



"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

Teapa, Tabasco a 22 de octubre del 2020
Oficio N°: ITSS-DIBQ-**305**/2020
Asunto: El que se indica.

C. LEIDY VERENICE CABALLERO GURRIA.

Pasante de la carrera de Ingeniería Bioquímica.
Presente.

Por este medio le informo que de acuerdo a la modalidad de Titulación que ha seleccionado: Titulación Integral por la opción I Tesis Profesional, y en virtud de que la comisión revisora integrada por: M.I.P.A. Juan Carlos Aguilar Arpaiz, M. en C. Leticia Almeida López, M. en C. José Alfredo Jiménez Juárez, determinan que se cumple satisfactoriamente con las observaciones que en proceso de revisión se hizo a su trabajo recepcional titulado: **"Evaluación de la eficacia de los microorganismos eficaces (ME) para el control de la bacteria (*Ralstonia solanacearum*) causante de la enfermedad del moko del plátano"**. Esta usted autorizado (a) para reproducirlo y concluir los requisitos formales que establece el Lineamiento de Titulación de esta Institución.

Sin otro asunto que tratar, me despido de Usted con un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®

Innovación Tecnológica y Superación por Siempre

Q.C.B. Jesús Armando Romero González

Jefe de División de Ingeniería Bioquímica



c.c.p. Archivo.

Carretera Teapa-Tacotalpa km. 4.5, Fco. Javier Mina, Teapa, Tabasco

Tel. (932) 32 4 06 50, Ext. 131 e-

mail: regionsierra@itss.edu.mx | academia_bioquimica@itss.edu.mx

www.tecnm.mx | www.itss.edu.mx





**TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO**



**INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR
DE LA REGIÓN SIERRA**



**TECNOLÓGICO NACIONAL DE MEXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE LA REGIÓN SIERRA**

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LOS MICROORGANISMOS
EFICACES (ME) PARA EL CONTROL DE LA BACTERIA *Ralstonia
solanacearum* CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DEL MOKO DEL
PLÁTANO**

Que para obtener el Título de Ingeniera Bioquímica:

Tesis Profesional (Opción I)

PRESENTA

LEIDY VERENICE CABALLERO GURRÍA

DIRECTORES DE TESIS

MIPA. JUAN CARLOS AGUILAR ARPAIZ

M. C. GERARDO RAMÍREZ SANDOVAL

TEAPA, TABASCO

OCTUBRE

AGRADECIMIENTO

Primeramente, doy gracias a Dios por permitirme realizar este trabajo y poder desarrollar los conocimientos adquiridos y por haber concluido mis estudios.

A mis maestros por haber portado todo su conocimiento y la formación educativa adecuada durante este período de estudio, su dedicación a la enseñanza y tiempo de prácticas.

A mi familia por el apoyo incondicional y por darme fuerzas necesarias para poder culminar mi estudio profesio

DEDICATORIA

A Dios por dame las fuerzas y paciencia necesarias para poder culminar un peldaño más en mi vida.

A mi madre por ser una mujer que me dio herramientas necesarias para impulsarme para salir adelante. También por el apoyo incondicional que ella me ha dado.

A mis maestro por impartirme sus conocimientos.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTO	i
DEDICATORIA	i
ÍNDICE	ii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN	3
III. ANTECEDENTES	5
3.1 Marchitez bacteriana por <i>Ralstonia solanacearum</i>	5
3.2 Distribución de <i>Ralstonia solanacearum</i> en América	5
3.2.1 Estudios de la caracterización de la <i>Ralstonia solanacearum</i> en Colombia....	5
3.2.2 Distribución de <i>Ralstonia solanacearum</i> en México	6
3.2.3 Distribución de <i>Ralstonia</i> en Tabasco.....	6
3.3 Síntomas.....	7
3.4 Generalidades de la bacteria <i>Ralstonia Solanacearum</i>	8
3.4.1 Características fenotípicas.....	8
3.4.2 Características fisiológicas.....	9
3.4.3 Características morfológicas	9
3.5 Clasificación	10
3.5.1 razas y Biovares	10
3.5.2 Características fenotípicas.....	10
3.5.3 Características fisiológicas.....	11
3.5.4 Características morfológicas	11
3.6 Clasificación	11
3.6.1 razas y Biovares	12
3.6.2 Biovares.....	13
3.6.3 Patogenicidad	13
3.7 Métodos de aislamiento, detención e identificación.	14
3.8 Método de dispersión y fuente de inóculo	14
3.9 Manejo de la enfermedad.....	15

3.10 Norma Oficial Mexicana NOM-068-FITO-2000	15
3.11 Microorganismo Eficaces (ME).....	17
3.12 Origen de los Microorganismos Eficaces (ME).....	18
3.12.1 Bacteria Fotosintética (<i>Rhodopseudomona spp</i>)	18
3.12.2 Bacteria ácido lácticas (<i>Lactobacillus spp</i>)	19
3.12.3 Levadura (<i>Saccharomyces spp</i>).....	19
3.12.4 Las especies principales que incluyen.....	19
3.13 Modo de acción de los microorganismos.....	20
3.14 Efectos de los Microorganismos eficaces sobre los cultivos	20
3.14.1 En los semilleros	21
3.14.2 En las plantas.....	21
3.14.3 En los suelos.....	21
3.15 Aplicación de los Microorganismos Eficaces.....	22
3.16 Uso de la tecnología ME.....	23
IV. OBJETIVOS	25
4.1 Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos específicos	25
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5.1 Obtención de muestras de tejido vegetal y suelo	26
5.2 Proceso de las muestras	27
5.2.1 Suelo.....	27
5.2.2 Tejido vegetal.....	28
5.3 Activación de Microorganismos eficaces	28
5.4 Preparación de diluciones de microorganismo eficaces	29
5.5 Preparación de Medio de cultivo	29
5.5.1 Preparación de papa dextrosa agar	29
5.5.2 Preparación de Cloruro de Tetrazolio (TTC) y agregado al medio de papa dextrosa agar.	30
5.5.3 Modificación del medio con ME.....	30
5.6 Siembra en medio de cultivo.....	30
5.7 Incubación de placas	31
5.8 Elaboración de las pruebas bioquímicas	31
5.8.1 Pruebas de Ryu	31

5.8.2 Producción de catalasa.....	32
5.9 Prueba preliminar del suelo	33
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
6.1 Aislamiento bacteriano del suelo y tejido enfermo.....	34
6.2 Confirmación de la bacteria	34
6.3 Resultados obtenidos del Medio modificado.....	34
6.4 Pruebas preliminares de control de <i>R. solanacearum</i>	35
VII. CONCLUSIÓN.....	36
VIII. RECOMENDACIÓN	37
IX. REFERENCIAS	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipo de manejo del Moko bacteriano en fincas plataneras con presencia de la enfermedad de Tabasco.	17
Tabla 2. Número de colonias de <i>R. solanacearum</i> de muestras concentradas y diluidas encontradas en medios de cultivos PDA modificado con las diferentes concentraciones de microorganismos eficaces.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Extracción de muestra del suelo infectado.....	26
Figura 2. Muestras en bolsa de polietileno y traslado en nevera de unicel.	26
Figura 5. Tubos de ensayos con muestras de suelo disueltas en agua destilada estéril. 27	
Figura 6. Microorganismos Eficaces en diferentes concentraciones.....	29
Figura 7. Siembra por el método de estría.....	31
Figura 8. Prueba positiva de Ryu de una muestra de suelo de Gram negativa.....	32
Figura 9. Prueba positiva de catalasa de una muestra de colonia de <i>R. solanacearum</i> . 32	

RESUMEN

El Moko bacteriano o marchitez bacteriana es causado por la bacteria *Ralstonia solanacearum* Smith (antes *Pseudomonas solanacearum*) y su nombre común se deriva de la variedad de plátano en que fue encontrado por primera vez por Edwin F. Existen tres razas de *Ralstonia solanacearum* de la cual la raza 2 es la que afecta a las diferentes variedades de plátano. Es una especie compleja con una alta variedad genética y patogénica, que puede presentar en diferentes cepas en una misma región o campo de cultivo lo que afecta tanto la expresión como el desarrollo de los síntomas. Determinar que cepas o Biovars de la bacteria están presentes podrían ayudar a plantear medidas más eficientes para un manejo integral la enfermedad.

Por lo tanto se realizó este proyecto con la finalidad de confirmar la presencia de la *Ralstonia Solanacearum* raza 2 y caracterizar las cepas de la bacteria presentes en los tejidos del plátano.

Se elaboró 18 aislamiento bacteriano de los diferentes de la Finca Santa Rita ubicado carretera Villahermosa-Teapa de los cuales utilizaron diferentes métodos de aplicaciones para combatir la marchitez bacteriana. Los aislamientos se caracterizaron mediante morfología de la colonia en medio de cultivo papa dextrosa conteniendo cloruro de tetrazolio.

