



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

IDENTIFICACIÓN DE BIOVARES DE *Ralstonia solanacearum* MEDIANTE
PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES A PARTIR DE AISLADOS
OBTENIDOS DE *Musa* spp.

AUTOR

TATIANA KARINA JÁCOME DÍAZ

AÑO

2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

IDENTIFICACIÓN DE BIOVARES DE *Ralstonia solanacearum* MEDIANTE
PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES A PARTIR DE AISLADOS
OBTENIDOS DE *Musa* spp.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

Ph.D. Fabio Marcelo Idrovo Espín

Autora

Tatiana Karina Jácome Díaz

AÑO

2018

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Identificación de biovares de *Ralstonia solanacearum* mediante pruebas bioquímicas y moleculares a partir de aislados obtenidos de *Musa* spp, a través de reuniones periódicas con el estudiante, Tatiana Karina Jácome Díaz, en el semestre 2018-2, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Fabio Marcelo Idrovo Espín
Doctor en Ciencias (Ciencias Biológicas: Biotecnología)
C.I. 1705952255

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Identificación de biovares de *Ralstonia solanacearum* mediante pruebas bioquímicas y moleculares a partir de aislados obtenidos de *Musa* spp, de Tatiana Karina Jácome Díaz, en el semestre 2018-2, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Carlos Andrés Bastidas Caldes
Master Universitario en Microbiología Avanzada

C.I. 020161619806

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Tatiana Karina Jácome Díaz

C.I. 0502372642

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”

Hernando Regalado García
Ingeniero Agrónomo
C.I. 1103440515

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por incentivarme a seguir adelante a pesar de los obstáculos. A mi hermano Cristian y a Nancy por sus consejos. Al laboratorio de Fitopatología de AGROCALIDAD por la disposición de sus instalaciones. A la Lic. Sabrina Méndez por haberme dado la oportunidad de estar en el laboratorio y aprender cada día.

Al ing. Jairo Guevara, Ing. Alexander Toaza e Ing. Hernando Regalado por guiarme; gracias por su amistad, paciencia y aprendizaje.

DEDICATORIA

A mis padres Loly y Betón por el apoyo incondicional en cada momento, por la motivación y soporte imprescindible en cada etapa de mi vida.

A mis hermanos Gabriel y Cristian por apoyarme y darme fortaleza para avanzar.

A Pablo por su amor, por estar pendiente de mí, por darme ánimos, por todo su apoyo.

RESUMEN

La bacteria *Ralstonia solanacearum* es considerada de alta agresividad, provoca la enfermedad del moko que conduce a la muerte repentina de Musáceas y otro tipo de cultivos. La infección ha llegado a varios países en Latinoamérica, entre los cuales se reportó la posible introducción de esta bacteria al Ecuador desde Colombia; país que tenía poco o nulo conocimiento sobre esta bacteria, motivo por el cual aumentó el interés de su estudio para conocer a que provincias se ha dispersado y lograr establecer en futuros estudios la ecología y epidemiología de la misma. Para el aislamiento de la bacteria se utilizó el Medio Semiselectivo Sur África (SMSA) que identifica las características de las colonias bacterianas y su posterior purificación fue realizada mediante el medio Agar Nutritivo. Conjuntamente se comparó la detección de la bacteria con la técnica DAS-ELISA y el sistema de identificación microbiológica (Biolog Inc), en el que se determinó los componentes bioquímicos; además se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para posteriormente identificar biovares por medio de pruebas metabólicas. Se evaluaron 80 muestras provenientes de fruto y pseudotallo de distintas variedades de banano provenientes de diferentes provincias del país que fueron proporcionados por la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD). El medio SMSA permitió detectar colonias de *R. solanacearum* y el sistema de identificación microbiológica Biolog detectó bacterias antagónicas. La técnica DAS-ELISA permitió detectar *R. solanacearum* y evaluar la cantidad de inóculo a concentraciones mayores de 10^8 UFC/mL. Con la técnica PCR se confirmó la bacteria y mediante resultados positivos se identificó biovares por medio de la degradación de disacáridos (celobiosa, lactosa y maltosa) y oxidación de polialcoholes (dulcitol, sorbitol y manitol); con lo cual se obtuvo tres tipos de biovares: biovar 1 en la provincia del Guayas, biovar 2 en Manabí y Guayas y biovar 3 en Manabí, Sucumbíos y Napo.

ABSTRACT

The bacterium *Ralstonia solanacearum* is considered to be highly aggressive, causing disease of moko that leads to the sudden death of Musaceae and other crops. The infection has reached several countries in Latin America, among which the possible introduction of this bacterium to Ecuador from Colombia was reported; country that had little knowledge about this bacterium, which is why it increased the interest of its study to know to which provinces it has dispersed and achieve in future studies the ecology and epidemiology of it. For the isolation of the bacteria, the South Africa Semi-selective Medium (SMSA) was used, which identifies the characteristics of the bacterial colonies and their subsequent purification was carried out through the Nutritive Agar medium. Together, the detection of the bacteria was compared with the DAS-ELISA technique and the microbiological identification system (Biolog Inc.), in which the biochemical components were determined; in addition, the polymerase chain reaction (PCR) was performed to subsequently identify biovars by means of metabolic tests. Were evaluated 80 samples of fruit and pseudostem of different varieties of banana from different provinces of the country that were provided by the Ecuadorian Agency for Quality Assurance of Agro (AGROCALIDAD). The SMSA medium allows detecting colonies of *R. solanacearum* and the microbiological identification system Biolog detected antagonistic bacteria. The DAS-ELISA technique detected *R. solanacearum* and evaluated the inoculum quantity to more than 10^8 UFC/mL. With the PCR technique the bacterium is confirmed and through the positive results it was identified by the degradation of disaccharides (cellobiose, lactose and maltose) and oxidation of polyalcohols (dulcitol, sorbitol and mannitol); with which three types of biovars were obtained: biovar 1 in the province of Guayas, biovar 2 in Manabí and Guayas and biovar 3 in Manabí, Sucumbíos and Napo.

INDICE

1. Capítulo I. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema	4
1.3 Objetivo general	4
1.4 Objetivos Específicos	4
1.5 Justificación de la investigación.....	5
2. Capítulo II. Marco Teórico.....	6
2.1 <i>Ralstonia solanacearum</i>	6
2.1.1 Clasificación taxonómica	6
2.1.2 Clasificación del complejo de especies de <i>R solanacearum</i>	7
2.1.2.1 Relación entre Razas y Biovares.....	8
2.1.3 Características Morfológicas	9
2.1.4 Distribución geográfica	11
2.1.1 Factores que inciden en la propagación de <i>R solanacearum</i>	12
2.1.2 Prevalencia en el mundo y en Ecuador	13
2.2 Género Musa	14
2.2.1 Origen.....	14
2.2.2 Clasificación Taxonómica	15
2.2.3 Cultivares	16
2.2.4 Morfología	17
2.2.5 Importancia Económica del Banano	20
2.2.6 Cultivo de Banano en Ecuador	21
2.3 Enfermedad del Moko.....	21
2.3.1 Signos y sintomatología	22
2.3.2 Ciclo de la Enfermedad	24
2.4 Métodos de aislamiento y detección de <i>R solanacearum</i>	26
2.4.1 Medios de cultivos para aislamiento de <i>R solanacearum</i>	26
2.4.2 ELISA sandwich de anticuerpo doble (DAS-ELISA).....	27
2.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa.....	28

2.4.4 Pruebas bioquímicas para identificar biovares de <i>R solanacearum</i>	29
3. Capítulo III. Procedimientos	30
3.1 Obtención de material vegetal.....	30
3.2 Materiales y Métodos	40
3.2.1 Diagrama de flujo de la metodología.....	40
3.2.2 Procesamiento de muestras de material vegetal	38
3.2.3 Aislamiento, purificación y detección de <i>R solanacearum</i> a partir de material vegetal infectado.....	38
3.2.4 Detección de <i>R solanacearum</i> mediante ensayos de Identificación microbiológica Biolog.....	40
3.2.5 Detección de <i>R. solanacearum</i> mediante ensayo Elisa Sánduche de Doble Anticuerpo (DAS-ELISA)	41
3.2.6 Extracción de ADN.....	42
3.2.7 Detección de <i>R Solanacearum</i> mediante ensayo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	42
3.2.8 Identificación de Biovares de <i>R Solanacearum</i>	43
4. Capítulo IV. Resultados y Discusión	44
4.1 Aislamiento, purificación y detección de <i>R solanacearum</i> a partir de material vegetal infectado.....	44
4.2 Detección de <i>R solanacearum</i> mediante ensayos de Identificación microbiológica Biolog.....	47
4.3 Detección de <i>R solanacearum</i> mediante ensayo Elisa Sánduche de Doble Anticuerpo (DAS-ELISA)	49
4.4 Detección de <i>R Solanacearum</i> mediante ensayo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	52
4.5 Identificación de biovares de <i>R solanacearum</i>	57
5. Conclusiones y recomendaciones	61
5.1 Conclusiones.....	61
5.2 Recomendaciones.....	62
REFERENCIAS	63

ANEXOS	71
--------------	----

1. Capítulo I. Introducción

1.1 Antecedentes

Ralstonia solanacearum es una bacteria Gram negativa, aeróbica, heterogénea, que representa un alto riesgo para cultivos como papa, tomate, pimiento, jengibre, aceitunas, moras, plátano, banano; entre otros. Provoca la enfermedad de la marchitez bacteriana más conocida como moko en la familia Musaceae, apareciendo durante los diferentes estados fenológicos de la planta (Martínez & Guzmán, 2011). La bacteria *R solanacearum* provoca varios síntomas en los cultivos infectados como: decaimiento de hojas, necrosis a nivel del sistema vascular y obstrucción de los tejidos conductores que transportan agua y nutrientes al tallo (Fegan, 2007; Umar Shahbaz et al., 2015; SENASICA, 2016) lo que implica la muerte de los cultivos.

Los primeros estudios sobre esta bacteria se han enfocado en la clasificación del género, lo que ha conllevado a variaciones en su nombre y caracterización. Según un estudio realizado por Rajeshwari et al., (1998) se detectó *R solanacearum* en plantas de tomate y papa gracias al desarrollo de la técnica ELISA y a la manipulación de anticuerpos policlonales específicos para esta bacteria.

La propagación de *R solanacearum* inició en Asia, especialmente en Indonesia, lugar de origen de esta bacteria, de la cual se ha dispersado hasta llegar a América Latina (Obrador Sánchez, 2016). En Malasia se determinó las características fenotípicas que provoca la bacteria en cultivos de banano, además se observó la variabilidad de cepas presentes en base a características epidemiológicas y ecológicas (Zulperi et al., 2016).

En América Latina, *R solanacearum* ha ocasionado varios problemas en la producción de cultivos de banano; siendo estos cultivos los que proveen un valor agregado a la economía de cada país, para lo cual se ha generado varios métodos para diagnosticar esta bacteria (Kinyua et al., 2014). Los diferentes métodos que se han ejecutado dependen de la patogenicidad y tipo de cepa (González et al., 2013).

México se ha mantenido alerta ante la dispersión de *R solanacearum*, debido a la facilidad que posee para permanecer durante varios años en suelos infectados (Obrador Sánchez, 2016). Los procesos para detectar esta bacteria comenzaron con estudios sobre los lugares afectados por medio del aislamiento bacteriano y a través de técnicas moleculares para identificar dicha bacteria; sin embargo no se ha determinado todos las cepas que puede estar vigentes en los cultivos o suelos (SENASICA, 2016).

En Costa Rica, se ha estudiado la ecología de *R solanacearum* en cultivos de tomate y geranio; los cuales han sido mayormente infectados (Espinoza, 2006). En Perú y Brasil se comprobó la prevalencia de *R solanacearum* en papa y pimiento a diferencia de otros países que han presentado daños con los cultivos de plátano como Colombia (Kinyua et al., 2014; Ribeiro, 2013).

Desde 1971, Colombia sufrió varios perjuicios por la presencia de *R. solanacearum* en uno de los cultivos de mayor importancia para este país, el plátano. A partir de este año se ha estimado cerca del 95% de predios plataneros que han sido afectados por la irrupción de la enfermedad del moko (Gómez Calvo, 2005). Las técnicas moleculares han permitido conocer los aspectos evolutivos de esta bacteria, pero no han tomado medidas eficaces para tomar un control que evite la diseminación hacia otras fronteras (Cardozo et al., 2009).

El banano genera fortalecimiento en el comercio local e internacional. El 30% del banano que se comercializa a nivel mundial lo proporciona Ecuador, posicionándose como el principal país exportador. A nivel nacional el banano representa el segundo producto de mayor exportación. Como actividad agrícola provee de ingresos económicos de forma directa e indirecta a más de 2 millones de personas (PRO ECUADOR, 2016). Dentro del territorio ecuatoriano, los cultivos del género *Musa* se encuentran distribuidos en mayor proporción a lo largo del sector costero. Las zonas de mayor producción son las provincias de los Ríos, El Oro, y Guayas con un aporte del 72% de la capacidad; sin embargo esta capacidad productiva puede disminuir por la presencia de plagas y enfermedades (Manzano, 2013).

Ante los problemas de destrucción de cultivos del género *Musa* en Colombia debido a la infección de *R solanacearum*, Ecuador se ha mantenido al margen sobre la dispersión de esta bacteria; sin embargo El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) realizó una investigación durante el 2014 sobre la posible introducción de *R solanacearum* al país. El enfoque de esta investigación surgió por el alto índice de cultivos afectados con esta bacteria en el sector fronterizo con Colombia y que presentaba características que hacían referencia a *R solanacearum*. La información generada a partir de este estudio no ha sido verificada por otros institutos de investigación agrícola, por lo que instituciones públicas como Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD) continúan con los estudios sobre la diseminación de esta bacteria en el país.

Según el laboratorio de Fitopatología de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro es necesario estudiar los aislados bacterianos de *R solanacearum* debido a la posible dispersión de esta bacteria dentro del país. Además de poder aplicar los diferentes mecanismos o procesos dentro del laboratorio que permitan realizar diagnósticos sobre la infección de este microorganismo en cultivos de banano y de esta manera dar a conocer los biovares presentes en la enfermedad del moko. La identificación de

biovares fue propuesto inicialmente por Denny & Hayward (2004) quienes evaluaron cepas de *R solanacearum* mediante pruebas metabólicas a través de la degradación de disacáridos y oxidación de polialcoholes en plantas de tomate; metodología que permitió analizar los diferentes tipos de biovares en otros cultivos.

1.2 Planteamiento del problema

Al ser considerada *R solanacearum* como el agente causal de la enfermedad del moko, provoca dificultades en la producción de banano, esta bacteria se convierte en un factor limitante para la comercialización de estos cultivos. En países fronterizos como Colombia, ya ha causado considerables pérdidas; por lo que es necesario desarrollar procedimientos eficaces para la detección temprana de este microorganismo, como requerimiento para la exportación. Además se incrementaría el riesgo de diseminación de esta bacteria en el país por medio de herramientas, maquinaria pesada e insectos.

Frente a la posible dispersión de la bacteria *R solanacearum*, han aumentado los diagnósticos sobre esta bacteria en cultivos del género *Musa*; sin embargo la carencia de protocolos y de conocimiento de este microorganismo han dificultado la realización de análisis certeros.

1.3 Objetivo general

- Identificar biovares de *Ralstonia solanacearum* mediante ensayos bioquímicos y moleculares a partir de aislados obtenidos de *Musa* spp.

1.4 Objetivos Específicos

- Aislar la bacteria *Ralstonia solanacearum* en tejido de frutos y pseudotallos de banano.

- Comprobar la sensibilidad de detección de *Ralstonia solanacearum* mediante el sistema de identificación microbiológica BIOLOG.
- Detectar *Ralstonia solanacearum* mediante ELISA y PCR.
- Identificar biovares de *Ralstonia solanacearum* a partir de aislados positivos confirmados por PCR.

1.5 Justificación de la investigación

Los estudios sobre la propagación de *R solanacearum* han sido de importancia a nivel mundial, debido a que se ha demostrado que es una bacteria de difícil control; por su rápida infección en una amplia variedad de cultivos. Dentro de los cuales el banano representa parte fundamental de la alimentación y comercialización interna y externa del Ecuador; siendo un cultivo altamente competitivo a nivel internacional; sin embargo esta se encuentra en un estado de vigilancia, que consiste en monitorear la presencia o ausencia de plagas dentro de un territorio geográfico.

El presente estudio contribuiría en la generación de información sobre el agente causal de la enfermedad del moko. La Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro requiere desarrollar un protocolo de detección de *R solanacearum* en aislados bacterianos de banano, y de esta manera identificar los biovares presentes en estos cultivos para mostrar grupos de cepas de *R solanacearum* que ocasionan esta enfermedad. A partir de este estudio se podría asociar a estos grupos de cepas en base al origen geográfico; y además se obtendría información útil sobre la diversidad poblacional de *R solanacearum*, ya que actualmente no se mantiene datos actualizados sobre la dispersión de esta bacteria en el Ecuador.

