

Caracterización morfológica y bioquímica de *Ralstonia solanacearum* raza 2, bacteria patógena en cultivos de banano y plátano en El Carmen, Manabí, Ecuador

Morphological and biochemical characterization of *Ralstonia solanacearum* race 2, pathogenic bacterium in banana and plantain crops in El Carmen, Manabí, Ecuador

Paulina Stephanie Saquicela Cruz¹, Elena V. Romanova²,
Rocío Noemí Guamán Guamán³, Santiago Miguel Ulloa Cortázar⁴,
Ángel Fabián Villavicencio Abril⁵



Siembra 10 (1) (2023): e4305

Recibido: 09/01/2023 Revisado: 03/02/2023 Aceptado: 06/03/2023

¹ Universidad de Rusia de la Amistad de los Pueblos-RUDN University. Avenida Miklukho-Maklaya, 6, 117198. Moscú, Rusia.

✉ 1032214693@pfur.ru

🌐 <https://orcid.org/0000-0002-5104-9758>

² Universidad de Rusia de la Amistad de los Pueblos-RUDN University. Avenida Miklukho-Maklaya, 6, 117198, Moscú, Rusia.

✉ romanova_ev@pfur.ru

🌐 <https://orcid.org/0000-0002-8287-5462>

³ Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Sede Santo Domingo de los Tsáchilas. Vía Santo Domingo-Quevedo km 24. P.O. BOX: 171-5-231B Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador.

✉ rocioguamang08@hotmail.com

🌐 <https://orcid.org/0000-0002-1795-4068>

⁴ Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Sede Santo Domingo de los Tsáchilas. Vía Santo Domingo-Quevedo km 24. P.O. BOX: 171-5-231B Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador.

✉ smulloa@espe.edu.ec

🌐 <https://orcid.org/0000-0001-6403-6780>

⁵ Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Sede Santo Domingo de los Tsáchilas. Vía Santo Domingo-Quevedo km 24. P.O. BOX: 171-5-231B Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador.

✉ avillavicencio1@espe.edu.ec

🌐 <https://orcid.org/0000-0003-0058-271X>

*Autor de correspondencia:
rocioguamang08@hotmail.com

Resumen

Las musáceas son muy importantes para la alimentación a escala mundial. En el Ecuador, estas ocupan el 20,57 % de la superficie plantada, siendo el cantón El Carmen uno de los principales sitios dedicados a esta explotación. Por otra parte, *Ralstonia solanacearum* es la causante de la enfermedad conocida como moko de plátano, la cual puede desaparecer el 100 % de una plantación. Por ello se realizó una caracterización morfológica y bioquímica de *R. solanacearum* raza 2, bacteria patógena en cultivos de banano y plátano en El Carmen, Manabí, Ecuador, con la finalidad de identificar y determinar las características, que confirmen la presencia del patógeno etiológico de la enfermedad presente en la mencionada zona. El análisis morfológico y bioquímico se realizó en laboratorio, las muestras fueron tomadas de plantaciones de plátano y banano (suelo y pseudotallo) con síntomas del moko. Como resultado, se identificó virulencia en la mitad de las muestras, se confirmó que la bacteria es Gram negativa, en forma de bacilo, positiva a catalasa, indol negativa, con carácter oxidativo y fermentativo de lactosa y glucosa, sin presencia de ácido sulfhídrico, incapaz de hidrolizar almidón, en cultivo *in vitro*; se confirmó que la temperatura de 4 °C y pH de 4,5 inhiben el aumento de sus poblaciones, sin embargo, los rangos de 25 y 37 °C con pH de 6,5 a 8,5 no resultaron ser restrictivos para su propagación; por ello, se afirma que El Carmen cumple con los estándares requeridos para que el patógeno proliferara de manera óptima.

Palabras clave: identificar características, moko del plátano, morfología bacteriana, *Ralstonia solanacearum*, virulencia.

Abstract

The musaceae are very important for food worldwide, in Ecuador they occupy 20,57% of the planted area, being the canton El Carmen one of the main sites dedicated to this exploitation. On the other hand, *Ralstonia solanacearum*, is the cause of the moko disease in plantain, which can wipe out 100% of a plantation. Therefore, a morphological and biochemical characterization of *R. solanacearum* Race 2, pathogenic bacterium in banana and plantain crops in El Carmen, Manabí, Ecuador, was carried

SIEMBRA

<https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/SIEMBRA>

ISSN-e: 2477-8850

ISSN: 1390-8928

Periodicidad: semestral

vol. 10, núm 1, 2023

siembra.fag@uce.edu.ec

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



Esta obra está bajo una licencia internacional Creative Commons Atribución-NoComercial

out in order to identify and determine the characteristics that confirm the presence of the etiological pathogen of the disease present in the mentioned area. The morphological and biochemical analysis was carried out at laboratory level; the samples were taken from plantain and banana plantations (soil and pseudo-stem), with symptoms of moko disease. As a result, virulence was identified in half of the samples. It was also confirmed that the bacterium is Gram negative, in its bacillus form, catalase positive, indole negative, with an oxidative and fermentative character of lactose and glucose, without presence of hydrogen sulfide, unable to hydrolyze starch in vitro culture. It was confirmed that the temperature of 4°C and pH of 4,5 inhibit the increase of its populations; however, the ranges of 25 and 37°C with pH of 6,5 to 8,5 did not prove to be restrictive for its propagation; therefore, it is affirmed that El Carmen meets the required standards for the t pathogen o proliferate optimally.

Keywords: characterization, moko disease in plantain, bacterial morphology, *Ralstonia solanacearum*, virulence.

1. Introducción

En el Ecuador, las musáceas participan con el 20,57 % de la superficie plantada, estableciéndose como el segundo cultivo permanente más representativo del país luego del cacao (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos [INEC], 2021).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2020), la cantidad de importaciones de plátano alcanzó en el año 2020 un estimado de 1.378.826 toneladas (ton) y en exportaciones un total de 1.463.828 ton, aproximadamente. A escala mundial, el mayor productor de plátano es África, ya que cubre el 71,8 % de la producción total, mientras que América produce 24,6 % (Lazo-Roger et al., 2017). Cabe considerar que Ecuador ha exportado un total estimado de 225.183 ton de plátano durante el mismo año (FAO, 2020), por lo que se ha establecido como uno de los principales países exportadores de plátano en el mundo, siendo el cantón El Carmen perteneciente a la provincia de Manabí, uno de los mejores sitios dedicados a esta explotación agrícola, ya que se ha logrado contabilizar más de 32.000 hectáreas dedicadas al cultivo de plátano, es decir, un 18,39 % de la producción agrícola total (Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal de El Carmen, 2021).

Por otra parte, *Ralstonia solanacearum* es una bacteria que tiene una distribución global y una amplia gama de hospederos, que podrían llegar a ser más de 200, en aproximadamente 50 diferentes familias de plantas (Denny, 2006). Esta bacteria causa una enfermedad muy agresiva y puede crecer en diversas condiciones climáticas (García et al., 2019; Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria [SENASICA], 2019). *R. solanacearum* llegó a ser catalogada, como la segunda más destructiva entre las bacterias fitopatógenas, generando graves consecuencias económicas en los productores (Mansfield et al., 2012), se considera que las pérdidas causadas en los cultivos debido a este patógeno en todo el mundo son extremadamente altas, pero difíciles de calcular debido a la irregularidad en la recopilación de datos (Paudel et al., 2020). Sin embargo, Elphinstone (2005) argumenta, que las pérdidas económicas causadas por *R. solanacearum* redondearían los mil millones de dólares a escala mundial. De las razas existentes de *R. solanacearum*, solo la raza 2 es la causante de enfermedad en las plantaciones de plátano y banano, también es conocida como moko de plátano o banano (Robinson y Galán Saúco, 2010; SENASICA, 2019). El moko puede ser tan agresivo que llegaría a desaparecer el 100 % de una plantación (Álvarez et al., 2015). A escala mundial, la presencia de la raza 2 de esta bacteria se logró confirmar en más de 40 países, distribuidos en todos los continentes, siendo América el continente más afectado y el que aún alberga a la bacteria, mientras que en otros continentes ya han logrado obtener el estatus de peste erradicada (European and Mediterranean Plant Protection Organization [EPPO], 2018). En Colombia se ha confirmado que más del 95 % de las plataneras se han visto afectadas por esta bacteria; asimismo, en Guyana se han reportado pérdidas de hasta el 74 % (SENASICA, 2019). Aunque en Ecuador no se han logrado establecer cifras exactas de las pérdidas que ha generado dicha enfermedad, se la conoce como el enemigo silencioso del plátano (Zumba, 2022).

Esta enfermedad fitosanitaria se alberga en el sistema vascular, provocando un crecimiento retrasado, marchitamiento y bajo rendimiento del cultivo, lo que genera pérdidas económicas en los productores; cabe considerar que este patógeno ataca a todas las variedades del género *Musa* (Sánchez Jorge, 2021; SENASICA, 2019).