Se hicieron pruebas bioquímicas de Ryu, catalasa, determinación de Biovar y patogenicidad de las plantas del plátano. Se encontraron tres diferentes tipos de colonia: fluidas (F), pequeña, fluida y redonda (PFR), y afluida (AF), de lo cual son comunes en la raza 2 reportadas por infección del Moko.

Las cepas F y la PFR se aislaron principalmente en órganos aéreos (pseudotallo, frutos e hijuelos), y la AF se obtuvieron de los órganos subterráneos (como y raíz). Las pruebas bioquímicas de Ryu y catalasa confirmaron que se trata de una bacteria Gram negativas por lo cual es patógena para el plantío del plátano. La determinación de Biovar demostró que se trata de una bacteria correspondiente al Biovar 1 de la raza 2 de la *Ralstonia Solanacearum*.

I. INTRODUCCIÓN

El Moko bacteriano es causado por la bacteria *Ralstonia solanacearum* Smith (antes *Pseudomonas solanacearum*) y su nombre común se deriva de la variedad de plátano en que fue encontrado por primera vez por Edwin F. Smith hizo la primera descripción de la enfermedad y del agente causal en 1896, pero fue Shomburgk en 1840 quien hizo los registros en banano (Thurston, 1984).

R. solanacearum es una bacteria patógena que causa marchitez severa en diferentes plantas (Smith et al., 1995). Es un organismo aeróbico obligado; el rango de temperaturas mínima, óptima y máxima para su supervivencia es de 10, 35 y 41 °C, respectivamente (Kelman, 1953). *R. solanacearum* es un bacillo gran negativo, de 0.5 a 1.5 µm de longitud, con un solo flagelo polar (Sneath et al., 1986). El medio Tetrazolio (TZC), descrito por Kelman y Person (1954) es el mejor para cultivar a *R. solanacearum*. En agar las colonias son inicialmente suaves, brillantes y opalescentes, pero llegan a ser oscuras con el tiempo.

La raza 2 se aisló inicialmente en América, principalmente en plantas del género *Heliconia*; algunas cepas originadas de *Heliconia* pueden atacar bananos (Ploetz, 1994) y plátanos, además de heliconias y otras musáceas (Stover, 1972; Gonzales, 1987). Cuatro cepas atacan plantas y frutos: D (Distorsión), B (Bananos), SFR (Pequeño fluido redondo) y H (Stover, 1972; Feakin, 1997; Gonzales, 1987).

En América, el Moko bacteriano fue descrito por primera vez en 1910 en Trinidad y acorde a Ploetz (1994) se encontraba desde el Amazonas de Brasil y Oriente de Perú, hasta Guatemala y sur de México. *R. solanacearum* está difundida en los trópicos, subtrópicos y áreas calurosas del mundo. Asia: India (Tamil Nadu, West Bengal), Indonesia, Malasia (Sabah), Filipinas, Tailandia, Vietnam; África: Etiopía, Libia, Nigeria, Senegal; Norte América: México, Estados Unidos (Florida); América Central: Belice (distribución restringida), Costa Rica, Cuba, El Salvador, Granada, Guadalupe, Guatemala, Honduras, Jamaica (distribución restringida), Nicaragua, Panamá, San Vicente, Trinidad y Tobago; Sur América: Brasil (Amapa, Amazonas, Bahía), Colombia, Guyana, Perú, Surinam, Venezuela (CAB International, 2011).

En México, Santos (1986) reportó a la enfermedad en la Depresión Central de Chiapas (Fucikovsky y Santos, 1991). En Tacotalpa, Tabasco (1991), apareció un brote de plantas enfermas con Moko bacteriano y a fines de 1994 y durante 1995 se encontraron nuevos brotes en fincas bananeras de los municipios de Teapa y Tacotalpa, Tabasco, y Pichucalco, Chiapas (Ramírez y Rodríguez, 1996).

Ralstonia solanacearum raza 2 causa diferentes síntomas en las plantas de banano y en plátano, acorde al sistema de infección. Esto incluye punto de entrada del patógeno a la planta y órgano afectado. En transmisiones por herramientas, la infección siempre converge en el corno ocasionando un amarillamiento foliar (Belalcázar, 1991).

Las plantas enfermas presentan un marchitamiento gradual en relación a la intensidad de la enfermedad. La marchitez es debida al taponamiento de haces vasculares del pseudotallo, producto del crecimiento bacteriano y acumulación de polisacáridos bacterianos. Sabadell (2003) menciona que el patógeno utiliza los vasos conductores como forma de multiplicación y dispersión. Los haces vasculares acaban bloqueándose dando lugar a los síntomas característicos de amarillamiento y marchitez, semejantes a los que la planta manifiesta cuando sufre sequía. Los síntomas del Moko bacteriano del plátano son visibles en todos los estados de crecimiento, principalmente en plantas jóvenes.

Stover (1972) establece cuatro patotipos para la Raza 2 cuya caracterización se basa en la morfología de la colonia, rango de plantas hospederas y patogenicidades, por lo que es necesario dar seguimiento al patógeno para determinar el posible impacto económico de cada uno de los patotipos. Hayward (2006) menciona que en algunos países de América Latina y el Caribe, esta plaga afecta a bananos de cocción del subgrupo “Bluggoe” (ABB) y bananos de postre pertenecientes al grupo Cavendish (AAA).

II. JUSTIFICACIÓN

Se propuso este proyecto debido a la presencia de la bacteria del Moko del plátano que afecta a gran parte de las plantaciones de banano de la Región Sierra de Tabasco, causando pérdidas económicas de consideración por las medidas de manejo que se tienen que aplicar para mantener bajo control a la enfermedad.

El estatus del Moko del plátano es considerado una plaga. Actualmente, la enfermedad se encuentra reportada en 26 municipios de los estados de Chiapas, Tabasco, Nayarit, Hidalgo y Veracruz (SENASICA, 2016).

Los aislamientos de *R. solanacearum* difieren en cuanto a su rango de hospederos, distribución geográfica, patogenicidad, relaciones epidemiológicas y propiedades fisiológicas. Debido a su alta heterogeneidad intraespecífica ha sido necesaria distinguir entre raza y biovares.

Las principales prácticas culturales de manejo de la enfermedad implican: desinfección de herramientas utilizadas en la plantación, control de malezas, rotación de cultivos, solarización y aireación del terreno en épocas secas; en plantaciones donde la enfermedad ya está establecida, las flores masculinas deben de ser continuamente removidas, posterior a la emisión de la última mano (Pradhanang et al., 2003).

Los resultados de esta investigación pretenden ayudar a mejorar el control del Moko y disminuir el impacto económico que tiene en la producción.

La mayoría de la información sobre la supervivencia de *R. solanacearum* en el suelo se deriva de la interpretación de su capacidad de infección luego de la siembra y resiembra de plantas indicadoras a diferentes intervalos de tiempo en áreas infestadas (Belalcázar, 1976; Granada, 1996; Rojas, 1992). También se ha evaluado, tomando como referencia la capacidad de infección al cabo de diferentes periodos de rotación (Jackson y González, 1981; Van Elsas *et al.*, 2000), la persistencia de la bacteria en residuos de cosecha (Graham, Jones y Lloyd, 1978) y en suelos infestados artificialmente (Mc Carter, 1976; Van Elsas *et al.*, 2000). De los resultados se ha deducido que la persistencia de la bacteria

en el suelo puede variar entre 6 y 48 meses, pero las diferencias dependen en gran medida de la metodología que se utilice en su determinación.

La longevidad del inóculo primario es importante para el éxito de la infección y depende de la habilidad que tiene el patógeno para escapar o resistir condiciones adversas del ambiente. La supervivencia varía con la clase de inóculo primario que el patógeno adopte y depende también de factores externos y de características intrínsecas del microorganismo (Shuster y Coiné, 1974). El principal medio para la diseminación de la bacteria es: semilla contaminada (cormos procedentes de fincas con focos de Moko), contacto entre raíces (Kelman y Sequeira, 1965), agua de escorrentía y de riego, insectos (abejas, avispas), maquinaria, herramientas contaminadas, partículas de tierra infestada y animales (Granada, 2002). Con el descubrimiento de mecanismos de señalización utilizados por algunas bacterias para censar la concentración de especímenes de la misma especie denominados '*quorum sensing*' (Williams, 2005), se ha sugerido que la activación de genes de virulencia procede en forma diferente según el nicho, dependiendo de la densidad de la población y de las posibles especies hospedero presente. Comportamientos como este explicarían también la razón de las diferencias en la determinación de la longevidad del inóculo.

Entre 2004 y 2005 se evaluó la presencia y persistencia de la bacteria *R. solanacearum* en el suelo y las aguas que conforman el flujo freático de cultivos de plátano. Durante el curso de la investigación se caracterizaron muestras de *R. solanacearum* por morfología y reacción a pruebas bioquímicas y moleculares (PCR) y se determinó el progreso de la incidencia del Moko a partir de un foco. Los resultados de la investigación permitieron determinar la eficacia de la rotación de cultivos como estrategia de manejo de la enfermedad en un área infestada.