2. Capítulo II. Marco Teórico

2.1 *Ralstonia solanacearum*

La enfermedad del Moko ha causado varios efectos negativos en plantaciones de banano en varios países de América Latina. El agente causal de esta enfermedad es la bacteria *Ralstonia solanacearum*; que debido a la diversidad de hospederos se la considera como un complejo de especies (Fegan, 2007; Naranjo Feliciano, Yglesia Lozano, García, & Martínez Zubiaur, 2015) las cuales forman un grupo heterogéneo de aislados bacterianos que poseen características comunes (Cardozo et al., 2009; Fegan & Prior, 2005; Naranjo et al., 2015). Gillings & Fahy utilizaron la denominación de complejo de especies para detallar la alta diversificación genética que existe entre aislados (Meng, 2013).

2.1.1 Clasificación taxonómica

Debido a la gran variedad de información relacionada en función al rango de hospederos, patogenicidad, distribución geográfica, epidemiología y propiedades fisiológicas han surgido modificaciones para determinar el actual nombre de ésta bacteria. Fue clasificada dentro de varios géneros como *Bacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* y finalmente se la incluyó en el género *Ralstonia* (Fegan, 2007; Obrador Sánchez, 2016; Priou, Gutarra, & Aley, 2006).

Como especie, el nombre también ha tenido varios cambios según características fisiológicas y filogenéticas. Inicialmente fue designado como *Bacillus musae*, posteriormente se estableció varios nombres, uno de ellos fue *Pseudomonas solanacearum*; nombre que aún se mantiene por algunas organizaciones de índole agrícola; sin embargo el nombre actual es *Ralstonia solanacearum*, el cual fue propuesto por Yabucchi y colaboradores a partir de 1995, dando la siguiente clasificación taxonómica:

Dominio.- Bacteria

Filo.- Proteobacteria

Clase.- Betaproteobacteria

Orden.- Burkholderiales

Familia.- Ralstoniaceae

Genero.- Ralstonia

Especie.- *Ralstonia solanacearum*

2.1.2 Clasificación del complejo de especies de *R solanacearum*

El complejo de especies de *R solanacearum* posee una clasificación a nivel subespecífico, que es una categorización fenotípica que relaciona a cinco razas y seis biovares. Las razas representan a subgrupos de especies basándose en la virulencia, expresión de síntomas y grupos hospederos donde la bacteria ha provocado infección (Sullivan et al., 2013). Los biovares son cepas bacterianas que se distinguen por características fisiológicas o bioquímicas (Fegan, 2005; González Torres, Casas, & Ortiz Díaz, 2013). En el caso de la enfermedad del moko, los biovares que determinan las características fisiológicas o bioquímicas son los biovares 1 y 3 (Zulperi et al., 2016).

Además de la clasificación subespecífica, existe una clasificación propuesta por Fegan & Prior (2005), la cual subdivide al complejo de especies de *R. solanacearum* en cuatro filotipos y cincuenta y cuatro secuevares. Los filotipos pertenecen a cuatro grupos genéticos (Fegan, 2007); los cuales fueron determinados mediante la diferenciación de características entre cepas a partir del análisis filogenético; con lo cual se estableció el filotipo I en el continente Asiático, el filotipo II en América, el filotipo III se determinó en el continente Africano e Islas cercanas en el Océano Índico y por último el filotipo IV fue encontrado en Indonesia (Fegan, 2007; Meng, 2013; Zulperi et al., 2016). Cada filotipo se relaciona con un grupo de secuevares, que son definidos como un

conjunto de cepas con una secuencia altamente conservada dentro de una región específica del genoma (Fegan, 2007; Cardozo et al., 2009).

2.1.2.1 Relación entre Razas y Biovares

Como se mencionó anteriormente las razas se clasifican de acuerdo a la variabilidad de hospederos (Perea et al., 2011; Umar Shahbaz et al., 2015). En el caso del banano, este cultivo puede ser infectado por diferentes biovares que pertenezcan a *R solanacearum* de una misma raza.

Existen cinco razas, la raza 1 posee un extenso grupo de hospederos entre los que se destacan algunos cultivos pertenecientes a la familia Solanaceae, tabaco, aceitunas, pimiento, maní y algunos bananos diploides. La raza 2 es más específica en cuanto a la irrupción de la enfermedad del moko, provocando problemas en bananos triploides y heliconias. La raza 3 afecta a grupos hospederos que se encuentra en climas fríos como algunas variedades de papa, tomate y geranio. La raza 4 afecta al jengibre y la raza 5 a la mora (Zulpiera et al., 2016).

Los biovares relacionan la capacidad de oxidación de polialcoholes (dulcitol, manitol y sorbitol) y la degradación de disacáridos (celobiosa, lactosa y maltosa) (Rueda-Puente et al., 2014). Debido a la variedad de biovares se ha determinado cinco; los cuales se diferencian por el comportamiento metabólico y bioquímico.

Las cepas correspondientes al biovar 1 no produce ninguna reacción con los disacáridos y polialcoholes, el biovar 2 metaboliza únicamente los disacáridos, el biovar 3 metabolizan todos los polialcoholes y disacáridos, en el biovar 4 las cepas solo metabolizan los polialcoholes y para el biovar 5 metabolizan todos los componentes a excepción del sorbitol y dulcitol (Meng, 2013). Además existe un sexto biovar que metaboliza ribosa y trehalosa, este biovar es una

variación del biovar 2, sin embargo se considera que es más específico para aislados obtenidos provenientes de cultivos de papa (Fegan, 2007; Meng, 2013).

2.1.3 Características Morfológicas

R. solanacearum posee una diversidad morfológica, describiéndose como un bacilo Gram negativo, aeróbico, no fluorescente que la diferencia de otras especies como *Pseudomonas fluorescens*, ya que tienen una filogenia cercana, pero se encuentra en distintos grupos de homología. Se define a la homología por la relación de especies que poseen caracteres similares, los cuales fueron obtenidos mediante herencia a partir de un ancestro común (Caldwell et al., 2004; Vinuesa, 2011). Posee entre uno o cuatro flagelos polares múltiples favorables para la motilidad; característicos que varía de acuerdo al tipo de colonia (Fegan, 2007). Tiene un tamaño entre 0.5 – 0.7 μm de ancho y 1.5 – 2-5 μm (Figura 1); puede dispersarse a través del agua o suelo y logra atravesar el sistema radicular de los cultivos hasta llegar a los haces vasculares (Fegan, 2007; Obregón & Rodríguez, 2011).

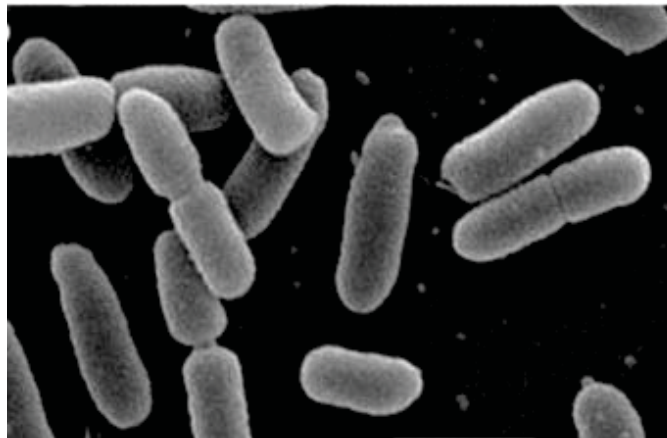


Figura 1. Imagen de *R. solanacearum* vista en microscopía electrónica de barrido.

Tomado de (Guarisch-Sousa et al., 2016).

De acuerdo a la diversidad morfológica se puede distinguir diferentes características dependiendo de la asimilación de sustratos, siendo estas colonias mucoides, pequeñas mucoides y redondas y variantes afluidas (Figura 2). (Tapeiro et al., 2007). Además existe colonias que puede apreciarse como avirulentas y virulentas (Figura 3), las colonias avirulentas poseen forma redonda, rugosa, no mucosida, pequeña, seca, con coloración rojo vino y tonalidad marrón alrededor de las colonias (Kinyua et al., 2014), pero considerando que son avirulentas estas son utilizadas como control biológico para disminuir la infección (Denny 2006). Las colonias virulentas tiene una forma circular con elevación convexa, borde irregular u ondulado, mucosida, color blanco y centro rosado (Espinoza, 2006; Tapeiro et al., 2007; Obrador Sanchez, 2016; Zheng et al., 2016).

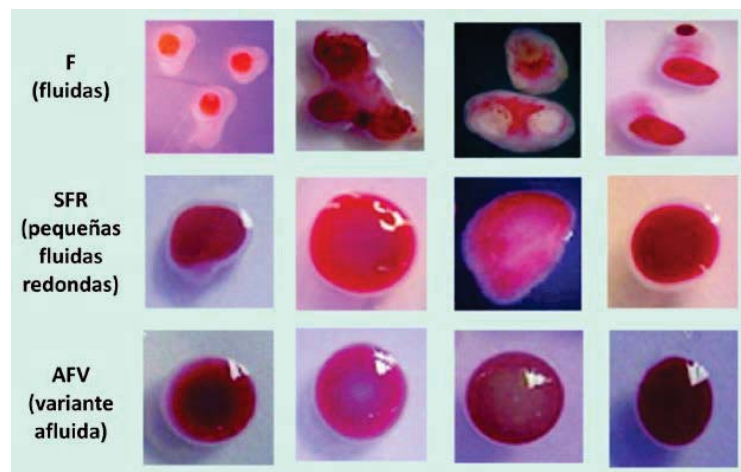


Figura 2. Diferentes tipos de colonias de *R. solanacearum*.

Tomado de (Tapeiro et al., 2007).

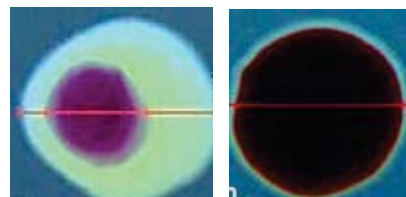


Figura 3. Colonias Virulentas y avirulentas de *R. solanacearum*.

Tomado de (Zheng et al., 2016).

2.1.4 Distribución geográfica

Los primeros indicios de *R. solanacearum* surgieron en Indonesia y Oceanía; aunque tiempo después llegó a propagarse por medio de la migración del hombre y la introducción de cultivos contaminados a África, posteriormente llegó a Sudamérica y algunas regiones del continente asiático (Figura 4) (Obrador Sánchez, 2016).



Figura 4. Dispersión y origen de *R. solanacearum* en el mundo.
Tomado de (Obrador Sánchez, 2016).

En Latinoamérica se ha perpetuado la presencia de esta bacteria en diferentes cultivos. México ha enfrentado la propagación de esta bacteria en papa, geranio y banano, al igual que Colombia; siendo estos países los que han planificado de manera recurrente planes para su prevención, erradicación o control. Brasil ha sido el eje de difusión de *R. solanacearum* para países vecinos que por medio de importación de cultivos, la bacteria se ha distribuido ampliamente en varias regiones afines (Gutarra, Herrera, Fernandez, Kreuze, & Lindqvist-Kreuz, 2017; Santiago, 2014).

Las principales regiones donde se ha mantenido vigente la propagación de esta bacteria es en países que poseen un clima tropical y subtropical; sin embargo en los últimos años se ha demostrado que su distribución ha sobrepasado sus

límites, ya que la bacteria puede adaptarse en climas más templados y fríos en regiones de América del Norte y algunos países del continente Europeo (EPPO, 2016). Como se puede observar en la Figura 5, la distribución de la bacteria de acuerdo a los puntos amarillos a nivel mundial.

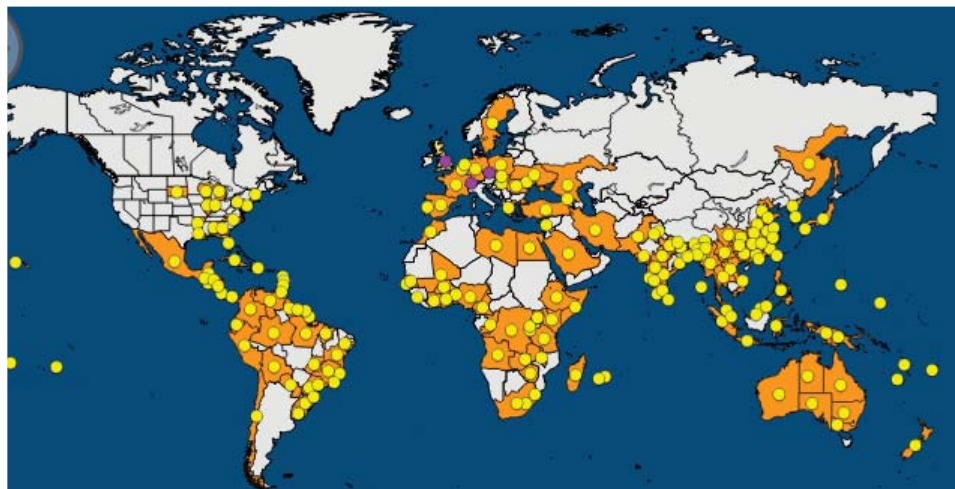


Figura 5. Distribución actual de *R. solanacearum*
Tomado de (EPPO, 2016).

La contaminación del agua y suelos con *R. solanacearum* induce a la adaptación y supervivencia de la bacteria durante varios años, provocando que aumente el riesgo de contagio en plantas sanas (EPPO, 2016; Kinyua, Miller, Chin, & Subedi, 2014).

2.1.1 Factores que inciden en la propagación de *R. solanacearum*

R. solanacearum ha provocado fuertes daños en varios cultivos, ocasionando la muerte repentina en varias plantaciones. Según Moncada (2014) existen varios factores que incrementan el riesgo de infección como: los escasos procedimientos metodológicos para controlar y erradicar la enfermedad del moko inducido por dicha bacteria, el escaso conocimiento sobre la ecología de la bacteria y la presencia de nuevos hospederos alternativos como malezas que van desarrollándose junto con cultivos asintomáticos incrementando las

fuentes de contaminación; convirtiéndose en una bacteria fitopatógena con alta capacidad de destrucción.

Por el amplio rango de hospederos, variedad climática, tipo de suelos, cultivares y una diversidad de razas no se conoce aún con exactitud el número de hectáreas de cultivos de banano afectados a nivel mundial por la irrupción de esta bacteria (Gutarra et al., 2017; Obrador Sánchez, 2016; Santiago, 2014).

2.1.2 Prevalencia en el mundo y en Ecuador

La prevalencia de *R solanacearum* se ha dado a nivel mundial, sobre todo en regiones del continente Americano; donde ha aumentado la infección en varios cultivos; dada la variedad de cultivos infectados, no se ha determinado un porcentaje explícito para cada hospedero que muestre las consecuencias de su infección, sobre todo en cultivos de la familia Musaceae, que representa un renglón económico para la mayoría de países. Sólo en Colombia se ha confirmado que más del 95% de predios plataneros han sido destruidos por la vigencia de esta bacteria y de la cual se ha realizado varios procesos para disminuir los efectos negativos que conlleva su presencia (EPPO, 2016).

En Ecuador, no se ha determinado con exactitud la vigencia de esta bacteria, debido a que no se han realizado todos los procesos necesarios para confirmar la posible diseminación en todo el país. Además de desconocer este microorganismo, es muy probable que las personas dedicadas a la producción de cultivos del género *Musa*, la confunda con otras especies como *Pseudomonas* spp, *Erwinia* spp, entre otros y como medida de prevención manipulen fertilizantes para el cuidado de estos cultivos; por consiguiente no se puede otorgar un porcentaje de cultivos infectados con *R solanacearum* en el país (Delgado, Morillo, Buitrón, Bustamante, & Sotomayor, 2014).

2.2 Género Musa

2.2.1 Origen

Se considera que los cultivos asociados al género *Musa* fueron los primeros en ser empleados por el hombre para su alimentación. Su origen se remonta a los bosques cálidos y húmedos de las regiones tropicales del Sudeste de Asia, siendo India y las Islas Salomón los lugares donde predominan las especies silvestres de banano como vegetación nativa (Ude, Pillay, Nwakanma, & Tenkouano, 2002).

La domesticación comenzó hace 7 000 años por medio de cruces entre especies y subespecies, generando varias hibridaciones que se han dispersado a nivel mundial gracias a la migración del hombre (Li & Ge, 2017; Ude et al., 2002).

Los ancestros de las especies del género *Musa* que se conoce actualmente provienen de dos especies silvestres diploides *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* (Figura 6) que poseen diferente genoma descrito como A y B respectivamente (Ball T, Vrydaghs L, Van Den Hauwe I, Manwaring J, 2006; Ude et al., 2002).



Figura 6. Banano (variedad “Cavendish”) y su ancestro *Musa acuminata*.

Tomado de (Science, 2012).

2.2.2 Clasificación Taxonómica

Durante el proceso de domesticación se estableció una clasificación de géneros de acuerdo a la distribución geográfica, en el que se encuentra el género *Ensete*, *Musella* y *Musa*; cuyo centro de origen se encuentra en Asia Oriental. El género *Musa* se subdivide en cinco secciones de acuerdo al número de cromosomas y a la morfología: *Ingetimusa*, *Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodoclamys* y *Musa* (Li & Ge, 2017; Perrier et al., 2011; SIMMONDS & WEATHERUP, 1990).