Según García et al. (2019) y Álvarez et al. (2015), *R. solanacearum* presenta característicamente dos tipos de colonias: una es la virulenta (de color blanca con centros rosados, mucoide, debido a la

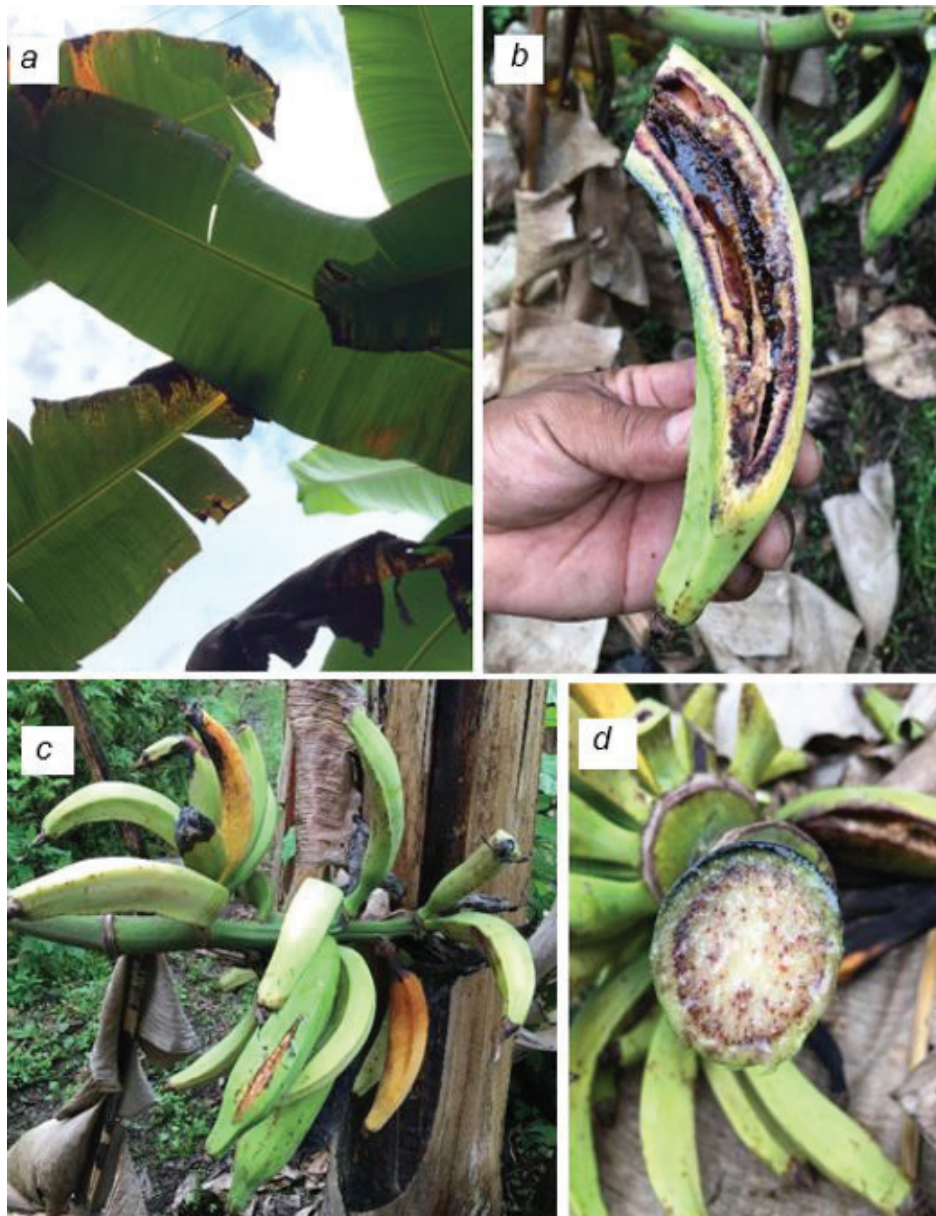


Figura 1. Síntomas de presencia de moko de plátano, a) en hojas (amarillamiento), b) en dedos (pudrición seca), c) en racimos (maduración temprana de dedos), d) en raquis (taponamiento de haces vasculares).

Figure 1. Symptoms of moko disease on plantain, a) on leaves (yellowing), b) on fingers (dry rot), c) on bunches (early ripening of fingers), d) in rachis (clogging of vascular bundles).

abundante producción de polisacáridos extracelulares, lisos, irregulares y redondos); y las colonias no virulentas (color rojo oscuro, secas, redondas, opacas, arrugadas y no fluidas, a las cuales para su diferenciación se debe emplear un medio de cultivo a base de cloruro de Trifeniltetrazolio-TTC).

Entre los síntomas más representativos del moko, se suele observar que la hoja central o bandera (Figura 1a), tiene un color amarillo, la que termina cayéndose, también es posible ver la *pudrición* (La Hora, 2022). Los frutos se ennegrecen, secan y presentan necrosis interna, de color marrón (Figura 1b), también se suele apreciar la deformación de racimos (Figura 1c), mientras que los haces vasculares del pseudotallo y raquis enfermo toman generalmente una coloración café-rojiza oscura (Figura 1d) (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca [MAGAP], y Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro [Agrocalidad], 2020).

Lamentablemente, en las plantaciones puede ocurrir la pérdida total de las plantas afectadas, siendo este uno de los mayores costos de manejo, relacionados con la aplicación de medidas de erradicación de focos infecciosos, también se debe agregar a las pérdidas, el tiempo que debe cesar la siembra de plátano y/o banano en el área donde se detectó la presencia del patógeno (MAGAP y Agrocalidad, 2020),

dicho tiempo puede variar, dependiendo de la cepa de *R. solanacearum*, ya que existen casos en las que el patógeno puede sobrevivir en suelo hasta 18 meses y en otros casos menos de 6 meses, debido a la alta resistencia de supervivencia que posee la bacteria, la que se desarrolla de mejor manera en agua contaminada, suelo húmedo o capas profundas del suelo (> 75 cm), esto se considera un reservorio del patógeno desde donde puede propagarse (Champoiseau et al., 2009; SENASICA, 2019).

A todos estos factores se suma el uso inadecuado del material de siembra, el mismo que, al no ser desinfectado de forma correcta, puede contribuir a la diseminación de la enfermedad, en grandes extensiones, incluyendo distancias entre países (Pardo et al., 2019). Asimismo, ha quedado demostrado que muchas malezas pueden ser hospedantes alternativos de la bacteria, al actuar como un puente para el patógeno entre los cultivos (MAGAP y Agrocalidad, 2020). Otros vectores de transmisión señalados por SENASICA (2019) son los insectos y las herramientas de poda contaminadas.

Por otra parte, asegurar la presencia de una enfermedad fitopatológica, por el simple hecho de observar y relacionar los síntomas con el modo de acción, no es suficiente para poder determinar un protocolo de manejo fitopatológico adecuado, por lo cual es indispensable que se realicen pruebas en laboratorio para identificar al agente etiológico de la enfermedad (Pardo et al., 2019). Según Delgado et al. (2016), la caracterización morfológica, fisiológica y química de las bacterias se han convertido en una inminente forma de identificar y determinar los caracteres que permiten diferenciar una especie bacteriana de otra, permitiendo estudiar de manera particular a las diferentes especies, ya que no todas poseen las mismas reacciones ante los mismos agentes (Universidad Abierta y a Distancia de México [UnADM], 2017). Se conoce que, ante las pruebas bioquímicas, las reacciones que experimenta cada organismo bacteriano son diferentes, por lo que se reconocen sus resultados como la “huella digital” de las bacterias, al basarse en la reacción de las enzimas (Kaiser, 2021).

Cabe reiterar que la identificación bacteriana por medio de las pruebas antes mencionadas, se basan en las características observables de la bacteria, como la morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas; estas son las más utilizadas, al ser mayormente accesibles económicamente en comparación con las pruebas de carácter genotípico (Bou Arévalo et al., 2011).

Por la problemática anteriormente expuesta y considerando la poca información actualizada encontrada con respecto a la enfermedad en cultivos de banano y plátano en Ecuador, se planteó una investigación dirigida a la caracterización morfológica y bioquímica de *Ralstonia solanacearum* raza 2, bacteria patógena en las plantaciones antes mencionadas, en El Carmen, Manabí, Ecuador, con la finalidad de identificar y determinar las características que confirmen la presencia del patógeno etiológico de la enfermedad presente en la mencionada zona; además de la identificación de los factores que afectan al crecimiento de la misma. La aplicación de la presente investigación tuvo como finalidad, generar información destinada a la detección y manejo de la bacteria, para otorgar bases que permitan la elaboración de un protocolo de manejo o control del moko del plátano, en el sitio evaluado.

2. Materiales y Métodos

El análisis bioquímico y morfológico de las cepas de *Ralstonia solanacearum* raza 2, se realizaron en los laboratorios de Microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Santo Domingo-Ecuador, en convenio con la Universidad de la Amistad de los Pueblos de Rusia.

Las muestras fueron tomadas en plantaciones de plátano y banano, con síntomas de infección por la bacteria *R. solanacearum* patógena del moko del plátano, tanto del suelo, como de tejidos vegetales (pseudotallo); estas se recogieron en los puntos considerados infectados que se mantenían registrados en las bases de datos de Agrocalidad (empresa gubernamental destinada a controlar, regular y asegurar la protección y el mejoramiento de la sanidad animal-vegetal e inocuidad alimentaria), en el cantón El Carmen, provincia de Manabí, Ecuador. Se georreferenciaron los puntos, en donde se recolectaron las muestras con ayuda del sistema de posicionamiento global.