No obstante la recomendación de la norma NOM-068, los productores de plátano en Tabasco realizan una serie de medidas de prevención y erradicación del Moko, aun cuando no está comprobado la eficacia de ellas en el control de la enfermedad. Además de que algunos de ellos son nocivos para el medio ambiente y para la salud de los trabajadores, por lo que se buscan métodos de control eficiente y menos agresivo, como pudieran ser los microorganismos eficaces.

III. ANTECEDENTES

3.1 Marchitez bacteriana por *Ralstonia solanacearum*

Los primeros registros de la enfermedad en banano fueron realizados por Shomburgk en 1840, la primera descripción de la enfermedad y agente causal fueron realizadas por Edwin F. Smith (Thurston, 1984). *R. solanacearum* raza 2 es una bacteria Gram negativa, en forma de bacilo, con dimensiones de 0.5-0.7 μm x 1.5-2.5 μm , móvil, con uno o cuatro flagelos polares cuando están presentes, sin embargo, la motilidad y posible presencia de flagelos de las cepas varía con el tipo de colonia y edad del cultivo (Agrios, 2006).

Exhibe enorme biodiversidad bioquímica y fisiológica, otras producen pigmentos fluorescentes, visibles solo bajo luz ultravioleta. Normalmente este patógeno afecta a través de las raíces sistemáticas a través del xilema y causa síntoma de marchitez que usualmente son letales (Deny, 2001).

3.2 Distribución de *Ralstonia solanacearum* en América

Se señala que la enfermedad es originaria del centro y Sudamérica, reporto primero en Honduras. En América se reporta que en 1940 el material vegetativo de propagación fue la principal vida de diseminación de la enfermedad en Venezuela y centro América. En Colombia se reportó por primera vez en 1945, así como en Perú, Hawái y a lo largo del río Amazonas. El Moko o marchitez bacteriana se había encontrado hasta 1960 en Venezuela, Panamá, Costa Rica y Honduras. Desde esa fecha el biotipo SFR, el cual es transmitido por insectos se había extendido a Guatemala, el salvador, Honduras, el Salvador, Nicaragua y México (Stover, 1972).

3.2.1 Estudios de la caracterización de la *Ralstonia solanacearum* en Colombia

En Colombia se encontró diferencias entre colonias típicas y colonias no típicas de la *Ralstonia solanacearum* en medios semi-selectivos sur África (SMSA-E) aislada de suelo y agua de área con Moko. Las características morfológicas de las colonias no típicas fueron muy variadas y consistieron principalmente de formas rizoides con bordes color

azul y centro rosado o redondas color anaranjado o morado intenso. Las colonias tipo fluido (F) presentaron formas irregulares, elevación, superficie opaca, aspecto mucoso, con bordes gruesos color crema, pigmentación central roja difusa y dimensiones de 4 x 5 mm, en promedio. Las colonias pequeñas, fluidas y redonda (SFR) exhibieron una forma ovalada más definida, con bordes más o menos enteros, definidos y mucho más delgado que el de las F. Presentaron elevación convexa, superficie lisa, baja fluidez, aspecto mucho menos mucoso que las F y con más amplia y definida coloración roja al centro con dimensiones de 4x5 mm, aproximadamente. Las colonias variantes afluidas (AFV) mostraron una marcada estructura redondeada, elevación convexa, bordes muy delgados, color crema casi imperceptibles, superficie brillante, coloración roja intensa y sus dimensiones fueron de 3 mm aproximadamente (Tapiero *et al.*, 2007).

3.2.2 Distribución de *Ralstonia solanacearum* en México

Fucikovsky, 1991 sugiere que la bacteria se introdujo inicialmente a México en 1960 procedente de Guatemala por medio de los vientos de la región del lago Izabal hacia la zona platanera de Tapachula, Chiapas. El movimiento de material de propagación infectado desde Chiapas a Tabasco, así como las lluvias y vientos fuertes huracanados de las zonas de Tapachula y Villa Flores, pudieron haber arrastrado la bacteria o los insectos de transmisores de las zonas montañosas de Chiapas y Tabasco. Actualmente la *Ralstonia* se localiza en las plantaciones de Chiapas y Tabasco.

3.2.3 Distribución de *Ralstonia* en Tabasco

Fucikovsky, 1991 reportó plantas de plátano afectadas por Moko bacteriano en fincas de la zona platanera de Tacotalpa, Tabasco. Ramírez y Rodríguez, 1997 señalaron que a finales de 1994 y durante 1995 se detectaron nuevos casos de Moko en fincas de la región de la sierra de Tabasco y norte de Chiapas. Desde su detección en 1991 en Tacotalpa, la enfermedad se diseminó hacia el municipio de Teapa.

El movimiento de trabajadores de campo de las empresas que poseen fincas plataneras en ambos municipios, aunado a la falta de aplicación de las medidas preventivas, propició una amplia diseminación de la enfermedad en la región de la sierra de Tabasco (Teapa y

Tacotalpa) y norte de Chiapas (Pichucalco). Los grandes crecientes de ríos de la región en la década de 1999 y 2009 pudieron contribuir a que la bacteria se diseminara en la zona por medios del agua que inundó las plantaciones río abajo, así como los restos de tejidos infectados arrastrados por la corriente y depositados en otra área. La junta local de sanidad vegetal de la sierra reportó que actualmente el 64 % de las fincas de la zona de la sierra de Tabasco presenta casos de Moko y en su conjunto la superficie es de 4,993.04 hectárea las que a su vez representa el 80 % de la zona (Rodríguez, 2001).

El Moko se detectó en fincas plataneras de los municipios de Huimanguillo, Cárdenas y Cunduacán, aunque en menor índice que en los municipios de Teapa y Tacotalpa, debido a la introducción más reciente de la enfermedad en esos municipios a través de materiales contaminados proveniente de Teapa (Ramírez *et al.*, 2006).

Un estudio sobre la incidencia de la enfermedad en fincas plataneras del municipio de Teapa, confirmó mediante la técnica serológica ELISA la presencia de por lo menos la cepa SFR de la raza 2 de *R. solanacearum* (Sánchez, 2000).

Gayosso (2001) encontró a *R. solanacearum* en plantas de *Heliconia wagneriana* obtenidas en diferentes localidades de Tabasco y norte de Chiapas, confirmando que esta planta ornamental es hospedera natural de la bacteria y representa una fuente potencial de infección para la planta de plátano cuando se cultiva asociadas a las heliconias.

3.3 Síntomas

En un estudio realizado sobre la incidencia y distribución del Moko en Tabasco, se describen los síntomas de la enfermedad que pueden aparecer en el hijuelo, plantas jóvenes en desarrollo, plantas a la floración o plantas con racimo, mostrando síndromes característicos en hojas, frutos, pseudotallo y cormos. En las plantas jóvenes se presenta una marchitez paulatina y posteriormente necrosis de las hojas que inicia generalmente por los bordes, ya sea en las hojas más jóvenes o en las más viejas de la planta. Los pseudotallos adquieren una característica coloración café rojiza de los vasos de conducto hasta llegar a la necrosis total de la vaina foliar de la hoja enferma. En plantas con racimos algunas muestran síntoma de follaje y el racimo, y otras solamente en el racimo.

Los racimos de la planta con marchitez foliar pueden mostrar pudrición total de los frutos recién formados, frutos amarillentos y verdes intercalados en todo el racimo o la maduración temprana del fruto, con rajaduras de la cascara y necrosis de la pulpa. Los síntomas en el racimo pueden limitarse al principio de la maduración de uno o varios frutos gradualmente todo el racimo. La pulpa de los frutos enfermos, presenta una pudrición que va de parda viscosa a gris seca con presencia de cavidades. Las plantas con racimos próximos a cosecha, generalmente no muestran síntomas externos en el follaje, aunque la pulpa presente pudrición (Ramírez *et al.*, 2006).

3.4 Generalidades de la bacteria *Ralstonia Solanacearum*

Ralstonia solanacearum E. F. Smith es el agente causal de la marchitez bacterianas que afecta varias especies alrededor de 50 familias de plantas, siendo responsable de fuertes pérdidas económicas en cultivos por todo el mundo (Ito *et al.*, 1988).

Las especies de este género son bacilos rectos curvos de 0.5-1.0x1.5-3.0 µm, móviles por medio de uno o varios flagelos polares, raramente inmóviles, aerobios estrictos, catalasa positivos y quimiorganotrofos; el género posee un gran número de especies, tanto saprofitas como patógenas de humanos, plantas y animales. La movilidad y posible flagelación de las cepas varía con el tipo de colonia o edad del cultivo (Agrios, 2006).

Exhiben una enorme diversidad bioquímica y fisiológica, otras producen pigmentos fluorescentes, visibles solo bajo luz ultravioleta. Normalmente este patógeno afecta a través de las raíces, se mueve sistemáticamente a través del xilema y causa síntomas de marchitez que usualmente son letales (Denny, 2001).

