la bacteria *Ralstonia solanacearum* se ha llevado a cabo considerando diversos factores relacionados con las relaciones epidemiológicas, como hospedero, patogenicidad, distribución geográfica, así como propiedades fisiológicas y metabólicas. De acuerdo con estos conceptos, se han definido dos niveles de clasificación: las razas y los biovars (Hayward, 1991).

Las razas se refieren al grado de especialización patogénica que la bacteria muestra al interactuar con especies vegetales específicas. En total, se han identificado cinco razas distintas:

1. ***R. solanacearum* raza 1:** Ataca a un amplio grupo de solanáceas, incluyendo tabaco (*Nicotiana tabacum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), olivo (*Olea europaea*) y berenjena (*Solanum melongena*) (Rueda-Puente, 2014).
2. ***R. solanacearum* raza 2:** Ataca a plantas de la familia Musáceas y Heliconias (Veloz, 2015).
3. ***R. solanacearum* raza 3:** Especializada en atacar principalmente a la papa (*Solanum tuberosum*), aunque también puede afectar a otras solanáceas (Patrice, 2009).
4. ***R. solanacearum* raza 4:** Afecta al jengibre (*Zingiber officinale*) (Veloz, 2015).
5. ***R. solanacearum* raza 5:** Estudios realizados en China han demostrado que esta raza afecta a la mora (*Rubus spp.*) (Veloz, 2015).

El concepto de biovar se basa en las propiedades fisiológicas y metabólicas de cada microorganismo. Esto incluye la capacidad de oxidar y reaccionar con ciertos compuestos químicos, así como utilizar ciertos azúcares como fuentes de energía (Hayward, 1991).

Morfología de *Ralstonia solanacearum*.

Esta bacteria es un bacilo Gram-negativo, aeróbico, móvil, no fluorescente, que mide 0,5-0,7 x 1,5-2,0 μm , posee de uno a cuatro flagelos polares, sin embargo, la presencia de flagelos y la motilidad está directamente relacionada con el tipo de colonia y la edad del cultivo bacteriano, la temperatura óptima a la que puede sobrevivir va desde los 10.35 °C y máximo 41 °C (Álvarez, 2013).

La cepa virulenta se distingue por tener una superficie lisa con bordes irregulares y un aspecto más fluido. Se caracteriza por una mayor producción de polisacáridos

extracelulares. En contraste, la cepa mutante o no virulenta presenta una superficie más rugosa con bordes regulares y redondeados. Su apariencia no es fluida, sino más bien seca, lo que dificulta su identificación en el campo (Sánchez Jorgge, 2021).

Figura 1.

Morfología virulenta y avirulenta en cultivo de R. solanacearum



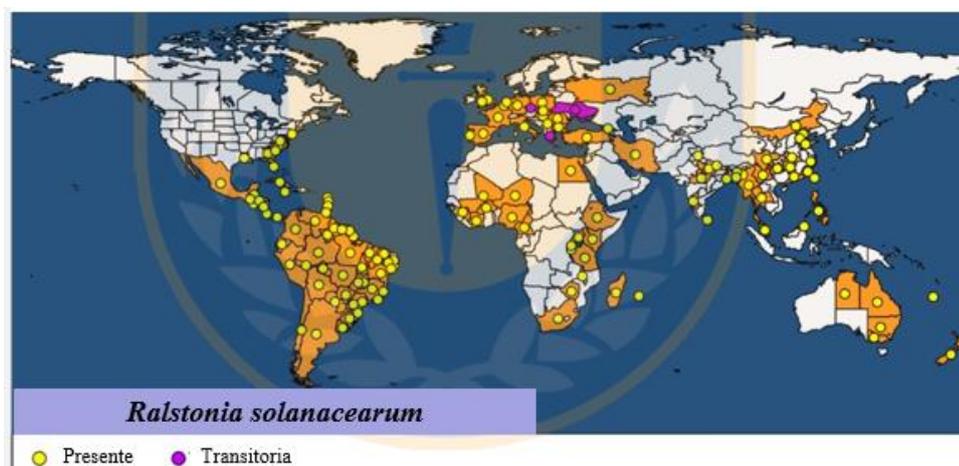
Nota. En el medio de cultivo Potato Dextrosa Agar, se pueden observar colonias de *Ralstonia solanacearum* con diferentes niveles de virulencia: a la izquierda las colonias virulentas y a la derecha las avirulentas. (Companioni González, 2019).

Distribución geográfica

Tras describir las características de la bacteria, es importante destacar que una vez esta bacteria ha afectado a los cultivos de una zona, región o país, las posibilidades de diseminación son múltiples. La bacteria puede propagarse a través de diversos medios, como el agua de riego que contenga la bacteria, plántulas infectadas, labores agrícolas o suelo infectado, ya que puede actuar como patógeno edáfico y persistir en él sin un hospedador específico (Hernández, 2009).

Figura 2.

Prevalencia de R. solanacearum en el mundo.



Nota: Es importante destacar la presencia de la bacteria en los países marcados con un punto amarillo. (AGROCALIDAD, 2021).

La enfermedad del Moko se encuentra presente en diversos continentes y países. En América, se ha registrado en Estados Unidos (Florida), así como en varios países de Centroamérica, incluyendo Belice, Costa Rica, Honduras, Guatemala, El Salvador, Trinidad y Tobago, Jamaica, Nicaragua, Panamá y Guayana Francesa. También se ha observado en Colombia, Ecuador, Perú, Surinam, Brasil (específicamente en las regiones de Amazonas y Bahía) y Venezuela. En Asia, se ha identificado en países como Malasia (tanto en Sabah como en la península de Malasia), Vietnam, Indonesia, Filipinas, Tailandia, y en algunas áreas de la India como Bengala occidental y Tamil Nadu. Además, la enfermedad del Moko ha sido reportada en África, abarcando países como Senegal, Libia, Etiopía y Nigeria (International, 2019).

Distribución en el Ecuador

La enfermedad del Moko hizo su primera aparición en Ecuador en la región amazónica, específicamente en la provincia de Napo, en el año 1978, según se documenta en el trabajo de Intriago (1988). Hasta la fecha, se han registrado casos de esta enfermedad en varias provincias, incluyendo Esmeraldas (AGROCALIDAD, Agencia ecuatoriana de

aseguramiento de la calidad del agro. Obtenido de Informe de Rendición de Cuentas – 2014, 2015), Sucumbíos (AGROCALIDAD, 2014) (AGROCALIDAD, Agencia ecuatoriana de aseguramiento de la calidad del agro. Obtenido de Guía de Campo Plagas Cuarentenarias, 2014) y Manabí (Delgado, R., Morillo, E., Buitrón, J., Bustamante, A., & Sotomayor, I., 2014), siendo Manabí la provincia más afectada por la enfermedad. Existe la suposición de que la bacteria podría haber sido introducida a través de material de propagación importado desde Colombia, ya que se tenía conocimiento de la existencia de esta enfermedad en Colombia desde la década de los 60, como indican Castañeda y Espinosa (2005).

Características de la marchitez bacteriana (Moko)

Medios de dispersión

- a. Herramientas de trabajo: Cualquier material que haya estado en contacto con una planta enferma o haya tocado una superficie que contenga la bacteria, como machetes, cuchillos, y chuzos de apuntalar (utilizados en la siembra y que consisten en un palo con una punta en uno de sus extremos, según la ASALE, 2023). Estos instrumentos pueden actuar como medios de dispersión de la enfermedad.
- b. Material vegetativo contaminado: El movimiento de rebrotes, cormos o maleza puede propagar fácilmente el fitopatógeno de una planta infectada a otra (Sánchez Jorgge, M., 2021).
- c. Suelo contaminado: Zapatos, botas de trabajo y maquinaria pueden transportar suelo contaminado por la bacteria a áreas que están libres de la enfermedad. Tanto las herramientas como el suelo son las principales causas de dispersión de la enfermedad entre fincas productoras de banano y plátano (AGROCALIDAD, 2021).
- d. Agua contaminada: Normalmente, esta forma de dispersión ocurre en dos situaciones: en primer lugar, cuando se utiliza agua de riego que contiene la bacteria y, en segundo lugar, durante inundaciones, ya que la bacteria es arrastrada por el

agua desbordada, contaminando áreas previamente libres de la enfermedad (AGROCALIDAD, 2015)

- e. Insectos vectores: Este método de dispersión es menos común. Sin embargo, si una planta ha sufrido alguna lesión o corte que permita que la bacteria se exponga fuera de la planta, un insecto podría servir como vector para transportar la bacteria e infectar otras áreas (Sánchez, 2021).

Proceso de Infección

Una vez que la planta ha sido infectada e invadida por *Ralstonia solanacearum*, la bacteria se desplaza a través del sistema vascular de la planta. Este proceso se ve directamente influenciado por las temperaturas ambientales; a medida que la temperatura aumenta, la propagación de la bacteria a través de los haces vasculares también se incrementa. (Veloz, 2015).

La capacidad de movimiento y distribución dentro de la planta está determinada por el tejido vegetal que ha sido colonizado por la bacteria. La movilidad y dispersión dentro del organismo vegetal se ven influenciadas por la estructura y composición del tejido que ha sido invadido por *Ralstonia solanacearum* (Ono, K., Hara, H. y Akazawa, J., 1984)

Este proceso de movilidad y colonización de la bacteria en el sistema vascular de la planta es un factor clave en el desarrollo de la marchitez bacteriana y puede ser de gran importancia para entender la patogénesis de la enfermedad y desarrollar estrategias de control efectivas. Las condiciones ambientales, como la temperatura, y las características del tejido vegetal desempeñan un papel fundamental en la propagación y la severidad de la infección. Comprender estos mecanismos puede ayudar a los agricultores a tomar medidas adecuadas para prevenir y controlar la diseminación de la enfermedad en sus cultivos (Ono, K., Hara, H. y Akazawa, J., 1984)

Cuando la bacteria ha colonizado completamente el xilema de la planta, el factor de patogenicidad, es decir, la capacidad del microorganismo para provocar la enfermedad,

lleva a la degradación de la pared celular de estos vasos, así como de los parénquimas adyacentes y todo el tejido cortical (CAEICDA, 1996).

Sintomatología y daños

Ralstonia solanacearum provoca diferente sintomatología en cada especie perteneciente a la familia de las Musáceas, acorde al sistema de infección. Lo que incluye el punto por el cual ingresa el patógeno en la planta, órgano al cual afecta y medio de transmisión (AGROCALIDAD, 2021).

Hojas

La sintomatología y los daños causados por *Ralstonia solanacearum* son de especial interés en el contexto de la producción de banano. La hoja candela, también conocida como hoja bandera o primera hoja, corresponde a la hoja más joven de la planta del banano.

Cuando esta hoja se infecta con el fitopatógeno, muestra un amarillamiento gradual que la torna amarillo-verdosa y se debilita hasta que se quiebra en la unión del limbo con el peciolo (AGROCALIDAD, 2021). Con el avance de la enfermedad, las hojas inferiores experimentan marchitamiento y desecación, presentando bandas amarillas con márgenes oscuros en los bordes. Finalmente, la hoja más prominente, conocida como bandera, junto con las plantas jóvenes de banano, sucumbe a la enfermedad (Sánchez, 2021).

Figura 3.

Hoja candela afecta por R. solanacearum en Musa AAA y Musa AAB



Nota: La imagen fue capturada a partir del "Plan de Acción para el Control de *Ralstonia solanacearum* raza 2", tal como se presenta en el recurso proporcionado por AGROCALIDAD (2021).

Pseudotallo

Después de la detección del amarillamiento en las hojas, se produce una coloración café oscura en el pseudotallo, específicamente en los haces vasculares (Sánchez Jorgge, 2021). Este oscurecimiento se debe al taponamiento de los haces por sustancias poliméricas extracelulares secretadas por *R. solanacearum* (AGROCALIDAD, 2021). En general, en las plantas que no tienen racimos, es común observar que los haces vasculares afectados se agrupan en la parte externa del pseudotallo, lo que sugiere su compromiso (SAGARPA, 2016).

Figura 4.

Síntomas de moko en pseudotallo en Musa AAA y Musa AAB



Nota: Plan de Acción para el Control de Ralstonia solanacearum raza 2 Síntomas de moko en pseudotallo" AGROCALIDAD, 2021) (SENASICA, 2013)

Raquis

Para detectar signos de infección en el raquis en *Musa AAA* y *Musa AAB*, se requiere realizar un corte transversal del mismo. En este proceso, se pueden observar puntos o manchas de coloración que varían de rojiza a café oscuro. Es en estos puntos donde la bacteria llega al racimo y al fruto (Sánchez, 2021). Por otro lado, si se realiza un corte longitudinal, se pueden identificar obstrucciones oscuras en los haces vasculares (Martínez Garnica, A., & García Rubio, F., 2003). Además, la diseminación de la enfermedad puede ocurrir de manera iatrogénica, es decir, debido al uso de herramientas de trabajo contaminadas con la bacteria que causa la enfermedad, o mediante insectos que se posan en plantas enfermas (Prieto Romo, J., Morales Osorio, JG, & Salazar Yepes, M., 2012).

Figura 5.

Síntomas de moko en raquis en Musa AAA y Musa AAB



Nota: Fotografía tomada de Plan de Acción para el Control de *Ralstonia solanacearum* raza 2 (AGROCALIDAD, 2021).

Racimo y frutos

El primer síntoma indicativo que la enfermedad llegó al fruto es la deformación y pudrición del mismo. En primera instancia cuando la enfermedad se llega a presentar en el racimo, la cascara cambia su coloración a amarilla rojiza, para posteriormente secarse y tornarse una coloración negra, evidenciando necrosis total en los frutos (Martinez Garnica, A., & García Rubio, F., 2003).

Figura 6.

Enfermedad del Moko tanto en los racimos como en los frutos en Musa AAA y Musa AAB



Nota: Fotografía toma de Plan de Acción para el Control de *Ralstonia solanacearum* raza 2 (AGROCALIDAD, 2021).

Cormo (Rizoma)

Se realiza un corte transversal del cormo, donde se evidencia dos fenómenos: coloración oscura en los haces vasculares infectados y la presencia de una circunferencia de color marrón oscura, la cual separa la zona central de la zona donde se forman las raíces de la planta (AGROCALIDAD, 2021).

Figura 7.

Síntomas de moko en cormo (Rizoma) en Musa AAA y Musa AAB



Nota: Fotografía toma de Plan de Acción para el Control de *Ralstonia solanacearum* raza 2 (AGROCALIDAD, 2021).

Control

El control de esta enfermedad mediante agentes químicos se ha mostrado ineficaz, y el uso de antibióticos resulta en un gasto desmesurado. Además, el uso de estos productos puede afectar la calidad del fruto y causar daños a otros microorganismos beneficiosos que habitan en las zonas afectadas y que no representan una amenaza para los cultivos.

Estas poblaciones de microorganismos propios del suelo y del ambiente en general también se ven afectadas por el aumento en las dosis, que normalmente se consideran como alternativas para el control de esta enfermedad (Rueda-Puente, 2014).

Varias investigaciones señalan que *R. solanacearum* ya es resistente a un gran número de bactericidas, antibióticos y productos químicos a nivel de campo como, antibióticos como Kasugamicina o productos cúpricos de oxiclорuro de cobre, óxido cuproso, sulfato cúprico (Rueda-Puente, 2014). El uso prolongado de estos productos químicos ha llevado al desarrollo de resistencia por parte de esta bacteria lo que acarrea pérdidas económicas para los pequeños y grandes agricultores al igual que para los consumidores (Ramírez, A. & Mijangos, L., 1999). Por lo que este tipo de problemáticas hacen considerar medidas de control alternativas que sean eficientes, sostenibles, sustentables y amigables con el medio ambiente, como es el caso de los biocontroladores, los cuales desempeñan un con estas características.

Controlador biológico (Biocontrolador)

Los biocontroladores son organismos con la capacidad de reducir, controlar o inhibir las poblaciones de otros organismos patógenos que causan un impacto significativo en una zona específica, ya sean hongos, bacterias, nematodos u otros (Guédez, C., Castillo, C., Cañizales, L., & Olivar, R., 2008). Estos biocontroladores utilizan diversos mecanismos para controlar y frenar el desarrollo de los patógenos. Entre los biocontroladores se encuentran los organismos antagonistas, que compiten de manera específica contra el patógeno por espacio y nutrientes, empleando diversos mecanismos como el micoparasitismo, la producción de compuestos inhibidores, la secreción de enzimas, la generación de metabolitos secundarios, entre otros (Infante, D., Martínez, B., González, N. & Reyes, Y., 2009).