2.1. Toma de muestras

Las muestras del tejido vegetal fueron tomadas de las plantas con síntomas de marchitamiento (Figura 1a, b, c, d), las muestras recolectadas fueron pequeñas porciones del pseudotallo, en las cuales se logró

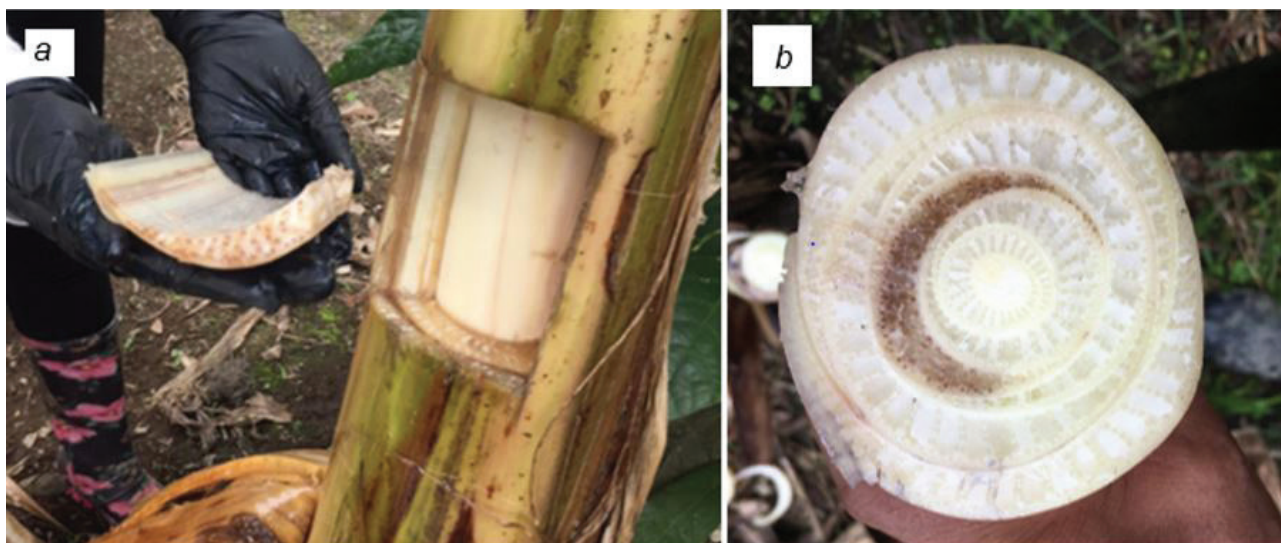


Figura 2. Muestras de pseudotallo con presencia de moko de plátano, a) extracción de la muestra, b) presencia de la bacteria en el centro del pseudotallo.

Figure 2. Samples of pseudostem with presence of moko on plantain, a) sample extraction, b) presence of the bacterium in the center of the pseudostem.

identificar presencia de haces vasculares de coloración café-rojiza (típico de la enfermedad) como se muestra en la Figura 2a, se tomaron a una altura de 80 cm del pseudotallo, con un cuchillo desinfectado con etanol al 70 %, extrayéndose un fragmento de este, en forma rectangular (5 cm de ancho x 10 cm de largo x 2 cm de espesor, aproximadamente), según lo descrito por Delgado et al. (2016). Se fueron extrayendo las diferentes capas externas del pseudotallo hasta lograr obtener una porción con haces vasculares necrosadas, comúnmente entre la tercera y cuarta capa (Figura 2b). Estas muestras se colocaron de forma individual en una funda plástica estéril, debidamente identificada, para poder ser almacenada en una hielera antes de ser transportada al laboratorio.

Las muestras que no presentaron haces vasculares rojizos se devolvieron nuevamente al pseudotallo, luego se cubrió con cinta adhesiva para impedir que la bacteria pudiese escurrir por la herida, contaminando el suelo u otros vectores que puedan diseminar la bacteria (Delgado et al., 2016). Finalmente, se aplicó el insecticida Deltaclor, con dosis de 1 centímetro cúbico por litro sobre la base de la planta hasta la zona en donde se tomó la muestra, a fin de reducir la probabilidad de algún tipo de dispersión del patógeno a través de insectos.

Para evaluar si las muestras del suelo albergaban al patógeno se empleó la siguiente metodología: las muestras se tomaron alrededor de las plantas que presentaron los síntomas típicos de la bacteria (Figura 1). Para ello se eliminó la capa superficial del suelo (5 cm) y se tomó un aproximado de 10 gramos de muestra de suelo en cuatro puntos diferentes, en un radio de 1 m, y se colocaron todas estas muestras dentro de una sola funda plástica estéril etiquetada para ser identificada y trasladada al laboratorio (Obrador Sánchez, 2016; Obregón Barrios et al., 2011)

2.2. Aislamiento de la bacteria

Los tejidos vasculares con signos característicos de la bacteria en las muestras se cortaron en pequeños fragmentos (1 cm x 1 cm) y se sumergieron en un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua destilada. Después de cinco minutos de incubación a temperatura ambiente (el agua del tubo se volvió turbia debido a la exudación de células bacterianas de los extremos cortados del tejido enfermo), luego se tomaron 100 μ l de una dilución con concentración 10^{-7} UFC/ml. Esta suspensión bacteriana diluida se vertió sobre la superficie de un medio solidificado de Kelman (1954), agar de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC o TZC), preparado según la guía establecida por García et al. (2019) para la diferenciación de cepas virulentas, de las no virulentas (Tabla 1). Finalmente, la suspensión bacteriana se extendió sobre la superficie del medio TTC, con un asa triangular estéril, las placas inoculadas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas.

Tabla 1. Guía para la preparación del medio de cultivo de TTC (García et al., 2019)^{a,b,c}.
Table 1. Guide for the preparation of the TTC culture medium (García et al., 2019).

Medio	Por litro
Caseína	1 g
Peptona	10 g
Glucosa	5 g
Para medio sólido:	
Agar	17 g

^a pH 6,5 - 7,0.

^b Esterilización a 121°C y 15 libras de fuerza por pulgada cuadrada (psi) durante 20 min.

^c Finalmente, se agregó 5 ml de una solución madre de TTC al 1 %. El TTC se agregó solo y después de que se esterilizó el medio en autoclave y se dejó enfriar hasta un aproximado de 55 °C. La solución madre de TTC también se esterilizó en autoclave durante 5 minutos a 121 °C y se almacenó a una temperatura de 4 °C.

Para aislar el patógeno del suelo se tomó 1 g de la mezcla de muestra de suelo, se diluyó en un tubo que contenía 9 ml de agua destilada estéril, se mantuvo en agitación manual por 5 min y después se tomaron 100 µl de la dilución con concentración 10⁻⁷ UFC/ml, luego se sembró en cajas Petri estériles que contenían el medio TTC, se incubó de la misma forma que en los tejidos vasculares. Este proceso se realizó por triplicado, a los dos tipos de muestras (vegetal y suelo). Después de la incubación se observaron los diferentes tipos de colonias, utilizando las características expuestas por los diferentes autores. Para colonias virulentas debían tener las siguientes características: ser de color blanco con centros rosados, y las colonias no virulentas de color rojo oscuro, secas, redondas, opacas, arrugadas y no fluidas (Fornos Blanco et al., 2021; Obrador Sánchez, 2016; Obregón Barrios et al., 2011).

2.3. Caracterización morfológica y bioquímica de *R. solanacearum*

Tinción Gram: se desarrolló con la metodología descrita por Sharma y Singh (2019). Se fijó la muestra en el portaobjetos, se colocó el cristal violeta, luego la muestra se sumergió en lugol, se enjuagó con alcohol, finalmente se bañó en safranina (colorea de rosa-rojizo a las bacterias Gram negativas), luego se observó bajo el microscopio, a un aumento de 100x, para determinar su forma y coloración. Esta prueba se realizó por triplicado.

Prueba de hidróxido de potasio (KOH): esta prueba se considera como específica para comprobar los resultados de la prueba antes descrita sin el uso de coloración (Silva Romeiro, 2001). Se colocaron aproximadamente 50 µl de KOH al 3 % (p/v), en un portaobjetos de vidrio, la muestra de la bacteria fue transferida asepticamente desde las placas de agar, sobre los 50 µl de KOH, con la ayuda de un asa estéril y se mezcló las células (si la viscosidad de la gota produjo un incremento considerablemente, son células Gram negativas) (Sharma & Singh, 2019). Esta prueba se realizó por triplicado a cada muestra.

La prueba de catalasa se realizó de acuerdo con los métodos descritos por Sharma y Singh (2019), para esto se añadió una gota de una solución al 3 % de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en un portaobjetos, y se añadió con ayuda de un asa estéril, una muestra del cultivo de la bacteria desde una placa de agar (la liberación de burbujas del cultivo se registró como catalasa positiva). La producción de burbujas de gas da una pista sobre la presencia de bacterias aeróbicas y facultativas (Razia et al., 2021). Esta prueba se realizó por triplicado a cada muestra.