3.4.1 Características fenotípicas

Estudios que incluyen rango de hospederos del patógeno, morfología de la colonia, análisis bioquímicos, fisiología y su caracterización molecular sugieren que esta bacteria es una especie compleja, heterogénea y comprende de diversas poblaciones (Martins, 2001).

Otros estudios demuestran la heterogeneidad de este organismo a nivel sub-específico como la diferencia en la versatilidad nutricional entre los biovars 1,2,3 y 4, formando grupos distintos a través de taxonomía numérica (Engelbrecht, 1989).

3.4.2 Características fisiológicas

Entre las características fisiológicas y bioquímicas de *R. solanacearum* están: no tiene crecimiento a más de 40 °C, reduce nitrato (NO₃) y dependiendo del biovar, puede producir ácido a partir de disacáridos y oxida alcoholes hexosa (Goszczyńska *et al.*, 2000).

3.4.3 Características morfológicas

Pueden observarse dos clases de principales de morfología de las colonias, una es fluida (mucoide) debido a su abundante producción de polisacáridos extracelular, lisa, irregulares y redonda; mientras que la otra es una colonia mutante de aparecía seca, redonda, translúcida, rugosa y no fluida.

En un medio que contenga sales de Tetrazolio las colonias normales virulentas, son lisas, fluidas, irregulares, blancas o levemente rojas en el centro de la colonia y las mutantes avirulentas son completamente puestas. Las diferencias entre los tipos de colonias y niveles de virulentas están relacionadas con la presencia y cantidad de polisacáridos extracelulares que producen las bacterias (Kelman, 1965).

En medio líquido complejo, las cepas mucoides tienen mayor porcentaje de células móviles cuando los cultivos han crecido a una concentración de 1×10^8 ufc/ml; sin embargo, los cultivos en fase estacionaria tienen muy pocas células móviles. Las células son inicialmente inmóviles, pero comúnmente adquieren movilidad después de estar en un medio de cultivo fresco por un espacio de tiempo de entre de 4 a 6 horas (Denny, 2001).

3.5 Clasificación

Al principio fue caracterizada como una *Pseudomonas* no fluorescente pero luego fue asignada al género *Burkholderia* (He *et al.*, 1983).

Al evidenciar completamente que no está relacionado con *Pseudomonas fluorescense*, transfirieron siete especies de bacteria al grupo II de homología del ARNr, incluyendo *P. solanacearum*, mientras que las *Pseudomonas fluorescentes* están en el grupo I de homología del ARN. El género *Ralstonia* es una nueva denominación de lo que anteriormente se le llamo *Pseudomonas*, la especie siguiente *solanacearum* (Yabuuchi *et al.*, 1995).

3.5.1 Razas y Biovares

R. solanacearum es muy heterogénea y teniendo en cuenta su patogenicidad ha sido clasificada en razas, con base al rango de hospederos y los diferentes biovares que se han modificado con base en las características fisiológicas; la raza 1 corresponde a los biovares 1, 3 o 4, la raza 2 a los biovares 1 o 3, la raza 3 a los biovares 2 y la raza 4 al biovar 4. Entre cada una de estas razas y biovares hay numerosos subtipos que pueden ser asociados en la localización geográfica en particular (He *et al.*, 1983).

3.5.2 Características fenotípicas

Estudios que incluyen rango de hospederos del patógeno, morfología de la colonia, análisis bioquímicos, fisiología y su caracterización molecular sugieren que esta bacteria es una especie compleja, heterogénea y comprende de diversas poblaciones (Martins, 2001).

Otros estudios demuestran la heterogeneidad de este organismo a nivel sub-especifico como la diferencia en la versatilidad nutricional entre los biovares 1, 2, 3 y 4, formando grupos distintos a través de taxonomía numérica (Engelbrecht, 1989).

3.5.3 Características fisiológicas

Entre las características fisiológicas y bioquímicas de *R. solanacearum* están: no tiene crecimiento a más de 40 °C, reduce nitrato (NO₃) y dependiendo del biovar, puede producir ácido a partir de disacáridos y oxida alcoholes hexosa (Goszczyńska *et al.* 2000).

3.5.4 Características morfológicas

Pueden observarse dos clases de principales de morfología de las colonias, una es fluida (mucoide) debido a su abundante producción de polisacáridos extracelular, lisa, irregulares y redonda; mientras que la otra es una colonia mutante de aparecía seca, redonda, translúcida, rugosa y no fluida.

En un medio que contenga sales de Tetrazolio las colonias normales virulentas, son lisas, fluidas, irregulares, blancas o levemente rojas en el centro de la colonia y las mutantes avirulentas son completamente puestas. Las diferencias entre los tipos de colonias y niveles de virulentas están relacionadas con la presencia y cantidad de polisacáridos extracelulares que producen las bacterias (Kelman, 1965).

En medio líquido complejo, las cepas mucoides tienen mayor porcentaje de células móviles cuando los cultivos han crecido a una concentración de 1×10^8 ufc/ml; sin embargo, los cultivos en fase estacionaria tienen muy pocas células móviles. Las células son inicialmente inmóviles, pero comúnmente adquieren movilidad después de estar en un medio de cultivo fresco por un espacio de tiempo de entre de 4 a 6 horas (Denny, 2001).

3.6 Clasificación

Al principio fue caracterizada como una *Pseudomonas* no fluorescente pero luego fue asignada al género *Burkholderia* (He *et al.*, 1983)

Al evidenciar completamente que no está relacionado con *Pseudomonas fluorescens*, transfirieron siete especies de bacteria al grupo II de homología del ARNr, incluyendo *P.*

solanacearum, mientras que las *Pseudomonas fluorescentes* están en el grupo I de homología del ARN. El género *Ralstonia* es una nueva denominación de lo que anteriormente se le llamo *Pseudomonas*, la especie siguiente *solanacearum* (Yabuuchi *et al.*, 1995).

3.6.1 Razas y Biovares

R. solanacearum es muy heterogénea y teniendo en cuenta su patogenicidad ha sido clasificada en razas, con base al rango de hospederos y los diferentes biovares que se han modificado con base en las características fisiológicas; la raza 1 corresponde a los biovares 1, 3 o 4, la raza 2 a los biovares 1 o 3, la raza 3 a los biovares 2 y la raza 4 al biovar 4. Entre cada una de estas razas y biovares hay numerosos subtipos que pueden ser asociados en la localización geográfica en particular (He *et al.*, 1983).

Al principio se reconocieron tres Razas *R. solanacearum*. La raza 1 afecta un amplio rango de hospedero que incluye la papa, tomate, tabaco, plátanos diploides, cacahuates, jengibre, olivo y muchas semillas particularmente solanáceas. La raza 2 está limitada a musáceas causando marchitez en plátano (enfermedad del Moko) y heliconias. La raza 3 afecta papa y tomate particularmente en ambiente frío, pero no es alta mente virulenta en otros cultivos de solanáceas (Goszcynska *et al.*, 2000).

Las tres razas se pueden diferenciar por inoculación de hoja de tabaco. La raza 1 causa marchitez típica, la raza 2 induce reacción hipersensibilidad y la raza 3 causa clorosis en el área infiltrada (Lozano, 1970).

La raza 2 *R. solanacearum* que afecta a plátanos tiene, a su vez, cuatro cepas diferentes se distinguen por su virulencia, síntomas que causan y características de sus colonias en medio de cultivo: la cepa D (distorsión), la cepa B (banana), la cepa SFR (pequeña, fluida y redonda) y la cepa H (heliconias) (Stover, 1972).

La cepa **B** se caracteriza por ser altamente sistemática y es rápidamente transmitida en labores de cultivo y cosecha. La cepa **SFR** se transmite por insectos y puede moverse rápidamente de inflorescencia antes de llegar a ser completamente sistemática. La cepa

H se denomina así porque fue aislada de plantas del generó *Heliconia*. La cepa **D** es aquella que causa distorsión de las plantas afectadas; ambos tipos pueden ser diseminados por inundación y se considera que ambos son endémicos de heliconias silvestres (Aranda, 1999).

3.6.2 Biovares

Existen medios especializados por *R. solanacearum* dentro de biovares junto con un amplio rango de hospederos. Cada uno de los biovares de *R. solanacearum* pueden ser diferenciados basándose en su habilidad y en diferencia para producir acido a partir de tres disacáridos (maltosa, lactosa, celobiosa) y la oxidación de tres alcoholes hexosa (manitol, dulcitol y sorbitol) (Denny, 2001).

Con base en esta metodología Sánchez (2000) encontró que la bacteria aislada en plantas afectadas por Moko en Teapa, Tabasco, corresponde a la cepa SFR y al biovar 1, confirmado que se trata de la raza 2.

3.6.3 Patogenicidad

Se refiere a la potencialidad de una cepa para inducir enfermedad o respuesta de hipersensibilidad (RH), que son dos tipos de interacción específicas para patógenos de plantas (Gómez, 2005).