La primera clasificación taxonómica fue realizada por Linneo en 1753, en el que determinó dos tipos de especies *M serpentium* y *M paradisiaca*, esta última es conocida por ser un híbrido entre las dos especies silvestres de origen; de la cual surgieron varios clones. Después de varios estudios en 1950 se dio una nueva interpretación taxonómica dada por el Botánico Cheesman (Ball T, Vrydaghs L, Van Den Hauwe I, Manwaring J, 2006; Li & Ge, 2017; Obrador Sánchez, 2016).

Dado esto actualmente se describe la clasificación taxonómica del género *Musa* de la siguiente manera:

Dominio.- Eukaryota
Reino.- Plantae
Filo.- Spermatophyta
Subfilo.- Angiospermae
Clase.- Monocotyledonae
Orden.- Zingiberales
Familia.- Musaceae
Género.- *Musa*

2.2.3 Cultivares

Dada la clasificación taxonómica se han proporcionado datos para poder definir a grupos filogenéticos que asocien a colecciones de la familia Musacea, con lo cual se ha conocido a todas las variedades como cultivares, tomando en cuenta la disposición genómica y fisiológica (Gómez, Alvarez, & Llano, 2005; Li & Ge, 2017; Nadal-Medina R, Manzo-Sánchez, G , Orozco-Romero J, Orozco-Santos M, 2009).

Las dos especies silvestres que dieron origen a la producción de varios cultivares (Tabla 1) son *M acuminata* y *M balbisiana*, considerados como donadores de los genomas A y B. En 1955, Simmonds y Shepherd clasificaron a estos cultivos inicialmente en diploides y triploides, tiempo después se determinó genotipos tetraploides, basándose en la composición genómica, fisonomías morfológicas y ubicación geográfica; por consiguiente se clasificaron de la siguiente manera: AA, AB, AAA, AAB, ABB (Li & Ge, 2017).

Los cultivos provenientes de estas dos especies silvestres se les nombran mediante letras mayúsculas que muestran la poliploidía y la composición genómica (Li & Ge, 2017; Perrier et al., 2011; Simmonds & Shepherd, 1955).

Tabla 1.

Cultivares comerciales de mayor importancia económica

Clon	Grupo	Subgrupo
<i>Enano Dominicano</i>	AAA	<i>Cavendish</i>
<i>Valery</i>	AAB	<i>Plantain</i>
<i>Morado</i>	AAA	<i>Cavendish</i>
<i>Manzano</i>	AAA	<i>Cavendish</i>
<i>Datil</i>	AAB	<i>Plantain</i>
<i>Rombon</i>	AA	<i>Cavendish</i>
<i>Seda</i>	AA	<i>Cavendish</i>

Adaptado de (Ball T, Vrydaghs L, Van Den Hauwe I, Manwaring J, 2006; Perrier et al., 2011) .

2.2.4 Morfología

Los cultivos del género *Musa* son plantas monocotiledóneas herbáceas gigantes perennes, tienen una altura de 3.5 a 7.5 metros (Li & Ge, 2017). El sistema radicular está formado de un rizoma llamado comúnmente bulbo, su crecimiento es subterráneo y horizontal, posee meristemas en las que nacen raíces fibrosas (Figura 7), son de color blanco cuando nacen y posteriormente obtienen un color amarillo y una textura más dura; el rizoma suministra de nutrientes a la planta, además de considerar al rizoma como el tallo verdadero con varias yemas; las cuales se desarrollan cuando la planta ha florecido y fructificado (Gómez Calvo, 2005; Perrier et al., 2011).

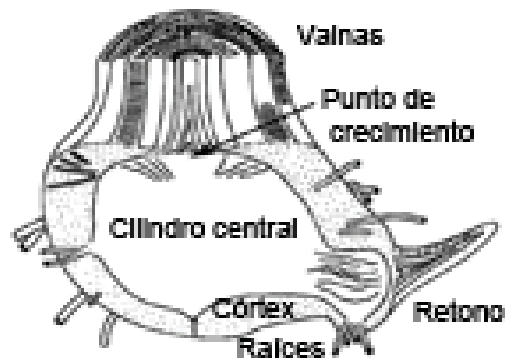


Figura 7. Ilustración del rizoma.

Tomado de (Vézina, 2016).

Cuando alcanza la madurez, la yema terminal adquiere la apariencia de inflorescencia, ya que es empujada desde el suelo hacia arriba por alargamiento del tallo, lo que ocasiona que brote el pseudotallo (Figura 8).



Figura 8. Corte transversal del pseudotallo.

Tomado de (Vézina, 2016).

Las hojas surgen en el interior del pseudotallo, tiene una forma de cilindro cuando emergen, son de color verde, en algunos casos toman un color amarillo verdoso, posee márgenes lisos, tiene una forma oblonga, las nervaduras son pinnadas, tiene ápice truncado, el limbo es elíptico alargado y la base es cordiforme o redonda; adquieren una apariencia desaliñada debido a que tienden a cortarse a lo largo de las nervaduras (Figura 9). Una planta posee entre 5 y 15 hojas totalmente desarrolladas, tiene un tamaño de 3 m de largo y

60 cm de ancho, se ubican en espiral a lo largo del rizoma (Martínez & Guzmán, 2011).



Figura 9. Formación de hojas en forma de espiral.

Tomado de (Vézina, 2016).

Las flores son de color amarillo, tiene seis estambres, el gineceo posee tres pistilos con ovario ínfero. Cuando se unen varias flores en cada bractea se forma un conjunto de frutos conocido como mano, que pueden contener entre 3 y 20 frutos (Robinson & Galán, 2010).

La inflorescencia muestra a un gran capullo púrpura, que se ubica en el extremo distal. Posteriormente dispone de una forma de espiga cuando empieza a florecer sobre el tallo axial (Figura 10) dentro de este se encuentran hileras dobles de flores que forman grupos entre 10 y 20 racimos que son protegidos por bracteas de color púrpura gruesas y carnosas. El peso de la inflorescencia ocasiona que el tallo aéreo o floral se arquee hacia el suelo (SENASICA, 2016).



Figura 10. Formación de la inflorescencia en forma de espiga.

Tomado de (Vézina, 2016).

Los frutos son una baya oblonga (Figura 11) que se inclina según su peso, son de color amarillo, amarillo verdoso, rojo, amarillo rojizo (Umar et al., 2013).



Figura 11. Variedad de frutos del género *Musa* spp.

Tomado de (Vézina, 2016).

2.2.5 Importancia Económica del Banano

Los frutos del género *Musa* proveen de una alta calidad nutricional. Según la Organización Mundial de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, el banano es considerado como el cuarto cultivo de mayor importancia económica, son 150 países dedicados a la producción, comercialización y exportación de este cultivo, representa el principal alimento para al menos 500 millones de personas, lo que aumenta el comercio externo e interno (Arias, Dankers, Liu, & Pilkauskas, 2004; PRO ECUADOR, 2016),

produciendo 105 millones de toneladas anuales aproximadamente de este cultivo, generando en el 2017, 1,098.07 dólares por tonelada métrica (Corporación Financiera Nacional, 2017) lo que permite fortalecer los ingresos económicos de cada país y desarrollar empleos de forma directa e indirecta.

2.2.6 Cultivo de Banano en Ecuador

Ecuador posee condiciones climáticas y geográficas favorables para la obtención de este cultivo que se da durante todo el año; lo cual beneficia a pequeños y grandes productores al ser capaces de satisfacer la demanda nacional e internacional (PRO ECUADOR, 2016). Cabe recalcar que el banano ecuatoriano ha sido certificado a nivel internacional por su alta calidad y valor nutricional; sin embargo su comercialización y producción puede ser afectada por la presencia de plagas y enfermedades que destruyen a estos cultivos, provocando la muerte de las mismas. La producción por hectárea de banano llega a un valor estimado de USD 8,786.85 a nivel nacional, siendo el 25.25% destinado para el control fitosanitario y manejo de enfermedades fúngicas, bacterianas o provocadas por virus (Salazar et. al, 2015).

2.3 Enfermedad del Moko

Son varias las enfermedades que pueden atacar a los cultivos del género *Musa*, sean enfermedades fúngicas, virales o bacterianas. Dentro de estas enfermedades se enfatiza en la enfermedad del moko; que posee una gran relevancia debido a la agresividad y muerte que provoca en la planta infectada (Fegan, 2007; Safni et al., 2014).

El nombre de esta enfermedad surgió 1890 en Trinidad donde se produjo altas pérdidas de cultivos de banano, eliminando las plantaciones casi en su totalidad; aunque se desconocía la causa de la enfermedad, se observó una determinada característica, que logró identificar a la enfermedad debido a la

presencia viscosa en los frutos (Nadal-Medina R, Manzo-Sánchez, G , Orozco-Romero J, Orozco-Santos M, 2009).

Actualmente esta enfermedad se encuentra distribuida en varias regiones alrededor del mundo, aunque se hace énfasis en el hemisferio occidental donde el desarrollo de los cultivos de banano ha aumentado (PRO ECUADOR, 2016; Rueda-Puente et al., 2014).

2.3.1 Signos y sintomatología

Los primeros síntomas son identificados en las hojas; en las cuales se observa un cambio de color verde a amarillento verdoso, lo que induce a un decaimiento y doblamiento de las hojas en la unión del limbo con el peciolo (Figura 12). Después de un periodo de tiempo, las hojas jóvenes se desecan y los márgenes de las mismas adquiere un color oscuro (SENASICA, 2016).



Figura 12. Desecamiento en hojas de plátano y cambio de color en el margen de las hojas.

Tomado de (SENASICA, 2016).

En el pseudotallo, se encuentra el sistema vascular y el xilema que le permite transportar nutrientes y agua necesaria para el desarrollo de la planta; sin embargo cuando se evidencia la enfermedad, los haces vasculares cambian de color de café claro a un tono marrón o negro (Figura 13) debido al taponamiento de los conductos vasculares por absorción de elementos o

sustancias poliméricas extracelulares que deterioran por completo el sistema vascular (Gómez Calvo, 2005; Zulperi et al., 2016).



Figura 13. Corte longitudinal de pseudotallo con síntomas primarios de infección de la enfermedad del Moko.

Tomado de (SENASICA, 2016).

En cuanto al rizoma, cuando se encuentra infectados se evidencia fragilidades en raíces (Figura 14), cambio de color a amarillo o marrón por infección de haces vasculares (SENASICA, 2016).



Figura 14. Visualización de rizoma infectado.

Tomado de (SENASICA, 2016).

Para los frutos, los síntomas se evidencian en la pudrición de racimos, provocando además secamiento y necrosis (Figura 15); para aquellos frutos que ya se han desarrollados se muestra una madurez prematura, la cáscara se

encuentra en un estado necrótico y la pulpa adquiere una consistencia harinosa (Peeters, Guidot, Vailliau, & Valls, 2013; SENASICA, 2016).



Figura 15. Frutos de banano con apariencia necrótica que representa la sintomatología de la enfermedad del Moko.

Tomado de (SENASICA, 2016).

2.3.2 Ciclo de la Enfermedad

La diseminación de esta enfermedad puede darse por: insectos, maquinaria pesada, herramientas, agua de riego contaminada transportada en canales, labores culturales y restos de plantas infectadas. En suelos la bacteria logra mantenerse hasta cuatro años para producir la enfermedad del moko en escasas condiciones de nutrientes y en bajas temperaturas (Gutarra et al., 2017; Kinyua et al., 2014).

El proceso de infección se da mediante tres fases; siendo la primera fase el ingreso de la bacteria a través de lesiones en raíces que se encuentran cerca del suelo; lugar que puede estar contaminado por el uso de maquinaria pesada infectada previamente con esta bacteria o por medio de la movilidad de personas que se trasladan en lugares infectados sin saberlo. En la segunda fase, la bacteria llega a los vasos del xilema y en la tercera fase se produce el marchitamiento (SENASICA, 2016). La infección inicia a partir de la contaminación de las raíces primarias, lo que causa daño en las zonas

radicales y raíces secundarias. La bacteria ingresa en el interior de la planta y logra multiplicarse, llegando al tejido vascular, provocando taponamiento en los tejidos, evitando el ingreso de sustancias y nutrientes necesarios para la planta (Obregón & Rodríguez, 2011). Cuando logra centrarse en el pseudotallo puede dispersarse lentamente y la enfermedad tarda en visualizarse dependiendo de la ecología bacteriana y del desarrollo de la planta (Espinoza, 2006; Peeters et al., 2013).

Por otro lado, puede existir una diseminación de la enfermedad entre plantas cuando se realiza cortes de especímenes infectados utilizando herramientas sin desinfectar que han tenido contacto con plantas infectadas ((SENASICA, 2016).

Los insectos que diseminan la enfermedad del moko son los áfidos (Aphidoidea), considerados como insectos fitopatógenos que se caracterizan por poseer un estilete en el aparato bucal que le permite cruzar la epidermis de las plantas y llegar al floema para alimentarse y obstruir el paso de ciertos nutrientes. Los perjuicios que ocasionan son el deterioro de las hojas jóvenes produciendo clorosis y necrosis, formación de agallas en raíces y en tallos (Simbaqueba, Serna, & Posada Flores, 2014). Estos insectos se alimentan de la savia del floema, lo que induce a un desorden en el metabolismo en las plantas; como consecuencia se adhieren a las lesiones provocados por *R solanacearum* y se propagan por medio de transporte entre plantas, aumentando el nivel de agresividad (Shaad, Jones & Chun, 2001; Swanson, Yao, Tans-Kersten, & Allen, 2005).

La temperatura del ambiente se considera como factor predominante para la irrupción de la enfermedad. El rango de temperatura en la que la patología puede ser más agresiva es entre de 24 a 35°C, pero si se encuentra en épocas de invierno o zonas menos templadas cerca de los 10°C, la bacteria no logra desarrollarse con facilidad, provocando que se impida el desarrollo de la misma (Ceballos, Álvarez, & Bolaños, 2014; Espinoza, 2006).

2.4 Métodos de aislamiento y detección de *R solanacearum*

2.4.1 Medios de cultivos para aislamiento de *R solanacearum*

El complejo de especies de *R solanacearum* poseen una gran variedad morfológica, debido a esto se requiere un medio de cultivo selectivo que permite diferenciar todos los tipos de colonias.

Existe una variedad de medios de cultivos para aislar *R solanacearum*, de los cuales la mayoría son semiselectivos, ya que se considera que no son totalmente propicios para el crecimiento de todas las cepas que conforma el complejo de especies de ésta bacteria y no omiten el crecimiento de otras bacterias Gram negativas como el género *Pseudomonas* (Schaad, Jones & Chun, 2001).

Dentro de los medios de cultivos que se han utilizado, se tiene el medio CPG, que contiene casaminoácidos (composición de aminoácidos procedentes del proceso de hidrólisis de la caseína), glucosa y agar, otro medio de cultivo es YPGA, que se compone de extracto de levadura, peptona, glucosa, almidón soluble y agar (EPPO, 2016). Además se conoce de un medio de mayor empleo que es el medio TZC agar (Cloruro de trifeníl tetrazolio) que está compuesto de cloruro de 2, 3, 5-trifeníl tetrazolio, peptona, destroxa y agar; sin embargo el medio de mayor uso es el medio SMSA (Medio Semiselectivo Sur África); el cual es una variación del medio TZC agar con la diferencia que el medio SMSA está compuesto de una disolución de antibióticos (Schaad, Jones & Chun, 2001).

El medio SMSA fue modificado para disponer del crecimiento más rápido de las cepas. Inicialmente contenía glicerol, pero éste puede ser remplazado con glucosa, siendo más beneficioso para que las colonias puedan crecer ágilmente e impidiendo problemas de crecimiento con bacterias competidoras

(Schaad, Jones & Chun, 2001; Fegan, 2007). El tiempo aproximado de incubación es de 48 a 72 horas a una temperatura óptima de 28°C.

Además el medio de cultivo B de King es empleado para diferenciar colonias de *Pseudomonas* spp., que presente fluorescencia, debido a que es considerado como la principal bacteria antagonista para *R solanacearum* y tiene la posibilidad de crecer en el medio de cultivo SMSA (Obrador & Sánchez, 2016).

2.4.2 ELISA sandwich de anticuerpo doble (DAS-ELISA)

La técnica de inmunoabsorción ligado a enzimas de sus siglas en inglés (ELISA), se ha convertido en un procedimiento base para la detección de antígenos virales mediante el uso de anticuerpos (Umar Shahbaz et al., 2015). Para varias investigaciones la técnica ELISA se ha considerado de gran ayuda para el diagnóstico vegetal, debido a que permite analizar varias muestras a la vez, es rápida, sencilla, pero a su vez puede tener problemas de sensibilidad o especificidad; tomando en cuenta que no diferencia células muertas de las vivas, lo que induce a falsos positivos o falsos negativos cuando los anticuerpos pueden detectar niveles muy bajos en las muestras de interés o en ciertos casos las proteínas se desnaturalizan por variaciones en relación a temperatura, o presión (Denny, 2006). A partir de sus características se han dado varios protocolos que modifican la técnica para un uso más específico.