Los biocontroladores son organismos capaces de reducir, controlar y/o inhibir las poblaciones de otros organismos patógenos que afectan de manera significativa una zona específica, como hongos, bacterias, nematodos y otros (Guédez, C., Castillo, C., Cañizales, L., & Olivar, R., 2008). Estos biocontroladores emplean diversos mecanismos para regular y detener el desarrollo de los patógenos. Dentro de los biocontroladores, se encuentran los organismos antagonistas, que forman un grupo más específico y compiten con el patógeno

por espacio y nutrientes, utilizando varios mecanismos como el micoparasitismo, la producción de compuestos inhibidores, la secreción de enzimas y la producción de metabolitos secundarios, entre otros (Infante, D., Martínez, B., González, N. & Reyes, Y., 2009).

Antagonismo

El antagonismo, en términos biológicos, se refiere a una interacción entre dos o más organismos o especies en la cual uno de ellos ejerce un efecto negativo sobre el otro. Este efecto negativo puede manifestarse a través de la inhibición, el deterioro o incluso la muerte de un organismo debido a la acción del otro, ya sea debido a la competencia por recursos limitados o a la producción de sustancias tóxicas (Andrade-Hoyos, P., Luna-Cruz, A., Osorio-Hernández, E., Molina-Gayosso, E., 2019) (Pérez, R., González, T., & Rojas, J., 2014). En el contexto de la microbiología, los antagonistas pueden incluir hongos, virus, bacterias, nemátodos y otros microorganismos que desempeñan un papel fundamental en la regulación de las poblaciones microbianas y en la competencia por nichos ecológicos específicos.

Pruebas fenotípicas y bioquímicas para identificación de *Ralstonia solanacearum*.

Métodos de detección y diagnóstico

La metodología utilizada para la detección de esta enfermedad es sistemática, sigue un procedimiento secuencial y ofrece resultados fiables en lo que respecta a la identificación del fitopatógeno responsable del Moko. Este proceso incluye los siguientes pasos:

Aislamiento de la bacteria en medios de cultivo selectivos y diferenciales, como el Agar 2-3-5-Trifenil-2H tetrazolio (también conocido como agar TTC). Esto se realiza a partir de muestras vegetales que muestran síntomas de marchitez. Identificación y caracterización fenotípica y bioquímica de la bacteria aislada. Determinación de la patogenicidad mediante pruebas moleculares como ELISA o PCR (AGROCALIDAD, 2021). Este proceso metodológico garantiza una detección precisa y confiable del patógeno causante del Moko.

Tinción diferencial

La tinción diferencial es una técnica microbiológica e histológica utilizada en el laboratorio para distinguir y clasificar bacterias en dos grupos taxonómicos: Gram positivas y Gram negativas, basándose en su respuesta a la tinción (Trujillo, 2023). La esencia de esta metodología radica en la capacidad de las partes celulares e intracelulares para interactuar con colorantes y sustancias químicas, mejorando así la observación de las estructuras microbianas bajo el microscopio, como lo explican Salvadori y sus colegas (2023).

El procedimiento implica la aplicación secuencial y meticulosa de varios pasos, que incluyen la fijación de la muestra, el uso de un colorante primario, lavados, la aplicación de un agente de fijación y un colorante de contraste o secundario (Hinojoza, 2023). Cada etapa cumple un propósito específico y contribuye a la diferenciación de los componentes celulares deseados (Savadori, P., Dalfino, S., Piazzoni, M., Parrini, M., Del Fabbro, M., Tartaglia, GM y, 2023).

Los colorantes empleados en esta técnica pueden ser de origen sintético o natural y se adhieren a componentes específicos presentes en las células, lo que proporciona contraste y permite su diferenciación (Arco, 2022). Entre las diversas técnicas de tinción diferencial, dos de las más destacadas en el campo microbiológico son la tinción Gram y la tinción ácido-alcohol. Estos métodos posibilitan la discriminación entre bacterias clasificadas como Gram-positivas y Gram-negativas (Savadori, P., Dalfino, S., Piazzoni, M., Parrini, M., Del Fabbro, M., Tartaglia, GM y, 2023).

La base química de la tinción se logra a través de cuatro soluciones: el cristal violeta, que actúa como tinte primario y se une al peptidoglicano presente en la pared celular de las bacterias; el lugol, que aumenta la afinidad del cristal violeta y el peptidoglicano; el alcohol-acetona, que decolora las bacterias Gram negativas eliminando el tinte; y la safranina, que

sirve como tinte de contraste y tiñe las bacterias Gram negativas (Delgado Rospigliosi, 2019).

La diferencia en la estructura de las paredes celulares determina la retención del tinte. Las bacterias clasificadas como Gram positivas poseen una capa de peptidoglicano más gruesa, en contraste con las Gram negativas que tienen una capa más delgada y una membrana externa lipídica adicional. En el proceso de tinción, el yodo forma una unión con el cristal violeta, que se mantiene en las bacterias Gram positivas, pero se disipa en las Gram negativas durante el proceso de decoloración con alcohol (Baidal Alvarez, 2023). La tinción de contraste realza las Gram negativas (Castañeda Alejo, 2020).

Prueba de flujo bacteriano

Esta prueba microbiológica se utiliza tanto en laboratorio como en el campo para diagnosticar bacterias que se desarrollan en los haces vasculares de las plantas, ya que utilizan este mecanismo para infectar al huésped. La base de esta prueba radica en la capacidad de ciertas bacterias para generar flujo. Esto se debe a la secreción de polisacáridos extracelulares, como el exopolisacárido (EPS), que les permite adherirse y formar una matriz viscosa. Un indicio positivo de la presencia de este tipo de microorganismos es la observación de hilos de exudado bacteriano en un medio líquido transparente, como agua destilada o solución salina (Patrice, G., 2009).

Figura 8.*Prueba de flujo bacteriano*

Nota. Se pueden observar filamentos de exudado bacteriano emergiendo de una sección transversal del tallo de una planta infectada por *R. solanacearum*. (Champoiseau, 2023).

Test de hidróxido de potasio (KOH)

Esta prueba es utilizada en microbiología para la identificación y diferenciación de ciertos tipos de microorganismos y como prueba confirmatoria de la caracterización Gram negativa. Esta técnica se basa en la capacidad que presenta el hidróxido de potasio para desnaturalizar la pared celular y liberar el material citoplasmático y el ADN, lo que produce una reacción que aumenta la viscosidad de la muestra (Sharma, 2019).

Test de catalasa

La enzima catalasa opera como una peroxidasa, desencadenando la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno a través de la reacción catalítica $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (Avila Linares, 2023). La detección de esta enzima podría sugerir la presencia de bacterias que son aerobias o anaerobias facultativas y que poseen el citocromo oxidasa en su estructura, excluyendo el caso de *Streptococcus*, según lo señalado por Aguilero (2021). Además, en microbiología, se utiliza una prueba basada en la capacidad del hidróxido de potasio para desnaturalizar la pared celular y liberar el material citoplasmático y el ADN, lo que produce una reacción que aumenta la viscosidad de la

muestra (Sharma & Singh, 2019). El principio de esta técnica se basa en el desprendimiento de burbujas cuando el peróxido de hidrógeno entra en contacto con bacterias productoras de catalasa, lo que es indicativo de una prueba positiva para catalasa.

Test de Oxidasa

En el contexto de la detección de microorganismos, una prueba bioquímica esencial es la que se utiliza para identificar la presencia de la enzima oxidasa. Esta enzima es clave en la oxidación del citocromo, un proceso que involucra la reducción del oxígeno molecular y, dependiendo de la especie bacteriana presente, puede generar peróxido de hidrógeno o agua, como se explica detalladamente en el trabajo de Espinal (2005). Los átomos de oxígeno desempeñan un papel crucial como aceptores finales de electrones en la cadena de transporte de electrones, como se menciona en la investigación de Iza (2023).

La reacción química que se produce en esta prueba se inicia con el sustrato 4-amino-N-dimetil-anilina (PADMA), que es oxidado por la enzima citocromo oxidasa. La representación química completa de esta reacción de oxidasa se describe de la siguiente manera: $\text{PADMA} + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{PADMA-ox} + \text{H}_2\text{O}$, como se informa en el estudio de Guerra et al. (2023). Un resultado positivo en esta prueba se confirma mediante un cambio de coloración, generalmente hacia tonos púrpura o azul oscuro, mientras que un resultado negativo se establece cuando no se observa ningún cambio de color, según lo indica Espinal (2005).

Es importante destacar que, en su mayoría, el sistema de citocromo oxidasa se encuentra en las bacterias aerobias. Sin embargo, es necesario mencionar que este no es el caso del género *Ralstonia*, que en su mayoría presenta un resultado negativo en la prueba de oxidasa, con la notable excepción de *Ralstonia picketti*, que se ha reportado como positiva para la oxidasa, como se señala en el trabajo de Tejera et al. (2016). Esta característica distintiva es relevante en el contexto de las pruebas bioquímicas para la detección de *Ralstonia* y contribuye a nuestro entendimiento de las características únicas de este género bacteriano.

Prueba Simmons Citrato Agar

Además de las pruebas de oxidasa y catalasa discutidas anteriormente, otra herramienta bioquímica fundamental utilizada en la detección y caracterización de bacterias, incluyendo el género *Ralstonia*, es la prueba que evalúa la utilización de compuestos amoniacales como fuentes de nitrógeno y el citrato como fuente de carbono. Esta prueba, conocida por su capacidad para discernir las preferencias metabólicas de los microorganismos, se basa en el principio de alcalinización del medio de cultivo.

En esta prueba, se utiliza un indicador de pH, en este caso, azul de bromotimol, que se incorpora en el medio de cultivo. Cuando un organismo es capaz de utilizar compuestos amoniacales como fuente de nitrógeno y citrato como fuente de carbono, este metabolismo resulta en la liberación de iones alcalinos, lo que provoca un aumento en el pH del medio. El cambio de coloración observable es de particular importancia; el medio, inicialmente verde, virará a un tono azul, lo que se considera un resultado positivo en la prueba, según lo detalla Espinal (2005).

Esta prueba bioquímica no solo es valiosa por sí misma, sino que también proporciona información complementaria sobre las capacidades metabólicas de las bacterias, lo que puede ser útil para identificar y caracterizar a las diferentes especies dentro del género *Ralstonia*. Al combinar esta prueba con las pruebas de oxidasa y catalasa mencionadas previamente, se obtiene un enfoque integral para la detección y diferenciación de estas bacterias, contribuyendo así a una comprensión más completa de su biología y ecología (Espinal, 2005).

Prueba de Lisina hierro Agar

Junto con las pruebas de oxidasa, catalasa y la capacidad de utilizar compuestos amoniacales y citrato como fuentes de nitrógeno y carbono, respectivamente, otro aspecto importante en la identificación de bacterias, incluyendo las del género *Ralstonia*, es la prueba de descarboxilasa de lisina. Esta prueba se realiza en un medio de cultivo sólido que

contiene peptona, extracto de levadura, glucosa y lisina como sustrato, y utiliza indicadores específicos para evaluar la actividad enzimática.

El cambio de coloración del medio de cultivo es una característica clave de esta prueba. Cuando los microorganismos fermentan la glucosa, acidifican el medio, lo que resulta en un cambio de color del púrpura inicial al amarillo, como se describe en la investigación de Rodríguez y colaboradores (2017). La actividad enzimática de la lisina descarboxilasa se favorece en un ambiente ácido, lo que conduce a la conversión de la lisina en cadaverina y la liberación de dióxido de carbono, aumentando el pH del medio y cambiando su coloración hacia tonos púrpura o violetas. Por otro lado, los microorganismos que fermentan la glucosa pero carecen de actividad de lisina descarboxilasa producen un cambio total en la tonalidad del medio, tornándolo amarillo.

Después de 24 horas de incubación, es posible observar una coloración amarilla en la parte inferior del tubo, mientras que la superficie adquiere un tono violeta, indicando el agotamiento de peptonas y un aumento en la alcalinidad, como se informa en el trabajo de Rodríguez et al. (2017). La producción de sulfuro de hidrógeno se manifiesta mediante la formación de sulfuro de hierro, lo que se puede identificar por el oscurecimiento del medio de cultivo.

Esta prueba es positiva cuando la superficie se torna alcalina y la profundidad alcalina (pico violeta/fondo violeta) indica una descarboxilación exitosa de la lisina por parte del microorganismo. Por otro lado, se considera negativa si la superficie es alcalina y la profundidad ácida (pico violeta/fondo amarillo) indica que no hubo descarboxilación de la lisina por parte del microorganismo. Esta prueba, junto con las anteriores, contribuye a una caracterización más precisa de las bacterias, incluyendo las del género *Ralstonia*, y facilita su identificación en el laboratorio.

Test de Ureasa Agar Base

Complementando las pruebas previamente mencionadas, otra evaluación bioquímica esencial en la identificación de bacterias, incluyendo aquellas pertenecientes al género *Ralstonia*, se basa en la capacidad de un organismo para descomponer la urea. Esta reacción es catalizada por la enzima ureasa y resulta en la generación de dos moléculas de amoníaco, junto con una molécula de dióxido de carbono, como se describe en el trabajo de Espinal (2005).

El cambio de coloración en el medio de cultivo es una característica distintiva de esta prueba. Las bacterias que hidrolizan la urea provocan un viraje de coloración, gracias al uso de un indicador de pH como el rojo de fenol. Este indicador inicialmente tiñe el medio de amarillo pálido, pero en presencia de amoníaco liberado por la acción de la ureasa, el medio cambia a un tono fucsia, lo que indica un resultado positivo en la prueba, según lo señala Espinal (2005).

La prueba de ureasa, junto con las pruebas previamente mencionadas, se convierte en una herramienta valiosa para la identificación integral de bacterias, incluyendo aquellas del género *Ralstonia*. Al evaluar una serie de características bioquímicas clave, los microbiólogos pueden obtener una imagen más completa de la biología y el metabolismo de estas bacterias, lo que contribuye a su detección y diferenciación en entornos de laboratorio.

Prueba Motilidad-Indol-Ornitina descarboxilasa (MIO Medio)

Las tres pruebas son efectuadas en un único medio de cultivo semisólido que es altamente nutritivo debido a la inclusión de extracto de levadura, peptona y triptona:

Motilidad. Si la bacteria tiene mecanismo de motilidad se observará turbidez y una nubosidad más allá de la línea de siembra en el medio 24 horas después de la siembra en picada, lo que indica que es una bacteria motil (Ortega, 2017) (Castro, 2006).

Indol. El indol es un producto de la degradación del aminoácido triptófano, por lo que la presencia de la enzima triptófano desaminasa en la bacteria a analizar produce la hidrólisis del aminoácido y su desaminación, dando como resultado la producción de amoníaco, ácido pirúvico e indol. Para observar la presencia de indol se emplea el reactivo de Kovac's, el cual forma un anillo de coloración rojiza en la superficie del medio de cultivo, revelando como prueba positiva y negativa si se mantiene el color del activo amarillo pálido (Espinal, 2005).

Ornitina descarboxilasa. Esta técnica se utiliza para identificar la enzima ornitina descarboxilasa. El medio de cultivo empleado incluye glucosa, que es un carbohidrato fermentable, y bromocresol púrpura como indicador de pH, lo que facilita la detección de un cambio en la coloración. Si existe la presencia de un microorganismo fermentador de glucosa, el medio se acidifica lo que producen viraje del color púrpura al amarillo, sin embargo, estas condiciones de acidez favorecen a la actividad enzimática de la ornitina descarboxilasa, que reacciona con la ornitina produciendo putrescina, lo que provoca la alcalinización del medio produciendo un viraje de color a purpura. Esta prueba se reporta como positiva si el medio tiene coloración purpura y negativo si es de color amarillo (Ortega et al., 2009).

Prueba Superficie/profundidad-Producción de gas-Producción de SH₂ (TSI Agar)

Las tres pruebas son ejecutadas en un medio de cultivo sólido común que contiene extracto de carne y pluripeptona.

Los carbohidratos susceptibles de fermentación que se encuentran en el medio son glucosa, sacarosa y lactosa. La presencia de tiosulfato de sodio en el medio actúa como el sustrato esencial para la generación de ácido sulfhídrico. El sulfato de hierro y amonio provee los iones Fe³⁺ requeridos, que, al interactuar con el ácido sulfhídrico producido, conduce a la formación de sulfuro de hierro, causando un cambio en la coloración hacia tonos oscuros. Dentro del medio de cultivo, se utiliza el rojo de fenol como indicador de pH, y el cloruro de sodio se encarga de mantener la homeostasis osmótica. La metabolización

de azúcares conduce a la generación de ácidos, los cuales son identificados mediante el uso del indicador de rojo de fenol. Esto conlleva a un cambio en la tonalidad del medio, pasando de naranja a amarillo en un ambiente ácido, según se menciona en la investigación de Castro y colaboradores (2006). Para la interpretación de resultados si la superficie es alcalina y la profundidad ácida (pico rojo/fondo amarillo) indica que el microorganismo solamente fermenta la glucosa. Y se reporta como K/A.