La determinación de la patogenicidad es un paso muy importante en la identificación de la bacteria fitopatógena. Las pruebas de patogenicidad no están estandarizadas y depende de la relación entre hospederos y patógeno (Goszczyńska *et al.*, 2005).

Debido a que existen dificultades para verificar todas las características de una bacteria y diferenciar entre especies, algunos grupos de bacterias fitopatógenas solo pueden ser diferenciados por su patogenicidad en plantas, ya que solo atacan determinadas especies de plantas. Esto se debe de que algunas *R. solanacearum* son muy restringidas a su rango hospederos, mientras que en otras más amplios (Gómez, 2005).

3.7 Métodos de aislamiento, detención e identificación

A pesar de la bacteria que se multiplica fácilmente en su hospedero, bajo condiciones invitro se multiplica más lentamente que otras bacterias patógenas y microorganismo saprofitos de plantas y suelo. El aislamiento de *R. solanacearum* a partir de muestra de plantas y suelos. El aislamiento de *R. solanacearum* a partir de muestras de plantas sintomáticas y frescas es usualmente fácil, debido a la alta densidad del patógenos en los tejidos.

El aislamiento del patógeno a partir de plantas asintomáticas es más difícil debido al bajo número de células viables presente en los tejidos, al igual que a partir de muestra de suelo por la presencia de otros organismos, muchos de los cuales pueden multiplicarse más rápidamente que *R. solanacearum* (Denny, 2001).

Estos medios varían en su complejidad y usualmente contienen antibióticos para la supresión de otros microorganismos; la preparación de algunas veces es complicada y son usados rutinariamente, como el caso de patógenos como *Erwinia spp.* Y *R. solanacearum* con los que se recomienda medios semiselectivos. Otros pequeños grupos de microorganismos utilizan fuentes de carbono complejas que usadas adecuadamente exhiben características de diagnóstico (Goszcynska *et al*, 2000).

3.8 Método de dispersión y fuente de inóculo

Las células bacterianas son capaces de sobrevivir por largos periodos de tiempo algunos tipos de suelo y bajo ciertas condiciones ambientales, la estrategia de manejo integra para marchitez bacteriana son dependiente de como el patógeno sobreviviente en el suelo (Ito *et al.*, 1998).

Algunas evidencias sugieren que la fase epifítica de la bacteria durante su ciclo de vida, puede contribuir a la supervivencia y proveer una fuente de inóculos para renovar las poblaciones del suelo. La persistencia de *R. solanacearum* en suelo puede ocurrir cuando la bacteria sobrevive en las plantaciones o permanece latente en los residuos de cosecha

infectado y/o en la rizófera de maleza hospederas, además este patógeno puede ser transportado en un amplio rango de material vegetativo de propagación (Hayward, 1991).

3.9 Manejo de la enfermedad

En ausencia de cultivos resistentes, el control de la enfermedad depende de la oportuna detección del patógeno en el suelo y en los materiales de propagación; además de sembrar material de propagación libre de *R. Solanacearum*. La detección es difícil debido a que forma parte de un amplio y complejo grupo de cepas que no ha sido universalmente detectada mediante una sola prueba.

Sin embargo, hoy en día se encuentran disponibles pruebas específicas para la detección e identificación de diferentes poblaciones de *R. solanacearum*. El entendimiento de la diversidad del patógeno en finca a nivel local es esencial para el futuro desarrollo y utilización de métodos de detección apropiados (Yu *et al.*, 2003).

3.10 Norma Oficial Mexicana NOM-068-FITO-2000

Si bien no existe un control químico eficaz contra la bacteria, la Norma Oficial Mexicana NOM-068-FITO-2000. Por la que se establecen las medidas fitosanitarias para combatir el Moko del plátano y prevenir su diseminación, propone una serie de medidas para reducir el impacto de la enfermedad en las plantaciones de plátano que a manera general y resumida son las siguientes:

- a) **Detección y muestreo.** En la zona bajo control fitosanitaria se debe realizar muestreos periódicos y personal oficial deberá verificar la presencia o ausencia del Moko. En zonas libres los muestreos deberán hacerse mensualmente durante un año y las muestras deberán enviarse a un laboratorio de prueba; en caso de los diagnósticos sean positivos, se notificara directamente a la dirección de sanidad vegetal quien será responsable de instruir al propietario de las medidas fitosanitarias a aplicar.

- b) **Eliminación de brotes.** Cuando se determine la presencia del Moko del plátano en una finca, se deberá eliminar la planta infectada y las circundantes en un radio de 10 metros. Las plantas se cortaran en trozos incluyendo rizomas y raíces, se aplicará bromuro de metilo en dosis de 80 gramos de ingrediente activo por metro cúbico u otro autorizan por la CICLOPLAFEST. Todas las herramientas usadas durante la eliminación deben desinfectarse con bactericida autorizado por la CICLOPLAFEST o formaldehidos al 10 %. En estos sitios no se deberán replantar hasta tres meses después del tratamiento.
- c) **Establecimiento de plantación.** Para replantar o establecer nuevas plantaciones se deberá usar plantas o rizomas (cormos) de plantaciones o viveros registrados que garanticen estar libre de plagas mediante un diagnostico fitosanitario negativo al Moko del plátano emitido por un laboratorio de prueba.
- d) **Labores culturales.** En las fincas de las zonas bajo control fitosanitario se deberá desinfectar todas las herramientas usadas de desoje, deshije eliminación de maleza, cosecha, adecuación de drenes, etc., utilizando un bactericida de amplio espectro o formaldehido al 10 %. Se deberá realizar el combate de insecto vectores tales como hormiga, moscas del vinagre, escarabajo y en general todos aquellos que puedan ser vectores de la enfermedad, para lo cual se usaran insecticida autorizados por la CICOPLASFEST. Se deberá eliminar la maleza que pueda servir de hospedero alterno a la bacteria, así como realizar la adecuación de drenes y cuidar la densidad de plantación para evitar condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad.
- e) **Cuarenta y movilización de fruta.** Se considera productos de cuarentena absoluta el follaje, suelo, rizomas e hijuelos de plátano y cualquier otro vegetal hospedero de la bacteria, provenientes de zonas de bajo control fitosanitario, por lo tanto queda prohibida su movilización a zonas libres de Moko. La fruta del plátano se considera de cuarentena parcial, y la que procede de zona bajo control fitosanitario deberá verificarse que no se movilice con follaje, y estar amparada por el certificado fitosanitario de Movilización Nacional.

No obstante, la recomendación de la Norma NOM-068, los productores de plátano de Tabasco realizan una serie de medidas de prevención y erradicación del Moko desde muy elementales hasta muy completas (Tabla 1), aun cuando no está comprobada la eficacia de ellas en el control de la enfermedad (Ramírez *et al.*, 2006).

Tabla 1. Tipo de manejo del Moko bacteriano en fincas plataneras con presencia de la enfermedad de Tabasco.

Prevención	Erradicación
No hay desinfección de la herramienta	Se corta y secciona la planta enferma; se aplica cal sobre los residuos y al suelo
Desinfección de herramienta con los bactericidas Bela plus o Mokodine	Se saca la planta desde el cormo, se secciona en trozos pequeños y se aplica Bela plus Mokodine sobre ello
Desinfección de herramientas con formol y rodamina (colorante)	Inyección de la planta enferma con el herbicida glifosato, posteriormente se aplica algún herbicida como Bela plus Mokodine o Bacterstop sobre el residuo
Desinfección de herramientas con formol y rodamina (colorante)	Se saca la planta desde el cormo, tanto la enferma como tres o cuatro que la rodea, se seccionan y se aplica bromuro de metilo o Busan a los residuos y al suelo, luego se cubren con plástico dejando la cubierta al menos dos semanas

Fuente: Ramírez *et al.*, 2006.

3.11 Microorganismo Eficaces (ME)

ME es una abreviatura para microorganismos eficaces (del inglés EM “efficient microorganism”). ME es un líquido que está hecho de una combinación de varios microorganismos benéficos de origen natural a base de bacterias fototróficas, lactobacilos, distintos tipos de levaduras y hongos de fermentación sin manipulación genética, cuando ME entra en contacto con materia orgánica, minerales quelados y

antioxidantes. Casi todos los químicos provocan un alto grado de oxidación y contaminación cualquier ambiente, solo la producción de antioxidantes fraccionada los productos químicos y así provoca una transformación natural y no causa la producción de sustancias patógenas.

Los ME funcionan con una medida de control biológico de patógeno que es dada con la introducción de estos microorganismos benéficos al ambiente de la planta. Los parásitos y patógenos son destruidos o controlados con procesos naturales, como la competitividad y antagonismo (Suqilanda, 1995 citado por Cayón, 2008).

3.12 Origen de los Microorganismos Eficaces (ME)

La tecnología ME fue desarrollada en la década de los ochenta por el Doctor Teruo Higa, profesor de horticultura de la universidad de Ryukyus en Japón. Estudiando las funciones individuales de diferentes microorganismos, encontró que el éxito de su efecto potencializador estaba en su mezcla. Desde entonces, esta tecnología ha sido investigada, desarrollada y aplicada a una multitud de usos agropecuarios y ambientales, siendo utilizada en más de 80 países del mundo.