Los primeros ensayos para la detección de *R solanacearum* fueron empleados inicialmente en cultivos de papa y tomate debido a que la infección provocada por la bacteria se encontraba en aumento en países europeos (Rajeshwari et al., 1998). Los anticuerpos policlonales reaccionan con la bacteria, pero no diferencian entre razas y biovares. Los anticuerpos monoclonales son pocos específicos para reaccionar con algunos aislados de *R solanacearum*, además que no existe ensayos que comparen cepas avirulentas y virulentas (Priou et al., 2006; Umar Shahbaz et al., 2015).

El ensayo DAS-ELISA se caracteriza por ser de alta especificidad y eficiencia para la detección de antígenos. Los anticuerpos policlonales son utilizados en su mayoría, ya que permiten extraer grandes cantidades de antígeno a diferencia de los anticuerpos monoclonales que solo detectan mínimas cantidades (Umar Shahbaz et al., 2015). Durante el procedimiento de este ensayo se provoca una reacción colorimétrica dada por una enzima peroxidasa, lo que permite que se conjuguen con el segundo anticuerpo para la detección del mismo (Schaad, Jones & Chun, 2001) y el sustrato TMB (sustrato peroxidasa) provoca el cambio de color o señal fluorescente en la muestra, demostrando un color azul, indicativo para resultado positivo y cuando no muestra color es resultado negativo.

2.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha sido método de preferencia para el diagnóstico molecular, la cual permite determinar ADN en pequeñas cantidades. Se caracteriza por ser un procedimiento altamente sensible y específico (Bartlett & Stirling, 2011; Denny, 2006). Este procedimiento se fundamenta en la elongación de un fragmento de ADN por medio de la enzima Taq ADN polimerasa, enzima termoestable que proporciona varias copias durante varios ciclos, además de emplear varias sustancias que favorece el proceso como cloruro de magnesio, una solución amortiguadora, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) y ADN molde (concentración de ADN necesaria para la reacción). Esta técnica se realiza en tres pasos: la desnaturalización del ADN a una temperatura que generalmente oscila en los 94°C, la hibridación del ADN con un par de cebadores específicos y la extensión de la cadena de ADN molde por medio de la enzima polimerasa (Umesha & Avinash, 2014)

Se ha aplicado ésta técnica como método de confirmación en el diagnóstico de bacterias fitopatógenas como *R solanacearum*, que requiere de varios estudios a nivel molecular, por lo que se ha estimado diversos protocolos. El uso de

cebadores específicos, tiempos y temperaturas adecuadas han permitido definir un protocolo para la detección de *R solanacearum*. Opina (1997) determinó inicialmente las condiciones adecuadas para el uso de cebadores universales que permitan detectar la bacteria, los cebadores 759-F y 760-R generan una amplicón de 282 pb; sin embargo existe otro tipo de cebadores específicos para la región 16S ARNr y 23S ARNr.

2.4.4 Pruebas bioquímicas para identificar biovares de *R solanacearum*.

Como ya se había descrito los biovares se diferenciar mediante la degradación de disacáridos y oxidación de polialcoholes. De acuerdo a la capacidad de metabolizar cada sustrato se determinará una clasificación (Tabla 2). Cada sustrato se combina con un medio de cultivo base verde oliva; el cual debe tener un pH de 7.2. Dependiendo del tiempo de incubación y el consumo de la bacteria se puede determinar un pH ácido mayor o igual a 6.0. Para este procedimiento se usa una colonia de *R solanacearum* proveniente de medios de cultivo sólidos para cada sustrato y de acuerdo a varias lecturas diarias durante 28 días e incubación a 28°C, se evalúa los cambios de coloración de verde a amarillo (Meng, 2013, Schaad, Jones & Chun, 2001).

Tabla 2.

Clasificación de biovares

Sustrato	Biovar 1	Biovar 2	Biovar 3	Biovar 4	Biovar 5
Celobiosa	-	+	+	-	-
Lactosa	-	+	+	-	-
Maltosa	-	+	+	-	-
Manitol	-	-	+	+	-
Sorbitol	-	-	+	+	+
Dulcitol	-	-	+	+	+

Tomado de (Kinyua et al., 2014; Schaad, Jones & Chun, 2001).

3. Capítulo III. Procedimientos

3.1 Obtención de material vegetal

La obtención del material vegetal se basó en la recolección de tejidos vegetales que han llegado al laboratorio de Fitopatología de AGROCALIDAD con posible sintomatología de *R solanacearum*. Los tejidos vegetales fueron frutos y pseudotallos de diferentes variedades de *Musa* spp proveniente de distintas provincias del país (Tabla 3) de las cuales se adquirió ochenta muestras

Tabla 3.
Muestras utilizadas para los ensayos experimentales

Código de Laboratorio	Localidad	Cultivo	Muestra	Código de Laboratorio	Localidad	Cultivo	Muestra
FP-16-0429	Manabí	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0136	Zamora Chinchipe	Plátano	Pseudotallo
FP-16-0430	Manabí	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0176	Manabí	Banano	Pseudotallo-Frutos
FP-16-0431	Manabí	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0179	Manabí	Banano	Pseudotallo
FP-16-0432	Manabí	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0515	Guayas	Banano	Frutos
FP-16-0433	Manabí	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0507	Guayas	Banano	Pseudotallo
FP-16-0804	Manabí	Plátano	Pseudotallo-Frutos	FP-17-0551	Guayas	Banano	Pseudotallo
FP-16-0805	Manabí	Plátano	Pseudotallo-Frutos	FP-17-0593	Guayas	Banano	Pseudotallo
FP-16-0806	Manabí	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0593	Guayas	Banano	Frutos
FP-16-0807	Manabí	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0523	Guayas	Banano	Frutos
FP-16-0808	Manabí	Plátano	Pseudotallo-Frutos	FP-17-0606	Esmeraldas	Banano	Pseudotallo

FP-16-0809	Manabí	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0607	Esmeraldas	Banano	Pseudotallo
FP-16-0810	Manabí	Plátano	Pseudotallo	FP-17-1024	Guayas	Banano	Frutos
FP-16-0811	Manabí	Plátano	Pseudotallo	FP-17-1051	Guayas	Banano	Frutos
FP-16-0615	Manabí	Plátano	Pseudotallo	FP-17-1052	Guayas	Banano	Frutos
FP-16-0816	Manabí	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0539	Guayas	Banano	Frutos
FP-16-0617	Manabí	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0255	Guayas	Banano	Frutos
FP-16-0618	Manabí	Plátano	Pseudotallo	042-09-001N	Sucumbios	Plátano	Pseudotallo
FP-16-0833	Guayas	Banano	Pseudotallo	043-09-001N	Sucumbios	Plátano	Pseudotallo
FP-16-0834	Los Ríos	Banano	Pseudotallo	FP-17-0255	Guayas	Banano	Frutos
FP-16-0884	Guayas	Banano	Pseudotallo	FP-17-0425	Guayas	Banano	Pseudotallo
FP-16-1105	Manabí	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0338	Manabí	Banano	Pseudotallo
FP-16-1106	Manabí	Banano	Pseudotallo	FP-17-0260	Guayas	Banano	Frutos
FP-16-1355	Sucumbios	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0229	Guayas	Banano	Frutos
FP-16-1361	Manabí	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0120	Guayas	Banano	Pseudotallo
FP-16-1362	Manabí	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0344	Manabí	Banano	Frutos

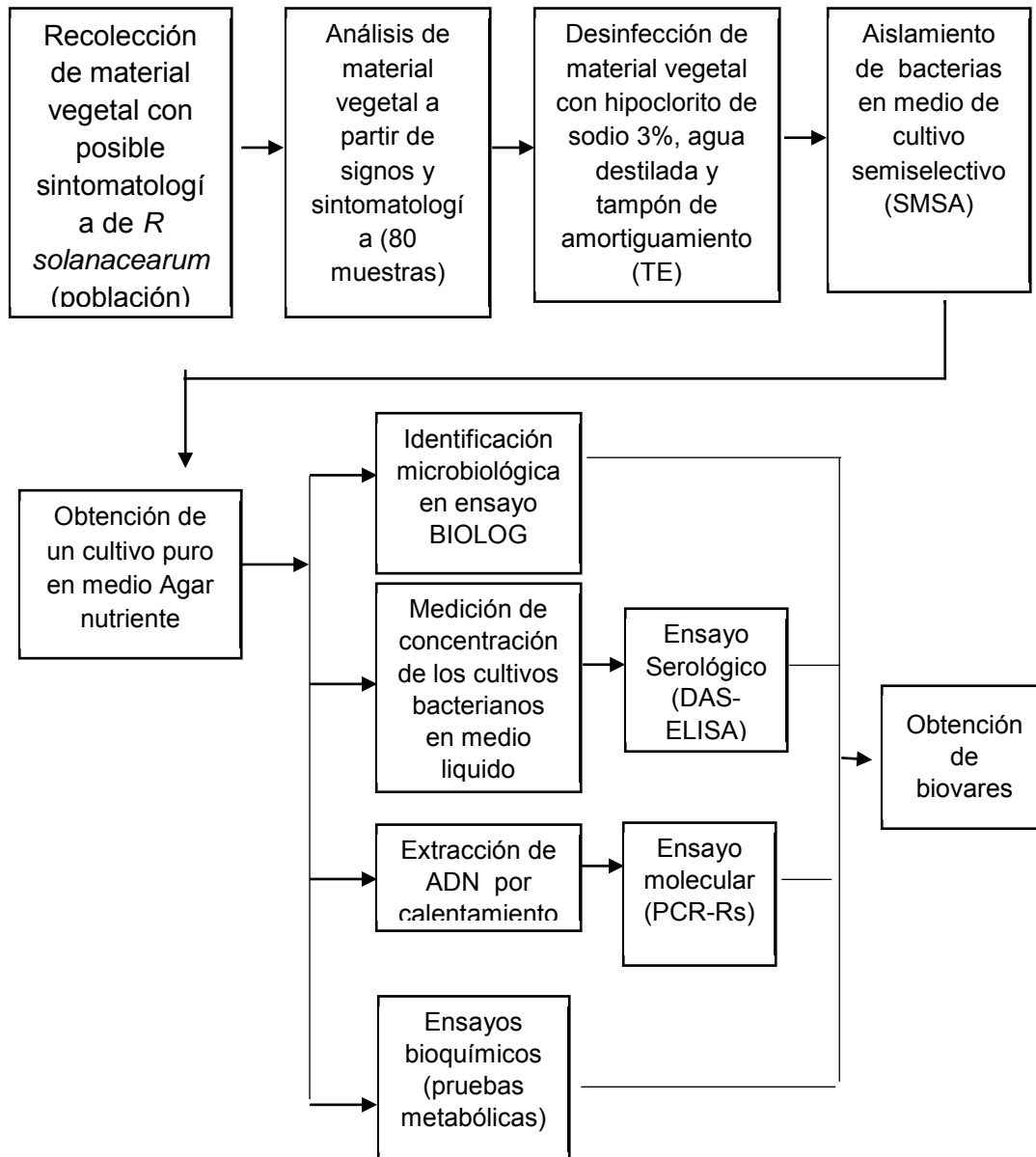
FP-16-1363	Manabí	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0580	Guayas	Banano	Pseudotallo
FP-16-1364	Manabí	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0462	Guayas	Banano	Pseudotallo
FP-16-1332	Napo	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0273	Manabí	Banano	Frutos
FP-16-1424	Sucumbíos	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0242	Manabí	Banano	Pseudotallo
FP-16-1882	Manabí	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0461	Guayas	Banano	Pseudotallo
FP-16-1883	Manabí	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0360	Manabí	Banano	Pseudotallo
FP-16-1884	Manabí	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0070	Sucumbíos	Banano	Pseudotallo
FP-17-1885	Manabí	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0071	Sucumbíos	Plátano	Frutos
FP-16-1906	Sucumbíos	Plátano	Pseudotallo- Frutos	FP-17-0072	Sucumbíos	Plátano	Frutos
039-09-001Y	Sucumbíos	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0073	Sucumbíos	Plátano	Pseudotallo
040-09-001Y	Sucumbíos	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0074	Sucumbíos	Plátano	Pseudotallo
041-09-001Y	Sucumbíos	Plátano	Frutos	FP-17-0177	Manabí	Plátano	Pseudotallo- Frutos
FP-17-0110	Napo	Plátano	Pseudotallo	FP-17-0178	Manabí	Plátano	Pseudotallo

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Diagrama de flujo de la metodología

Tabla 4.

Diagrama de flujo elaborado para el trabajo experimental



3.2.2 Procesamiento de muestras de material vegetal

Se cortó 1 cm de cada fragmento de tejido vegetal infectado, el cual fue desinfectado con hipoclorito de sodio a una concentración del 3% y agitación manual durante veinte segundos, seguido de tres lavados con agua estéril durante un minuto para eliminar residuos del desinfectante. Posteriormente se maceró cada fragmento de tejido vegetal en un mortero con una solución buffer (TE) Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM, con un pH de 8.0.

3.2.3 Aislamiento, purificación y detección de la bacteria *R solanacearum* a partir de material vegetal infectado

Partiendo de los tejidos vegetales macerados con la solución buffer TE, se procedió a tomar 30 μ L de la suspensión macerada, la cual fue sembrada con un asa de Digralsky en cajas Petri con el medio semiselectivo SMSA (caseína hidrolizada 1 g/L, peptona 10 g/L, sacarosa 10 g/L, agar 18 g/L, disolución de cloruro 2,3,5 trifenil tetrazolio 50 mg/L y disolución de antibióticos: Polimixina β 100 mg/L, bacitracina 25 mg/L, cloranfenicol 5 mg/L, penicilina G 0,5 mg/L, se agregó cristal violeta 5 mg/L a la disolución de antibióticos). La disolución de antibióticos y la disolución de cloruro 2, 3,5 trifenil tetrazolio fueron esterilizadas con una membrana de filtración de 0,22 μ m en condiciones asépticas; las cuales fueron agregadas cuando el medio se encontró a 50°C. El medio de cultivo se incubó durante 48 horas a 28°C.

En el medio SMSA se observó colonias con apariencia similar a la bacteria *R solanacearum*; las cuales fueron nuevamente sembradas por agotamiento en tres medios de cultivos. En el medio TZC agar fue utilizado únicamente para mostrar si existe diferencias morfológicas de colonias virulentas y avirulentas como lo indica Tapeiro et al., (2007) y Kinyua et al., (2014), el medio B de King se empleó para descartar aquellas colonias en las que se observó pigmentos

fluorescentes y en medio Agar Nutritivo fue utilizado para tener un cultivos puros para los ensayos Biolog, DAS-ELISA y PCR. Estos medios de cultivos fueron incubados durante 24 horas a 28°C.

3.2.4 Detección de *R solanacearum* mediante ensayos de Identificación microbiológica Biolog

El sistema Biolog es empleado para identificar diversos microorganismos. En el caso de bacterias el sistema muestra a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas a través de 94 pruebas bioquímicas; siendo 71 de estas pruebas utilizadas para fuentes de carbono y 23 para ensayos de sensibilidad química, las cuales proporcionan una “huella digital fenotípica” para determina el tipo de microorganismo a nivel de especie (Biolog Inc, 2016).

El ensayo Biolog se lo realiza en tres fases, la primera corresponde al uso de un turbidímetro, el cual fue empleado para medir la turbidez de la bacteria. Se calibró el turbidímetro con un tubo blanco y con estándares del 85% para verificar que el equipo funcione correctamente. Posteriormente se tomó una colonia purificada de *R solanacearum* en Agar Nutritivo con un hisopo de algodón estéril y se introdujo en un tubo de caldo de suspensión específico para bacterias (IF-A) hasta alcanzar una turbidez del 95% \pm 2. El caldo de suspensión IF-A contiene peptona y glucosa.

La segunda fase corresponde a la inoculación en placas (MicroPlate) GEN III mediante el uso de una pipeta multicanal, en el cual se dispensó 100 μ L en cada pocillo. La tercera fase consistió en la incubación de la microplaca entre 18 a 24 horas a 30°C para realizar lecturas en el equipo Biolog, donde se determinó el género y especie de cada aislado ensayado de acuerdo a una base de datos que maneja el equipo Biolog.

3.2.5 Detección de *R. solanacearum* mediante ensayo Elisa Sánduche de Doble Anticuerpo (DAS-ELISA)

Para la detección mediante pruebas serológicas se utilizó el kit Agdia (N.C. SRP 33900) de acuerdo al protocolo del fabricante. Se utilizó una microplaca con 72 pocillos; un control positivo, un control negativo y una muestra blanco.

Se realizó una variación del método realizado por Rajeshwari et al., (1998). En el cual se tomó una colonia purificada de *R solanacearum* en Agar Nutritivo, que fue incorporada en 5 mL de caldo nutritivo y en SMSA líquido; las cuales se agitaron entre 18 y 24 horas en plancha de agitación, de esta manera se logró medir la concentración bacteriana en unidades McFarland.