Prueba de oxidación-fermentación: una vez preparado el medio de Hugh y Leifson, se inoculó por picadura (se introduce el asa, con el inóculo en un tubo conteniendo agar en columna, sin tocar las paredes del tubo y en forma paralela, asegurándose que el inóculo quede distribuido a lo largo de toda la punción) (Reynoso et al., 2015). Se realizó este procedimiento para cada muestra en dos tubos distintos, uno en condiciones de aerobiosis (sin parafina) y otro en circunstancias de anaerobiosis (con parafina). Se procedió a incubar las muestras por el lapso de 48 h a 37 °C, según el protocolo de Apolinario Carmona (2018), si ambos tubos se encontraran acidificados luego del tiempo de incubación, la bacteria corresponderá a un metabolismo fermentativo para el carbohidrato utilizado; al contrario, si el tubo aeróbico estuviera acidificado, la bacteria sería oxidativa.

Prueba de indol: en esta prueba se usó un método semejante al utilizado por Apolinario Carmona (2018). Se trabajó con un tubo de ensayo que contenía 7 ml de caldo caseína-peptona-glucosa (CPG), al que se inoculó con el patógeno e incubó por 24 h a 37 °C. Luego se tomó una pequeña alícuota de 2 ml, a la cual se le añadió el reactivo de Kovacs, con eso podemos determinar si se produjo indol (Kaiser, 2021) Esta prueba se realizó por triplicado para cada muestra.

Prueba de Kligler hierro agar: se preparó el medio de Kligler según la descripción del producto comercial (Rossi, 2021), inmediatamente se distribuyó a un tubo de ensayo. Este proceso se ejecutó nuevamente por cada repetición. Luego se dejó reposar, para enfriar en una ubicación inclinada de manera que se formó un pico de flauta profundo, para luego ser inoculado como corresponde; se sembró en estrías, en un tubo que contenía agar pico de flauta, usando la técnica de la picadura (Reynoso et al., 2015). Finalmente se incubó durante 24 horas a 37 °C. Para la lectura de resultados, se tomó en cuenta tres partes importantes: primero pico/fondo (si la reacción es ácida será amarilla - A y si la reacción es alcalina será roja - K); segundo la producción de gas (fue leído como positivo o negativo al igual que el tercero), y tercero la producción de ácido sulfhídrico (H₂S) (Hossain et al., 2021). Esta prueba se realizó por triplicado a cada prueba.

Prueba de hidrólisis de almidón: se prepararon placas de agar nutritivo que contuvieron 0,2 % de almidón soluble (p/v), se rayaron con los aislados y se incubó a 37 °C, hasta observar un fuerte crecimiento, luego las placas se inundaron con solución de IKI (lugol), la que contenía yodo a razón de 1 g; yoduro de potasio, 2 g; y agua destilada, 100 ml. Una zona clara alrededor de una colonia se registró como reacción positiva (Sharma y Singh, 2019).

2.4. Factores que afectan el crecimiento de la bacteria

Antes de observar los efectos que causan, un crecimiento o decrecimiento en los aislados de la bacteria en un cultivo *in vitro*, se tomó en cuenta los otros factores que puede influir en la presencia o ausencia de este patógeno, tales como las propiedades químicas del suelo y/o las condiciones del medio ambiente en donde crece la bacteria.

2.4.1. Análisis químicos del suelo

Se sabe que las características químicas del suelo influyen en la abundancia y diversidad de los patógenos del suelo, en nuestro caso *R. Solanacearum* (Spann y Schumann, 2010). Para estos análisis se empleó el protocolo establecido por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Ecuador [INIAP] establecido para el muestreo del suelo y su posterior análisis químico. Primero, se realizó una observación y selección del terreno, con la finalidad de identificar lotes con características agroecológicas (pendiente, vegetación, tipo de suelo, entre otros) y de manejo (drenaje, fertilización, edad del cultivo entre otros) similares, en cada área no mayor a 5 hectáreas se tomaron 15 submuestras, haciendo un recorrido en zigzag tomando en cuenta la metodología de Mendoza y Espinoza (2017). Evitando recolectar muestras en donde se haya colocado fertilizantes recientemente, al pie de las cercas, en caminos, en lugares de acumulación de materia vegetal, zonas con estiércol y zonas muy pantanosas (INIAP, 2006).

Previo a la toma de las submuestras, se limpió 5 cm de la superficie del suelo, luego con una pala se hizo un hoyo con forma de “V” de aproximadamente 20 cm; se tomó una muestra de entre 2 a 3 cm de espesor, con un machete limpio y se retiró los bordes de la muestra, hasta dejar un rectángulo aproximado de 5 cm de ancho, esta submuestra se colocó dentro de un balde limpio. Este proceso se repitió hasta conseguir el total de, mínimo, 15 submuestras, las mismas que se mezclaron uniformemente, de esta mezcla se tomó un aproximado de 1 kg y finalmente se colocó dentro de una funda plástica limpia, a la que se identificó con los datos necesarios antes de ser trasladados al laboratorio (INIAP, 2006).

En los análisis de suelo, se llegó a medir el pH, la materia orgánica [MO] se ocupó la titulación de Welkley-Black, las relaciones Ca/Mg, Mg/K y Ca+Mg/K por conductimetría. Los resultados fueron promediados para las fincas que mostraron presencia del patógeno y fueron descritas como “zona enferma” y “zona sana” se tomaron muestras de una finca con ausencia de la bacteria, para lograr comparar los resultados obtenidos.

2.4.2. Tolerancia de los aislados de *R. solanacearum* ante diferentes temperaturas

Para la determinar los factores que afectan el crecimiento del patógeno, se empleó una metodología basada en lo descrito por Bhanwar (2022), buscando determinar qué efecto tiene la temperatura en el crecimiento de la bacteria en los diferentes aislados, esto se estudió al almacenar los matraces a diferentes temperaturas de incubación; 4, 25 y 37 °C (± 1 °C). El cultivo bacteriano se inoculó por separado en tres diferentes matraces cónicos de 250 ml, que contenían 25 ml de caldo de TTC y tras su inoculación con un asa estéril, se incubó durante 48 horas a cada matraz a las diferentes temperaturas mencionadas. Transcurrido el tiempo se tomaron 100 μ l, para ser diluido a una concentración hasta 10^{-5} en agua destilada, luego se vertió sobre la superficie de una caja Petri con medio solidificado de TTC. Las placas inoculadas se incubaron finalmente a 37 °C por 24 h.

2.4.3. Tolerancia de aislados de *R. solanacearum* ante diferentes concentraciones de pH

El efecto del pH en el crecimiento de los aislados bacterianos se estudió ajustándolo en el caldo de TTC, este cultivo bacteriano también se inoculó por separado en 3 diferentes matraces cónicos de 250 ml, que contenían 25 ml de caldo de TTC y tras su inoculación con un asa estéril, se incubó a 37 °C durante 48 horas. El pH se ajustó en cada uno de los matraces sobre los niveles 4,5, 6,5 y 8,5, respectivamente. Transcurrido este tiempo, se tomaron 100 μ l para ser diluidos a una concentración hasta 10^{-5} en agua destilada, luego se vertió sobre la superficie de una caja Petri con medio solidificado de TTC. Las placas inoculadas se incubaron a 37 °C por 24 h. Las colonias finalmente fueron contadas directamente en la caja y registradas. Los datos obtenidos de la investigación realizada se analizaron mediante la prueba de Chi cuadrado, con un nivel de significación de 0,05.

3. Resultados y Discusión

3.1. Caracterización morfológica y bioquímica de *R. solanacearum*

En el cantón El Carmen, provincia de Manabí, Ecuador, se afirma la presencia de las cepas virulentas en seis muestras de tejidos vegetales y en tres muestras del suelo, las cuales se registraron en el mapa epidemiológico generado como resultado de la investigación, como se puede observar en la Figura 3, en el mapa se describen las coordenadas de toma de muestras y la altura sobre el nivel del mar de cada punto.

Las cepas virulentas aisladas en medio TTC mostraron las siguientes características: blancas con centros rosados, de bordes irregulares y circulares, mucoides. Estas características son paralelas a las halladas por Akter et al. (2021), Mutimawurugo et al. (2019) y Zheng et al. (2019) para cepas virulentas (Figura 4).

De las nueve muestras con presencia virulenta, todas mostraron resultado de bacilo Gram negativo (Tabla 2). La confirmación se dio cuando la prueba de KOH dio positiva, lo que significa que fueron bacterias Gram negativas (Tabla 2), al mostrar la formación de un hilo mucoide que, según Lemessa Ocho (2006), Sharma (2018) y Phondekar et al. (2020), son resultados característicos del patógeno.

La interpretación de los resultados de Kligler hierro agar (Tabla 2) fueron pico de flauta ácido (A) y de fondo de tubo ácido (A); interpretando al ácido cuando existe una coloración amarilla en el medio, lo que significa que el patógeno es fermentador de glucosa y lactosa, a esto se suma la no presencia de un ennegrecimiento, lo que significaría la ausencia de ácido sulfhídrico, esta interpretación se llevó a cabo según la ficha técnica de Rossi (2021). Hossain et al. (2021) nos explican que la bacteria tiene diferentes habilidades fermentadoras de azúcares, sumando a sus resultados se logra encontrar algunas investigaciones previas, como las de Barrios Díaz (2015) y Apolinario Carmona (2018), quienes nos indican que *R. solanacearum* es una bacteria fermentadora de glucosa y lactosa en el medio de Kligler, además de producir una reacción negativa ante la formación de ácido sulfhídrico, ratificando los resultados obtenidos en la presente investigación.