Si la superficie es ácida y la profundidad alcalina (pico amarillo/fondo rojo) indica que el microorganismo solamente fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa. Y se reporta como A/K.

Si la superficie es alcalina y la profundidad alcalina (pico rojo/fondo rojo) indica que el microorganismo no es fermentador de azúcares. Y se reporta como A/A.

La presencia de burbujas en el medio de cultivo o la ruptura del mismo indica que el microorganismo produce gas (Castro, 2006).

Prueba Producción de SH₂-Indol-Motilidad (SIM Medio)

Las tres pruebas se realizan en el mismo medio de cultivo semisólido a base de tripteína y la peptona. La peptona tripteína es susceptible de ser metabolizada por ciertas bacterias, resultando en la producción de indol. Cuando este indol reacciona con el reactivo de Kovács, se produce un cambio de coloración en la superficie del medio de cultivo, adquiriendo una tonalidad rojiza (Anchatuña Endara, 2018). Por medio de tiosulfato de sodio las bacterias que producen sulfuro de hidrógeno (SH₂) reducen los iones de sulfato (SO₄) presentes en el medio a sulfuro de hidrógeno (SH₂). El SH₂ reacciona con el hierro presente en el medio, formando sulfuro ferroso (FeS), que es un compuesto negro insoluble que indica que la prueba es positiva (Añasco, 2023). A su vez las bacterias que producen indol hidrolizan el triptófano presente en el medio, formando ácido pirúvico y amoníaco. El ácido pirúvico se desamina y se convierte en indol. La presencia de indol se detecta mediante la adición de reactivo de Kovacs, que reacciona con el indol y forma un complejo

de color rojo lo que indica un resultado positivo (Anchatuña Endara, 2018). El agar semisólido del medio facilita la observación de la movilidad de las bacterias (Añasco, 2023).

Medios de cultivos diferenciales y selectivos

Los medios de cultivo diferenciales y selectivos son tipos de medios utilizados en microbiología para favorecer el crecimiento de ciertos microorganismos y permitir su diferenciación en base a características específicas (Apella, 2005). Los medios de cultivo selectivos permiten seleccionar el crecimiento de una especie o grupo determinado de microorganismos, mientras que inhibe el crecimiento de otros (González L. &, 2016). Estos medios incorporan elementos que promueven el desarrollo de una categoría precisa de bacterias, al mismo tiempo que restringen el crecimiento de otras variedades. Los medios de tipo selectivo tienen como propósito aislar y cultivar microorganismos concretos, como señala Chacana (2003).

Por otro lado, los medios de cultivo diferenciales tienen la función de discernir entre distintas especies de microorganismos, como indica González (2016). Estos medios contienen componentes que permiten la discriminación entre dos especies presentes en la muestra. Se utilizan con el fin de reconocer especies particulares de microorganismos y para detectar variaciones en su comportamiento, según subraya Marrero (2023). Los medios de cultivo diferenciales y selectivos son fundamentales para el aislamiento y la identificación de bacterias, hongos y levaduras ya que permiten detectar y distinguir diferentes cepas o especies dentro de una muestra, inhibiendo o limitando el crecimiento de otros microorganismos, ya que en su composición contienen antibióticos, inhibidores del desarrollo bacteriano, sales o colorantes específicos (Savadori, 2023).

Agar nutritivo (AN)

El Agar Nutritivo es un medio de cultivo ampliamente utilizado en microbiología con el propósito de aislar y cultivar microorganismos que poseen requerimientos nutricionales mínimos. Este medio está compuesto principalmente por agar, un polisacárido derivado de algas marinas, y una combinación de extractos de carne o peptona, extractos de levadura y

otros nutrientes básicos. Las principales aplicaciones para este tipo de medio es el cultivo y la conservación de cepas, resistencia a los antibióticos y sensibilidad (Fangio, 2007).

Agar Rosa Bengala + Cloranfenicol + Dichlorán (DRBC)

La combinación de los compuestos Dichlorán y Rosa de Bengala ejerce una notoria restricción tanto en la extensión como en la altura del desarrollo colonial de hongos lo que lo caracteriza como medio de cultivo selectivo. Esta medida preventiva evita que el crecimiento excesivo de algunas colonias enmascare a otras de crecimiento más lento o moderado, al mismo tiempo que facilita un recuento colonial más preciso y preciso. La presencia de Cloranfenicol, junto con un pH reducido de 5,6, impide el crecimiento de la gran mayoría de las bacterias. Este medio de cultivo demuestra una notable tolerancia al crecimiento de hongos y levaduras, lo que lo convierte en una opción idónea para la enumeración de hongos, ya sean potencialmente tóxicos o no. No obstante, no es un medio diagnóstico adecuado para la detección de productores específicos de micotoxinas (Scharalau, 2023).

Patata Dextrosa Agar (PDA)

Es un medio de cultivo nutritivo no diferencial, utilizado principalmente para el aislamiento y el cultivo de hongos. Está compuesto por extracto de patata, dextrosa y agar, que proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento de los hongos y levaduras (Fangio, 2007).

Agar 2-3-5-Trifenil-2H tetrazolio (TTC)

Es un medio de cultivo diferencial utilizado para evaluar la viabilidad y la actividad metabólica de los microorganismos. El TTC es un compuesto químico que se reduce en presencia de microorganismos activos y viables, formando un precipitado rojo insoluble. Este medio permite distinguir entre microorganismos vivos, que presentarán colonias rojas, y microorganismos no viables, que no mostrarán cambios de color. Y es empleado como medio selectivo para la identificación de *Ralstonia* spp. Cuando las bacterias respiran y están metabólicamente activas, reducen el TTC a un producto insoluble de color rojo

formazán. Este cambio de color indica la presencia de actividad metabólica y, por lo tanto, la viabilidad de las bacterias en el medio. Sin embargo, no todas las bacterias son capaces de reducir el TTC y formar el producto de color rojo. *Ralstonia* spp., en general, poseen la capacidad de reducir el TTC y generar este cambio de color característico (Sharma, 2019).

Figura 9.

Cepa de *R. solanacearum* en medio selectivo TTC



Nota. En el medio de cultivo agar TTC, se observan colonias de *Ralstonia solanacearum* que presentan virulencia. (Champoiseau, 2023).

Métodos de evaluación de microorganismos antagonistas.

Cultivos duales:

Los cultivos duales constituyen una técnica de laboratorio utilizada para investigar las interacciones entre dos microorganismos diferentes que se desarrollan en un mismo medio de cultivo. Esta técnica es ampliamente empleada en la evaluación de antagonismo, ya que permite el estudio de relaciones simbióticas, mutualistas o competitivas entre estos microorganismos, ofreciendo valiosa información sobre su comportamiento y su impacto en su entorno.

El principio subyacente en los cultivos duales radica en cultivar principalmente dos organismos distintos en un mismo medio de cultivo, aunque en ciertos estudios se pueden incorporar más microorganismos para observar sus interacciones directas o indirectas. Estos microorganismos se disponen en proximidad física, lo que facilita el contacto directo o indirecto entre ellos. A lo largo del crecimiento, se pueden observar diversos resultados y patrones, como la inhibición del crecimiento de uno por parte del otro, la estimulación mutua del crecimiento o la formación de estructuras característicamente relevantes (Morales Gallardo, 2016).

Placa de agar perforado:

La placa de agar perforado es una técnica utilizada en microbiología para investigar la movilidad y la difusión de microorganismos en un medio de cultivo sólido. Esta metodología permite la observación y el análisis de los patrones de crecimiento y la capacidad de difusión de los microorganismos a través del agar. Consiste en la creación de agujeros en el agar mediante una herramienta estéril. Estos agujeros pueden formarse en línea recta, en patrones circulares concéntricos o en cualquier disposición deseada. Los microorganismos se siembran en la superficie del agar y se colocan cerca de los agujeros perforados después de determinar su concentración adecuada para el estudio (Morales, 2016).

Capítulo III: Metodología

Ubicación del área de investigación

En el presente estudio, se abordó en la ubicación geográfica específica de los Laboratorios de AGROCALIDAD en el sector La Granja, localizado en la parroquia de Tumbaco (cabecera cantonal), perteneciente al cantón Tumbaco, ubicado en la provincia de Pichincha, en el país de Ecuador.

Ubicación Ecológica

El presente estudio se enfoca en la ubicación ecológica de los laboratorios de AGROCALIDAD, que sirvieron como el sitio de realización de la investigación sobre la evaluación de microorganismos antagonistas para el control biológico *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. Estos laboratorios están situados en un contexto identificado como Bosque Húmedo Tropical, caracterizado por su altitud a 2.300 metros sobre el nivel del mar. Dentro de este entorno, se registra una temperatura media sostenida de alrededor de 18.3 °C, mientras que la precipitación anual alcanza una cifra de 1.500 mm. La humedad relativa, se mantiene a un nivel promedio constante del 70%.

Los datos utilizados en este estudio se obtuvieron a partir del Servicio Meteorológico e Hidrológico Nacional del Ecuador – INAMHI (2023). Estos detalles geográficos y climáticos proporcionan el marco necesario para comprender el contexto ambiental en el cual se llevó a cabo la investigación.

Recolección de muestras

Las cepas de *Ralstonia solanacearum* fueron obtenidas a partir de muestras de pseudotallo, raquis y frutos de plantas de banano (*Musa paradisiaca*) que mostraban los síntomas característicos de la marchitez bacteriana. Estos síntomas incluían clorosis con bordes oscuros en las hojas, amarillamiento foliar y marchitez en raquis, tallo y fruto (AGROCALIDAD, 2021). Como prueba preliminar se realizó la prueba de flujo bacteriano que consiste en el corte transversal de una sección del raquis, tallo y fruto con síntomas de marchitez, el corte realizado fue en forma de cilindro con un diámetro aproximado de 10-15 cm y una altura de 5-10 cm. El cilindro se colocó en la superficie un recipiente transparente, lleno de agua destilada. Y se evaluó la presencia de un precipitado en forma de hilos de coloración blanquecina y de aspecto viscoso en un intervalo de tiempo de 5 a 10 minutos (Perea et al., 2011). Se tomó una pequeña muestra del precipitado y se sembró en medios de cultivo Agar papa dextrosa (PDA) o agar nutritivo (AN) para su aislamiento.

El aislamiento del cultivo de *Ralstonia solanacearum* se llevó a cabo mediante la prueba de flujo bacteriano. Se utilizó un asa estéril para tomar una muestra del precipitado blanquecino resultante de la prueba. Luego, esta muestra se sembró por estriado en medio de cultivo PDA (Agar de Papa-Dextrosa) o agar nutritivo AN (Agar Nutritivo) y se incubó en una incubadora Memmert modelo UFE-600 INE 600 a una temperatura promedio de 28 ± 2 °C durante 36 horas.

Durante el proceso de incubación, se evaluó la morfología de las colonias bacterianas. Se observaron principalmente dos tipos de morfología de colonias bacterianas. Las colonias consideradas como virulentas presentaron una apariencia blanquecina y una textura cremosa. Poseían una forma irregularmente redondeada, una consistencia fluida y un aspecto opaco. En contraste, las colonias mutantes o avirulentas se caracterizaron por ser uniformemente redondas, de menor tamaño y con una textura más seca (Blanco, 2021).

Medio de cultivo – diferencial.

Se procedió tomando de 1 a 2 colonias con un asa estéril de la cepa previamente sembrada en agar PDA y se sembraron en un medio de cultivo conteniendo cloruro de 2-3-5-Trifenil-2H tetrazolio (TTC) (Cruz, 2023). Posteriormente, se analizó la formación de colonias bacterianas que presentaban características fluidas y contornos irregulares. Estas colonias exhibieron un color blanco con núcleos de tono rosa. Este proceso tuvo lugar después de un período de incubación de 2 a 5 días a una temperatura constante de 28 ± 1 °C, como se indica en el trabajo de Flórez (2019).

Pruebas fenotípicas para identificación de *Ralstonia solanacearum*.

Tinción diferencial.

Se realizó la preparación de un frotis bacteriano tomando una colonia aislada con un asa bacteriológica y extendiéndola en un portaobjetos. Luego, se procedió a teñir el frotis con cristal violeta, dejándolo reposar durante 30 segundos. A continuación, se añadió lugol y se esperó un minuto antes de llevar a cabo la decoloración con etanol al 95% durante 20 segundos. Finalmente, se aplicó el colorante de contraste, safranina, y se permitió que

actuara durante 1 minuto. Entre cada etapa de coloración, se realizó un lavado con agua destilada. Se procedió a la evaluación bajo el microscopio con un objetivo de 100x, observando la presencia de bacterias Gram-negativas, que se caracterizan por presentar una coloración rosa-rojiza y tener una forma de bacilos con dimensiones de aproximadamente 0,5-0,7 x 1,5-2,0 μm , de acuerdo con la descripción de Perea et al. (2011).

Test de hidróxido de potasio (KOH)

La prueba de KOH se considera específica ya que confirma los resultados de la tinción diferencial. En este procedimiento, se colocaron 50 μl de KOH al 3 % (p/v) en un portaobjetos de vidrio estéril. Luego, se tomó una muestra de la bacteria con una asa bacteriológica aséptica y se transfirió a los 50 μL de KOH en el portaobjetos, homogeneizando la muestra mediante movimientos circulares. Se evaluó la viscosidad resultante, observando un aumento considerable en la misma, lo que indicó la presencia de bacterias Gram negativas, como se describe en el trabajo de Sharma & Singh (2019). Esta prueba se repitió tres veces para cada muestra, garantizando resultados consistentes y confiables.

Test de catalasa

En el desarrollo de la prueba de catalasa, se procedió a colocar 50 μl de una solución que contenía un 3 % de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sobre un portaobjetos de vidrio estéril. Posteriormente, utilizando un asa bacteriológica aséptica, se tomó una muestra de la bacteria y se transfirió cuidadosamente a los 50 μl de H_2O_2 en el portaobjetos, asegurándose de homogeneizar la mezcla. La evaluación de la producción de burbujas en la reacción entre las bacterias y el H_2O_2 fue un indicador clave en esta prueba. La observación de la presencia de burbujas se registró como una prueba positiva para la actividad de la catalasa, siguiendo las pautas establecidas en la investigación de Sharma & Singh (2019). Cabe destacar que esta prueba se realizó en triplicado para cada muestra, garantizando la obtención de resultados precisos y reproducibles.

Test de oxidasa

Se procedió a preparar una suspensión bacteriana extrayendo una muestra de una colonia del cultivo bacteriano y transfiriéndola a un tubo de ensayo que contenía 3 ml de agua estéril, asegurando la homogeneización de la suspensión. En un papel filtro estéril se aplicaron 50 µl de diclorhidrato de N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD) como reactivo de oxidasa, seguidos inmediatamente por 50 µl de la suspensión bacteriana. Esta mezcla se dejó reposar durante un período de 20-30 segundos. La evaluación se basó en el cambio de coloración del papel, que se tornaría azul o morado en presencia de interacción entre la bacteria y el reactivo de oxidasa. Se registró como prueba negativa cuando no se observó ningún cambio de coloración, de acuerdo con las pautas establecidas en la investigación de Sharma & Singh (2019). Es importante destacar que esta prueba se realizó en triplicado para cada muestra, garantizando la obtención de resultados confiables y consistentes. Pruebas bioquímicas para identificación de *Ralstonia solanacearum*.

Se utilizaron diversas pruebas bioquímicas como herramientas clave para caracterizar el microorganismo en estudio. La preparación de estas pruebas se llevó a cabo siguiendo cuidadosamente las indicaciones y recomendaciones proporcionadas para garantizar su precisión.

A través de esta metodología, se evaluaron una amplia gama de propiedades y características del microorganismo, incluyendo su capacidad de fermentación, la producción de compuestos específicos y su motilidad. La utilización de pruebas como el Simmons Citrato Agar, Lisina Hierro Agar, Ureasa Agar Base, Motilidad-Indol-Ornitina descarboxilasa (MIO Medio), Superficie/Profundidad-Producción de gas-Producción de SH₂ (TSI Agar) y Producción de SH₂-Indol-Motilidad (SIM Medio) permitió obtener un perfil completo del comportamiento bioquímico y metabólico del microorganismo, lo que contribuyó significativamente a la caracterización precisa y exhaustiva de la especie en estudio.