McFarland es una escala que permiten medir la cantidad de población microbiana contenida en un fluido (Benson, 2011). Para este ensayo se manejó un densitómetro. Se utilizó concentraciones de 10^8 UFC/mL. Después de medir las concentraciones de cada bacteria, se centrifugó 1 mL de los medios de cultivo líquido durante 10 minutos a 12 000 g, se descartó el sobrenadante y se agregó 500 μ L de buffer de extracción GEB en el pellet bacteriano, lo que proporcionó una solución homogénea que facilitó el ensayo.

Para evaluar los resultados, se utilizó un lector de placas ELISA (BIOTEK Modelo ELX800), que mide las unidades de densidad óptica (UDO) a 650 nm. Se evaluó el valor de UDO de los controles positivos que debía ser mayor a 1 como máximo y 0,8 como mínimo. En el caso de los aislados bacterianos ensayados se calculó el promedio UDO de los controles negativos y blancos multiplicado por dos; este cálculo es denominado Cut off.

Si la muestra tiene un promedio de UDO mayor o igual al resultado del Cut off se considera como positivo, pero si presenta valores menores al resultado es negativo.

Cut off: 2 X (Promedio UDO de los controles negativos)

Muestra con Prom. UDO \geq Cut off, es considerado **positiva**

Muestra con Prom. UDO $<$ Cut off, es considerado **negativa**

3.2.6 Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN por calentamiento de acuerdo al método alternativo modificado de Fegan (2007) para lo cual se suspendió pellets bacterianos con 100 μ L de agua DEPC libre de RNAsas y DNAsa en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL; los cuales se colocaron en un termobloque a 95°C con agitación de 450 rpm durante 10 minutos y se centrifugaron a 14 000 g durante 2 minutos; obteniendo dos fases, la fase líquida será el ADN puro y la fase acuosa que se encuentra en el fondo del tubo de microcentrífuga es descartado. Se verificó la pureza y cantidad del ADN mediante el equipo espectrofotométrico NanoDrop.

3.2.7 Detección de *R Solanacearum* mediante ensayo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Para detectar la presencia de *R solanacearum* y validar con los ensayos morfológicos y serológicos, se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los cebadores utilizados fueron 759-F (5'-GTCGCCGTCAACTCACTTTCC-3') y 760-R (5'-GTCGCCGTGAGCAATGCGGAATCG-3'), cebadores universales que dan una amplicón de 282 pb (Cardozo et al., 2009).

Para la mezcla de reactivos de PCR, se utilizó 5 μ L de ADN, 1X Got Taq Flexi buffer, 1,25 mM MgCl₂, 0,25 mM dNTP's, 0,5 μ M para cada cebador y 0,6 U de enzima (GoTaq Hot Start Polymerase), el volumen final de cada reacción fue de 25 μ L. Como controles negativos se utilizó agua DEPC y los controles

positivos fueron adquiridos por parte del laboratorio de Biología Molecular de Agrocalidad. Se utilizó un termociclador (BIO-RAD) en donde se empleó un programa con un ciclo de desnaturalización inicial de 96°C por 2 min, 40 ciclos que comprende desnaturalización del molde de ADN de 94°C por 20 segundos, hibridación de 63°C por 20 segundos y una extensión de copia de 72°C por 30 segundos y un ciclo de extensión final de 72°C por 5 min.

Los productos PCR fueron observados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, con 0,5X de buffer TBX, teñidos con 4 µL de Syber Green y visualizados en luz ultravioleta con un voltaje de 100 Amperios durante 30 minutos. El marcador molecular utilizado fue de 1 kb (Promega).

3.2.8 Identificación de Biovares de *R Solanacearum*

A partir de las muestras bacterianas detectadas como *R solanacearum* por medio de PCR, se realizó una clasificación en biovares de acuerdo a la degradación de disacáridos (maltosa, lactosa, celobiosa) y la oxidación de polialcoholes (dulcitol, sorbitol, manitol).

Se utilizó un medio de cultivo base (1 g/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,2 g/L KCl, 0,2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L bacto peptona, 3 g/L agar y 80 mg/L azul de bromotimol, con un pH de 7,2), obteniendo un medio de cultivo de color verde oliva. Este medio de cultivo en combinación con los disacáridos y polialcoholes es utilizado para observar el metabolismo de las colonias pertenecientes a *R solanacearum* de acuerdo al cambio de color.

El medio fue esterilizado a 121°C durante 15 minutos. Se preparó disoluciones acuosas del 10% con cada sustrato, se utilizó una membrana de filtración con un tamaño de 0,22 µm para esterilizar cada uno y se adicionaron al medio de cultivo base cuando se encuentre a 55°C. Se dispensó 5 mL del medio de cultivo con cada sustrato en tubos de ensayo en condiciones asépticas.

Para identificar los diferentes tipos de biovares se procedió a utilizar colonias bacterias purificadas de *R solanacearum* en Agar Nutritivo; las cuales fueron introducidas en las tres cuartas partes del medio verde oliva. Se incubó a 28°C y se evaluó los cambios de los medios de cultivo durante siete días.

4. Capítulo IV. Resultados y Discusión

4.1 Aislamiento, purificación y detección de la bacteria *R solanacearum* a partir de material vegetal infectado

Las muestras analizadas determinaron los diferentes síntomas de la enfermedad del moko y su desarrollo en los tejidos vegetales. Los pseudotallos presentaron una mayor colonización de la bacteria que los frutos, multiplicándose y afectando al tejido vascular. Se evidenció que la bacteria puede permanecer latente durante largos periodos de tiempo a temperatura ambiente, como en algunos casos las muestras vegetales que mostraron signos y sintomatología aparente a *R solanacearum* tenían un periodo de 2 años en almacenamiento. De acuerdo con Fegan (2007) la colonización de la bacteria en el hospedero puede permanecer por más de 18 meses, esto se relaciona conforme al tipo de cepa que se encuentre en el tejido vegetal. A partir del tejido vegetal se aislaron 70 cepas de *R solanacearum*, mediante el manejo de medios de cultivo

Dentro de los medios de cultivo, existen los medios selectivos que son aquellos que facilitan el crecimiento de un microorganismo de interés o de un grupo en específico (Cultimed, 2010). La mayoría de estos medios de cultivo emplean diferentes tipos de antibióticos para evitar el crecimiento de otros microorganismos que no son requeridos (Espinoza, 2006). Para *R solanacearum* se ha establecido que no existe un medio completamente selectivo, debido a que esta bacteria es considerada como un complejo de especies y un solo medio de cultivo no permite detectar los diferentes tipos de colonias (Shaad, Chun & Jones, 2011).

Generalmente se ha utilizado cultivos como YPGA, CPG o YDC para aislar la bacteria de forma rápida, pero los sustratos empleados no permiten diferenciar todas las variedades de colonias, por lo que es necesario emplear otro tipo de medios de cultivos. El medio de cultivo SMSA mostró mejores características morfológicas similares con las descritas para a *R solanacearum*. Las colonias obtenidas en este medio de cultivo fueron colonias mucoides, convexas, blancas, con centro rosado, redondas con borde ondulado (Figura 16). Este medio de cultivo se demoró entre 48 y 72 horas en evidenciar el crecimiento de colonias a diferencia de otros medios de cultivo que el tiempo de incubación es menor o igual a 24 horas.

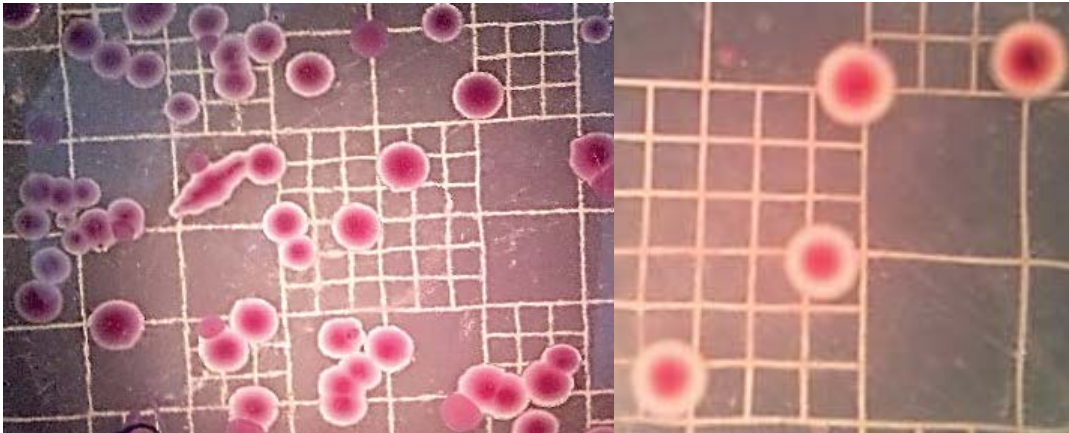


Figura 16. Aislamiento de colonias que muestran características morfológicas correspondientes a *R solanacearum* en medio de cultivo SMSA

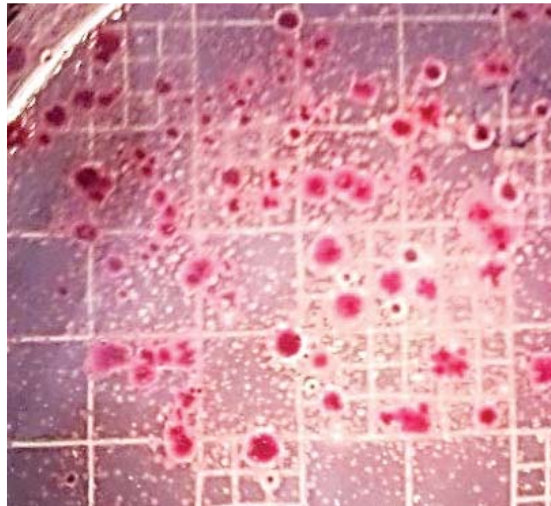


Figura 17. Colonias aisladas con apariencia de *R solanacearum* en medio de cultivo TZC agar

El medio de cultivo TZC agar empleado no fue específico para definir colonias de *R solanacearum* (Figura 17). De acuerdo con Kinyua et al., (2014) en el medio TZC agar se debe observar colonias blanquecinas con pigmentos de color rojo vino y decoloración marrón alrededor de las colonias, pero en los resultados obtenidos en este trabajo no se observó esa coloración. Las características morfológicas que presentaron en el medio TZC agar se pudieron apreciar con cierta similitud a las observadas en el medio de cultivo SMSA, con la diferencia que hubo mayor crecimiento y aglutinación de colonias, ya que el medio TZC agar no utiliza antibióticos y este permite el crecimiento de otras bacterias que asimilan los mismos sustratos (Shaad, Chun y Jones, 2001). Además Zheng et al., (2016) describe al medio TZC agar como un medio en el que se puede diferenciar colonias avirulentas y virulentas de *R solanacearum*, no obstante esa diferencia no se pudo observar en los resultados obtenidos debido a la aglutinación de colonias blanquecinas y rojizas que son más prevalentes en este medio de cultivo, por lo cual las colonias se mezclan y no se observa ningún tipo de diferenciación; sin embargo (Obrador-Sánchez, 2017; Rueda-Puente et al., 2014) mencionan que se puede distinguir claramente este tipo de colonias en el medio SMSA; siendo colonias irregulares, mucoides, rosadas y halo blanco y las colonias avirulentas son

menos mucoides con un color entre rojo o rosado; las cuales concuerdan con el aislamiento obtenido.

Los medios de cultivo SMSA y TZC agar son conocidos ampliamente para el aislamiento de *R solanacearum*. Los dos medios de cultivo poseen dentro de sus componentes cloruro 2, 3,5 trifenil tetrazolio, que permite pigmentar las colonias correspondientes a *R solanacearum* debido al contenido de formazan, que es empleado para la proliferación celular; siendo esta sustancia la que actúa como colorante; la cual es metabolizada por las bacterias, lo que provee de mejores condiciones para el aislamiento de esta bacteria (Espinoza, 2006).

El uso de cloruro 2,3,5 trifenil tetrazolio se complementa con la disolución de antibióticos, que mejoran el aislamiento de esta bacteria, lo cual se pudo evidenciar en los resultados con el medio SMSA, evitando el crecimiento de bacterias competidoras, oportunistas o saprofitos que pueden ser inoculadas debido a que las muestras vegetales provienen del campo y están expuestas a una amplia gama de microorganismos que se adhieren a los tejidos vegetales (Sikirou, Beed, Ezin, Hoteigni, & Miller, 2017).

Además se descartaron colonias que presentaron pigmentos fluorescentes, estas en su mayoría pertenecen al género *Pseudomonas* spp, que son consideradas como las principales bacterias que producen antagonismo (EPPO, 2016; Obrador Sánchez, 2016) e inhiben el crecimiento de colonias de *R solanacearum*.

4.2 Detección de *R solanacearum* mediante ensayos de Identificación microbiológica Biolog

El ensayo Biolog tiene la facultad de identificar varios microorganismos que pueden estar en un aislado bacteriano (Biolog Inc, 2016; Verschuere Laurent, Fievez Veerle, Van Vooren Lieven, 1997). Como resultado se identificó cuatro

especies de bacterias: *Ralstonia pickettii*, *Pseudomonas fluorescense*, *Paenibacillus* spp y *Pectobacterium carotovorum*.

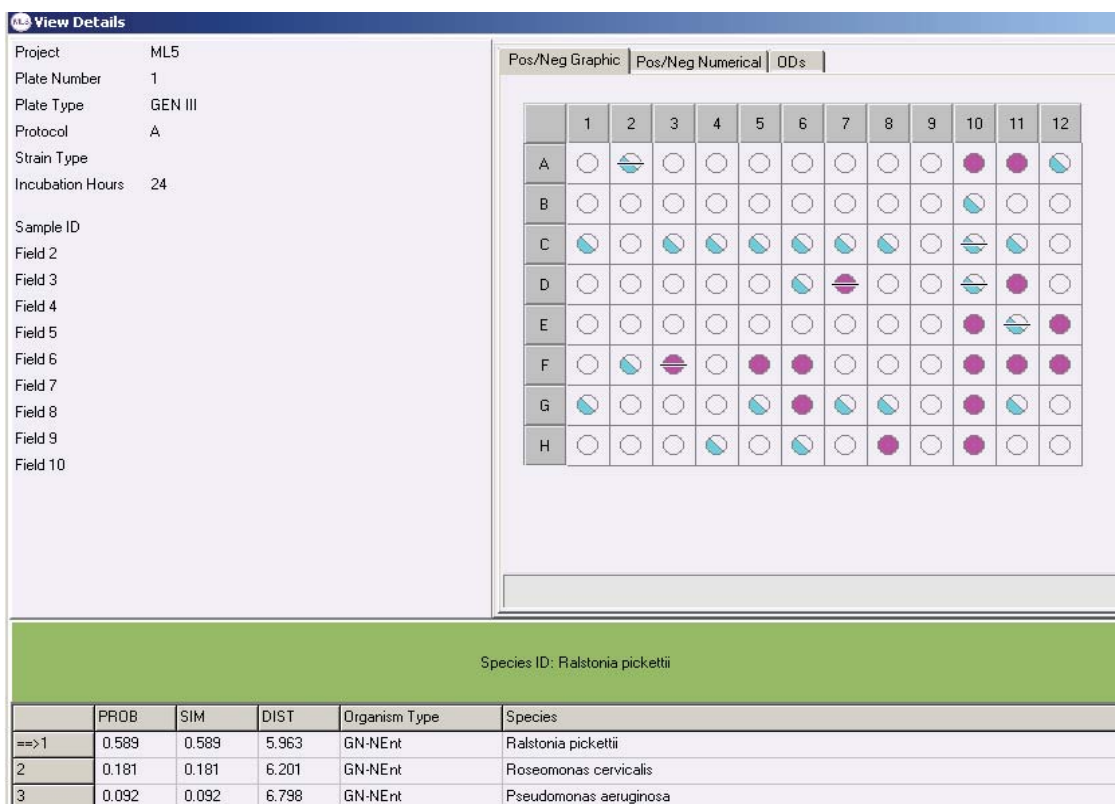


Figura 18. Detalles de lectura de identificación de especie emitida por el equipo Biolog.

El ensayo Biolog realizó un screening de acuerdo a las 94 pruebas bioquímicas para detectar un listado de varios microorganismos que posiblemente se encuentra en el aislado ensayado. En la Figura 18, se visualiza el resultado de un aislado bacteriano a partir de las 71 pruebas para fuentes de carbono observadas en las columnas 1 a 9 y las 21 pruebas de sensibilidad química se encuentran en las columnas 10 a 12. Los controles negativos y positivos se encuentran en los pocillos A1 y A10. El color rosado indica resultado positivo, el color celeste pintado a la mitad muestran que el límite del consumo de los diferentes sustratos y los círculos que no tienen ningún color determinan un resultado negativo (Biolog Inc, 2016). A partir de estos resultados el sistema Biolog indicó un porcentaje de similitud de 0, 5895% correspondiente a *R picketti*; los cuales se comparan con la base de datos del sistema Biolog, sin

embargo el valor de similitud es muy bajo para considerar como un resultado eficiente y a su vez se evidenció la presencia de otros microorganismos competidores.