La prueba de catalasa dio positivo (Tabla 2), lo que se manifiesta visualmente con la aparición de burbujas de gas en la gota de en el peróxido de hidrógeno después de que se mezcló con un asa llena

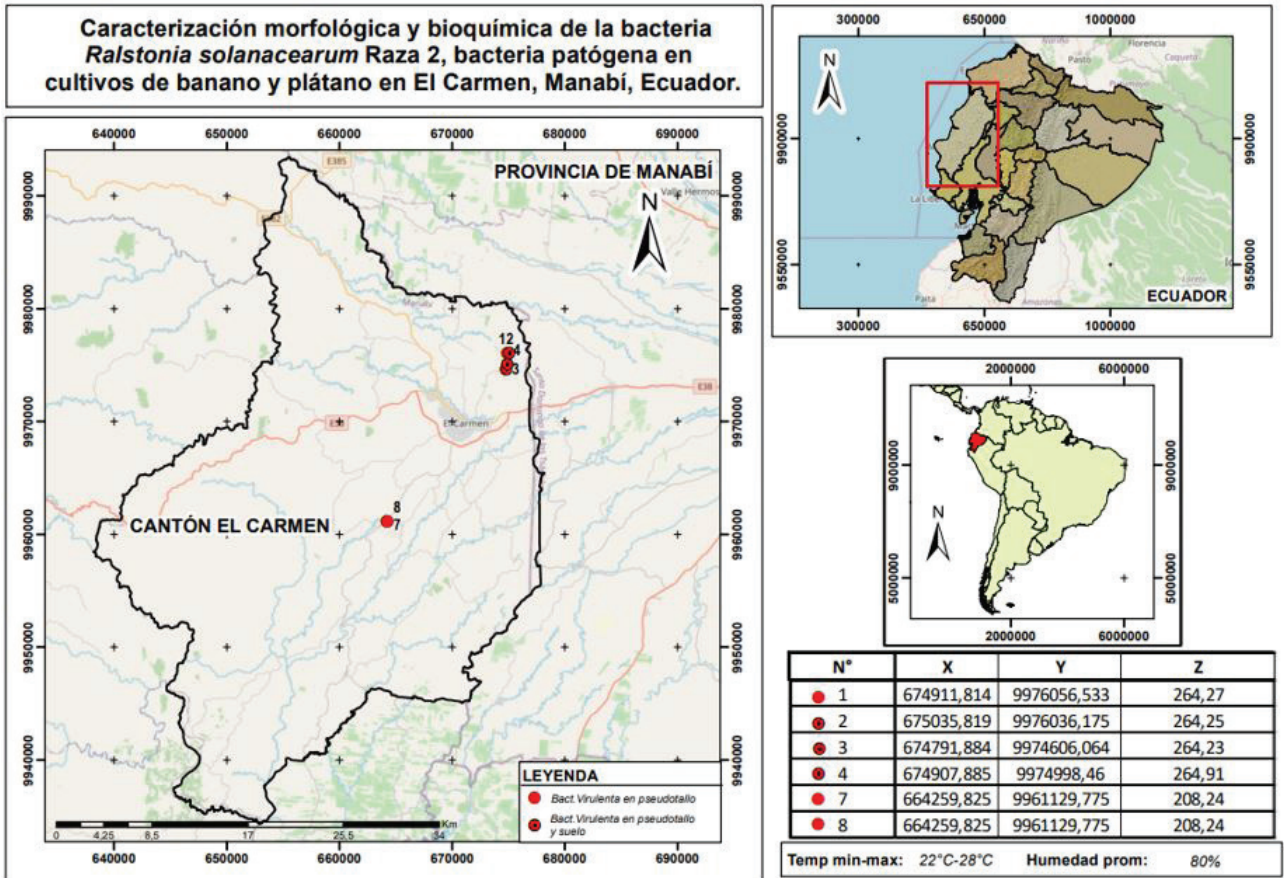


Figura 3. Mapa epidemiológico generado como resultado de la investigación.
Figure 3. Epidemiological map generated as a result of the research.

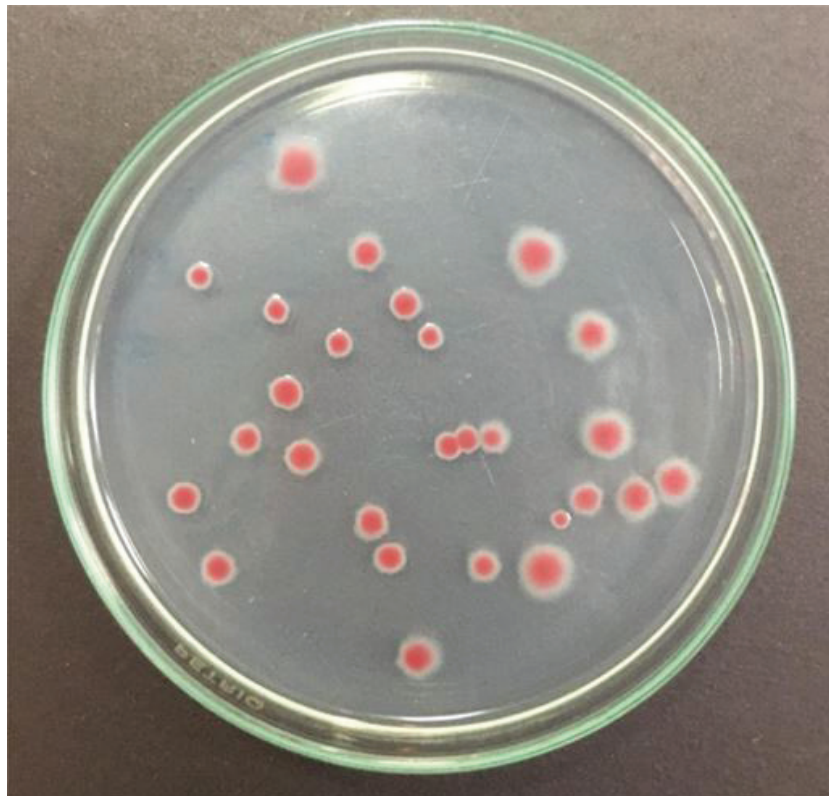


Figura 4. Aislados de *R. solanacearum* de cepa virulenta en medio TTC.
Figure 4. *R. solanacearum* isolates of virulent strain in TTC medium.

Tabla 2. Resultados de las pruebas morfológicas y bioquímicas a muestras positivas para moko en plátano.
Table 2. Results of morphological and biochemical tests on banana moko positive samples on plantain.

Muestras	Pseudotallo*						Suelo*		
	1	2	3	4	7	8	2	3	4
Pruebas morfológicas									
Tinción Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KOH	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pruebas bioquímicas									
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Metabolismo O/F*	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kligler (Pico/fondo) A/A, H ₂ S -	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de almidón	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Metabolismo oxidativo (O) / fermentativo (F) de carbohidratos; + positivo; - negativo; A = reacción ácida

de cultivo bacteriano en el portaobjetos de vidrio. Esta caracterización bioquímica ha sido realizada por investigaciones previas como las de Phondekar et al. (2020), Hossain et al. (2021) y Razia et al. (2021) a la bacteria *R. solanacearum*, en las que obtuvieron resultados paralelos a los descritos en esta investigación.

En la prueba de óxido-fermentación realizada al patógeno, se obtuvo un resultado oxidativo (Tabla 2), ya que solo el tubo sin parafina (aeróbico) se acidificó, es decir, cambió de coloración. En los trabajos de Perea Soto et al. (2011) y Dhital et al. (2011) ya habían descrito esta característica oxidativa al ocupar al hidrato de carbono, mientras que Cores Rodríguez y Scarzella Testa (2016), explican que la característica oxidativa es la manera que tiene el patógeno de obtener energía y nutrientes.

Por otro lado, tenemos a la prueba de indol, que se manifestó negativa (Tabla 2) ya que se mostró un anillo color caramelo en la superficie del medio líquido del tubo, ante la presencia del reactivo de Kovacs. Kaiser (2021) indica en su libro que algunas bacterias ocupan la enzima triptofanasa para convertir el aminoácido triptófano en moléculas de indol, ácido pirúvico y amoníaco, pero en el caso de la *R. solanacearum*, Kumari y Ranjan (2019) han expresado un resultado negativo ante esta prueba, resultados que concuerdan con los obtenidos por Restrepo Alvarado (2002) y Shokina et al. (2017) que identifican la ausencia de la enzima triptofanasa en el patógeno, ante un resultado negativo de la prueba.

La interpretación de los resultados de Kligler hierro agar (Tabla 2) fueron pico de flauta ácido (A) y de fondo de tubo ácido (A); interpretando ácido con la coloración amarilla del medio, lo que significa que el patógeno es fermentador de glucosa y lactosa, a esto se suma la no presencia de un ennegrecimiento, lo que significaría la ausencia de ácido sulfhídrico, esta interpretación se llevó a cabo según la ficha técnica de Rossi (2021). Hossain et al. (2021) explican que la bacteria tiene diferentes habilidades fermentadoras de azúcares, sumando a sus resultados se logra encontrar algunas investigaciones previas, como las de Barrios Díaz (2015) y Apolinario Carmona (2018), quienes indican que *R. solanacearum* es una bacteria fermentadora de glucosa y lactosa en el medio de Kligler, además de producir una reacción negativa ante la formación de ácido sulfhídrico, ratificando los resultados obtenidos en la presente investigación.