Los ME son una combinación de microorganismo benéficos de origen natural, que se han utilizado tradicionalmente en la alimentación, o se encuentra en los mismos.

Hay tres tipos de vida microbiana que se une para formar la mezcla. No es una determinada cepa de microbios las que contienen la clave, sino más bien la combinación de diferentes grupos lo que da el efecto positivo que estamos buscando. Estos grupos son:

3.12.1 Bacteria Fotosintética (*Rhodopseudomonas spp*)

Son bacterias autótrofas que sintetizan sustancias útiles a partir de la secreción de raíces, materia orgánica y gases dañinos, usando la luz solar y el calor del suelo como fuente de energía. Las sustancias sintetizadas comprenden aminoácidos, ácidos nucleicos, sustancias bioactivas y azúcares, promoviendo el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Los metabolitos son absorbidos directamente por ellas, y actúan como sustratos para incrementar la población de otros microorganismos eficaces.

3.12.2 Bacteria ácido lácticas (*Lactobacillus spp*)

Estas bacterias producen ácido láctico a partir de los azúcares y otros carbohidratos sintetizados por bacterias fototróficas y levaduras. El ácido láctico es un fuerte esterilizador, suprime microorganismos patógenos e incrementa la rápida descomposición de la materia orgánica. Las bacterias ácido lácticas aumentan la fragmentación de los componentes de la materia orgánica, como la lignina y la celulosa, transformando esos materiales sin causar influencia negativa en el proceso.

3.12.3 Levadura (*Saccharomyces spp*)

Sintetizan sustancias antimicrobianas y otras útiles para el crecimiento de las plantas a partir de los aminoácidos y azúcares secretados por las bacterias fotosintéticas, la materia orgánica y las raíces de las plantas. Con respecto a la biofermentos, éstos presencian condiciones microbianas particulares. Las fermentaciones lácticas son el resultado de la transformación de azúcares (glucosa y lactosa) en ácido láctico, gracias a la acción de diversas bacterias. El azúcar principal en la leche es la lactosa, un disacárido compuesto por una molécula de glucosa y una de galactosa. Las bacterias lácticas tienen en ellas su principal sustrato energético y como resultado de su metabolismo se produce ácido láctico. Los biofermentos presentan un número elevado de microorganismos importantes para el control de las plagas y enfermedades. *Lactobacillus spp.* Tiene relaciones antagónicas con el tipo de bacterias putrefactorias (FUNDASES, 2007).

3.12.4 Las especies principales que incluyen

- **Bacteria ácido láctico:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus lactis*
- **Bacterias Fotosintéticas:** *Rhodospseudomonas plastrus*, *Rhodobacter sphaeroides*.
- **Levaduras:** *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Actinomyces*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseus*.
- **Hongos de fermentación:** *Aspergillus oryzae*, *Mucor hiemalis*.

Estos microorganismos son efectivos cuando entran en contacto con materia orgánica secretan sustancias beneficiosas como vitaminas, ácidos orgánicos, minerales quelatados y fundamentos substanciales antioxidantes (González, 1995 citado por Eguez, 2000).

Los ME vienen únicamente en forma líquida y contienen microorganismo útiles y seguros. No es un fertilizante, ni un químico, no es sintético y no ha modificado genéticamente. Este se utiliza junto con la materia orgánica para enriquecer los suelos y para mejora de la flora y la labranza. Dichos microorganismos se encuentran en estado latente y por lo tanto se utilizan para hacer otros productos secundarios de microorganismo eficientes (Higa, 1993 citado por Vázquez, 2004).

3.13 Modo de acción de los microorganismos

Los microorganismos eficaces actúan de manera que toman sustancias generadas por otros organismos basando en ello su funcionamiento y desarrollo. Las raíces de las plantas secretan sustancias que son utilizadas por los microorganismos eficaces para crecer, sintetizado aminoácidos, nucleicos, vitaminas, hormonas, y otras sustancias bioactivas. Cuando los microorganismos eficaces incrementan su población, como una comunicación en el medio en que se encuentra, se incrementa su población, como una comunidad en el medio en que se encuentran, se incrementa la actividad de los microorganismos naturales, enriqueciendo la microflora, balanceando los ecosistemas microbiales, suprimiendo microorganismos patógenos (Sort, 2002 citado por Brock, 2004).

3.14 Efectos de los Microorganismos eficaces sobre los cultivos

El principio de acción de los ME no radica en el ataque de otros microorganismos, sino en la competencia con ellos. Debido a la capacidad de colonización de los ME, es posible reducir las plagas o enfermedades por un proceso conocido “exclusión competitiva” (APNAN, 1996).

Los microorganismos eficaces, como inoculante microbiano, restablece el equilibrio microbiológico del suelo, mejorando sus condiciones físico-químicas, incrementando la

producción de los cultivos y su protección; además conserva los recursos naturales, generando una agricultura sostenible.

Entre los efectos sobre el desarrollo de los cultivos se pueden encontrar:

3.14.1 En los semilleros

- Aumento de la velocidad y porcentaje de germinación de las semillas, por su efecto hormonal, similar al ácido giberelico.
- Aumento del vigor y crecimiento del tallo y raíces, desde la germinación hasta la emergencia de las plántulas, por su efecto como rizo bacterias promotoras del crecimiento vegetal.
- Incremento de las probabilidades de supervivencias de las plántulas.

3.14.2 En las plantas

- Genera un mecanismo de supresión de insectos y enfermedades en las plantas, ya que pueden inducir la resistencia sistémica de los cultivos a enfermedades.
- Consume los exudados de raíces, hojas, flores y frutos, evitando la propagación de organismo patógenos y desarrollo de enfermedades.
- Incrementa la calidad y productividad de cultivos.
- Promueve la floración, fructificación y maduración por sus efectos hormonales en zonas meristemáticas.
- Incrementa la capacidad de fotosintética por medio de un mayor desarrollo foliar.

3.14.3 En los suelos

Los efectos de los microorganismos eficaces en el suelo, están enmarcados en el mejoramiento de las características físicas, biológicas y supresión de enfermedades. Entre sus efectos se pueden mencionar:

a) Efectos en las condiciones físicas del suelo

Mejora la estructura y agregación de las partículas del suelo, reduce su compactación, incrementa los espacios porosos y mejora la filtración del agua. De esta manera se disminuye la frecuencia de riesgo, tornando los suelos capaces de absorber 24 veces más las aguas de lluvia, evitando la erosión, por el arrastre de las partículas.

b) Efectos en la microbiología en el suelo

Suprime o controla las poblaciones de microorganismo patógenos que se desarrollan en el suelo por competencia. Incrementa la biodiversidad microbiana, generando las condiciones necesarias para que los microorganismos benéficos nativos prosperen (Sort, 2002 citado por Brock 2004).

3.15 Aplicación de los Microorganismos Eficaces

El deterioro y la degeneración son debido al proceso de oxidación. La oxidación es causante de crisis y colapso. El oxígeno activado, no el que inhalan nuestros pulmones, así como el cloro (Cl), el óxido de nitrógeno, y el sulfato posee una gran acción antioxidante. También los fertilizantes químicos de síntesis artificiales y plaguicidas y herbicidas agrícolas son agentes antioxidantes de un extremo poder (APNAN, 1995).

Los ME tienen la peculiaridad de erradicar, borrar, la información contenida en multitud de sustancias. Esto se ha comprobado en los ecosistemas forestales y agrícolas, donde la presencia de niveles lo suficiente altos de ME regeneran y purifican la aplicación.

La raíz de las plantas que se desarrollan en suelos tratados con ME son más resistentes y elásticas, a la vez, ni se pudren ni se mueren con facilidad. La obtención de raíces fuertes y resistentes aumenta la eficacia de las plantas a la hora de absorción de los nutrientes. Los microorganismos eficaces amortiguan la oxidación al tiempo que alimentan a las plantas con sus secreciones. Mejoran la capacidad de retención hídrica del substrato, que conlleva a una disminución de la concentración de oxígeno en el mismo, ya que la

cantidad de aire y agua en el suelo son inversamente proporcionales. Esto conlleva a una mejora en el crecimiento y desarrollo natural de las plantas, aumentando así de forma positiva las producciones (FUNDASES, 2007).

Los suelos tratados con ME se vuelven equilibrados, es decir, aquellos suelos arcillosos se tornan más mullidos y ligeros, aquellos demasiados aireados más compactos y con mayor capacidad de retener agua, tanto los suelos ácidos como alcalinos se convierte en neutros, contrarrestando así su excesiva polaridad. Es más, en suelo pantanoso llega a mejorar el drenaje, e incluso aunque este continúe anegado, en cuyo caso asegura en mínimo de aireación para prevenir daños en cosechas. Los procesos de antioxidación de 20 encadenados por los ME son debidos principalmente a dos elementos, como son las propias sustancias que segregan los microorganismos, y la emisión de ondas generadas por estos mismos, como las bacterias fotosintéticas (que producen sustancias como vitaminas C y E).