Como resultado de este ensayo se pretendió detectar *R solanacearum*; sin embargo este ensayo fue deficiente, ya que la especie que detectó en su mayoría fue *R pickettii*, aunque el porcentaje de similitud es bajo, se ha estimado que esta especie posee un comportamiento metabólico, filogenético y quimiotaxonómico muy cercano con *R solanacearum* (Shaad, Jones & Chun, 2001). La relación entre estas especies comenzó en la reclasificación del género *Ralstonia* de acuerdo al grupo de homología; con lo cual que se ha considerado que existe una diferenciación del 3% sobre las secuencias concatenadas que distingue a *R picketti* de *R solanacearum*, mediante el proceso de hibridación 70% de ADN-ADN (Taghavi, Hayward, Sly, & Fegan, 1996; Yabuuchi, Eiko, Kosako, Yoshimasa, Yano, Ikuya, Hottas, Hisako, Nisciuchi, 1995). La estrecha relación entre *R picketti* y *R solanacearum* ha complicado los procesos de detección, añadiendo que *R picketti* se ha convertido en una especie oportunista y endófito en las cultivos de banano (Obrador et al., 2017) pero además se describe que la adsorción de fuentes de carbono y azúcares se determina como un marcador fenotípico para la diversidad de cepas de *Ralstonia* spp. (Yabuuchi et al., 1995) con lo que se evidenció en este ensayo la ausencia de algunos sustratos como manitol, lactosa, galactosa en *R pickettii* a comparación de *R solanacearum* que asimila varias fuentes de carbono que fueron comprobados en la identificación de biovares.

4.3 Detección de *R solanacearum* mediante ensayo Elisa Sánduche de Doble Anticuerpo (DAS-ELISA)

Los resultados del ensayo DAS-ELISA fueron obtenidos mediante el uso de caldos de cultivo que permitieron enriquecer la concentración bacteriana proveniente de cultivos sólidos (Naranjo & Martínez, 2013), debido a que su

concentración es muy baja y se encuentra por debajo de límite de detección entre 10^1 - 10^2 UFC/mL. Además Álvarez et al., (2008) menciona que los ensayos serológicos poseen un nivel de sensibilidad bajo, la cual puede mejorar mediante el enriquecimiento con el uso de caldos de cultivos que aumenta la concentración del microorganismo y favorece la adsorción o dilución de compuestos inhibidores; con lo cual se enriqueció la concentración bacteriana de 12×10^8 UFC/mL en Caldo Nutritivo y 18×10^9 UFC/mL en Caldo SMSA sin embargo el uso de Caldo SMSA es más complejo en cuanto a su elaboración y conlleva un alto costo por el implemento de antibióticos, por lo que su uso fue limitado.

Para evaluar las concentraciones bacterianas, se realizó una lectura a 650 nm en el lector de placas ELISA (Maca BIOTECK), que mediante el cálculo Cutt off (Tabla 5) se determinó 35 resultados positivos, que presentan concentraciones de 12×10^8 UFC/mL. Visualmente se observó que los controles positivos y muestras bacterianas de *R solanacearum* dan una coloración azul y los controles negativos y blancos no mostraron cambio de color.

Tabla 5.

Resultados DAS-ELISA

Nº Cepa	Cód. Laboratorio	Control Positivo	Control Negativo	Blanco	Aislado Bacteriano	Cálculo Cutt off	Resultado
1	FP-16-0429	1,207	0,098	0,080	0,215	0,178	Positivo
2	FP-16-0430	1,207	0,098	0,080	0,224	0,178	Positivo
3	FP-16-0804	1,056	0,055	0,077	0,135	0,132	Positivo
4	FP-17-0136	1,264	0,075	0,077	0,159	0,152	Positivo
5	FP-17-0176	1,264	0,075	0,077	0,383	0,152	Positivo

6	FP-17-0179	1,264	0,075	0,077	0,238	0,152	Positivo
7	FP-17-0515	1,264	0,075	0,077	0,354	0,152	Positivo
8	FP-17-0593	0,811	0,077	0,077	0,199	0,154	Positivo
9	FP-17-0606	0,811	0,077	0,077	0,362	0,154	Positivo
10	FP-17-0523	0,932	0,046	0,046	0,145	0,092	Positivo
11	FP-17-0515	0,932	0,046	0,046	0,177	0,092	Positivo
12	FP-17-1052	0,992	0,051	0,050	0,101	0,101	Positivo
13	FP-17-0606	1,462	0,056	0,047	0,280	0,103	Positivo
14	FP-17-0523	1,462	0,056	0,047	0,167	0,103	Positivo
15	FP-17-0593	1,462	0,056	0,047	0,153	0,103	Positivo
16	FP-17-0607	1,462	0,056	0,047	0,200	0,103	Positivo
17	FP-17-0515	1,462	0,056	0,047	0,198	0,103	Positivo
18	FP-17-0388	1,648	0,051	0,051	0,341	0,102	Positivo
19	FP-17-0593	1,648	0,051	0,051	0,184	0,102	Positivo
20	FP-17-0551	1,648	0,051	0,051	0,186	0,102	Positivo
21	FP-16-0618	1,648	0,051	0,051	0,203	0,102	Positivo
22	FP-16-0833	1,648	0,051	0,051	0,199	0,102	Positivo
23	FP-16-0834	1,509	0,027	0,049	0,381	0,076	Positivo
24	FP-16-0884	1,509	0,027	0,049	0,191	0,076	Positivo
25	FP-16-1106	1,509	0,027	0,049	0,225	0,076	Positivo

26	FP-16-1105	1,509	0,027	0,049	0,282	0,076	Positivo
27	FP-16-1355	1,509	0,027	0,049	0,153	0,076	Positivo
28	FP-16-1361	1,651	0,054	0,047	0,289	0,101	Positivo
29	FP-16-1362	1,651	0,054	0,047	0,140	0,101	Positivo
30	FP-16-1363	1,651	0,054	0,047	0,185	0,101	Positivo
31	FP-16-1364	1,651	0,054	0,047	0,126	0,101	Positivo
32	FP-16-1332	1,651	0,054	0,047	0,169	0,101	Positivo
33	FP-16-1424	0,877	0,046	0,052	0,160	0,098	Positivo
34	FP-16-1883	0,877	0,046	0,052	0,169	0,098	Positivo
35	FP-16-0618	0,924	0,048	0,046	0,110	0,094	Positivo

4.4 Detección de *R Solanacearum* mediante ensayo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Dentro de todas los métodos utilizados para la detección de *R solanacaerum*, la técnica molecular PCR es ampliamente empleada, esta proporciona altos niveles de sensibilidad y especificidad (Naranjo & Martínez, 2013; Obrador Sánchez, 2016). A partir de este ensayo se confirmó los resultados obtenido mediante el uso de medios de cultivo y ensayo DAS-ELISA, los cuales utilizan cebadores universales 759-F/760-R. Estos cebadores detecta *R solanacearum* a nivel de especie, que dan resultados positivos que se visualizan con la amplificación de bandas, con un tamaño de 282 pb (Cardozo & Rodríguez, 2009; Perea et al., 2011).

Mediante aislados bacterianos provenientes de frutos de banano se demostró la amplificación de bandas, con el tamaño esperado para *R solanacearum* a nivel de especie (Figura 19), lo que evidencia la diseminación de la bacteria en algunas provincias del país. Además se obtuvo resultados positivos a partir del aislamiento de la bacteria obtenido en pseudotallos de banano en Manabí, Guayas y Napo (Figura 20), asimismo se determinó que la dispersión de *R solanacearum* está vigente en estos cultivos, con lo cual se debe tomar procedimientos para controlar esta bacteria y evitar que aumente su propagación.

R solanacearum es un microorganismo de difícil control y la evidencia de microorganismos competidores o antagonistas pueden ser utilizados como agentes de control, que disminuyen el crecimiento poblacional de esta bacteria (Jones & Harmon, 2010; Melgar, Rivera, Brown, & Weller, 2012), ya que se ha considerado que se propagan de forma muy rápida. Este procedimiento debe ser controlado e inicialmente realizado a nivel laboratorio; sin embargo los métodos para disminuir la diseminación de este patógeno se enfocan en la eliminación de malezas, que son consideradas como fuentes de inóculo al igual que las especímenes que presentan la infección, estas deben removerse junto con las raíces y el suelo infectado para que sean destruidas sin afectar otro suelo agrícola (Perea et al., 2011). Los suelos son focos para la permanencia de la bacteria, por lo que se necesita de tratamientos que permita la liberación del patógeno y sea viable para la producción de nuevos cultivos. La variación de temperaturas altas puede reducir las poblaciones de *R solanacearum*, su eficacia tiene relación con la humedad del suelo y el tiempo de exposición. Además de implementar controles de labores culturales que incluyen la desinfección de herramientas en los procesos de cuidado de los cultivos, desinfección de calzados de las personas que se encuentra en las zonas contaminadas. Los tratamientos químicos mediante fumigación también son alternativa para el control de esta bacteria, aunque esto representa efectos secundarios en el ambiente, además es un proceso largo y costoso (Ceballos et al., 2014; R. García, García, & Delgado, 1999).

Tabla 6

Concentraciones de ADN por medio de extracción por calentamiento

ID muestra	Conc. Ácido Nucleico	Unidad	A260	A280	260/280	260/230	Tipo de Muestra
Blanco	0,0	ng/μl	-0,001	-0,003	0,19	-0,9	ADN
* FP-17-0070	31,1	ng/μl	0,6222	0,379	1,74	0,77	ADN
FP-17-0071	42,9	ng/μl	0,857	0,484	1,77	1,10	ADN
+FP-16-1883	45,6	ng/μl	0,912	0,505	1,81	1,02	ADN
FP-16-0506	662,3	ng/μl	13,246	7,732	1,80	0,96	ADN
FP-16-0616	63,3	ng/μl	1,265	0,615	2,06	1,88	ADN
FP-17-0176	83,0	ng/μl	9,660	4,917	1,96	2,16	ADN
* FP-17-0073	72,7	ng/μl	1,454	0,732	1,99	0,84	ADN
FP-16-1362	119,1	ng/μl	2,383	1,380	1,73	0,70	ADN
FP-16-1355	1023,9	ng/μl	20,477	11,888	1,72	0,84	ADN
+FP-16-1882	334,2	ng/μl	6,683	4,172	1,60	0,76	ADN
FP-16-1424	59,5	ng/μl	1,190	0,695	1,71	0,96	ADN
* FP-17-0177	393,8	ng/μl	7,876	4,394	1,80	1,09	ADN
FP-16-0607	26,5	ng/μl	0,530	0,292	1,81	1,07	ADN
FP-16-1106	27,4	ng/μl	0,547	0,297	1,84	1,02	ADN
FP-16-0809	26,5	ng/μl	0,530	0,304	1,74	0,91	ADN
040-009-01	33,6	ng/μl	0,672	0,368	1,83	0,73	ADN
+FP-17-0110	96,9	ng/μl	1,937	1,170	1,86	0,86	ADN
+FP-17-0072	30,4	ng/μl	0,607	0,3411	1,80	1,03	ADN

+FP-17-0074	75,0	ng/μl	1,500	0,882	1,70	0,84	ADN
+FP-17-0178	757,6	ng/μl	15,152	8,015	1,89	1,08	ADN
042-009-01	38,0	ng/μl	0,759	0,439	1,73	1,25	ADN
FP-16-1364	178,2	ng/μl	3,564	1,929	1,85	0,89	ADN
FP-16-1751	229,9	ng/μl	4,598	2,672	1,72	0,80	ADN
* FP-17-0179	75,6	ng/μl	1,512	0,781	1,94	1,12	ADN
FP-17-0917	26,3	ng/μl	0,526	0,279	1,88	0,89	ADN
+FP-17-0136	23,5	ng/μl	0,470	0,236	1,99	1,59	ADN
FP-17-0344	209,8	ng/μl	4,185	2,313	1,81	0,92	ADN
FP-17-0515	418,8	ng/μl	10,317	6,775	1,72	0,57	ADN
FP-17-0120	16,0	ng/μl	0,320	0,178	1,80	0,87	ADN
FP-16-1750	416,1	ng/μl	8,322	4,351	1,91	1,17	ADN
FP-16-0811	1057,1	ng/μl	21,141	13,760	1,54	0,59	ADN
FP-17-0539	45,5	ng/μl	0,910	0,545	1,87	0,72	ADN
*FP-17-0262	637,7	ng/μl	12,753	7,424	1,72	0,95	ADN
FP-17-0344	195,9	ng/μl	3,917	2,011	1,95	1,03	ADN
FP-16-1105	295,9	ng/μl	5,918	3,125	1,89	0,92	ADN

Nota: *: Muestras de aislados bacterianos provenientes de tejidos vegetales de banano visualizados en la figura 19. +: Muestras de aislados bacterianos provenientes de tejidos vegetales de plátano visualizados en la figura 20.

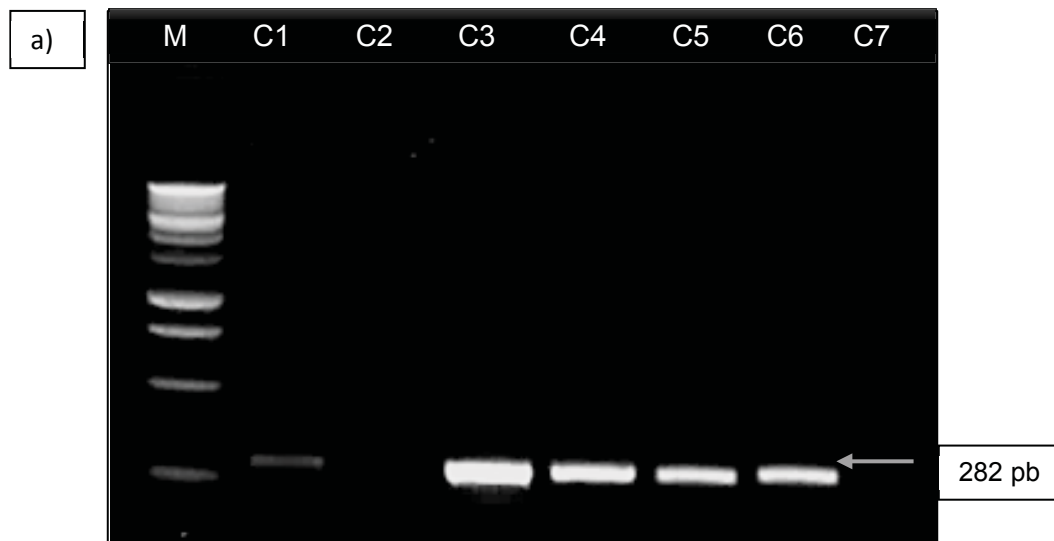


Figura 19. Resultado de la amplificación de *R solanacearum* a partir de ADN de aislados bacterianos proveniente de frutos de banano.

- a) Electroforesis en gel de agarosa 1,5%, teñido con SYBR Safe. **M**: Marcador de peso molecular 1kb (Promega). **C1-C5**: FP-17-0262, FP-17-0070, FP-17-0179, FP-17-0177, FP-17-0073 **C6**: Control positivo, **C7**: Control negativo.

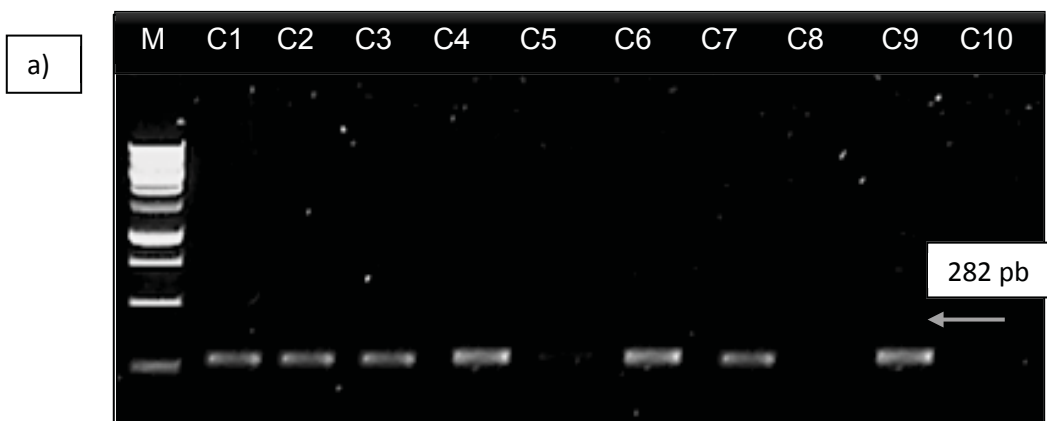


Figura 20. Resultado de la amplificación de *R solanacearum* a partir de ADN de aislados bacterianos proveniente de pseudotallos de plátano.