En cuanto a la prueba de hidrólisis de almidón a la bacteria, Sharma (2018) manifiesta que la ausencia de formación de zonas blancas alrededor de la siembra, una vez añadido el lugol en la caja de agar, corresponde a un resultado negativo, con lo que se confirma nuestros resultados presentes en la Tabla 2, aunque estos no han sido los únicos autores que caracterizan a la *R. solanacearum* como una bacteria que no hidroliza almidón Shokina et al. (2017) y Bawari y Narendrappa (2019) también lo confirman en sus trabajos.

3.2. Factores que afectan al crecimiento de la bacteria

Hubo dificultades al momento de obtener aislados viables del suelo; el mayor problema es el crecimiento rápido de otros microorganismos en las cajas de agar, dificultades que también enfrentó Obrador Sánchez

(2016), a pesar de que se indica que las poblaciones de la bacteria en el suelo son mayores al estar a menos de 1 m de distancia de las plantas con síntomas y de 0 a 10 cm de profundidad (Obregón Barrios et al., 2011).

Al añadir la información de la zona de donde fueron tomadas las muestras de tejido vegetal y suelo con resultados positivos para presencia de *R. solanacearum*, el Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial del cantón El Carmen (Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal de El Carmen, 2015) indica una media de altura de 350 metros sobre el nivel del mar (m s.n.m.) y en la investigación de Bautista-Montealegre et al. (2016), en donde no se presentó la bacteria en las fincas a partir de los 1.676 m s.n.m., pero bajo esta altura existía incidencia de esta y en cuanto a la temperatura los resultados del Plan de desarrollo y ordenamiento territorial (Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal de El Carmen, 2015) indican que en el cantón varía entre los 22 y 25 °C, con una humedad promedio del 80 % (Figura 3), lo que conlleva a que la sensación térmica pueda llegar a elevarse sobre los 28 °C, si lo comparamos con lo obtenido por Bautista-Montealegre et al. (2016) quien ubicó a fincas enfermas sobre un piso térmico templado, mientras que a las fincas sanas dentro de los climas fríos o extremadamente fríos, las cuales presentaron temperaturas promedio de 8 a 17 °C, se lograría comprobar lo descrito por Champoiseau et al. (2009) quienes indican que la temperatura mínima óptima de crecimiento es 28 °C y que bajo los 4 °C de temperatura se ve decaída (Bhanwar, 2022), siendo la temperatura óptima de crecimiento los 35 °C (SENASICA, 2019), mientras que Goszczynska et al. (2000) delimitan la temperatura de crecimiento a 41 °C, y aunque El Carmen no tenga una temperatura óptima se encuentra dentro de un rango en el que sí logra un crecimiento favorable del patógeno.

Los análisis químicos que se realizaron al suelo de las fincas plataneras arrojaron los siguientes resultados (Tabla 3), el pH tanto en el suelo de zonas enfermas, como en zonas sanas fue ligeramente ácido, es decir, entre un rango de 6,0 y 6,5 esto según Cartagena Ayala (2002), ya que se obtuvo en las fincas enfermas 6,25 y en las zonas sanas 6,30. Aunque dicha acidez en suelo puede estar relacionada con el hecho de que El Carmen es una zona lluviosa (media de 2.750 mm) y a la penetración de bases debido a la disolución de estas sustancias o su lixiviación en proporciones significativas, otra razón por la que estos suelos pueden ser ácidos es que los cultivos no se fertilizan, lo que hace que las plantas absorban las bases del suelo y aumenten la concentración de iones de hidrógeno, por ende, el suelo se vuelve ácido (Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal de El Carmen, 2015), se considera que el uso continuo de fertilizantes minerales disminuye el pH del suelo y esta disminución puede alterar la microbiota y las actividades microbianas en el suelo (Adamtey et al., 2016; Ngeno et al., 2022). En estudios realizados por Li et al. (2017), se ha demostrado que existe una acidificación significativa en los suelos que contienen al patógeno, es decir, que los suelos con tendencia a ser ácidos, aumentan las poblaciones microbianas del suelo, particularmente de *R. solanacearum* (Ngeno et al., 2022), pero con un pH de 5,8 no se logró encontrar la presencia del patógeno en el suelo, o al menos así lo describen Bautista-Montealegre et al. (2016) en su estudio.

La materia orgánica es considerada un indicador de la salud del suelo por su impacto positivo, como se ve descrito en el Plan de desarrollo y ordenamiento territorial (Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal de El Carmen, 2015). Este plan indica que el 88,31 % del suelo en el cantón El Carmen tiene un contenido de materia orgánica en suelo de nivel medio, que según Cartagena Ayala (2002) oscilan entre el 3 y el 5%. En su estudio, Cartagena Ayala (2002) menciona que la materia orgánica es la fuente principal de algunos elementos como nitrógeno, fósforo y azufre. En las fincas que se realizaron los análisis, se obtuvieron los mismos resultados, es decir, un nivel medio de materia orgánica, para las fincas con presencia de la bacteria como para su control. Sin embargo, existen estudios mucho más amplios respecto al tema que han descrito que las fincas sanas tienen una mayor cantidad de materia orgánica (Bautista-Montealegre et al., 2016). Otros autores han mencionado la correlación positiva entre el porcentaje de materia orgánica en suelo y la abundancia de la bacteria *R. solanacearum* (Wang et al., 2022). Yadessa et al. (2010) demostró en un estudio que la mejora de las características fisicoquímicas del suelo, como la materia orgánica, posiblemente tengan efectos negativos en el patógeno, este aumento de materia orgánica puede desempeñar un papel importante en la minimización del daño infligido a la planta por *R. solanacearum*.

Por otro lado, al analizar los resultados de la Tabla 4, los factores que afectan el crecimiento de la bacteria en ambiente in vitro se observó a la bacteria ante los cambios de temperatura y la concentración de pH. Se logró observar que, según los resultados obtenidos para los rangos expuestos en esta investigación, la temperatura a la que mejor se adaptó el patógeno fue de 37 °C, con un pH promedio

Tabla 3. Análisis químico del suelo de las plataneras con y sin presencia de *R. solanacearum*.
Table 3. Chemical soil analysis of plantain farms with and without the presence of *R. solanacearum*.

Análisis	Zona enferma	Zona sana
pH	6,25	6,30
Materia orgánica (%)	2,90	2,90
Ca/Mg	3,65	3,80
Mg/K	3,99	4,81
Ca+Mg/K	18,48	23,33

Tabla 4. Efectos del nivel de pH y temperatura en el crecimiento de la bacteria (UFC/ml).
Table 4. Effects of pH level and temperature on the bacteria growth (UFC/ml).

pH	T°		
	4 °C	25 °C	37 °C
4,5	17x10 ⁵	112x10 ⁵ *	228x10 ⁵ *
6,5	126x10 ⁵ *	269x10 ⁵ *	356x10 ⁵ *
8,5	112x10 ⁵ *	224x10 ⁵ *	288x10 ⁵ *

* Valores estimados.

de 6,5; mientras que la menos favorable fue la temperatura de 4 °C y el pH promedio de 4,5 con una probabilidad de $6.796e^{-10}$ ante la prueba de Chi².

Con ello se confirma lo mencionado por quienes argumentan que la *R. solanacearum* no crece por debajo de un umbral de pH de 4,4 (Li et al., 2017), mientras Bhanwar (2022), indica, que los pH de entre 5 a 7 son los mejores para el crecimiento de la bacteria. En cuanto a la temperatura, se logró observar una alta relación entre esta y el patógeno (Goszczyńska et al., 2000), relación que ya se ha visto comprobada anteriormente en estudios realizados sobre el tema que indican que las poblaciones bacterianas disminuyen rápidamente en temperaturas bajo los 4 °C (Bhanwar, 2022), mientras que el rango en el que se ve un mejor crecimiento empieza desde los 20 °C siendo la temperatura óptima entre los 30 y 35 °C, con un máximo de 41 °C en el que ya no se observa crecimiento (Bhanwar, 2022; Champoiseau et al., 2009).

4. Conclusiones

De las 18 muestras totales extraídas de los cultivos de banano y plátano en El Carmen, Manabí, tan solo la mitad (9/18), lograron presentar síntomas virulentos, siendo las muestras de pseudotallo las que mostraron mayor incidencia, al presentar seis resultados positivos, en comparación con las muestras del suelo las mismas que expusieron solo tres casos positivos.

En cuanto a la caracterización, se logró determinar que las muestras de *Ralstonia solanacearum* pertenecientes a la zona antes mencionada, fueron bacterias Gram negativas en forma de bacilo, esto se logró probar mediante las pruebas de tinción Gram y la prueba de KOH.

Este conjunto de pruebas realizadas al patógeno, han confirmado la presencia de la bacteria buscada, ya que mostró ser catalasa positiva, indol negativo, ser de carácter oxidativo para la obtención de energía en medios anaeróbicos y fermentativos de lactosa y glucosa, sin presencia de ácido sulfhídrico en medio de Kligler, además de no ser capaz de hidrolizar almidón.