Aislamiento y multiplicación de las bacterias antagonistas

Para aislar posibles antagonistas, se procedió a tomar muestras de aproximadamente 1 kg de suelo, compost y estiércol vacuno. Cada muestra se homogeneizó de manera independiente y luego se extrajo una submuestra de 50 g de cada una. Estas submuestras se colocaron en matraces, cada uno conteniendo 450 ml de agua destilada estéril, y se agitaron durante 5 minutos utilizando un agitador magnético.

A continuación, se realizaron diluciones seriadas que abarcaron desde 10^{-2} hasta 10^{-6} de estas submuestras. De cada dilución, se tomaron 100 μ l, los cuales se dispusieron en la superficie de placas de Petri que contenían medio de cultivo AN. Estos 100 μ l se extendieron sobre las placas utilizando un asa estéril. Las placas resultantes se incubaron a una temperatura constante de $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante un período que osciló entre 24 y 72 horas, utilizando la misma incubadora que se empleó para las cepas de *R. solanacearum*.

Una vez concluida la incubación, se procedió a aislar y purificar cada una de las cepas obtenidas siguiendo el protocolo de López-Nieto (2020). Este proceso implicó seleccionar de manera individual las colonias más grandes y claramente diferenciadas presentes en las placas de Petri y volver a sembrarlas en nuevas placas para su posterior análisis y caracterización.

Evaluación de potenciales microorganismos antagonistas

Cultivos Duales (Cruza) para bacterias.

Para llevar a cabo este método, se procedió a sembrar *Ralstonia solanacearum* en cajas Petri que contenían medio de cultivo PDA. La siembra se realizó de manera uniforme, cubriendo toda la superficie de la caja Petri, utilizando un hisopo estéril y alcanzando una concentración de 0.5 McFarland (equivalente a 3×10^8 UFC/ml). Luego, se permitió que el cultivo reposara durante 10 a 15 segundos.

Inmediatamente después, utilizando un asa bacteriológica previamente esterilizada, se tomó una colonia de la cepa antagonista con una concentración también de 0.5 McFarland (3×10^8 UFC/ml) y se sembró en línea horizontal sobre el medio de cultivo donde se encontraba previamente la cepa patógena. Las placas Petri se incubaron a una temperatura de 28 °C durante un período de 72 horas.

Posteriormente, se procedió a analizar la extensión de la zona de inhibición utilizando un calibrador vernier, siguiendo el método descrito por López (2020). Para evaluar la respuesta antagonista, se calculó el Potencial antagonista o índice de inhibición. Esto se logró midiendo el diámetro del halo de inhibición y restando el diámetro de la colonia de la cepa antagonista (como se describe en Astorga-Quirós et al., 2014).

La fórmula utilizada para determinar el índice de inhibición consistió en dividir el valor del diámetro correspondiente al halo de inhibición por el diámetro de la colonia de la cepa antagonista. El resultado de esta operación se multiplicó por cien, obteniendo así el porcentaje del índice de inhibición.

Placa de Agar Perforado

Para llevar a cabo este procedimiento, se prepararon suspensiones de bacterias antagonistas y bacterias fitopatógenas, ajustando su concentración a 3×10^8 UFC/mL (equivalente a 0.5 en la escala de McFarland). Luego, se agregaron 100 µL de la suspensión bacteriana del patógeno en placas Petri que contenían medio de cultivo PDA, y se distribuyeron uniformemente en toda la superficie de la placa utilizando un hisopo estéril.

Posteriormente, se realizaron perforaciones en el agar con un diámetro de 0.5 cm y una profundidad de aproximadamente 0.3 mm. A continuación, se añadieron 20 µl de la solución de antagonistas, también ajustada a una concentración de 3×10^8 UFC/ml (0.5 en la escala de McFarland), directamente en el agujero previamente creado en el agar, siguiendo el método descrito por López-Nieto (2020).

Para evaluar la respuesta antagonista, se calculó el Potencial antagonista o índice de inhibición, que mide la movilidad y la difusión de los microorganismos en un medio de cultivo sólido. Este cálculo se realizó midiendo el diámetro del halo de inhibición y restando el diámetro del agujero creado en el agar, como se describe en Astorga-Quirós et al. (2014).

La fórmula utilizada para determinar el índice de inhibición consistió en tomar el valor del diámetro correspondiente al halo de inhibición y dividirlo por el diámetro del pozo que se efectuó en el agar con el sacabocado. El resultado de esta operación se multiplicó posteriormente por un factor de cien, obteniendo así el porcentaje del índice de inhibición.

Cultivos Duales (Cruza) para hongos.

Para esta prueba se realizaron dos variaciones.

En la prueba preliminar de la interacción entre hongos y bacterias, se utilizó agar PDA como medio de cultivo. Se sembró una suspensión de *Ralstonia solanacearum* en agar PDA en la mitad de una placa de Petri, alcanzando una densidad de 0.5 en la escala de McFarland (equivalente 3×10^8 UFC/ mL). En el extremo opuesto de la placa de Petri, se dispuso un disco de agar de 15.6 mm de diámetro que contenía el hongo antagonista, manteniendo una separación de 10 mm desde el borde de la placa. Es importante destacar que tanto la bacteria como el hongo se sembraron en lados opuestos de la placa.

En una segunda variante de la prueba, se volvió a emplear agar PDA como medio de cultivo. En esta ocasión, se sembró una suspensión de *R. solanacearum* en toda la superficie de la placa de Petri utilizando un isopo estéril, logrando una densidad de 0.5 en la escala de McFarland (3×10^8 UFC/ mL). Después de un período de secado de 1 minuto, se colocó un disco de agar de 15.6 mm de diámetro que contenía el hongo a evaluar. Todas las placas de Petri se incubaron a una temperatura de 28 °C, y se evaluó la interacción entre el hongo y la bacteria. Además, se midieron los diámetros de crecimiento tanto del patógeno como del hongo antagonista a las 72, 96 y 120 horas después de la incubación.

Para evaluar la respuesta antagonista de los hongos, se utilizó la escala propuesta por Ezziyyani et al. (2004). El Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) se calculó a partir de los datos de crecimiento de cada microorganismo con potencial antagonista en el cultivo dual, utilizando la fórmula descrita por Suarez et al. (2008). Esta fórmula implica restar el radio del patógeno en el cultivo dual al radio del patógeno en el cultivo testigo y luego dividir el resultado por el radio del patógeno en el cultivo testigo. El valor obtenido se multiplicó posteriormente por cien para expresar el PICR como un porcentaje.

Crecimiento Radial

En el contexto de este estudio, se utilizó una regla milimetrada para medir la distancia desde el centro del inóculo hasta el borde que englobaba el crecimiento del micelio dentro de la placa de Petri. Este proceso se realizó de forma regular cada 24 horas, a partir del momento de la siembra y se prolongó a lo largo de un período de cuatro días. Esta metodología de seguimiento se basó en una adaptación del enfoque propuesto por Colquier (2017).

Tasa de extensión radial:

Usando la información sobre el crecimiento radial y el tiempo promedio de colonización, se determinó la tasa de expansión radial mediante la aplicación de la siguiente ecuación y se expresa en milímetros, que fue propuesta por Angulo y colaboradores (2022). La fórmula utilizada para la determinación de la Tasa de expresión radial consiste en restar el valor del diámetro final de la colonia (mm) menos el diámetro inicial (mm) dividirlo por la resta del tiempo final de la incubación (Horas) menos tiempo inicial de incubación (tiempo cero).

Evaluación de viabilidad de *R. solanacearum*

Para evaluar la viabilidad de la bacteria *R. solanacearum*, se empleó una metodología de resiembra utilizando el medio de cultivo TTC, tal como se describe en el trabajo de López-Nieto (2020). El procedimiento involucró la obtención de una muestra del cultivo dual de hongos después de un período de incubación de 120 horas. Posteriormente, esta muestra se inoculó utilizando la técnica de estría en el medio de cultivo TTC, seguida de un proceso de incubación a una temperatura constante de 28°C, como se detalla en el estudio de Cruz (2023).

Se llevaron a cabo observaciones en intervalos de tiempo específicos, concretamente a las 24, 42 y 72 horas posteriores a la inoculación. En caso de que el patógeno mantuviera su viabilidad, se pudo apreciar el desarrollo de colonias bacterianas en el medio. Un aspecto característico de estas colonias fue el cambio de color, pasando de ser blancas a tonos rojizos. Esta modificación en la coloración de las colonias se debe a la oxidación del medio de cultivo, un proceso catalizado por las bacterias presentes. Este cambio de coloración se convierte en un indicador confiable de la viabilidad del patógeno evaluado, tal como se ha señalado en la investigación de Flórez (2019).

Finalmente, se informaron los resultados de la viabilidad del patógeno mediante el uso de un grado de viabilidad de cepas bacterianas modificado, conforme a lo propuesto por Ezziyyani et al. (2004) y Astorga-Quirós et al. (2014).

Tabla 1.

<i>Escala para evaluación de la viabilidad de R. solanacearum</i>	Grado de Viabilidad
Ninguna invasión de la superficie de <i>R. solanacearum</i>	0
$\frac{1}{4}$ Invasión de la superficie de <i>R. solanacearum</i>	1
$\frac{1}{2}$ Invasión de la superficie de la <i>R. solanacearum</i>	2
Total invasión de la superficie de <i>R. solanacearum</i>	3
Invasión de la superficie de <i>R. solanacearum</i> y esporulación	4

Nota. Tabla modificada de Ezziiyani et al. (2004) y Astorga-Quirós et al. (2014).

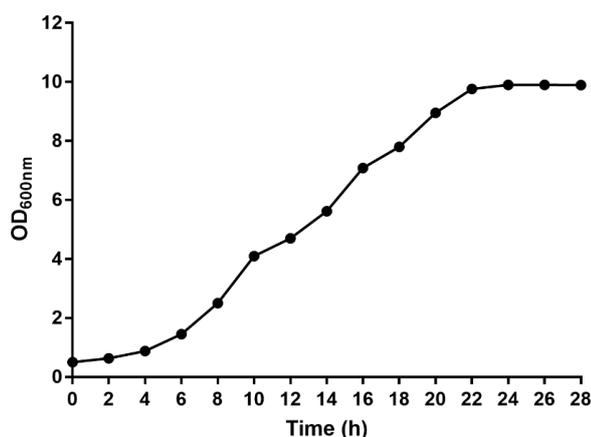
Capítulo IV: Resultados y Discusión

Resultados

Curva de crecimiento del microorganismo del patógeno

Macagnan et al. (2017) trazaron la curva de crecimiento de la cepa de *Ralstonia solanacearum* para analizar su desarrollo en función del tiempo de fermentación. Concluyeron que la fase exponencial se produjo a las 8 horas, seguida de una fase estacionaria que se mantuvo durante un período que abarcó desde las 22 hasta las 28 horas de cultivo. Por consiguiente, se seleccionó un tiempo de 24 horas para analizar los resultados de la densidad óptica (OD). Estos parámetros y proporcionaron una representación visual de la curva de crecimiento del microorganismo, permitiendo una mejor comprensión de su comportamiento a lo largo del tiempo de fermentación (Macagnan et al., 2017).

Curva de crecimiento del microorganismo



Nota El experimento fue medido utilizando OD600 densidad óptica (OD en el eje Y y horas en el eje X proporcionando una representación visual de la curva de crecimiento del microorganismo, permitiendo una mejor comprensión de su comportamiento a lo largo del tiempo de fermentación (Macagnan et al., 2017).

Identificación de *Ralstonia solanacearum* mediante pruebas fenotípicas y bioquímicas.

Mediante las pruebas fenotípicas y bioquímicas se determinó la presencia de la bacteria *Ralstonia solanacearum*. Estas actividades se ejecutaron siguiendo los protocolos establecidos en el Plan de Acción para el Control de *Ralstonia solanacearum* raza 2, edición No. 2 emitida por AGROCALIDAD (2021). Las muestras recolectadas fueron transportadas y procesadas en el Laboratorio de Diagnóstico Vegetal de Fitopatología de la Agencia. Posteriormente, se proporcionó un medio de cultivo conteniendo el posible fitopatógeno al Laboratorio de Diagnóstico Animal de Microbiología la cual fue codificada como CP01, donde se dio inicio al proceso de identificación de la bacteria *Ralstonia solanacearum* a través de pruebas fenotípicas y bioquímicas.

En relación a la identificación fenotípica, se realizó una tinción Gram utilizando una pequeña colonia obtenida del medio de cultivo proporcionado por el laboratorio de

Diagnóstico Vegetal de Fitopatología. La observación microscópica reveló la presencia de una bacteria Gram negativa con forma de bacilo flagelado. Además, se empleó una prueba de hidróxido de potasio (KOH) como test de confirmación para bacterias Gram negativas.

La prueba de flujo bacteriano también se realizó, dando como resultado una reacción positiva observándose una secreción viscosa y blanquecina en forma de hilos de exudado bacteriano. Además, al aplicar peróxido de hidrógeno a una pequeña colonia de la muestra, se observó la liberación de burbujas, lo que indica una reacción positiva para la enzima catalasa.

La identificación del tipo de cepa se realizó mediante la implementación de medios diferenciales, mediante el uso del medio TTC. En presencia de *Ralstonia solanacearum*, se observó un cambio en la coloración de las colonias, pasando de blanco a rojo.

Adicionalmente, una muestra de la cepa se inoculó en PDA. El patrón de crecimiento bacteriano que se manifestó en este medio indicó que se trataba de una cepa virulenta. Esta inferencia se basa en características morfológicas específicas como la coloración, bordes irregulares y la apariencia de las colonias, que presentaban una textura mucoide, aspecto cremoso y fluidez, todo ello contribuyendo a un aspecto opaco. Como última prueba fenotípica, se llevó a cabo la prueba de oxidasa, la cual arrojó un resultado positivo, debido a que se produjo un cambio de coloración hacia el tono púrpura azulado.

Para llevar a cabo la identificación bioquímica se empleó una batería de seis pruebas bioquímicas. Simmons Citrato Agar, Motilidad-Indol-Ornitina descarboxilasa (MIO Medio), Superficie/Profundidad-Producción de Gas-Producción de SH₂ (TSI Agar) y SH₂-Indol-Motilidad (SIM Medio).

Tabla 2.

Identificación de Ralstonia solanacearum mediante pruebas fenotípicas y bioquímicas

Muestra	Cepa CP01
---------	-----------

		Repeticiones (n)		
		n1	n2	n3
		Pruebas bioquímicas		
MIO	Motilidad	+	+	+
	Indol	-	-	-
	Ornitina descarboxilasa	+	+	+
TSI	Superficie/profundidad	K/A	K/A	K/A
	Producción de gas	-	-	-
	Producción de SH ₂	-	-	-
SIM	SH ₂	-	-	-
	Indol	-	-	-
	Motilidad	+	+	+

Nota: La tabla muestra los resultados de las pruebas bioquímicas MIO, TSI y SIM realizadas a la misma muestra CP01, con tres repeticiones.

Aislamiento de microorganismos potencialmente antagonistas

Al término de la investigación, se logró llevar a cabo el aislamiento de un total de doce cepas, abarcando un espectro que incluye géneros como *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Actinomicetos* spp, *Beauveria* spp., *Penicillium* spp., *Metarhizium* spp. y *Trichoderma* spp. Estas cepas fueron obtenidas de diversas fuentes, como suelo, material vegetal y compostaje. Cepas demostraron presentar un potencial antagonista contra de *Ralstonia*

solanacearum. Con el fin de facilitar su identificación y seguimiento, las cepas identificadas como portadoras de esta propiedad fueron etiquetadas y codificadas con las designaciones: CA01, CA02, CA03, CA04, CA05, CA06, CA08, CA09, CA10, CA11, CA12 y CA13. Este proceso de clasificación y codificación permitió una organización precisa y sistémica de las cepas identificadas como poseedoras de características antagonistas.

Evaluación la respuesta antagonista

De las tres técnicas empleadas en la etapa preliminar para evaluar la capacidad antagonista de los microorganismos frente al fitopatógeno, se optó por seleccionar la técnica de cultivos duales, aplicable a todas las cepas aisladas. Esta elección se realizó con el propósito de llevar a cabo la evaluación *in vitro* de los antagonistas. Esta decisión se fundamentó en la observación de una inhibición más evidente de *Ralstonia solanacearum* por parte de los microorganismos aislados en comparación con las otras alternativas consideradas.