Otra clara cualidad de los ME es la de actuar como potente desodorante en procesos de descomposición, erradica totalmente los malos olores, debido en gran parte a los atinomyces que son los responsables de olores a recientes llovido de la tierra. Esta cualidad se utiliza en depuración de aguas residuales, pudiendo estas volver a ser reutilizadas en diversos ciclos, desodorantes y limpiezas de fosas sépticas y en ganadería, lo que reduce la contaminación de las aguas subterráneas, y como además de eliminar el mal olor acelera la descomposición se muestra como un gran aliado en el proceso de compostaje de la materia orgánica para uso agrícola reduciendo el tiempo de maduración y nos quita de tener que voltear la pila de compost, pues los ME actúan también en situaciones anaeróbicas (Rolli, 2013).

3.16 Uso de la tecnología ME

Los microorganismos eficaces protegen a las plantas del ataque de patógenos por competición por nutriente, antagonismo y parasitismo, por otro lado la planta estimula el sistema de asociación interdependiente lixiviando azúcares, aminoácidos y sales minerales necesarios al crecimiento de los microorganismos en simbiosis en detrimento o en deterioro de los patógenos (Tokeshi, 2001).

Algunas de las sustancias secundarias producidas por los ME son el inositol, ubiquinonas, saponinas, polisacáridos de bajo peso molecular, polifenoles y quelatos. Estas sustancias pueden inhibir patógenos y promover el crecimiento de especies benéficas (Higa, 1994 citado por Cayón 2008).

El uso de los microorganismos eficaces se fundamenta en utilizar microorganismos antagonicos que sean capaces de reproducirse colonizar un ambiente dado y al cambiar las condiciones inhiba la población de otro organismo (Higa, 1993 citado por Vázquez 2004).

El efecto de los ME sobre la supresión de algunos hongo patogénicos fueron investigados obteniendo buenos resultados (Castro *et al.* 1993, citado por Vázquez 2004).

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Contribuir al combate de la enfermedad Moko al plátano mediante el uso de tecnologías inocuas y amigables con el medio ambiente.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la eficacia *in vitro* de los microorganismos eficaces en el control de la bacteria *Ralstonia solanacearum*
- Evaluar la eficacia del control de *Ralstonia solanacearum* mediante la aplicación de microorganismos eficaces al suelo.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención de muestras de tejido vegetal y suelo

Se eligió la Finca Bananera Santa Rita localizada entre la Ranchería Galeana y las Liliás del municipio de Teapa, Tabasco. Se procedió de la siguiente manera para la obtención de las muestras:

1. Se identificaron las plantas de banano que presentaban síntomas característicos de la enfermedad Moko.
2. Se cortaron trozos de diferentes tamaños de peciolo de hoja, pseudotallo, cormo y raíces para luego obtener el tejido vegetal.
3. Se tomó 1 kg de muestras del suelo circundante a la base de las plantas (Figura 1).
4. Se introdujeron en bolsas de polietileno, se etiquetaron, se colocaron en una hielera de unicel y se trasladaron al Laboratorio del Suelo de la carrera de Ingeniería en Agronomía del ITSS, ubicado en el km. 4.5 carretera Teapa-Tacotalpa (Figura 2).



Figura 1. Extracción de muestra del suelo infectado.



Figura 2. Muestras en bolsa de polietileno y traslado en nevera de unicel.

5.2 Proceso de las muestras

5.2.1 Suelo

1. Se pesó un gramo de cada una de las tres muestras de suelo en una balanza granataria marca Vibra modelo AJH-220E.
2. Se introdujo en un tubo de ensayo de 9 ml que contenía agua destilada estéril, a esta dilución se le consideró como “solución madre” y se realizó 3 diluciones, en el cual se pipeteo un mililitro de la solución madre.
3. se agregó a un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua destilada estéril agitándolo para homogenizar la muestra y conformar una dilución de 10^{-1} . De esta concentración a su vez, se tomó un mililitro. se agregó a un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril agitando para homogenizar y obtener una dilución de la muestra 10^{-2} , por último, se tomó un mililitro de la segunda dilución y se agregó a un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril agitando para homogenizar y obtener una dilución de la muestra 10^{-3} (Figura 3).

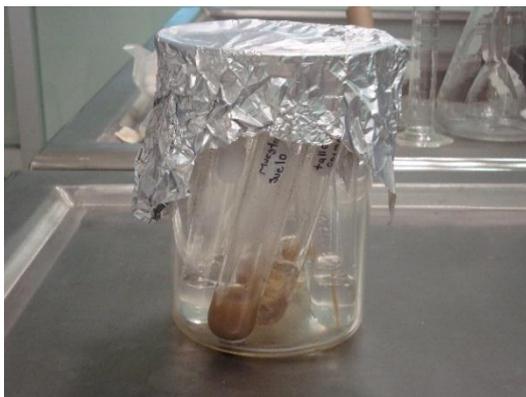


Figura 3. Tubos de ensayos con muestras de suelo disueltas en agua destilada estéril.

5.2.2 Tejido vegetal

1. Se cortó el tejido vegetal de las muestras de hoja, pseudotallo, cormo y raíces una sección de un centímetro cúbico.
2. desinfectaron en un vaso de precipitado con hipoclorito de sodio al 3 % por 10 minutos.
3. Se lavaron en agua destilada estéril y luego se colocaron en tubos de ensayo con agua destilada estéril.
4. Se agitó cada tubo con la muestra por un minuto y luego se dejó reposar por 10 minutos para que las bacterias salieran del tejido; esta dilución se consideró como solución madre y de ella se tomaron las muestras que se sembraron en medio de cultivo.

5.3 Activación de Microorganismos eficaces

1. Para activar los microorganismos primero se procedió a calentar en un recipiente de aluminio 1 litro de melaza hasta llegar a la temperatura de 70 °C, se dejó enfriar hasta que se obtuvo la temperatura de 30 °C.
2. se agregó un litro de Microorganismos Eficaces (ME), mezclándolos en el recipiente de aluminio para luego colocar la mezcla en un tanque de plástico de 200 L.
3. Y finalmente, a los 2 litros de mezcla se le agregó 18 litros de agua no clorada; se midió el pH de la mezcla, luego se procedió a cerrar el recipiente de forma herméticamente, durante tres días a cuatro días se midió el pH de la mezcla de los microorganismos con la melaza hasta alcanzar un pH de menos de 4.0 de acidez para tener 100 % de la activación.

5.4 Preparación de diluciones de microorganismo eficaces

Para hacer las disoluciones de 40 %, 60 %, 80 % y 100 %:

1. Se tomaron 240 ml de los Microorganismos Eficaces de los que se activaron. Se disolvieron en agua destilada (Figura 4).



Figura 4. Microorganismos eficaces en diferentes concentraciones.

5.5 Preparación de Medio de cultivo

3.5.1 Preparación de papa dextrosa agar

1. Se pesó 39 mg de agar papa dextrosa que se disolvió con 1 L de agua destilada en un matraz Erlenmeyer.
2. Se procedió a calentarlo en un termo agitador hasta llegar al punto de ebullición.
3. Se esterilizo en la autoclave a $121 \pm$ por 15 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

5.5.2 Preparación de Cloruro de Tetrazolio (TTC) y agregado al medio de papa dextrosa agar

1. Se pesó 1 gramo de cloruro de tetrazolio (Sigma) para 100 ml de agua destilada. Se colocaron 50 ml de agua destilada estéril en un matraz de 100 ml.
2. Se agregó el gramo de cloruro de tetrazolio y luego se aforó con agua destilada. Se agitó suavemente para homogenizar la mezcla

5.5.3 Modificación del medio con ME

1. Se colocó 40 ml de los Microorganismos Eficaces obtenido el medio de cultivo del matraz Erlenmeyer de 250 ml y se agitó para poder mezclarlo.
2. Se colocó de 15 a 20 ml en las 18 cajas Petri para los diferentes cultivos.
3. Se dejó durante tres días solidificar a los medios de cultivo para proceder con los siguientes pasos.

5.6 Siembra en medio de cultivo

1. Se tomó con un aza bacteriológico estéril una muestra de la solución madre para sembrar y se utilizó el método de Siembra agar papa destroza por el método de estría
2. Por agotamiento con medio de Tetrazolio modificado con los ME (Figura 5).
3. Se repitió este procedimiento para las soluciones madre de suelo y de tejido y para las diluciones correspondientes; tanto para suelo como para tejido.
4. Se sembró tres placas por concentración de ME, y como testigo se aplicó mediante estriada agua destilada estéril en medio de papa dextrosa Agar sin ME.



Figura 5. Siembra por el método de estría.

5.7 Incubación de placas

1. Se colocaron en una incubadora por 36 horas a 24-25 °C al proceder con las cajas Petri.
2. revisaron para observar el crecimiento de las bacterias y cuantificar las colonias bacterianas presentes.