- a) Electroforesis en gel de agarosa 1,5%, teñido con SYBR Safe. **M**: Marcador de peso molecular 1kb (Promega). **C1-C8**: FP-16-0110, FP-17-0136, FP-16-0615, FP-16-1882, FP-17-0178, FP-15-1883, FP-17-0072, FP-17-0074. **C9**: Control positivo, **C10**: Control negativo.

La extracción de ADN por calentamiento fue aplicada como alternativa ante los métodos convencionales. La manipulación de calor con los cultivos bacterianos promueve lisis bacteriana, la centrifugación permitió realizar una precipitación en el contenido celular para conseguir ADN (Espinoza, 2006). Los valores de pureza fueron evaluados con la relación de absorbancias A_{260/280}, en su mayoría se obtuvo ADN con una pureza entre 1,8 y 2,0 (Tabla 6); la cual se considera valores de pureza óptima, además una pureza entre 1.6 y 1.8 son calificados como valores aceptables pero además hubo resultados de pureza menores a 1.6, lo que implica que existió una probable contaminación con proteínas o compuestos aromáticos (García & Pinto, 2014).

Este método podría reemplazar al uso de kits de extracción; sin embargo necesita de bastante precaución para evitar posibles contaminaciones, de esta manera se podría evitar la extracción de ADN inestable o que presente turbidez, lo que induce a una calidad baja de ADN.

4.5 Identificación de biovares de *R solanacearum*

La identificación de biovares de *R solanacearum* en cultivos de banano determinan las características fenotípicas de la infección en el hospedero. Este procedimiento es reproducible, accesible y fácil de realizar (Denny, 2006); siendo un método de detección que complementa con los ensayos fisiológicos, serológicos y moleculares.

Al séptimo día se evaluó la actividad metabólica de 22 muestras bacterianas confirmadas como *R solanacearum* en PCR a partir de la degradación de disacáridos y oxidación de polialcoholes (Tabla 2), en el cual se utilizó un medio de cultivo verde oliva que es un indicativo para determinar el metabolismo de los cultivos bacterianos (Figura 21).



Figura 21. Medio de cultivo verde oliva dividido en seis sustratos (disacáridos y polialcoholes) para la identificación de biovares.

Las primeras 72 horas de incubación se evidenció el cambio de viraje en el medio de cultivo, provocando un cambio de color de verde a amarillo con un pH ácido menor a 6. Este cambio de coloración de acuerdo con Naranjo & Martínez (2013) se debe a la oxidación de las fuentes de carbono. Los disacáridos fueron los primeros en modificar el viraje, los polialcoholes alteraron su viraje al quinto día y en una cepa no hubo alteración. La actividad metabólica se evalúa durante 7 días, que se considera un periodo de tiempo suficiente para mostrar los cambios en el medio de cultivo. Según Kinyua et al., (2006) se necesita de 28 días para evaluar el cambio de viraje en el medio de cultivo y el crecimiento de la colonia; sin embargo en este trabajo se demostró que entre el tercer y quinto día los primeros resultados de identificación de biovares.

La bacteria asimila de mejor manera a los disacáridos, adaptándose al medio con los nutrientes y proteínas como mejores fuentes de carbono. Según Zulperi et al., (2016) los biovares se encuentran relacionados con características metabólicas que definen los rasgos particulares de la sintomatología de la enfermedad del moko en Musaceas. A partir de este ensayo se determinó que tipo de biovares se encuentran presentes en Ecuador provocando la enfermedad del moko.

Se identificó los biovars 1, 2 y 3. El Biovar 1 no asimiló ningún sustrato, manteniendo el color verde del medio de cultivo base o con tonalidad azul (Figura 22).

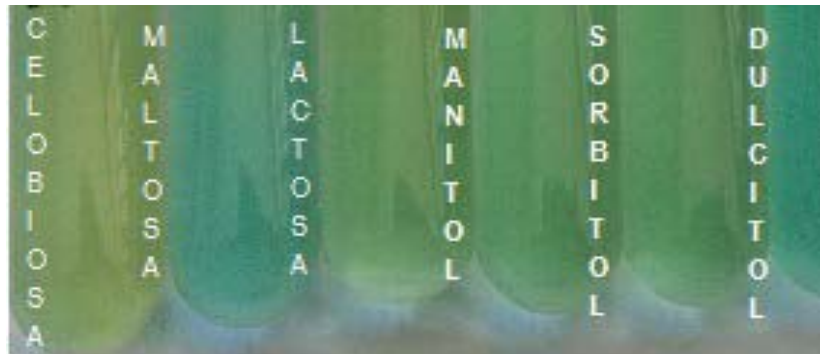


Figura 22. Cepa definida como biovar 1 de *R. solanacearum* aislada en pseudotallo de banano obtenido en la provincia del Guayas.

El biovar 3 metabolizó todos los sustratos, degradando disacáridos y oxidando polialcoholes (Figura 23).



Figura 23. Cepa definida como biovar 3 de *R. solanacearum* aislada en fruto de plátano de la provincia de Sucumbios.

Los biovars 1 y 3 demostraron las características fenotípicas de la enfermedad de moko. Según el hospedero (*Musa* spp.) pertenecen a la raza 1 y 2 y filotipo II que hace referencia al continente Americano. El biovar 3 obtenido como resultado corresponde a las provincias de Manabí, Napo y Sucumbios y el biovar 1 a la provincia del Guayas.

El biovar 2 (Figura 24) solo degradó los disacáridos y no consumió los polialcoholes. Este biovar fue encontrado en la provincia de Manabí; sin embargo se lo encuentra en su mayoría para la raza 3; siendo este un resultado posiblemente erróneo ya que Fegan (2007) indica que en su mayoría la caracterización de estas cepas son pertenecientes a solanáceas y posiblemente se haya originado una contaminación con otro microorganismo que alteró la actividad metabólica, pero en el ensayo PCR anteriormente realizado, se verificó como resultado positivo la presencia de *R solanacearum*; esto determinaría la probabilidad que el biovar 2 esté presente en la enfermedad del moko.



Figura 24. Cepa definida como biovar 2 de *R solanacearum* aislada en pseudotallo de banano de la provincia de Manabí.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Se aislaron 70 cepas de *R solanacearum* proveniente de distintas variedades de banano de diferentes provincias del país, en el que se evidenció una mayor colonización en pseudotallos empleando el medio de cultivo SMSA, que posee una disolución de antibióticos que inhibió el crecimiento de la mayoría de bacterias competidoras.

Se comprobó que el sistema de identificación microbiológica Biolog fue ineficiente para detectar *R solanacearum*, ya que el mecanismo de detección relacionó a otra especie, *R picketti*, debido a que posee una correlación filogenética y metabólica muy cercana con *R solanacearum*.

Los ensayos DAS-ELISA y PCR permitieron detectar *R solanacearum* de forma más eficiente que el ensayo Biolog, el ensayo serológico detectó esta bacteria utilizando medios de cultivo enriquecidos que aumentaron la concentración de los cultivos bacterianos, además mediante PCR se determinó la presencia *R solanacearum* utilizando los cebadores 759-F y 760-R, confirmando la presencia y propagación de esta bacteria en varias provincias del país.

Se identificó tres tipos de biovars mediante el análisis de la actividad metabólica a partir de los resultados obtenidos en PCR; los cuales se agruparon de acuerdo al origen geográfico, siendo la provincia de Manabí la que presentó la mayor cantidad de cepas definidas como biovar 3, seguido de la provincia de Sucumbíos y Napo, la provincia de Guayas presentó una cepa definida como biovar 1 y el biovar 2 fue obtenido en Manabí y Guayas.

El conjunto de pruebas moleculares y serológicas es de gran ayuda para confirmar microorganismos con alto nivel de agresividad, ya que mejorarán la

caracterización de poblaciones bacterianas y permitirán un mejor estudio sobre la bacteria.

5.2 Recomendaciones

La alternativa para aislar *R solanacearum* sin macerar el tejido vegetal en Buffer TE, podría ser mediante el exudado, ya que de esta manera se puede visualizar que la bacteria se encuentre presente.

El uso de BSA (Albúmina de suero bovino) permitirá que la extracción de ADN sea más eficiente y se pueda visualizar claramente el amplicón en muestras que posiblemente presentaron problemas y no se determinó resultados ciertos.

Se debe continuar realizando estudios sobre la dispersión de *R solanacearum* para emplear métodos de prevención y control que eviten grandes pérdidas en zonas donde se produce los cultivos de banano y plátano, considerando que esta bacteria se propaga rápidamente y permanece latente durante varios años en suelos y en tejidos vegetales.

REFERENCIAS

- Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro. (2013). *Ralstonia solanacearum* race 2 (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1996 (Vol. 2). Recuperado el 21 de marzo de 2017 de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2015/04/Manualdecentrosdeacopioybodegas1.pdf>
- Alvarado, A., Rueda, E., Ponce, J., Avendaño, L., Santillano, J., Borboa, J., ... Holguín, R. (2013). Detección de *Ralstonia solanacearum* en *Solanum tuberosum* L. en el Estado de Sonora, México. Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias de La Universidad Nacional de Ucuyo, 45(2), 29–45. Recuperado el 21 de marzo de 2017 de <http://www.scielo.org.ar/img/revistas/refca/v45n2/html/v45n2a03.htm>
- Arias, P., Dankers, C., Liu, P., & Pilkauskas, P. (2004). La economía mundial del banano 1985-2002. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación, 107. Recuperado el 10 de mayo de 2017 <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ball T, Vrydaghs L, Van Den Hauwe I, Manwaring J, D. L. E. (2006). *Differentiating banana phytoliths: wild and edible Musa acuminata and Musa balbisiana*. Journal of Archaeological Science, 33(9), 1228–1236. <https://doi.org/10.1016/J.JAS.2005.12.010>
- Biolog Inc. (2016). *GEN III MicroPlate*. Recuperado el 02 de octubre de 2017 de http://www.biolog.com/pdf/milit/00P_185rA_GEN_III_MicroPlate_IFU_Mar2008.pdf
- Cardozo, C., & Rodríguez, P. (2009). Caracterización molecular del complejo de especies *Ralstonia solanacearum* en la zona bananera de Urabá. Agronomía Colombiana, 27(2), 203–210. Recuperado el 13 de febrero de 2017 de <http://www.scielo.org.co/img/revistas/agc/v27n2/v27n2a08.pdf>
- Ceballos, G., Álvarez, E., & Bolaños, M. M. (2014). Reducción de poblaciones de *Ralstonia solanacearum* raza 2 (Smith) en plátano (Musa AAB Simmonds) con aplicación de ex-tractos de Trichoderma sp.

- (Alexopoulos y Mims) y bacterias antagonistas. *Acta Agronomica*, 63(1). <https://doi.org/10.15446/acag.v63n1.43121>
- Corporación Financiera Nacional. (2017). Ficha Sectorial: Banano y Plátanos. Recuperado el 11 de julio de 2017 <https://www.cfn.fin.ec/wp-content/uploads/2017/09/Ficha-Sectorial-Banano.pdf>
- Cultimed. (2010). Manual Básico de Microbiología.
- 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. New Disease Reports*, 30, 23. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2014.030.023>
- EPPO. (2016). Protocolo de Diagnóstico para regular enfermedades: *Ralstonia solanacearum*, 21(1), 173–178.
- Espinoza, M. A. (2006). Diseño e implementación de un método para la detección de *Ralstonia solanacearum* raza 3 biovar 2 en plantas usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)". Recuperado el 13 junio de 2017 de <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/443>
- Fegan, M. (2007). *Bacterial Wilt of Banana Diagnostics Manual*. In C. R. C. F. T. P. Protection (Ed.).
- García, A., & Pinto, R. (2014). "Cuantificación del ADN. Diferencias entre espectrofotometría UV y fluorimetría."
- García, R., García, A., & Delgado, L. (1999). Marchitez bacteriana del tomate causada por el biovar 2 a, de *Ralstonia solanacearum* en algunas localidades del estado Merida-Venezuela. *Revista Forestal Venezolana*, 43(2), 183–189. Recuperado el 13 de junio de 2017 de https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/33228632/articulo43_2_6.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1536079077&Signature=2GoxUR6zOLOdIAMGJ4FtJJOKSAs%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DMARCHITEZ_BACTERIANA_DEL_TOMATE_CAUSADA.pdf
- Gómez, E., Alvarez, E., & Llano, G. (2005). Identificación y caracterización de

- cepas de *Ralstonia solanacearum* raza 2, agente causante del Moko de plátano en Colombia. *Fitopatol. Colomb*, 28(2), 71–75. Recuperado el 13 de febrero de 2017 de http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/cepas_ralstonia_Moko_2.pdf
- Gómez Calvo, E. A. (2005). Identificación y caracterización del agente causal del Moko de plátano *Ralstonia solanacearum* raza 2 provenientes de plantaciones afectadas en Colombia. *Ciat*, 28(2), 71–75. Recuperado el 13 de febrero de 2017 de http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos_ciat/ipm/pdfs/tesis_eduardo_gomez.pdf
- González Torres, C., Casas, M., & Ortiz Díaz, J. (2013). Manejo de *Ralstonia Solanacearum* raza 2 a través de productos químicos y biológicos. *SciELO*, 2, 217–223. Recuperado el 23 de noviembre del 2017 de <http://revistas.ustabuca.edu.co/index.php/ITECKNE/article/view/399>
- Guarisch-Sousa, R., Puigvert, M., Coll, N. S., Siri, M. I., Pianzola, M. J., Valls, M., & Setubal, J. C. (2016). *Complete genome sequence of the potato pathogen Ralstonia solanacearum UY031*. *Standards in Genomic Sciences*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0131-4>
- Gutarra, L., Herrera, J., Fernandez, E., Kreuze, J., & Lindqvist-Kreuze, H. (2017). *Diversity, Pathogenicity, and Current Occurrence of Bacterial Wilt Bacterium Ralstonia solanacearum in Peru*. *Frontiers in Plant Science*, 8(July), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01221>
- Kinyua, Z. ., Miller, S. . A., Chin, A., & Subedi, N. (2014). *Bacterial Wilt Disease Standard Operating Procedure for Use in Diagnostic Laboratories Version : EA-SOP- RS1*. The International Plant Diagnostic network.
- Li, L. F., & Ge, X. J. (2017). *Origin and domestication of cultivated banana*. *Ecological Genetics and Genomics*, 2, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.egg.2016.10.001>
- Malaysian Society for Molecular Biology & Biotechnology., N., National Working Group on Biotechnology (Malaysia), F., Hollway, G., Wang, J., Li, T., Maghirang, R., ... Timmis, J. (1997). *Asia-Pacific journal of molecular biology and biotechnology*. (Vol. 5). Malaysian Society for Molecular

- Biology & Biotechnology [and] the National Working Group on Biotechnology. Recuperado el 15 de noviembre de 2017 de <https://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:57627#.WSxgjHmP7Ik.men> deley&title=A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying Burkholderia solanacearum (formerly Pseudomonas solanacearum) - UQ eSpace
- Manzano, A. (2013). *“Identificación de los causales de enfermedades bacterianas en banano (Musa AAA) en zonas productoras seleccionadas del Ecuador.”* Universidad de Guayaquil. Recuperado el 13 de febrero de 2017 de <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/3500>
- Meng, F. (2013). *Ralstonia Solanacearum Species Complex and Bacterial Wilt Disease*. Journal of Bacteriol Parasitol, 4(2), 1–4. <https://doi.org/10.4172/2155-9597.1000>
- Nadal-Medina R, Manzo-Sánchez, G , Orozco-Romero J, Orozco-Santos M, G.-G. S. (2009). Diversidad genética de bananos y plátanos (. Rev. Fitotec. Mex., 32(1), 1–7. Recuperado el 23 de junio de 2017 de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802009000100001
- Naranjo, E., & Martínez, Y. (2013). Avances en el diagnóstico de la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*): situación actual y perspectivas en Cuba. Revista de Protección Vegetal, 28(3), 160–170. Recuperado el 23 de junio de 2017 de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522013000300001&script=sci_arttext&lng=en
- Naranjo Feliciano, E., Yglesia Lozano, A., García, A., & Martínez Zubiaur, Y. (2015). Diversidad genética de aislados de *Ralstonia solanacearum* de Cuba, mediante amplificación de las regiones repetitivas del genoma (REP-PCR). (Spanish). *Genetic Diversity among Cuban Strains of Ralstonia Solanacearum Assessed by Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction (REP-PCR)*. (English), 30(1), 52–59. Recuperado el 11 de noviembre de 2017 de

<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=108912606&lang=es&site=ehost-live>