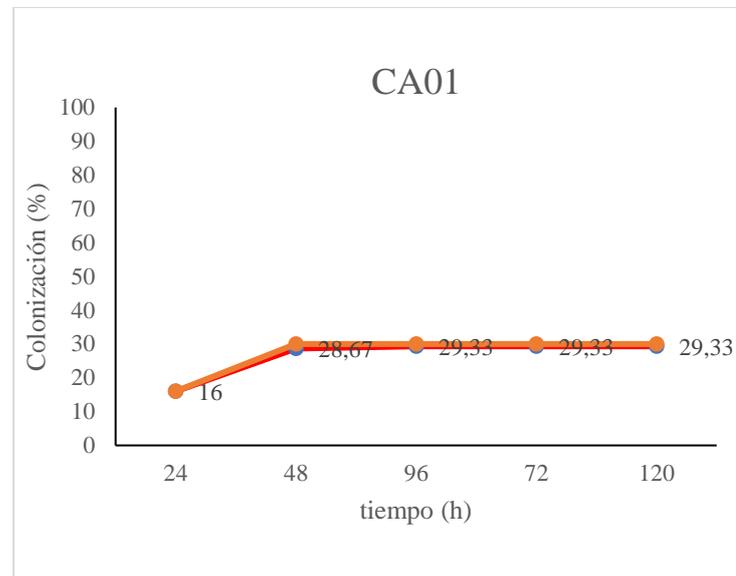
Fue evaluado uno por uno el porcentaje de colonización de cada cepa con capacidad antagonista contra el fitopatógeno. Además, se incluyó en el estudio un grupo de control que consistía exclusivamente en la cepa antagonista. Este grupo de control desempeñó un papel fundamental al actuar como punto de referencia para cuantificar la colonización del microorganismo en el medio de cultivo PDA, en ausencia de la presencia de *Ralstonia solanacearum*. Cada porcentaje fue calculado 24, 48,72,96,120 horas después de la inoculación de la cepa en el medio de cultivo con el fitopatógeno.

Donde se obtuvo los siguientes resultados de cada cepa:

.

Figura 10.

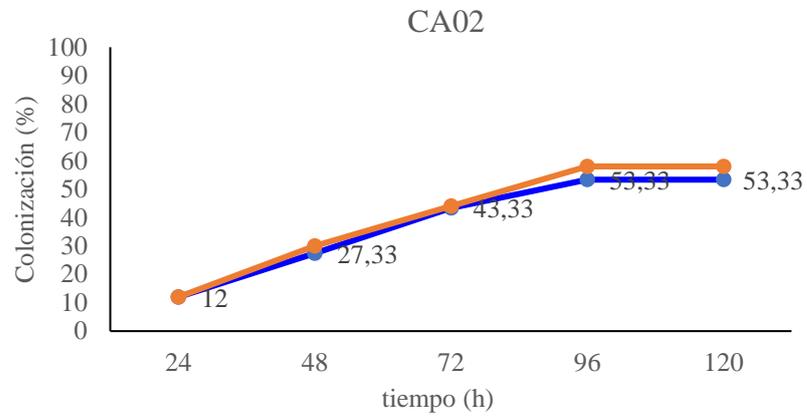
Cepa CA01, Tiempo vs porcentaje de colonización.



Nota: La grafica muestra el porcentaje de colonización de la cepa CA01 vs *R. solanacearum* en color azul y en naranja el control del porcentaje de colonización de la cepa CA01 en ausencia del patógeno. Los valores de colonización cada 24 horas fueron de 16 %, 28.67 %, 29.33%, 29.33%, 29.33%, respectivamente para CA01 vs *R. solanacearum*. Y 16%, 30%, 30%, 30%, 30%, para el control.

Figura 11.

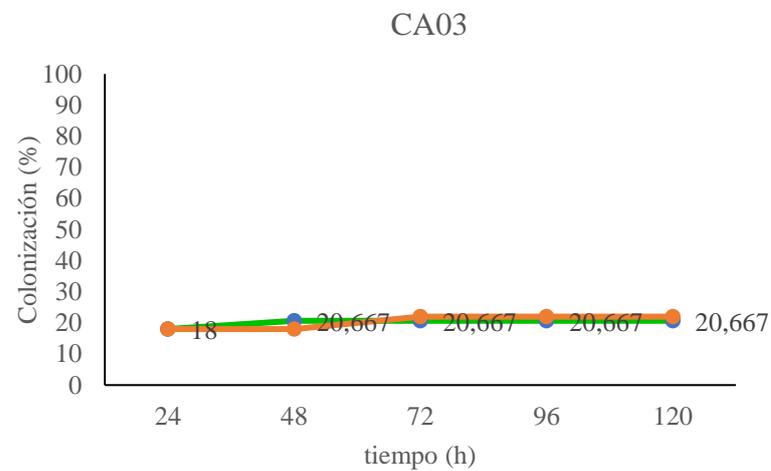
Cepa CA02, Tiempo vs porcentaje de colonización.



Nota: La grafica muestra el porcentaje de colonización de la cepa CA02 vs *R. solanacearum* en color azul y en naranja el control del porcentaje de colonización de la cepa CA02 en ausencia del patógeno. Los valores de colonización cada 24 horas fueron de 12 %, 27.33 %, 43.33%, 53.33%, 53.33%, respectivamente para CA02 vs *R. solanacearum*. Y 12%, 30%, 44%, 58%, 58%, para el control.

Figura 12.

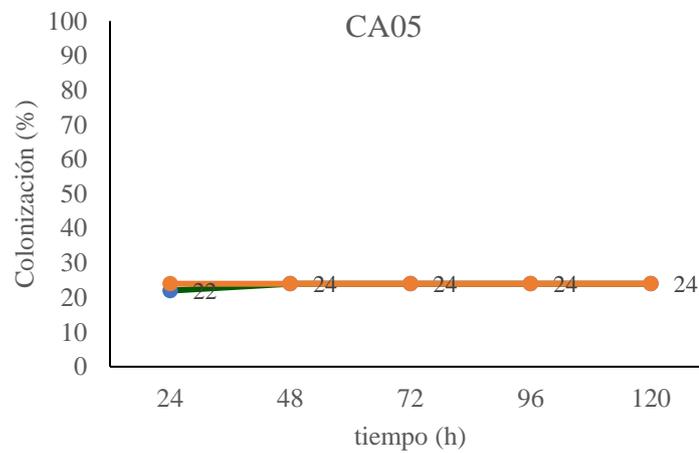
Cepa CA03, Tiempo vs porcentaje de colonización.



Nota: La grafica muestra el porcentaje de colonización de la cepa CA03 vs *R. solanacearum* en color azul y en naranja el control del porcentaje de colonización de la cepa CA03 en ausencia del patógeno. Los valores de colonización cada 24 horas fueron de 18 %, y se mantuvo constante en 20.66 % hasta las 120 horas para CA03 vs *R. solanacearum*. 18%, 18%, 22%, se mantuvo constante en 20.66 % hasta las 120 horas para del control.

Figura 13.

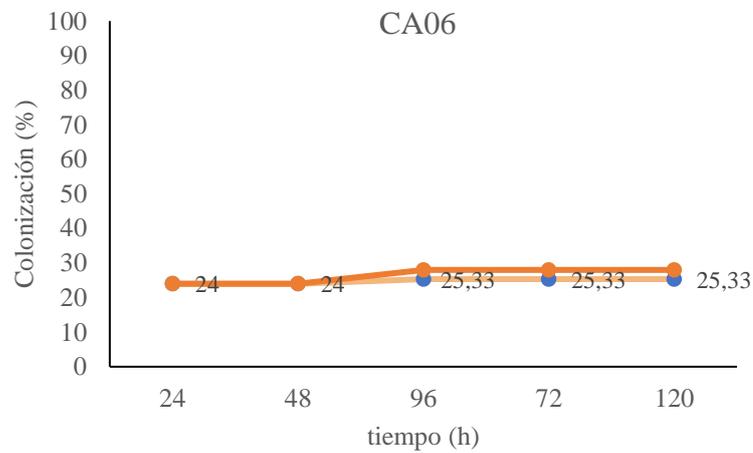
Cepa CA05, Tiempo vs porcentaje de colonización.



Nota: La grafica muestra el porcentaje de colonización de la cepa CA05 vs *R. solanacearum* en color azul y en naranja el control del porcentaje de colonización de la cepa CA05 en ausencia del patógeno. Los valores de colonización cada 24 horas fueron de 22 %, y se mantuvo constante en 24% en las siguientes 120 horas para CA05 vs *R. solanacearum*. Y 24%, en las siguientes 120 horas para del control.

Figura 14.

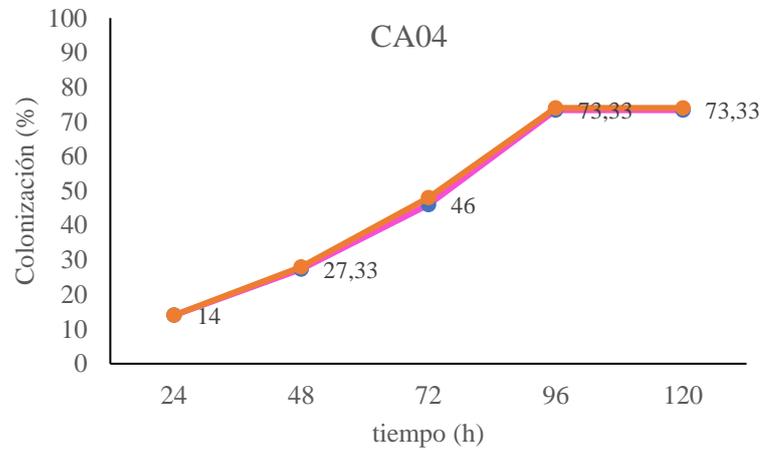
Cepa CA06, Tiempo vs porcentaje de colonización.



Nota: La grafica muestra el porcentaje de colonización de la cepa CA06 vs *R. solanacearum* en color azul y en naranja el control del porcentaje de colonización de la cepa CA06 en ausencia del patógeno. Los valores de colonización cada 24 horas fueron de 24 %, 24% y se mantuvo constante en 25.33 % hasta las 120 horas para CA06 vs *R. solanacearum*. 24%, 24%, y se mantuvo constante en 28% hasta las 120 horas para del control.

Figura 15.

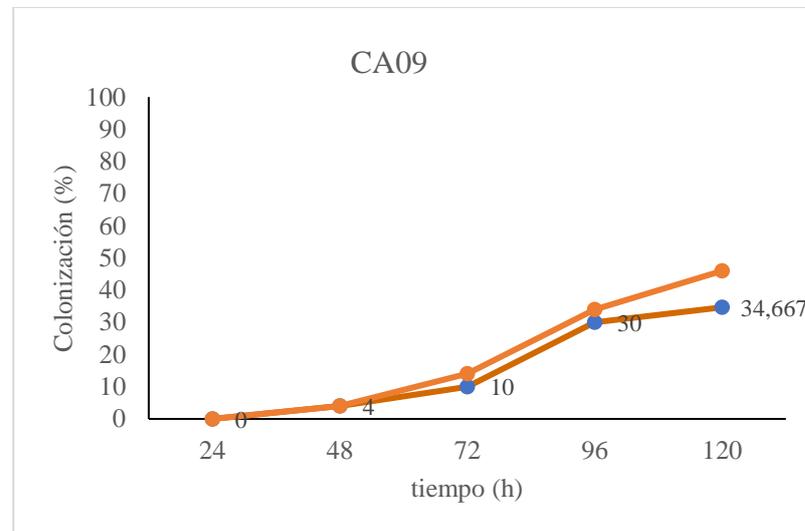
Cepa CA04, Tiempo vs porcentaje de colonización.



Nota: La grafica muestra el porcentaje de colonización de la cepa CA04 vs *R. solanacearum* en color azul y en naranja el control del porcentaje de colonización de la cepa CA04 en ausencia del patógeno. Los valores de colonización cada 24 horas fueron de 14%, 27.33%, 46%, y se mantuvo constante en 73.33 % hasta las 120 horas para CA04 vs *R. solanacearum*. 14%, 28%, 48%, y se mantuvo constante en 74% hasta las 120 horas para del control.

Figura 16.

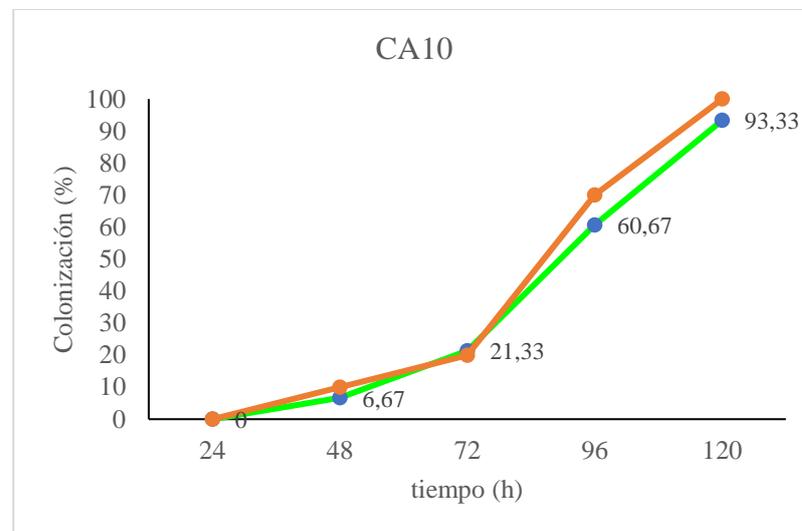
Cepa CA09, Tiempo vs porcentaje de colonización.



Nota: La grafica muestra el porcentaje de colonización de la cepa CA09 vs *R. solanacearum* en color azul y en naranja el control del porcentaje de colonización de la cepa CA09 en ausencia del patógeno. Los valores de colonización cada 24 horas fueron de 0%, 4%, 10%, 30% y 34.66% para CA09 vs *R. solanacearum*. Y 0%, 4%, 14%, y 46% para del control.

Figura 17.

Cepa CA10, Tiempo vs porcentaje de colonización.

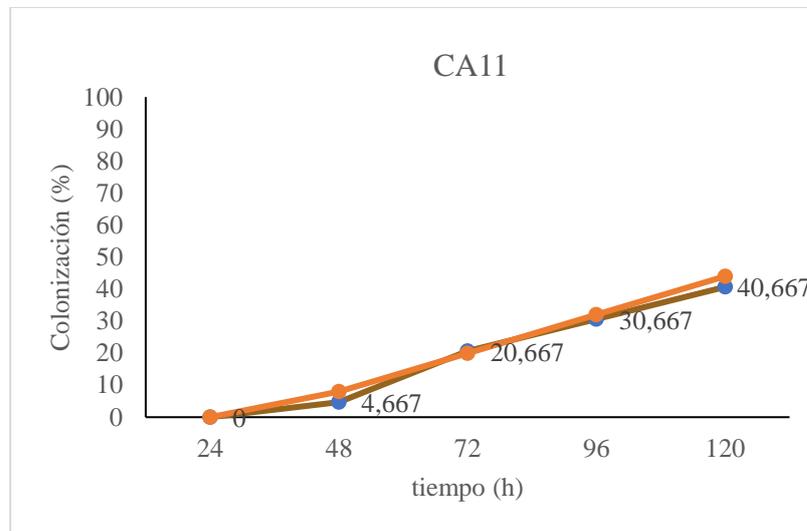


Nota: La grafica muestra el porcentaje de colonización de la cepa CA10 vs *R.*

solanacearum en color azul y en naranja el control del porcentaje de colonización de la cepa CA10 en ausencia del patógeno. Los valores de colonización cada 24 horas fueron de 0%, 6.67%, 21.33%, 60.67% y 93.33% para CA10 vs *R. solanacearum*. 0%, 4%, 10%, 20%, 70% y 100% para del control.

Figura 18.

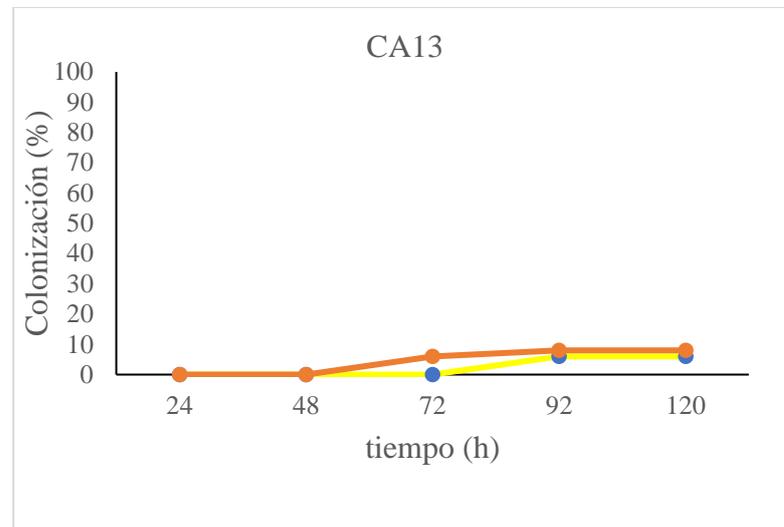
Cepa CA11, Tiempo vs porcentaje de colonización.