Se conoció que las condiciones climáticas del cantón El Carmen fueron favorables para la proliferación de la bacteria *R. solanacearum*, al ubicarse a 350 m s.n.m., mantener una temperatura dentro del rango de 22 y 25 °C, establecerse bajo una humedad relativa promedio del 80 % y una precipitación promedio de 2.750 mm, mientras que las características del suelo fueron un pH de 6,25, materia orgánica de 2,90 %, conservando una relación entre las bases de Ca/Mg = 3,65; Mg/K = 3,99 y Ca+Mg/K = 18,48.

De manera *in vitro* se logró confirmar que la temperatura de 4 °C inhibe el aumento de poblaciones bacterianas, y que el pH de 4,5 es un limitante para su desarrollo, pero en los rangos de 25 °C y 37 °C, sobre un pH de 6,5 a 8,5, aunque no son sus condiciones óptimas de crecimiento, no resultaron ser restrictivos para su propagación.

Agradecimiento

A la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, sede Santo Domingo, por la apertura de sus laboratorios. A Agrocalidad-El Carmen, y a la Asociación Corpicsupal, en especial al señor Trajano Bejarano y a los ingenieros Raúl García, José Verduga y Francisco Centeno por su énfasis, colaboración, dedicación, respaldo y tiempo para que se realice la investigación.

Contribuciones de los autores

- Paulina Stephanie Saquicela Cruz: conceptualización, análisis formal, investigación, metodología, administración del proyecto, supervisión, validación, visualización, redacción – revisión y edición.
- Elena V. Romanova: conceptualización, análisis formal, investigación, administración del proyecto, supervisión, visualización, validación, visualización, redacción – revisión y edición.
- Rocío Noemí Guamán Guamán: conceptualización análisis formal, investigación, administración del proyecto, recursos, supervisión, validación, visualización, redacción – revisión y edición.
- Santiago Miguel Ulloa Cortázar: conceptualización, metodología, recursos, software, redacción – revisión y edición.
- Ángel Fabián Villavicencio Abril: conceptualización, visualización, redacción – borrador original. redacción – revisión y edición.

Implicaciones éticas

Los autores declaran que no existen implicaciones éticas.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no existen conflictos de interés financieros o no financieros que podrían haber influido en el trabajo presentado en este artículo.

Referencias

- Adamtey, N., Musyoka, M., Zundel, C., Cobo, J., Karanja, E., Fioboe, K., Muriuki, A., Mucheru, M., Vanlauwe, B., Berset, E., Messmer, M., Gattinger, A., Bhullar, G., Cadisch, G., Fliessbach, A., Mäder, P., Niggli, U., y Foster, D. (2016). Productivity, profitability and partial nutrient balance in maize-based conventional and organic farming systems in Kenya. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 235(1), 61-79. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.10.001>
- Akter, N., Islam, M., Hossain, M., Islam, M., Chowdhury, S., Hoque, S., Nitol, R., y Tasnin, R. (2021). Management of wilt complex of eggplant (*Solanum melongena* L.) caused by *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum* and *Meloidogyne* spp. *American Journal of Plant Sciences*, 12(1), 1155-1171. <https://doi.org/10.4236/ajps.2021.127080>
- Álvarez, E., Pantoja, A., Gañan, L., y Ceballos, G. (2015). *Current status of Moko disease and black sigatoka in Latin America and the Caribbean, and options for managing them*. Publicación CIAT N° 404. Centro Internacional de Agricultura Tropical [CIAT]; Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO].

- http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/CURRENT_STATUS_OF_MOKO_DISEASE_AND_BLACK_SIGATOKA_IN_LAC_AND_OPTIONS_FOR_MANAGING_THEM_final.pdf
- Apolinario Carmona, G. G. (2018). *Identificación bioquímica y molecular de bacterias patógenas aisladas de plantas de papa (Solanum tuberosum) cultivadas en Chirgua, Edo. Carabobo, Venezuela*. Universidad Central de Venezuela. <http://saber.ucv.ve/handle/10872/19685>
- Barrios Díaz, R. Á. (2015). *Identificación de bacterias patógenas aisladas de tubérculos de papa (Solanum tuberosum) con síntomas de pudrición blanda, colectadas en Sanare, Estado Lara*. Universidad Central de Venezuela. <http://saber.ucv.ve/handle/10872/13474>
- Bautista-Montealegre, L. G., Bolaños-Benavides, M. M., Abuanza-González, C. A., Argüelles-Cárdenas, J. H., y Forero-Camacho, C. A. (2016). Moko del plátano y su relación con sus propiedades físicas y químicas en suelos del departamento de Quindío, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 10(2), 273-283. <http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2016v10i2.5066>
- Bawari, M., y Narendrappa, T. (2019). In-vitro evaluation of bioagents and antibiotics against *Ralstonia solanacearum* causing brinjal wilt. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(2), 2038-2041. <https://www.phytojournal.com/archives/2019/vol8issue5/PartAL/8-5-422-613.pdf>
- Bhanwar, R. (2022). Effect of temperature and pH level on growth of bacterial wilt causing *R. solanacearum* under in vitro condition. *The Pharma Innovation Journal*, 11(1), 1656-1659. <https://www.thepharmajournal.com/archives/2022/vol11issue1/PartW/11-1-168-631.pdf>
- Bou Arévalo, G., Fernández Olmos, A., García De La Fuente, C., Sáenz Nieto, J., y Valdezate Ramos, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Cartagena Ayala, Y. E. (2002). *El análisis químico de suelos una herramienta para diseñar recomendaciones de fertilización y enmiendas en los cultivos*. Universidad Central del Ecuador. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/4776>
- Champoiseau, P., Jones, J., y Allen, C. (2009). *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties. *Plant Health Progress*, 1(1), 1-10. <https://doi.org/10.1094/PHP-2009-0313-01-RV>
- Cores Rodríguez, S., y Scarzella Testa, A. (2016). *Identificación del agente causal del tallo hueco en tomate en Uruguay*. Universidad de la República. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/19662>
- Delgado, R., Lahuathe, B., Delgado, J., Peñaherrera, L., Navia, D., y Arias, M. (2016). *Plan de acción para el manejo, control y erradicación del moko (Ralstonia solanacearum raza 2), en plátano*. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias.
- Denny, T. (2006). Plant pathogenic *Ralstonia* species. En S. S. Gnanamanickam (ed.), *Plant Associated Bacteria, part III* (pp. 573-644). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_16
- Dhital, S., Thaveechai, N., y Shrestha, S. (2011). Characteristics of *Ralstonia solanacearum* strains of potato wilt disease from Nepal and Thailand. *Nepal Agriculture Research Journal*, 4(1), 42-47. <https://doi.org/10.3126/narj.v4i0.4868>
- Elphinstone, J. (2005). The current bacterial wilt situation: A global overview. En C. Allen, P. Prior, y A. C. Hayward, *Bacterial wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex* (pp. 9-28). American Phytopathological Society (APS Press).
- European and Mediterranean Plant Protection Organization [EPPO]. (2018). *EPPO Global Database*. <https://gd.eppo.int/>
- Fornos Blanco, J. A., Rivera Moran, J. C., Sánchez Gómez, I. E., Monzón Centeno, A. J., y Ramírez Reynoza, D. J. (2021). Razas, biovares y mecanismos de resistencia de aislados de *Ralstonia solanacearum* en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Nicaragua. *La Calera*, 21(37), 1-23. <https://doi.org/10.5377/calera.v21i37.12821>
- García, R. O., Kerns, J. P., y Thiessen, L. (2019). *Ralstonia solanacearum* Species Complex: A quick diagnostic guide. *Plant Health Progress*, 20(1), 7-13. <https://doi.org/10.1094/PHP-04-18-0015-DG>
- Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal de El Carmen. (2015). *Plan de desarrollo y ordenamiento territorial del cantón El Carmen*. Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal de El Carmen. https://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdocumentofinal/1360000550001_PDyOT%20CANTON%20EL%20CARMEN%20FINAL%202019-04-2015%2019-04-2015_23-58-40.pdf

- Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal de El Carmen. (2021). *El plan de uso y gestión de suelo PUGS del cantón El Carmen es el instrumento que regula la planificación, ordenamiento y gestión del territorio urbano y rural del cantón*. Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal de El Carmen. <https://elcarmen.gob.ec/Transparencia/PUGS%20y%20PDOT/PUGS25ago2021.pdf>
- Goszczyńska, T., Serfontein, J., y Serfontein, S. (2000). *Introduction to practical phytobacteriology. A Manual for Phytobacteriology* (1st ed.). Safrinet.
- Hossain, F., Billah, M., Ali, R., Parvez, S., Sorwer, A., Zaoti, Z., Hasan, Z., Hasan, F., Dutta, A., Khalekuzzaman, I., y Biswanath, S. (2021). Molecular identification and biological control of *Ralstonia solanacearum* from wilt of papaya by natural compounds and *Bacillus subtilis*: an integrated experimental and computational study. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 6972-6986. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.07.069>
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos [INEC]. (2021). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua 2020*. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2020/Presentacion%20ESPAC%202020.pdf
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias [INIAP]. (2006). *Muestreo de suelos para análisis químico con fines agrícolas*. Plegable no. 272. INIAP. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2025>
- Kaiser, G. (2021). *Microbiology Labs II*. https://bio.libretexts.org/Learning_Objects/Laboratory_Experiments/Microbiology_Labs/Microbiology_Labs_II
- Kelman, A. (1954) The relationship of pathogenicity of *pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. *Phytopathology*, 44, 693-695.
- Kumari, R., y Ranjan, R. 2019. Characterization of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt of potato. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(5), 1762-1767. <https://www.phytojournal.com/archives/2019/vol8issue5/PartAG/8-5-103-154.pdf>
- La Hora. (16 de septiembre del 2022). *1.13 hectáreas afectadas por el 'moko del plátano'*. <https://www.lahora.com.ec/santo-domingo/1-13-de-hectareas-afectadas-por-el-moko-del-platano/>
- Lazo-Roger, Y., Nivelá-Morante, P. E., Rojas-Rojas, J. A., Taipei-Taipei, M. V., Piloso-Chávez, K. J., Pedraza-González, X., Aragundi-Velarde, J. G., y Chávez Solórzano, M. (2017). Evaluación de trampas para capturas de picudo negro (*Cosmopolites sordidus* Germar) en cultivo de plátano (*Musa ABB* cv. Hartón). *Revista Misionero del Agro*, 15(4), 4-9. http://www.uagraria.edu.ec/publicaciones/revistas_cientificas/15/055-2017.pdf
- Lemessa Ocho, F. (2006). *Biochemical, pathological and genetic characterization of strains of Ralstonia solanacearum (Smith) from Ethiopia and biocontrol of R. solanacearum with bacterial antagonists*. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover. <https://doi.org/10.15488/6737>
- Li, S., Liu, Y., Wang, J., Yang, L., Zhang, S., Xu, C., y Ding, W. (2017). Soil Acidification Aggravates the Occurrence of Bacterial Wilt in South China. *Frontiers in Microbiology*, 8(1), 703-712. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00703>
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S., Machado, M., Toth, I., Salmond, G., y Foster, G. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(6), 614-629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
- Mendoza, R. B., y Espinoza, A. (2017). *Guía técnica para muestreo de suelos*. Universidad Nacional Agraria. <https://repositorio.una.edu.ni/id/eprint/3613>
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca [MAGAP], y Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro [Agrocalidad]. (2020). *Ralstonia solanacearum* race 2 (*Smith 1896*) *Yabuuchi et al. 1996*. <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/foc51.pdf>
- Mutimawurugo, M., Wagara, I., Muhinyuza, J., y Ogweno, J. (2019). Virulence and characterization of isolates of potato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) in Rwanda. *African Journal of Agricultural Research*, 14(6), 311-320. <https://doi.org/10.5897/AJAR2018.13686>
- Ngeno, D., Murungi, L., Fundi, D., Wekesa, V., Haukeland, S., y Mbaka, J. (2022). Soil chemical properties influence abundance of nematode trophic groups and *Ralstonia solanacearum* in high tunnel tomato production. *AAS Open Research*, 2(3), 1-14. <https://doi.org/10.12688/aasopenres.12932.1>

- Obrador Sánchez, J. A. (2016). *Variabilidad genética de la bacteria Ralstonia solanacearum de cepas aisladas en México*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. <http://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/468>
- Obregón Barrios, M., Rodríguez Gaviria, P., y Salazar Yepes, M. (2011). Supervivencia de *Ralstonia solanacearum* en suelo y tejido de plantas de banano en Urabá, Colombia. *Fitosanidad*, 15(2), 91-97. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209122297004>
- Organización para la Agricultura y la Alimentación [FAO]. (2020). *FAOSTAT database collection*. <https://www.fao.org/faostat/es/#home>
- Pardo, J. M., López Álvarez, D., Ceballos, G., Álvarez, E., y Cuellas, W. J. (2019). Detection of *Ralstonia solanacearum* phylotype II, race 2 causing Moko disease and validation of genetic resistance observed in the hybrid plantain FHIA-21. *Tropical plant pathology*, 44(1), 371-379 <https://doi.org/10.1007/s40858-019-00282-3>
- Paudel, S., Dobhal, S., Álvarez, A. M., y Arif, M. (2020). Taxonomy and phylogenetic research on *Ralstonia solanacearum* species complex: a complex pathogen with extraordinary economic consequences. *Pathogens*, 9(11), 886. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110886>
- Perea Soto, J. M., García Estrada, R. S., Allende Molar, R., Carrillo Fasio, J. A., León Félix, J., Valdez Torres, B., y López Soto, F. S. M. (2011). Identificación de razas y biovares de *Ralstonia solanacearum* aisladas de plantas de tomate. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 29(2), 98-108. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092011000200002
- Phondekar, U., Bhagwat, R. G., Rathod, R. R., Gadhave, A. D., Nirgude, Y. R., Nalawade, R. R., y Joy, J. (2020). Isolation and characterization of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt of potato in Konkan Region of Maharashtra. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(10), 136-142. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.910.018>
- Razia, S., Chowdhury, M. S. M., Aminuzzaman, F. M., Sultana, N., e Islam, M. (2021) Morphological, pathological, biochemical and molecular characterization of *Ralstonia solanacearum* Isolates in Bangladesh. *American Journal of Molecular Biology*, 11(1), 142-164. <https://doi.org/10.4236/ajmb.2021.114012>
- Restrepo Alvarado, S. (2002). *Estandarización de una técnica de diagnóstico de agua y suelo de Ralstonia solanacearum agente causal de la marchitez bacteriana de cultivos de papa*. Pontificia Universidad Javeriana. <http://hdl.handle.net/10554/56907>
- Reynoso, M., Magnoli, C., Barros, G., y Demo, M. (2015). *Manual de microbiología general*. UniRío Editora. <http://www.unirioeditora.com.ar/producto/manual-microbiologia-general/>
- Robinson, J., y Galán Saúco, V. (2010). *Bananas and plantains* (2nd ed.). Ediciones Mundi Prensa.
- Rossi, A. (2021). *Kligler Hierro Agar*. Laboratorios Britania S.A. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60706c3393e51.pdf
- Sánchez Jorgge, M. A. (2021). *Ralstonia Solanacearum en el cultivo de plátano en el Ecuador*. Universidad Técnica de Babahoyo. <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/10306>
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria [SENASICA]. (2019). *Moko del plátano. Ralstonia solanacearum raza 2*. Ficha Técnica No. 03. Dirección General de Sanidad Vegetal. <https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/ContenidoPublico/Fichas%20tecnicas/Ficha%20T%C3%A9cnica%20de%20Moko%20del%20platan.pdf>
- Sharma, D. K. (2018). Morphological and biochemical characterization of *Ralstonia solanacearum* (smith) in brinjal (*Solanum melongena* L.) in Rajasthan (India). *Advances in Plants & Agriculture Research*, 8(3), 284-288. <https://doi.org/10.15406/apar.2018.08.00328>
- Sharma, D., y Singh, Y. (2019). Characterization of *Ralstonia solanacearum* isolates using biochemical, cultural, molecular methods and pathogenicity tests. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(4), 2884-2889. <https://www.phytojournal.com/archives/2019/vol8issue4/PartAU/8-4-392-512.pdf>
- Shokina, K. V., Mayorov, P. S., Feoktistova, N. A., Sapparov, K. N., y Vasilyev, D. A. (2017). Scheme of allocation and typing of *Ralstonia solanacearum*. En *VIII Международная научно-практическая конференция* (pp. 284-287). Sarátov. <http://lib.ugsha.ru:8080/bitstream/123456789/11477/1/2017-03-284-287.pdf>
- Silva Romeiro, R. da (2001). *Métodos em bacteriología de plantas*. Editora UFV.

-
- Spann, T. M., y Schumann, A. W. (2010) Mineral nutrition contributes to plant disease and pest resistance. *EDIS*, (4), HS1181. <https://doi.org/10.32473/edis-hs1181-2010>
- Universidad Abierta y a Distancia de México [UnADM]. (2017). *Microbiología y taxonomía microbiana. U3. Caracterización microbiana*. UnADM. <https://hopelchen.tecnm.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r126326.PDF>
- Wang, Z., Zhang, Y., Bo, G., Zhang, Y., Chen, Y., Shen, M., Zhang, P., Li, G., Zhou, J., Li, Z., y Yang, J. (2022). *Ralstonia solanacearum* infection disturbed the microbiome structure throughout the whole tobacco crop niche as well as the nitrogen metabolism in soil. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10(1), e903555. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.903555>
- Yadessa, G., van Bruggen, H., y Ocho, F. (2010). Effects of different soil amendments on bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* and on the yield of tomato. *Journal of Plant Pathology*, 92(2), 439-450. <http://www.jstor.org/stable/41998820>
- Zheng, X., Zhu, Y., Wang, J., Wang, Z., y Liu, B. (2019). Combined use of a microbial restoration substrate and avirulent *Ralstonia solanacearum* for the control of tomato bacterial wilt. *Scientific Reports* 9(1), e20091. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56572-y>
- Zumba, L. (13 de febrero de 2022). *El moko del banano: una amenaza silenciosa*. Expreso. <https://www.expreso.ec/actualidad/economia/moko-banano-amenaza-silenciosa-121561.html>