- Obrador-Sánchez, José Abraham Tzec-Simá, Miguel, Canto-Canché, B. (2017). *Techniques for isolation , identification and molecular characterization of Moko disease-related Ralstonia solanacearum strains*, 509–533. Recuperado el 23 de noviembre de 2017 de <http://rmf.smf.org.mx/Vol3532017/RMF1705-1.pdf>
- Obrador Sánchez, J. A. (2016). Variabilidad genética de la bacteria *Ralstonia solanacearum* de cepas aisladas de plátano en México. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Tesis doctoral. Recuperado el 12 de mayo de 2017 de https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/468/1/PC_B_BT_D_Tesis_2016_Obrador_Jose.pdf
- Obregón Mónica Barrios, Paola Andrea Rodriguez Gaviria, M. S. Y. (2011). Supervivencia de *Ralstonia solanacearum* en suelo y tejido de plantas de banano en urabá, colombia, *15*(2), 91–97. Recuperado el 13 de octubre del 2017 de <http://www.fitosanidad.cu/index.php/fitosanidad/article/view/23>
- Peeters, N., Guidot, A., Vailleau, F., & Valls, M. (2013). *Ralstonia solanacearum, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era*. *Molecular Plant Pathology*, *14*(7), 651–662. <https://doi.org/10.1111/mpp.12038>
- Perea, M. J., Saúl Raymundo, G., Raúl, A. M., Carrillo, A., Leon, J., Valdez, B., & Mell, F. (2011). Identificación de Razas y Biovares de *Ralstonia solanacearum* Aisladas de Plantas de Tomate. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *29*(2), 98–108. Recuperado el 13 de febrero de 2017 de <http://www.socmexfito.org/2013-06-19-02-41-01/002-vol-24/518-identificacion-de-razas-y-biovares-de-ralstonia-solanacearum-aisladas-de-plantas-de-tomate>
- Perrier, X., De Langhe, E., Donohue, M., Lentfer, C., Vrydaghs, L., Bakry, F., ... Denham, T. (2011). *Multidisciplinary perspectives on banana (Musa spp.) domestication*. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences, 108(28), 11311–11318.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1102001108>
- Priou, S., Gutarra, L., & Aley, P. (2006). *An improved enrichment broth for the sensitive detection of Ralstonia solanacearum (biovars 1 and 2A) in soil using DAS-ELISA*. *Plant Pathology*, 55(1), 36–45.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01293.x>
- PRO ECUADOR. (2016). *Banana 2016. Analisis Sectorial Banana*. Recuperado el 13 de febrero de 2017 de <https://www.proecuador.com.ec/>.
- Rajeshwari, N., Shylaja, M. D., Krishnappa, M., Shetty, H. S., Mortensen, C. N., & Mathur, S. B. (1998). *Development of ELISA for the detection of Ralstonia solanacearum in tomato: Its application in seed health testing*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(5), 697–704. <https://doi.org/10.1023/A:1008892400077>
- Rueda-Puente, E. O., Hernández-Montiel, L. G., Holguín-Peña, R. J., Ruiz Espinoza, F. H., López Elías, J., Huez Lopez, M. A., ... Ortega-García, J. (2014). *Ralstonia solanacearum: Una enfermedad bacteriana de importancia cuarentenaria en el cultivo de Solanum tuberosum L .*, 1(1), 24–36. Recuperado el 13 de febrero de 2017 de <http://www.agricultura.uson.mx/publicaciones/arbitradas/16-Rueda%20Puente%20y%20col%2020141.pdf>
- Safni, I., Cleenwerck, I., De Vos, P., Fegan, M., Sly, L., & Kappler, U. (2014). *Polyphasic taxonomic revision of the Ralstonia solanacearum species complex: Proposal to emend the descriptions of Ralstonia solanacearum and Ralstonia syzygii and reclassify current R. syzygii strains as Ralstonia syzygii subsp. syzygii subsp. nov., R. s.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(2014), 3087–3103. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.066712-0>
- Santiago, T. R. (2014). *A deep analysis of the genetic structure of Ralstonia solanacearum in Brazil reveals not much sex in the population!*
- SENASICA. (2016). *MOKO DEL PLÁTANO Ralstonia solanacearum raza 2* Smith Ficha Técnica No. 3. Recuperado el 18 de junio de 2017 de <https://www.gob.mx/senasica>

- Sikirou, R., Beed, F., Ezin, V., Hoteigni, J., & Miller, S. A. (2017). *Distribution, pathological and biochemical characterization of Ralstonia solanacearum in Benin*. *Annals of Agricultural Sciences*, 62(1), 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.aogas.2017.05.003>
- Simbaqueba, R., Serna, F., & Posada Flores, F. (2014). Curaduría, morfología e identificación de áfidos (hemiptera: aphididae) del museo entomológico unab. primera aproximación.*. *Boletín Científico Centro De Museos Museo De Historia Natural*, 18(1), 222–246. Recuperado el 23 de noviembre de 2017 de https://www.researchgate.net/profile/Francisco_Serna3/publication/288542900_Curatorship_morphology_and_identification_of_aphids_Hemiptera_Aphididae_deposited_in_the_UNAB_entomological_museum_first_approximation/links/569f062d08ae4af52544ae11.pdf
- Simmonds, N. W., & Shepherd, K. (1955). *The taxonomy and origins of the cultivated bananas*. *Journal of the Linnean Society of London, Botany*, 55(359), 302–312. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1955.tb00015.x>
- SIMMONDS, N. W., & WEATHERUP, S. T. C. (1990). *Numerical taxonomy of the wild bananas (Musa)*. *New Phytologist*, 115(3), 567–571. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00485.x>
- Sullivan, M., Daniells, E., Southwick, C., and Mackesy, D. 2013. *CPHTS Pest Datasheet for Ralstonia solanacearum race 3 biovar 2*. USDA-APHIS-PPQ-CPHST.
- Swanson, J. K., Yao, J., Tans-Kersten, J., & Allen, C. (2005). *Behavior of Ralstonia solanacearum Race 3 Biovar 2 During Latent and Active Infection of Geranium*. *Phytopathology*, 95(2), 136–143. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0136>
- Taghavi, M., Hayward, C., Sly, L. I., & Fegan, M. (1996). *Analysis of the phylogenetic relationships of strains of Burkholderia solanacearum, Pseudomonas syzygii, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences*. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, 46(1), 10–15.

<https://doi.org/10.1099/00207713-46-1-10>

- Tapiero, A., Morales., Rodríguez, S. (2007). Dispersión de *Ralstonia solanacearum* en suelos cultivados con plátano en el Piedemonte Llanero. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 8, 52–60. Recuperado el 13 de febrero de 2017 de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5624575>
- Ude, G., Pillay, M., Nwakanma, D., & Tenkouano, A. (2002). *Genetic Diversity in Musa acuminata Colla and Musa balbisiana Colla and some of their natural hybrids using AFLP Markers. Theoretical and Applied Genetics*, 104(8), 1246–1252. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0914-4>
- Umar Shahbaz, M., Mukhtar, T., Irfan UI-Haque, M., & Begum, N. (2015). *Biochemical and serological characterization of Ralstonia solanacearum associated with chilli seeds from Pakistan. International Journal of Agriculture and Biology*, 17(1), 31–40.
- Umesha, S., & Avinash, P. (2014). *Multiplex {PCR} for simultaneous identification of {Ralstonia} solanacearum and {Xanthomonas} perforans. 3 Biotech*, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0223-z>
- Verschuere Laurent, Fievez Veerle, Van Vooren Lieven, V. W. (1997). *The contribution of individual populations to the Biolog pattern of model microbial communities.*
- Vézina, A. (2017). *The banana plant.* Musapedia Recuperado el 13 de agosto de 2017 de <http://www.promusa.org/Musapedia>
- Yabuuchi, Eiko, Kosako, Yoshimasa, Yano, Ikuya, Hottas, Hisako, Nisciuchi, Y. (1995). *Transfer of Two Burkholderia and An Species to Ralstonia Proposal of Ralstonia pickettii (Ralston , Palleroni and Doudoroff 1973) Comb . Nov ., Ralstonia solanacearum*, 39(11), 897–904.
- Zulperi, D., Sijam, K., Ahmad, Z. A. M., Awang, Y., Ismail, S. I., Asib, N., & Hata, E. M. (2016). *Genetic diversity of Ralstonia solanacearum phyloptype II sequevar 4 strains associated with Moko disease of banana (Musa spp.) in Peninsular Malaysia. European Journal of Plant Pathology*, 144(2), 257–270. <https://doi.org/10.1007/s10658->

ANEXOS

Tabla 7.
Resultados Completos de DAS-ELISA

Nº Cepa	Cód. Laboratorio	Control Positivo	Control Negativo	Blanco	Aislado Bacteriano	Cálculo Cutoff	Resultado
1	FP-16-0429	1,207	0,098	0,080	0,215	0,178	Positivo
2	FP-16-0430	1,207	0,098	0,080	0,224	0,178	Positivo
3	FP-16-0431	1,207	0,098	0,080	0,103	0,178	Negativo
4	FP-16-0432	1,207	0,098	0,080	0,114	0,178	Negativo
5	FP-16-0433	1,207	0,098	0,080	0,111	0,178	Negativo
6	FP-16-0804	1,056	0,055	0,077	0,135	0,132	Positivo
7	FP-16-0805	1,056	0,055	0,077	0,091	0,132	Negativo
8	FP-16-0806	1,056	0,055	0,077	0,052	0,132	Negativo
9	FP-16-0807	1,056	0,055	0,077	0,084	0,132	Negativo
10	FP-16-0808	1,056	0,055	0,077	0,059	0,132	Negativo
11	FP-16-0809	1,129	0,062	0,071	0,129	0,133	Negativo
12	FP-16-0810	1,129	0,062	0,071	0,122	0,133	Negativo
13	FP-16-0811	1,129	0,062	0,071	0,056	0,133	Negativo
14	FP-16-0615	1,129	0,062	0,071	0,069	0,133	Negativo
15	FP-16-0616	1,129	0,062	0,071	0,062	0,133	Negativo
16	FP-16-1682	1,264	0,075	0,077	0,066	0,152	Negativo
17	FP-17-0136	1,264	0,075	0,077	0,159	0,152	Positivo
18	FP-17-0176	1,264	0,075	0,077	0,383	0,152	Positivo
19	FP-17-0179	1,264	0,075	0,077	0,238	0,152	Positivo
20	FP-17-0515	1,264	0,075	0,077	0,354	0,152	Positivo
21	FP-17-0507	0,811	0,077	0,077	0,125	0,154	Negativo
22	FP-17-0539	0,811	0,077	0,077	0,065	0,154	Negativo
23	FP-17-0551	0,811	0,077	0,077	0,092	0,154	Negativo
24	FP-17-0593	0,811	0,077	0,077	0,199	0,154	Positivo
25	FP-17-0606	0,811	0,077	0,077	0,362	0,154	Positivo
26	FP-17-0523	0,932	0,046	0,046	0,145	0,092	Positivo

27	FP-17-0593	0,932	0,046	0,046	0,055	0,092	Negativo
28	FP-17-0607	0,932	0,046	0,046	0,051	0,092	Negativo
29	FP-17-0515	0,932	0,046	0,046	0,177	0,092	Positivo
30	FP-17-1024	0,932	0,046	0,046	0,053	0,092	Negativo
31	FP-17-1051	0,992	0,051	0,050	0,057	0,101	Negativo
32	FP-17-1052	0,992	0,051	0,050	0,101	0,101	Positivo
33	FP-17-0136	0,992	0,051	0,050	0,051	0,101	Negativo
34	FP-17-0176	0,992	0,051	0,050	0,056	0,101	Negativo
35	FP-17-0179	0,992	0,051	0,050	0,059	0,101	Negativo
36	FP-17-0515	0,882	0,049	0,049	0,072	0,098	Negativo
37	FP-17-0507	0,882	0,049	0,049	0,055	0,098	Negativo
38	FP-17-0539	0,882	0,049	0,049	0,058	0,098	Negativo
39	FP-17-0551	0,882	0,049	0,049	0,062	0,098	Negativo
40	FP-17-0593	0,882	0,049	0,049	0,050	0,098	Negativo
41	FP-17-0606	1,462	0,056	0,047	0,280	0,103	Positivo
42	FP-17-0523	1,462	0,056	0,047	0,167	0,103	Positivo
43	FP-17-0593	1,462	0,056	0,047	0,153	0,103	Positivo
44	FP-17-0607	1,462	0,056	0,047	0,200	0,103	Positivo
45	FP-17-0515	1,462	0,056	0,047	0,198	0,103	Positivo
46	FP-17-0388	1,648	0,051	0,051	0,341	0,102	Positivo
47	FP-17-0593	1,648	0,051	0,051	0,184	0,102	Positivo
48	FP-17-0551	1,648	0,051	0,051	0,186	0,102	Positivo
49	FP-16-0618	1,648	0,051	0,051	0,203	0,102	Positivo
50	FP-16-0833	1,648	0,051	0,051	0,199	0,102	Positivo
51	FP-16-0834	1,509	0,027	0,049	0,381	0,076	Positivo
52	FP-16-0884	1,509	0,027	0,049	0,191	0,076	Positivo
53	FP-16-1106	1,509	0,027	0,049	0,225	0,076	Positivo
54	FP-16-1105	1,509	0,027	0,049	0,282	0,076	Positivo
55	FP-16-1355	1,509	0,027	0,049	0,153	0,076	Positivo

55	FP-16-1355	1,509	0,027	0,049	0,153	0,076	Positivo
57	FP-16-1362	1,651	0,054	0,047	0,140	0,101	Positivo
58	FP-16-1363	1,651	0,054	0,047	0,185	0,101	Positivo
59	FP-16-1364	1,651	0,054	0,047	0,126	0,101	Positivo
60	FP-16-1332	1,651	0,054	0,047	0,169	0,101	Positivo
61	FP-16-1424	0,877	0,046	0,052	0,160	0,098	Positivo
62	FP-16-1884	0,877	0,046	0,052	0,066	0,098	Negativo
63	FP-16-1883	0,877	0,046	0,052	0,169	0,098	Positivo
64	FP-16-1882	0,877	0,046	0,052	0,090	0,098	Negativo
65	FP-16-1885	0,877	0,046	0,052	0,063	0,098	Negativo
66	FP-16-1906	0,924	0,048	0,046	0,050	0,094	Negativo
67	FP-16-0618	0,924	0,048	0,046	0,110	0,094	Positivo
68	FP-16-0833	0,924	0,048	0,046	0,056	0,094	Negativo
69	FP-16-0834	0,924	0,048	0,046	0,051	0,094	Negativo
70	FP-16-0884	0,924	0,048	0,046	0,056	0,094	Negativo

GEN III MicroPlate

A1 Negative Control	A2 Dextrin	A3 D-Maltose	A4 D-Trehalose	A5 D-Cellobiose	A6 GenBioside	A7 Sucrose	A8 D-Turanose	A9 Stachyose	A10 Positive Control	A11 pH 6	A12 pH 3
B1 D-Raffinose	B2 α -D-Lactose	B3 D-Melibiose	B4 β -Methyl-D-Glucoside	B5 D-Salicin	B6 N-Acetyl-D-Glucosamine	B7 N-Acetyl- β -D-Mannosamine	B8 N-Acetyl-D-Galactosamine	B9 N-Acetyl Neuraminic Acid	B10 1% NaCl	B11 4% NaCl	B12 5% NaCl
C1 α -D-Glucose	C2 D-Mannose	C3 D-Fructose	C4 D-Galactose	C5 D-Methyl Glucose	C6 D-Fucose	C7 L-Fucose	C8 L-Rhamnose	C9 Inosine	C10 1% Sodium Lactate	C11 Fusidic Acid	C12 D-Serine
D1 D-Sorbitol	D2 D-Mannitol	D3 D-Arabinol	D4 myo-Inositol	D5 Glycerol	D6 D-Glucose-6-PD4	D7 D-Fructose-6-PD4	D8 D-Aspartic Acid	D9 D-Serine	D10 Troicandonylin	D11 Rifamycin SV	D12 Minocycline
E1 Gelatin	E2 Glycyl-L-Proline	E3 L-Alanine	E4 L-Arginine	E5 L-Aspartic Acid	E6 L-Glutamic Acid	E7 L-Histidine	E8 L-Pyrroglutamic Acid	E9 L-Serine	E10 Lincomycin	E11 Guantidine HCl	E12 Naproot 4
F1 Pectin	F2 D-Galacturonic Acid	F3 L-Galactonic Acid Lactone	F4 D-Gluconic Acid	F5 D-Glucuronic Acid	F6 Glucuronamide	F7 Mucic Acid	F8 Glucic Acid	F9 D-Saccharic Acid	F10 Vancomycin	F11 Tetrazolium Violet	F12 Tetrazolium Blue
G1 β -Hydroxy-Phenylacetic Acid	G2 Methyl Pyruvate	G3 D-Lactic Acid Methyl Ester	G4 L-Lactic Acid	G5 Citric Acid	G6 α -Keto-Glutaric Acid	G7 D-Malic Acid	G8 L-Malic Acid	G9 Bromo-Succinic Acid	G10 Nalidixic Acid	G11 Lithium Chloride	G12 Potassium Tetrate
H1 Tween 40	H2 γ -Amino-Butyric Acid	H3 α -Hydroxy-Butyric Acid	H4 β -Hydroxy-DL-Butyric Acid	H5 α -Keto-Butyric Acid	H6 Acetoacetic Acid	H7 Propionic Acid	H8 Acetic Acid	H9 Formic Acid	H10 Aztreonam	H11 Sodium Butyrate	H12 Sodium Bromate

Figura 24. Disposición de ensayos en la microplaca del Sistema Biolog.

Tomado de (Biolog Inc, 2016).