Nota: La grafica muestra el porcentaje de colonización de la cepa CA11 vs *R. solanacearum* en color azul y en naranja el control del porcentaje de colonización de la cepa CA11 en ausencia del patógeno. Los valores de colonización cada 24 horas fueron de 0%, 4.667%, 20.667%, 30.66% y 40.66% para CA11 vs *R. solanacearum*. 0%, 8%, 20%, 32%, 44% para del control.

Figura 19.

Cepa CA13, Tiempo vs porcentaje de colonización.

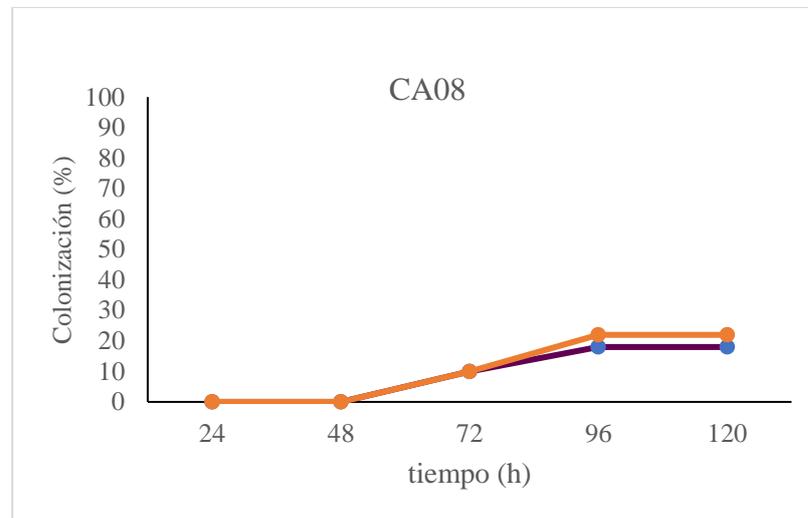


Nota: La grafica muestra el porcentaje de colonización de la cepa CA13 vs *R.*

solanacearum en color azul y en naranja el control del porcentaje de colonización de la cepa CA13 en ausencia del patógeno. Los valores de colonización cada 24 horas fueron de 0% en las primeras 72 horas 6% en las restantes 120 horas para CA13 vs *R. solanacearum*. 0% en las primeras 48 horas, 6% las 72% y 8% en las restantes para 120 horas del control.

Figura 20.

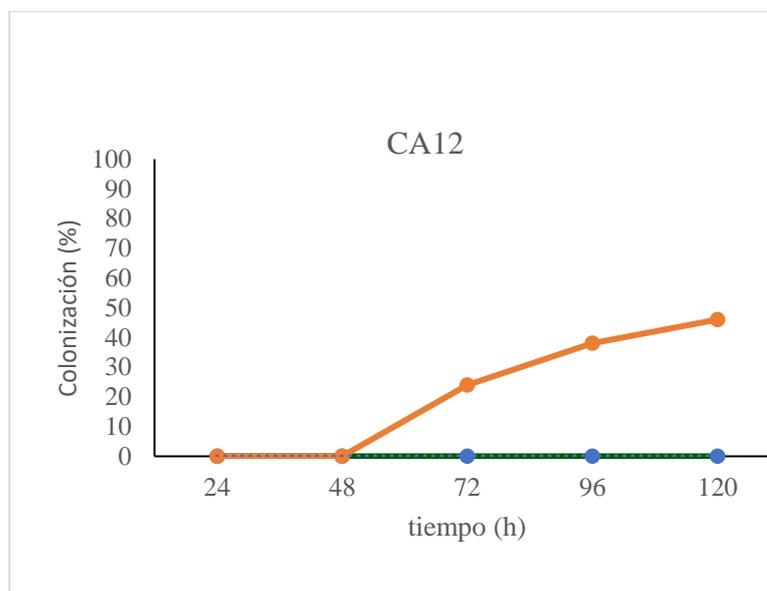
Cepa CA08, Tiempo vs porcentaje de colonización.



Nota: La grafica muestra el porcentaje de colonización de la cepa CA08 vs *R. solanacearum* en color azul y en naranja el control del porcentaje de colonización de la cepa CA08 en ausencia del patógeno. Los valores de colonización cada 24 horas fueron de 0% en las primeras 48 horas, 10% en 72 horas y 18% en las restantes 120 horas para CA08 vs *R. solanacearum*. 0% en las primeras 48 horas, 10% las 72% y 72% en las restantes para 120 horas del control.

Figura 21.

Cepa CA12, Tiempo vs porcentaje de colonización.



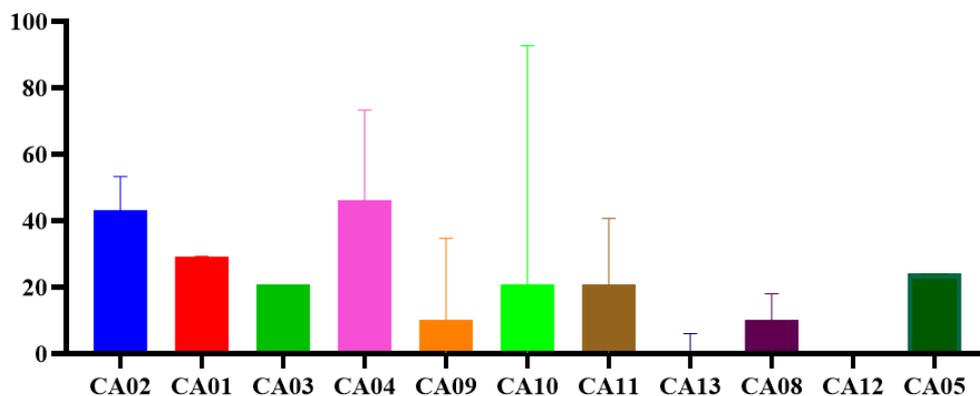
Nota: La grafica muestra el porcentaje de colonización de la cepa CA12 vs *R.*

solanacearum en color azul y en naranja el control del porcentaje de colonización de la cepa CA12 en ausencia del patógeno. Los valores de colonización cada 24 horas fueron de 0% y se mantuvo constante en las restantes 120 horas para CA12 vs *R. solanacearum*. 0% en las primeras 48 horas, 24% las 72%; 38 y 46% respectivamente en las restantes para 120 horas del control.

De los doce microorganismos sometidos a evaluación contra *Ralstonia solanacearum*, únicamente tres de ellos exhibieron una respuesta antagonista de relevancia; específicamente, las cepas CA02, CA04 y CA10 para ello se empleó Una ANOVA y prueba de Kruskal-Wallis, un método no paramétrico adecuado para comparar múltiples grupos independientes cuando los datos no cumplen con los supuestos de normalidad.

Figura 22.

Comparación porcentajes de Colonización mediante la prueba de Kruskal -Wallis

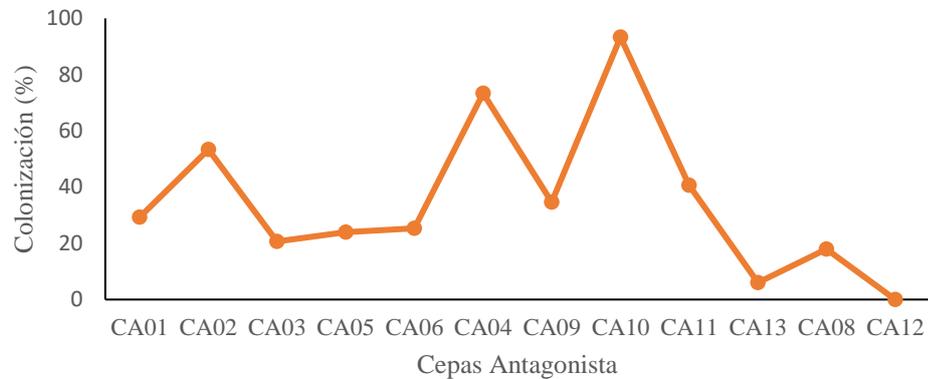


Nota. Test ANOVA, prueba de Kruskal –Wallis para porcentajes de colonización de potenciales microorganismos antagonistas vs *R. solanacearum* ($H= 31.25$, $p < 0.05$).

Donde los resultados de la prueba de indicaron que existe una diferencia estadísticamente significativa en los porcentajes de colonización entre los microorganismos evaluados ($H= 28.49$, $p < 0.05$). Las cepas CA02, CA04 y CA10 que presentaron mejor respuesta antagonista, lo hicieron a través de un mecanismo de competencia directa con el fitopatógeno por recursos, tanto por espacio como por nutrientes. Este fenómeno se alinea con la conceptualización planteada por Droby y colaboradores (2009), quienes caracterizan el antagonismo por competencia como la concurrencia en la demanda de recursos iguales o equivalentes por parte de dos o más poblaciones microbianas, siempre y cuando la utilización de tales nutrientes resulte en una reducción, control o inhibición del crecimiento de los restantes microorganismos presentes, resultando en una disminución consecuente tanto de la cantidad como del espacio disponible para los organismos remanentes (Droby et al. 2009).

Figura 23.

Respuesta antagonista - Colonización (%) vs. Cepas Antagonista



También se obtuvieron los resultados de la evaluación de las cepas CA02, CA04 y CA10 en términos de su respuesta antagonista, utilizando la métrica de tasa de extensión radial, así como el porcentaje de colonización obtenido para cada cepa.

En primer lugar, se examinó la tasa de extensión radial como un indicador clave de la capacidad antagonista de las cepas. Los resultados indicaron que la cepa CA02 exhibió una tasa de extensión radial promedio de $0.215 \text{ (mm horas}^{-1}) \pm 0.006$, lo que sugiere una respuesta moderada pero significativa en términos de inhibición del crecimiento.

Por su parte, la cepa CA04 mostró una tasa de $0.304 \text{ (mm horas}^{-1}) \pm 0.006$, lo que indica una mayor capacidad antagonista en comparación con la cepa CA02.

Sin embargo, la cepa CA10 presentó la tasa más alta, registrando $0.483 \text{ (mm horas}^{-1}) \pm 0.006$, lo que sugiere una fuerte respuesta antagonista y una mayor capacidad de inhibición del crecimiento de la población objetivo.

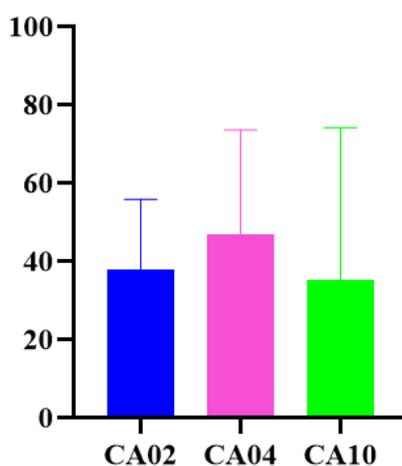
En segundo lugar, se procedió a evaluar el porcentaje de colonización de las cepas CA02, CA04 y CA10. Estos valores proporcionan información valiosa sobre la capacidad de cada cepa para colonizar el entorno específico del huésped. Los resultados mostraron que la cepa CA02 logró una colonización del $53.33\% \pm 0.057$, indicando una presencia sustancial en el nicho ecológico estudiado. Por otro lado, la cepa CA04 demostró un nivel

aún mayor de colonización, con un porcentaje del $73.33\% \pm 0.6$, lo que sugiere una adaptación exitosa al ambiente y una presencia dominante. Por último, la cepa CA10 exhibió la colonización más significativa, alcanzando un porcentaje del $93.33\% \pm 0.577$, lo que refleja su fuerte habilidad para establecerse en el entorno huésped.

No obstante, se procedió a llevar a cabo un análisis mediante la prueba de Kruskal-Wallis para contrastar las variaciones en el porcentaje de colonización entre las cepas CA02, CA04 y CA10. Los resultados revelaron que no se encontraban diferencias sustanciales y estadísticamente significativas en el porcentaje de colonización entre las tres cepas evaluadas ($H = 0.6987$, $p = 0.7267$).

Figura 24.

Comparación porcentajes de Colonización mediante la prueba de Kruskal -Wallis de las cepas CA02, CA04, CA10



Nota. Test ANOVA, prueba de Kruskal –Wallis para comparación entre los mejores porcentajes de colonización de potenciales microorganismos antagonistas vs R. solanacearum ($H = 0.6987$, $p = 0.7267$).

Viabilidad in vitro de la cepa de *Ralstonia solanacearum*

En la evaluación de la viabilidad, se realizó una comparación con la tabla de viabilidad propuestas por Ezziyyani et al. (2004) y Astorga-Quirós et al. (2014), en conjunto con los resultados obtenidos en el laboratorio. En el ensayo con la cepa CA02, a pesar de haber logrado un porcentaje de colonización significativo, el fitopatógeno aún mostraba viabilidad después del enfrentamiento con la cepa antagonista. No obstante, su crecimiento experimentaba una reducción evidente en la caja de cultivo TTC, lo que condujo a una clasificación de viabilidad de grado 1. Similarmente, en el ensayo con la cepa CA04, se observó un patrón similar. Aunque las colonias del fitopatógeno presentaban un crecimiento disminuido en la caja de cultivo, la cepa de *Ralstonia solanacearum* mantenía su viabilidad en un grado 1. Por otro lado, el ensayo con la cepa CA10 mostró un comportamiento distinto. La cepa patógena *R. solanacearum* exhibió una viabilidad de grado cero. En conjunto, los resultados revelan diferentes niveles de efectividad antagonista entre las cepas CA02, CA04 y CA10. La cepa CA10 demostró un efecto bactericida más marcado, lo que sugiere su potencial como agente de control biológico.

Caracterización de microorganismos antagonistas efectivos contra *Ralstonia Solanacearum*

Tabla 3.

Caracterización fenotípica y bioquímica de *Bacillus* spp.

Muestra	Cepa CA01 (<i>Bacillus</i> spp.)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
	Pruebas morfológicas		
Tinción Gram	+	+	+
KOH	-	-	-
Morfología colonia	No filamentosa	No filamentosa	No filamentosa
Coloración	Crema	Crema	Crema
Margen	Entero	Entero	Entero

Morfología micro.	bacilar	bacilar	bacilar
Esporas	+	+	+
Pruebas Bioquímicas			
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	-	-	-
Urea	-	-	-

Tabla 4.

Caracterización fenotípica y bioquímica de Bacillus spp.

Muestra	Cepa CA02 (<i>Bacillus spp.</i>)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
Pruebas morfológicas			
Tinción Gram	+	+	+
KOH	-	-	-
Morfología colonia	Filamentosa	Filamentosa	Filamentosa
Coloración	Blanco	Blanco	Blanco
Margen	Ondulado	Ondulado	Ondulado
Morfología micro.	bacilar	bacilar	bacilar
Esporas	+	+	+
Pruebas Bioquímicas			
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	-	-	-
Urea	-	-	-

Tabla 5.

Caracterización fenotípica y bioquímica de Bacillus spp.

Muestra	Cepa CA03 (<i>Bacillus spp.</i>)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3

Pruebas morfológicas			
Tinción Gram	+	+	+
KOH	-	-	-
Morfología colonia	Filamentosa	Filamentosa	Filamentosa
Coloración	Blanco	Blanco	Blanco
Margen	Ondulado	Ondulado	Ondulado
Morfología micro.	bacilar	bacilar	bacilar
Esporas	+	+	+
Pruebas Bioquímicas			
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	-	-	-
Urea	-	-	-

Tabla 6.

Caracterización fenotípica y bioquímica de Actinomicete spp.

Muestra	Cepa CA04 (<i>Actinomicete</i> spp.)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
Pruebas morfológicas			
Tinción Gram	+	+	+
KOH	-	-	-
Morfología colonia	Seca-rugosa	Seca-rugosa	Seca-rugosa
Morfología micro.	Filamentosa	Filamentosa	Filamentosa

Geosmina	+	+	+
DRBC	-	-	-
Pruebas Bioquímicas			
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	-	-	-
Producción de gas	-	-	-

Tabla 7.

Caracterización fenotípica y bioquímica de Pseudomona spp.

Muestra	Cepa CA05 (<i>Pseudomonas</i> spp.)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
Pruebas morfológicas			
Tinción Gram	-	-	-
Morfología colonia	Lisas	Lisas	Lisas
Coloración	Claro	Claro	Claro
Margen	Mucoide	Mucoide	Mucoide
2-aminoacetofenona	+	+	+
Morfología micro.	Bastón	Bastón	Bastón
Esporas	-	-	-
Pruebas Bioquímicas			
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	+	+	+

Urea	-	-	-
------	---	---	---

Tabla 8.

Caracterización fenotípica y bioquímica de Pseudomona spp.

Muestra	Cepa CA06 (<i>Pseudomonas</i> spp.)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
Pruebas morfológicas			
Tinción Gram	-	-	-
Morfología colonia	Lisas	Lisas	Lisas
Coloración	Claro	Claro	Claro
Margen	Mucoide	Mucoide	Mucoide
2-aminoacetofenona	-	-	-
Morfología micro.	Bastón	Bastón	Bastón
Esporas	-	-	-
Pruebas Bioquímicas			
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	+	+	+
Urea	-	-	-

Tabla 9.

Caracterización fenotípica y bioquímica de *Pseudomona* spp.

Muestra	Cepa CA09 (<i>Trichoderma</i> spp.)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
Pruebas morfológicas			
Morfología colonia	Aterciopelada	Aterciopelada	Aterciopelada
Crecimiento	Radial	Radial	Radial
Coloración	Verdosa	Verdosa	Verdosa
Conidios	-	-	-
Morfología micro.	Fialides y conidias	Fialides y conidias	Fialides y conidias
	Hifas- septos	Hifas- septos	Hifas- septos
DRBC	+	+	+

Tabla 10.

Caracterización fenotípica y bioquímica de *Trichoderma* spp.

Muestra	Cepa CA10 (<i>Trichoderma</i> spp.)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
Pruebas morfológicas			
Morfología colonia	Aterciopelada	Aterciopelada	Aterciopelada
Crecimiento	Radial	Radial	Radial
Coloración	Verdosa	Verdosa	Verdosa
Conidios	+	+	+
Morfología micro.	Fialides y conidias	Fialides y conidias	Fialides y conidias
	Hifas- septos	Hifas- septos	Hifas- septos
DRBC	+	+	+

Tabla 11.

Caracterización fenotípica y bioquímica de *Trichoderma* spp.

Muestra	Cepa CA11 (<i>Trichoderma</i> spp.)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
Pruebas morfológicas			
Morfología colonia	Aterciopelada	Aterciopelada	Aterciopelada
Crecimiento	Radial	Radial	Radial
Coloración	Blanca	Blanca	Blanca
Conidios	-	-	-
Morfología micro.	Fialides y conidias	Fialides y conidias	Fialides y conidias
	Hifas- septos	Hifas- septos	Hifas- septos
DRBC	+	+	+

Tabla 12.

Caracterización fenotípica y bioquímica de *Penicillium* spp.

Muestra	Cepa CA08 (<i>Penicillium</i> spp.)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
Pruebas morfológicas			
Morfología colonia	Aterciopelada	Aterciopelada	Aterciopelada
Crecimiento	Radial irregular	Radial irregular	Radial irregular
Coloración	Azul verdosa	Azul verdosa	Azul verdosa
Conidios	+	+	+
Morfología micro.	Conidias	Conidias	Conidias
DRBC	+	+	+

Tabla 13.

Caracterización fenotípica y bioquímica de *Metharizium spp.*

Muestra	Cepa CA12 (<i>Metarhizium spp.</i>)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
Pruebas morfológicas			
Morfología colonia	Algodonosa	Algodonosa	Algodonosa
Crecimiento	Radial	Radial	Radial
Coloración	Beige	Beige	Beige
Conidios	+	+	+
Morfología micro.	forma de racimo	forma de racimo	forma de racimo
DRBC	+	+	+

Tabla 14.

Caracterización fenotípica y bioquímica de *Beauveria spp.*

Muestra	Cepa CA13 (<i>Beauveria spp.</i>)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
Pruebas morfológicas			
Morfología colonia	Aterciopelada	Aterciopelada	Aterciopelada
Crecimiento	Radial	Radial	Radial
Coloración	Blanco	Blanco	Blanco
Conidios	+	+	+
Morfología micro.	Conidios en cadenas	Conidios en cadenas	Conidios en cadenas
DRBC	+	+	+

Discusión

La evaluación fenotípica de *Ralstonia solanacearum* ha sido fundamental en la investigación, permitiendo caracterizar este patógeno de manera precisa. En primer lugar, varios estudios, como los realizados por Sánchez (2021) y Blanco et al. (2021), destacan la morfología típica de *R. solanacearum*, describiéndola como un bacilo con flagelos que le confieren movilidad. Esta característica se alinea con su clasificación taxonómica como una bacteria Gram negativa, como lo confirma la tendencia a teñirse de rosa durante la tinción de Gram.

Para confirmar la identificación de bacterias Gram negativas, la prueba de KOH, introducida por Camino (2018), se ha revelado como una herramienta valiosa. Esta prueba se basa en la interacción entre la pared celular bacteriana y el hidróxido de potasio, desencadenando la desnaturalización de la pared y la liberación de material citoplasmático, lo que resulta en una solución viscosa, como lo explican Sharma y Singh (2019).

La capacidad de *R. solanacearum* para generar hebras de exudado viscoso en presencia de agua, como señalan Patrice (2009) y Castañeda (2005), es otro rasgo distintivo importante. Esta habilidad le permite moverse entre huéspedes durante inundaciones, haciendo que la prueba de flujo bacteriano sea una herramienta valiosa tanto en el campo como en el laboratorio.

Otra prueba bioquímica destacada es el test de oxidasa, como indicó Espinal (2005). La producción de la enzima oxidasa por parte de *R. solanacearum* se ha confirmado, y esta prueba es crucial para diferenciar esta bacteria de otros microorganismos, ya que participa en reacciones de transferencia de electrones, como argumentan Espinal (2005) y Fornos (2021).

El medio TTC, recomendado por Flores (2019), ofrece información adicional al evaluar la viabilidad bacteriana a través de un cambio de color causado por la actividad metabólica de la bacteria. Además, la morfología de la colonia bacteriana proporciona pistas

importantes sobre la virulencia, como lo destacan Blanco y colaboradores (2021) y Denny (2007).

La fermentación de glucosa, confirmada por Castro y colaboradores (2006), se erige como una característica metabólica distintiva de *R. solanacearum*, contribuyendo a su diferenciación de otros microorganismos. La ausencia de la capacidad para generar gas y sulfuro de hidrógeno, como también señalado por Castro y colaboradores (2006), refuerza la especificidad en la identificación.

Por último, la prueba MIO Medio, sugerida por Ortega y su equipo (2009), ha sido útil para caracterizar *R. solanacearum*, al confirmar la presencia de flagelos y la falta de producción de indol. Además, la enzima ornitina descarboxilasa, mencionada por Ortega y colaboradores (2009), desempeña un papel crucial en la fermentación de glucosa, lo que subraya su importancia en la identificación precisa de este patógeno.

En la evaluación de las cepas CA01, CA03, CA05, CA09, CA10, CA11, CA13, CA08 y CA12, se pudo constatar que presentaron un nivel reducido de colonización. Esta característica condujo a la ausencia de la inhibición de *R. solanacearum* en las condiciones evaluadas, lo que según Obregon (2009) es un comportamiento esperado en cepas bacterianas y fungicas que se enfrentan por primera vez a un patógeno. Por otra parte, se pudo observar la formación de un biofilm producido por el fitopatógeno al tener interacción con las cepas antagonistas. Fenómeno que se ha mencionado en trabajos anteriores, como el estudio de Obregon (2009), menciona que este fitopatógeno posee una serie de mecanismos de supervivencia que le confieren una ventaja competitiva frente a otros microorganismos. Estos mecanismos, comúnmente denominados factores de virulencia, no solo están relacionados con su virulencia intrínseca, sino que también desempeñan un papel defensivo. Postulado que es también confirmados por Sanabria (2014) quien menciona que estos factores de virulencia son los mecanismos con los cuales *R.*

solanacearum obtiene ventaja al infectar una planta o un sustrato frente a otros microorganismos.

En su investigación, Obregon (2009) postula la existencia de tres tipos de polisacáridos extracelulares (EPS) producidos por el fitopatógeno: N-acetil galactosamina, desoxi-L-ácido galacturónico y trideoxi-D-glucosa. El monosacárido N-acetil galactosamina contribuye significativamente a la formación y estabilidad del biofilm, proporcionando propiedades adhesivas a la matriz de EPS. Esta adherencia eficaz a las superficies resulta crucial para la colonización de plantas huésped y otros sustratos relevantes (Siri, 2010).

En relación con la estructura tridimensional del biofilm, el desoxi-L-ácido galacturónico desempeña un papel fundamental. Esta estructura contribuye a la formación de una matriz de biofilm que, a su vez, actúa como una barrera protectora contra factores ambientales adversos y microorganismos competidores. Esta función protectora es esencial para el éxito de *R. solanacearum* en su entorno (Llerena, 2019).

Asimismo, la trideoxi-D-glucosa, componente adicional de la matriz de biofilm, aporta una dimensión de diversidad a la estructura. Se presume que esta diversidad podría permitir a las bacterias adaptarse a diversas condiciones ambientales, lo que podría impactar en la tasa de colonización de las cepas antagonistas estudiadas. En resumen, la matriz de biofilm formada por estos componentes de EPS beneficia a *R. solanacearum* en varios aspectos clave, incluyendo adhesión, colonización, protección y adaptación (Acuña, 2014). Razón por la cual la respuesta del control es mayor en términos de colonización debido a que no se presentaba ninguna respuesta que interfiriera en el desarrollo de cada microorganismo evaluado.

Existió diferencia significativa en cuanto a la respuesta antagonista referente al porcentaje de colonización de cada microorganismo, cepas: CA01 con 29.33 %, CA02 53.33%, CA03 20.66%, CA05 24%, CA06 28%, CA04 73.33, CA09 36.66%, CA10 60.67%, CA11 40.66%, CA13 8%, CA08 18%, CA12 46% ($H= 28.49$, $p < 0.05$), lo cual es

comportamiento que se espera de microorganismos silvestre y que tiene relación por lo citado por Morales (2016) quien menciona que cada microorganismo está sujeto a condiciones específicas que le permiten desarrollarse, lo que le otorga la capacidad de sobrevivir frente a otro microorganismo presente, si estas condiciones no son las idóneas se verá reflejado en la capacidad de reproducirse y nutrirse con valores menores al 50 % de colonización en caja Petri .

En cuanto a la evaluación de la viabilidad se determinó que las dos cepas CA02 y CA04 no inhibieron al patógeno a diferencia de la cepa CA10 lo cual concuerda con los hallazgos descritos por Fontecha (2015), quien menciona que muchos microorganismos antagonistas ejercen efectos tanto bactericidas como bacteriostáticos. El efecto bactericida implica la completa inhibición del crecimiento y reproducción del patógeno, mientras que el efecto bacteriostático controla la nutrición y reproducción del patógeno mediante el antagonista. Este fenómeno puede llevar a la recuperación del patógeno si el antagonista es eliminado Fontecha (2015). En contraste, el efecto bactericida resulta en la completa erradicación del patógeno. Estos resultados se alinean con los aportes de Astorga-Quirós y sus colaboradores (2013), quienes señalan que este comportamiento es más común en hongos altamente competitivos.

Para la caracterización de las cepas antagonistas se pudo determinar que la cepa CA02 pertenece al género *Bacillus* spp. Al comparar estos hallazgos con las investigaciones y pruebas bioquímicas previas realizadas por Sosa (2011) y Bozzetta (2017). También la cepa CA04 coinciden con lo reportado por Salazar y sus colegas (2013) y Otero (2011) referente al microorganismo perteneciente al género *Actinomycetes* spp. Adicional la descripción morfológica obtenida del hongo CA10 coincidió con los detalles reportados por Umaña (2019) y Vélez (2019) identificándolo como un hongo perteneciente al género *Trichoderma* spp.

Capítulo V: Conclusiones

El presente estudio se centró en la evaluación de microorganismos antagonistas para el control biológico *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. Mediante el empleo de pruebas fenotípicas y bioquímicas, se ha logrado identificar de manera precisa y confiable la presencia de *Ralstonia solanacearum* en muestras de musáceas con sintomatología de Moko. Los microorganismos obtenidos aislados de muestras de suelo, compost y material vegetal, pertenecen a los géneros *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Actinomicetos* spp., *Beauveria* spp., *Penicillium* spp., *Metarhizium* spp. y *Trichoderma* spp.,

Dentro de estas cepas, se destaca el comportamiento antagonista de las cepas CA02, CA04 y CA10, caracterizado por una competencia exitosa con *R. solanacearum*. El porcentaje de colonización observados fueron del 53.33%, 73.33% y 92.67% ($p>0.05$) respectivamente, sin evidencia estadística de diferencias significativas. Al confrontar estas cepas con *R. solanacearum*, se ha registrado una reducción significativa en la viabilidad del patógeno. Específicamente, se observó un grado de viabilidad de *R. solanacearum* de 0, 1 y 1 posterior al enfrentamiento con las cepas CA02, CA04 y CA10, correspondientemente.

Es importante resaltar que las cepas CA02 pertenece al género *Bacillus* spp., CA04 a *Actinomicetos* spp. y CA10 al género *Trichoderma* spp. Estas cepas presentaron un control efectivo sobre la viabilidad de *R. solanacearum*, demostrando su potencial como agentes de control biológico *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. A pesar de que no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de colonización entre las cepas antagonistas CA02, CA04 y CA10 ($p=0.7267$), sus altas tasas de control sobre la viabilidad del patógeno subrayan su promisorio aplicación en estrategias de manejo fitosanitario.

Capítulo VI: Recomendaciones

En conjunto, estas investigaciones delimitan las complejidades de la caracterización bioquímica de *R. solanacearum*, por lo que se recomienda y se subraya la importancia de

un enfoque integral y múltiples pruebas para la identificación precisa de este fitopatógeno, en aras de fortalecer la comprensión en el campo de la biotecnología y la fitopatología. A su vez se recomienda implementar nuevas metodologías para la inhibición de *Ralstonia solanacearum* como la producción en masa de metabolitos secundarios o agentes antimicrobianos.

Se sugiere que se realicen estudios adicionales para evaluar la eficacia de estas cepas en condiciones de campo, a fin de validar su capacidad para mitigar eficazmente la propagación de *R. solanacearum* en situaciones reales de cultivo. Además, se recomienda llevar a cabo investigaciones más profundas para comprender los mecanismos moleculares subyacentes a la interacción entre las cepas antagonistas y el patógeno, lo que podría permitir una optimización aún mayor de las estrategias de control biológico. En última instancia, la aplicación de estas cepas en programas de manejo fitosanitario podría contribuir significativamente a la sostenibilidad y salud de los cultivos de musáceas, reduciendo la dependencia de productos químicos y minimizando los impactos ambientales asociados.

También se recomienda tomar las medidas de bioseguridad necesarias para el trabajo con este fitopatógeno ya que al ser un microorganismo biotrófico, el ser humano puede actuar como un vector y diseminar el microorganismo, lo que puede concluir con contagios en plantaciones aledañas.

Bibliografía

AEBE, E. d. (2022). *Estadísticas exportación de banano en Ecuador AEBE*. Obtenido de

Estadísticas exportación de banano en Ecuador AEBE:

<https://www.aebe.com.ec/reportes>

- AGROCALIDAD. (2014). *Agencia ecuatoriana de aseguramiento de la calidad del agro. Obtenido de Guía de Campo Plagas Cuarentenarias*. AGROCALIDAD. doi:s:
<http://www.agrocalidad.gob.ec/wpcontent/uploads/2014/12/guia%20de%20campo%20plagas%20cuarentenarias.pdf>
- AGROCALIDAD. (2015). *Agencia ecuatoriana de aseguramiento de la calidad del agro. Obtenido de Informe de Rendición de Cuentas – 2014 (Vol. 1)*.
- AGROCALIDAD. (2015). *Agencia ecuatoriana de aseguramiento de la calidad del agro. Obtenido de Informe de Rendición de Cuentas – 2014*. Obtenido de Agencia ecuatoriana de aseguramiento de la calidad del agro. Obtenido de Informe de Rendición de Cuentas – 2014.
- AGROCALIDAD. (2021). *PLAN DE ACCIÓN PARA EL CONTROL DE RALSTONIA SOLANACEARUM RAZA 2 - PLAN DE ACCIÓN PARA EL CONTROL DE RALSTONIA SOLANACEARUM RAZA 2*. Ministerio de Agricultura y Ganadería. doi:https://aportecivico.gobiernoelectronico.gob.ec/legislation/processes/42/draft_v%2082%20ersions/62
- AGROCALIDAD. (2023). *Agencia de control de calidad fito y zoosanitaria. El producto orgánico ecuatoriano presente en la Organic Food & Eco Living Iberia 2023*. doi:<https://www.agrocalidad.gob.ec/el-producto-organico-ecuadoriano-presente-en-la%02organic-food-eco-living-iberia-2023/>
- Álvarez. (2013). *Dirección General de Sanidad Vegetal. Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria*. (SENASICA, Ed.) Obtenido de Dirección General de Sanidad Vegetal. Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/746658/FICHA_T_CNICA_MOKO.pdf
- Anchatuña Endara, D. J. (2018). *Serotipificación, resistencia antimicrobiana y determinación de genes de resistencia de Salmonella spp. aisladas de aves acuáticas silvestres en*

tres lagunas Andinas: Yahuarcocha, Yambo y Colta (Bachelor's thesis, Quito: UCE).

doi:<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/17100>

Andrade-Hoyos, P., Luna-Cruz, A., Osorio-Hernández, E., Molina-Gayosso, E.,. (2019).

Antagonismo de Trichoderma spp. vs hongos asociados a la marchitez de chile (Vol. 10). Revista mexicana de ciencias agrícolas.

doi:<https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326>

Añasco, P. U. (2023). *Aislamiento y caracterización convencional de bacterias anaerobias del compartimento 1 de la alpaca (Vicugna pacos)* (Vol. 7). Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar. doi:https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i2.5479

Apella, M. C. (2005). *Microbiología de agua. Conceptos básicos.* (Vol. 1).

doi:<http://www.ine.es/normativa/leyes/incinor.htm>

Arco, L. C. (2022). *Tinción de Gram intraoperatoria en bilis para la prevención de complicaciones infecciosas en la duodenopancreatectomía.* Cirugía española.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.ciresp.2021.05.004>

Avila Linares, A. (2023). *Cristalización de la catalasa-Peroxidasa (katG) de Mycobacterium tuberculosis.* Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

doi:<http://riaa.uaem.mx/handle/20.500.12055/3624>

Baidal Alvarez, L. L. (2023). *Evaluación del efecto bacteriostático y resistencia a antibióticos en juveniles del camarón blanco Penaeus vannamei (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias Naturales.* Universidad de Guayaquil.

doi:<http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/67641>

Blanco, J. A. (2021). *Razas, biovares y mecanismos de resistencia de aislados de Ralstonia solanacearum en el cultivo de papa (Solanum tuberosum L.) en Nicaragua* (Vol. 23).

La Calera. doi:<https://doi.org/10.5377/calera.v21i37.12821>

- Bull, C. D. (2010). COMPREHENSIVE LIST OF NAMES OF PLANT PATHOGENIC BACTERIA , 1980-2007. . *Journal of Plant Pathology*, 92(3), 551–592. .
- CAEICDA. (1996). *Taller de fitopatología tropical. 1era Ed. México*. COLPOS.
- Camino, P. (2018). *Respuesta de genotipos de banano y plátano procedentes de la colección de germoplasma del INIAP a MOKO (Ralstonia solanacearum) raza2 en condiciones de invernadero*. Obtenido de Respuesta de genotipos de banano y plátano procedentes de la colección de germoplasma del INIAP a MOKO (Ralstonia solanacearum) raza2 en condiciones de invernadero:
<http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/14447>
- Castañeda Alejo, S. M. (2020). *Evaluación de la capacidad degradativa de caucho de un consorcio microbiano nativo bajo condiciones de laboratorio, Arequipa, 2019*.
doi:<https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/9825>
- Castro, S. T. (2006). *Comparación de diferentes métodos para identificar las especies del género Proteus* (Vol. 38). Revista argentina de microbiología.
doi:http://http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S032575412006000300002&script=sci_arttex
- Champoiseau, P. G. (2023). *Ralstonia solanacearum race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties* (Vol. 10). Plant Health Progress.
doi:<https://doi.org/10.1094/PHP-2009-0313-01-RV>
- Companioni González, B. D. (2019). *Trichoderma: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura* (Vol. 19). Biotecnología Vegetal.
doi:http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2074-86472019000400237
- Cruz, P. R. (2023). *Caracterización morfológica y bioquímica de Ralstonia solanacearum raza 2, bacteria patógena en cultivos de banano y plátano en El Carmen, Manabí, Ecuador* Caracterización morfológica y bioquímica de Ralstonia solanacearum raza

2, *bacteria patógena en ban* (Vol. 10).

doi:<https://doi.org/10.29166/siembra.v10i1.4305>.

Delgado Rospigliosi, A. S. (2019). *Evaluación del consorcio microbiano aislado de desechos líquidos de tinción "GRAM", para la biorremediación de aguas 86 sintéticas con cristal violeta*. Ucsm.edu.pe.

doi:<https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/9747>

Delgado, R. M. (2014). *First Report of Moko Disease Caused by Ralstonia solanacearum Race 2 in Plantain(Musa AAB) in Ecuador*. (Vol. 30). New Disease Reports.

Delgado, R., Morillo, E., Buitrón, J., Bustamante, A., & Sotomayor, I. (2014). *First Report of Moko Disease Caused by Ralstonia solanacearum Race 2 in Plantain(Musa AAB) in Ecuador* (Vol. 30). New Disease Reports,.

Denny, T. (2007). Plant pathogenic Ralstonia species. *Springer*, 573–644.

EFEagro. (2023). *La exportación de banano de Ecuador cae 6,57 % en 2022*. Obtenido de La exportación de banano de Ecuador cae 6,57 % en 2022:

<https://efeagro.com/exportacion-banano-ecuador/>

Espinal, G. (2005). *Manual de prácticas de microbiología I*. INTEC.

Estrada Martínez, S. &.-P. (2017). *Producción de banano orgánico, una experiencia exitosa en La sabana del cantón pasaje, provincia El Oro, Ecuador* (Vol. 51).

Fangio, M. F. (2007). *Actividad antimicrobiana de mieles del sudeste de la provincia de Buenos Aires frente a Escherichia coli* (Vol. 39). Revista argentina de microbiología. doi:http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S032575412007000200013&script=sci_arttext

FAO, O. d. (1995). *Norma Internacional sobre Medidas Fitosanitarias No. 4 sobre Medidas*.

- Giraldo, M. C. (2011). *Análisis de la variabilidad genética de la colección colombiana de musáceas usando marcadores isoenzimáticos* (Vol. 60). Acta Agronómica.
- González, I. A. (2009). Protección vegetal.
doi:http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000200001
- González, L. &. (2016). *Diseño e implementación de una plataforma de software, aplicada a la determinación de microorganismos en medios de cultivo selectivos*.
<http://repositoriodspace.unipamplona.edu.co/jspui/handle/20.500.12744/458>.
- Guédez, C., Castillo, C., Cañizales, L., & Olivar, R. (2008). *Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible* (Vol. 7). Academia.
- Gutiérrez, G. C. (2023). *Respuesta de la producción de plantas plátano (Mussa spp) porel método de micro cormos con la aplicación de tres bioestimulantes (Bachelor's thesis, Jipijapa-Unesum)*. doi:<http://repositorio.unesum.edu.ec/handle/53000/5290>
- Handelskammer, D.-E. I.-u. (2023). *Informe sector bananero AHK Ecuador; AHK Ecuador*.
Obtenido de Informe sector bananero AHK Ecuador; AHK Ecuador.
- Hayward, A. (1991). *Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by Pseudomonas solanacearum*.
- Hernández, A. F.-H.-C. (2009). *Clavibacter michiganensis ssp sepedonicus: Una Enfermedad Bacteriana En El Cultivo De Papa (Solanum Tuberosum L.) En Sonora, México*. (Vol. 10). Tropical and Subtropical Agroecosystems.
- Hinojoza. (2023). *Tinción de Gram de líquido biliar para la prevención de complicaciones infecciosas en la duodenopancreatectomía*. Universidad de Málaga.
doi:<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=315698>
- Infante, D., Martínez, B., González, N. & Reyes, Y. (2009). *Mecanismos de acción de Trichoderma frente a hongos fitopatógenos* (Vol. 24). Protección Vegetal.
doi:http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S10102752200900010000

- INIAP, I. N. (2022). *Escalando mejora continua en banano orgánico de exportación familiar (BOXF)*. Obtenido de Escalando mejora continua en banano orgánico de exportación familiar (BOXF):
https://www.iniap.gob.ec/wpcontent/uploads/2022/01/PROYECTO%20FONTAGRO%20BOXF%202021_Postulacion.pdf
- International, C. (2019). *Ralstonia solanacearum race 2 (moko disease) .Crop Protection Compendium. Global Module. CAB International. United Kingdom.*
doi:<https://www.cabi.org/isc/datasheet/44999>.
- Intriago, M. (1988). *Diagnóstico y Reconocimiento de las Principales Enfermedades de Banana en Ecuador. . Diagnóstico y Reconocimiento de las Principales Enfermedades de Banana en Ecuador. In Memorias Curso “Tecnología del cultivo de banano” 7 al 10 de junio de 1988 (Vol. 1).*
- Lwin, M. Y. (2006). *Development of biological control of Ralstonia solanacearum through antagonistic microbial populations.* (Vol. 8). International Journal of agriculture and biology.
- MAG, M. d. (2018). *Indicador Agrocomercio*. Obtenido de Indicador Agrocomercio:
<http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/indicador-agrocomercio>
- MAGAP. (2021). *Rendición de Cuentas 2021.*
doi:<http://1.https://www.agricultura.gob.ec/rendicion-de-cuentas-2021/>
- Mansfield, J. G. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant. *Molecular plant pathology*, 13(6), 614-629. .
- Martinez Garnica, A., & García Rubio, F. (2003). *Manejo de la enfermedad del Moko o ereke en el cultivo del plátano para la orinoquia Colombiana [Management of Moko or ereke disease in banana cultivation in the Colombian Orinoquia region].*
doi:http://turipana.org.co/manejo_enfermedad_moko.htm.

- Morales Gallardo, S. (2016). *Evaluación del potencial antagónico de cepas silvestres de Trichoderma spp. hacia microorganismos fitopatógenos*.
doi:http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/1950
- Obrador, J. (2016). *Variabilidad genética de la bacteria Ralstonia solanacearum de cepas aisladas de plátano en México*. Centro de Investigación.
- Ono, K., Hara, H. y Akazawa, J. (1984). *Estudios ecológicos sobre la marchitez bacteriana del tabaco, causada por Pseudomonas solanacearum EF Smith. V. El movimiento del patógeno en las plantas de tabaco*. (Vol. 43). o. Boletín de la Estación Experimental del Tabaco de Okayama.
doi:<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19851304189>
- Ortega, D. A. (2017). *Alta prevalencia de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAs) en aislados clínicos de Klebsiella pneumoniae (KPN) productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)* (Vol. 30). Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas. doi:<https://doi.org/10.26807/remcb.v30i1-2.70>
- Overbeek, L. S. (2002). *A polyphasic approach for studying the interaction between Ralstonia solanacearum and potential control agents in the tomato phytosphere* (Vol. 48). Journal of microbiological. doi:[https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(01\)00347-5](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(01)00347-5)
- Patrice, G. (2009). *Ralstonia solanacearum raza 3 biovar 2. El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos – Programa de Iniciativa Nacional de Investigaciones*.
- Patrice, G. (2009). *Ralstonia solanacearum raza 3 biovar 2. El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos – Programa de Iniciativa Nacional de Investigaciones*.
- Perea Soto, J. M. (2011). *Identificación de razas y biovars de Ralstonia solanacearum aisladas de plantas de tomate*. (Vol. 29). Revista mexicana de fitopatología.
doi:http://8.https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092011000200002

- Pérez, R., González, T., & Rojas, J. (2014). *Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y maíz.*
- Portal, N. G. (2011). *Purificación de Metabolitos Fitotóxicos a Partir del Filtrado de Cultivode* (Vol. 11). *Revista Biotecnología Vegetal.*
doi:<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/226>
- Pradhanang, P. M. (2003). *Effects of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato* (Vol. 87). *Plant Disease.*
doi:<https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.4.423>
- Prieto Romo, J., Morales Osorio, JG, & Salazar Yepes, M. (2012). *Identificación de nuevos hospedantes de *Ralstonia solanacearum* (Smith) raza 2 en Colombia* (Vol. 23). *Revista de Protección Vegetal.*,. doi:http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-275220120003000003&script=sci_arttex
- PROEcuador. (2022). *Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones. Obtenido de Análisis sectorial Plátano 2022.* Obtenido de Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones. Obtenido de Análisis sectorial Plátano 2022:
[http://www.proecuador.gob.ec/wpcontent/uploads/2015/06/PROEC_AS2015_PLATA NO1.pdf](http://www.proecuador.gob.ec/wpcontent/uploads/2015/06/PROEC_AS2015_PLATA_NO1.pdf)
- Ramírez, A. & Mijangos, L. (1999). *Efectos Nocivos Provocados por el Uso de Plaguicidas en la Fauna Silvestre de México y sus Consecuencias Ecológicas.*
doi:<http://www.ambiente-ecologico.com/revist54/ramire54.htm>
- Rueda-Puente, E. O.-M.-P.-G. (2014). *Ralstonia 93 solanacearum: Una enfermedad bacteriana de importancia cuarentenaria en el cultivo de *Solanum tuberosum* L* (Vol. 9). *INVURNUS.* doi:<https://www.researchgate.net/publication/264701986>

- SAGARPA. (2016). *Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural pesca y alimentación. Moko del platano Ralstonia solanacearum raza 2 Smith (Vol. 1)*. Boletín Técnico no. 3.
- Sánchez Jorge, M. (2021). *Ralstonia Solanacearum en el cultivo de plátano en el Ecuador. Universidad Tecnica de Babaoyo*. UTB.
doi:<http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/10306>
- Sánchez Jorge, M. (2021). *Ralstonia Solanacearum en el cultivo de plátano en el Ecuador. Universidad Tecnica de Babaoyo*. . Obtenido de
<https://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/10306>
- Sánchez, M. (2021). *Ralstonia Solanacearum en el cultivo de plátano en el Ecuador. Universidad Tecnica de Babaoyo*. Obtenido de
<https://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/10306>
- Savadori, P. D. (2023). Acta histochemica. doi:<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2022.151992>
- Savadori, P., Dalfino, S., Piazzoni, M., Parrini, M., Del Fabbro, M., Tartaglia, GM y. (2023). Acta histochemica. doi:<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2022.151992>
- Scharalau. (2023). *Scharlau Microbiología - Ficha Técnica, 064-PA6068 DRBC Agar*.
doi:https://www.scharlab.com/docs/tds/descargarpdf.php?path=064PA6068_TDS_ES.pdf&idid=ES&ref=064-PA6068
- Schomburgk, R. (1840). *Urgent Plant Pest and Disease Problems in the Caribbean (Vol. 2)*. Jamaica, Caribbean: Cambridge University Press.
- Schomburgk, R. (1840). *Urgent Plant Pest and Disease Problems in the Caribbean (Vol. 1)*. Cambridge University Press.
- SENASICA. (2013). *Manual Operativo de la Campaña contra Moko del Plátano (Ralstonia solanacearum raza 2)*. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad

Agroalimentaria (SENASICA). doi: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/288483/Manual_Operativo_de_la_Campa_a_contra_Moko_del_Platano.pdf.

Sharma, D. y. (2019). *Characterization of Ralstoniasolanacearum isolates using biochemical, cultural, molecular methods and pathogenicity tests*. (Vol. 8). Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.

doi:<https://www.phytojournal.com/archives/2019/vol8issue4/PartAU/8-4-392-512.pdf>

Smith, E. F. (1914). *Las bacterias en relación con las enfermedades de las plantas*. instituto carnegie, Washington DC.

Umrao, K. V. (2021). *Biocontrol potential of bacteriophage ϕ sp1 against bacterial wilt-causing Ralstonia solanacearum in 95 Solanaceae crops* (Vol. 31).

doi:<https://doi.org/10.1186/s41938-021-00408-3>

Veloz, K. (2015). *Determinación del comportamiento de 15 cultivares de musa spp y 2 heliconias frente a la inoculación de Ralstonia solanacearum, agente causal del moko bacteriano*. doi:<https://repositorio.uteq.edu.ec/items/c68b49cf-847b-4383-%20be9d-09b95f60caba>

Villanueva, V. A. (2020). *Introducción de marca de banano orgánico en el mercado ecuatoriano Introduction of organic banana brand in the Ecuadorian market*. (Vol. 51). INNOVA Research Journal.