5.7 Elaboración de las pruebas bioquímicas

1. Se realizó las pruebas de Ryu y la prueba catalasa para la caracterización de las pruebas bioquímicas de la bacteria.
2. Se realizó la primera prueba fue la de Ryu para determinar si era Gram positiva o Gram negativa.
3. Se procedió con la prueba de catalasa para indica si la bacteria es anaerobia o aeróbica; las bacterias de la marchitez del plátano son de Fitopatógenas son Gram positiva y aeróbicas.

5.8.1 Pruebas de Ryu

1. Se colocó una gota de una solución acuosa de hidróxido de potasio (KOH) al 3 % sobre un portaobjeto. Se tomó luego con un asa bacteriológica una porción de la colonia bacteriana.
2. Se mezcló con el KOH mediante suaves movimientos circulares (Rodríguez, 2001). Si al retirar suavemente el asa de la muestra.

3. Se formó un hilo mucoso se considera una bacteria como Gram negativa y por lo tanto Fitopatógenas; si no se forma el hilo la bacteria es Gram positiva y no patógena (Figura 6).



Figura 6. Prueba positiva de Ryu de una muestra de suelo de Gram negativa.

5.8.2 Producción de catalasa

1. Se utilizó una solución comercial de peróxido de hidrogeno al 3.5 % para realizar la prueba de catalasa de la cual se colocó una gota en un portaobjeto.
2. Se tomó con el asa una muestra de la colonia bacteriana aislada para la cual se depositó sobre el peróxido (Figura 7).
3. se observó al colocar el peróxido si se presenta una reacción efervescente de la bacteria para asegurar si es aerobia, pero, si no presentaba las reacciones efervescentes es anaerobia.

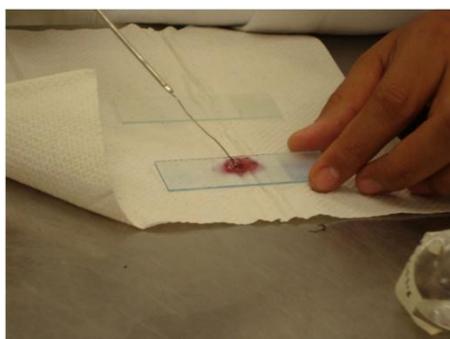


Figura 7. Prueba positiva de catalasa de una muestra de colonia de *R. solanacearum*.

5.9 Prueba preliminar del suelo

1. Se tomaron 240 ml de microorganismos activados para hacer la disolución de los Microorganismos Eficaces (ME).
2. Se diluyeron en agua destilada diferentes cantidades de ME para obtener las concentraciones de 40 %, 60 %, 80 % y 100 %.
3. Se aplicaron las concentraciones de ME en los vasos de unicel que contenían el 80 ml de suelo donde se había aislado previamente *Ralstonia solanacearum*.
4. Se obtuvo un gramo de cada tratamiento luego de los 30, 60 y 90 días después de la aplicación de los ME.
5. Se procesó luego para asilar colonias bacterianas.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento bacteriano del suelo y tejido enfermo

Se obtuvieron de las muestras tomadas de las fincas bananeras santa Rita se obtuvo aislamiento de bacterianos cuyas colonias tenían aspecto morfológico similares a las que se han encontrado en estudio reportados por Sánchez (2000), Ramírez *et al* (2006) y López (2010) en Teapa, Tabasco, y por Gómez (2005) en Colombia.

Se encontraron dos tipos de colonias con las características siguientes:

Tipo 1: redondas, pequeñas blancas con el centro rojo y bordes gruesos

Tipo 2: redonda, fluida y roja.

Estas colonias se obtuvieron de muestras concentradas y se observó que su crecimiento fue más evidente que en las muestras diluidas en diferentes concentraciones tanto de suelo como de tejido.

6.2 Confirmación de la bacteria

Además de las características de las colonias, de acuerdo a las pruebas de catalasa y Ryu los aislamientos corresponde a la bacteria *Ralstonia solanacearum* raza 2 y concuerda con los resultados reportados anteriormente en la zona.

6.3 Resultados obtenidos del Medio modificado

En el medio PDA modificado con las diferentes concentraciones de ME encontró que entre mayor porcentaje de ME en el medio disminuyeron las colonias de *Ralstonia* tanto en las muestras de suelo como las de tejido de banano con síntomas de la enfermedad (Tabla 2).

Tabla 2. Número de colonias de *R. solanacearum* de muestras concentradas y diluidas encontradas en medios de cultivos PDA modificado con las diferentes concentraciones de microorganismos eficaces.

	Concentrados	10⁻¹	10⁻²
<i>ME 60 %</i>	20	7	6
<i>ME 80 %</i>	15	5	2
<i>ME 100 %</i>	5	3	0

Estos resultados muestran que los ME ejerce un efecto supresor probablemente en la reproducción de la bacteria que se traduce en una menor aparición de colonias del patógeno en el medio cultivo.

6.4 Pruebas preliminares de control de *R. solanacearum*

En el suelo naturalmente infectado con la bacteria contenido en los vasos y que recibió la aplicación de los ME, se aislaron colonias bacterias con las mismas características de los aislamientos iniciales a los 30 y 60 días. A los 90 días se aplicó agua. Esta prueba muestra también un efecto de control de los ME contra la bacteria, sin embargo, es preliminar y se implementó ante la imposibilidad de realizar el ensayo programado en campo por falta de tiempo, por lo que estos resultados deberán ser comprobados en un ensayo de campo.

VII. CONCLUSIÓN

- De acuerdo al tipo de colonia y las pruebas bioquímicas se confirma que la bacteria encontrada en el tejido de la planta del plátano y asociada con los síntomas de Moko corresponde a *Ralstonia solanacearum* Raza 2.
- El menor crecimiento de colonias bacterianas en medio de tetrazolio modificado con diferentes concentraciones de microorganismo indica un efecto supresor de la bacteria al aumentar la cantidad de ME.
- El ensayo de control de ME contra la bacteria en el suelo infectado y contenido en vasos parece apoyar lo anterior, pero estos resultados deberán ser comprobados en un ensayo de campo para determinar la eficacia de los ME en el control del Moko.

VIII. RECOMENDACIÓN

- Continuar para confirmar estos resultados y realizar los estudios de los ME aplicados al suelo.
- Usar los conocimientos así generados en el planteamiento de tragedias más eficaces para manejo de enfermedades.

IX. REFERENCIAS

- Agrios, G. N, 2005. Fitopatología, 2da edición. México, Limusa, 952 p.
- Agrios, G. N, 2006. Fitopatología, editorial limusa. Págs.4-6, 31-32, 555-557,571-572
- American Phytopathological Society -APS-. Introductory Plant Pathology Resources. APSnet. Introduction to the Major Pathogen Groups [Consultado enero 2014]. En: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/Bacteria.aspx>.
- APNAN, 1995. ME application Manual for APNAN countries. Primera edicion Tailandia. Consultado el 23 de marzo 2017 disponible en línea. <http://www.agriton.nl/apnanman.html#5>.
- APNAN, 1996. The user manual, EM nature famimg guide: Kyusei Nature Farming with Effective Microorganism”. 2nd Arizona, U.S.A., EM Technology inc. (Consultado el 28 de marzo l 2017).
- APNAN, 2007. (Asia-pasific Nature agricultura Network TH). EM Application Manual for APNAN countries. 1a ed. Tailandia, 1995. Consultado el 20 de abril 2017. Disponible en internet <http://www.agriton.nl/apnanman.html#trung>.
- Aranda, O. S. 1991. Enfermedades del Moko del plátano causada por *Pseudomonas solanacearum* (*Ralstonia Solanacearum*). Memorias del curso fitopatógenos de importancia cuarentenaria. SAGDR. México s/p.
- Arenas, A., López, D., Álvarez, E., Llano, G. y Loke, J. 2006. Efecto de prácticas ecológicas sobre la población de *ralstonia solanacearum* Smith, causante de Moko de plátano. Centro Internacional de agricultura tropical, CIAT.A. A6713 Cali, Colombia. Pág. 76-78.
- Belalcázar S. 1991. El cultivo del plátano (*Musa AAB Simmonds*) en el trópico. Serie Manual de Asistencia Técnica No. 50. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Subgerencia de Investigación; Centro Internacional de Investigación para el Desarrollo (CIID) Canadá; Comité Departamental de Cafeteros del Quindío; Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano (INIBAP), Cali, Colombia. 376 p.
- Brock, T. 2004. Microbiología Enciclopedia básica visual. Editorial. Océano. Tomo VIII. Editorial. Prentice hall.
- CAB INTERNATIONAL. 2007. Crop Protection Compendium. Wallingford, UK.

- Cayón, A. Osorno, V. 2008. Efectos de *Mycosphaerella Fijiensis* sobre la filosofía de la hoja de banano. Proyecto Académico para la Ing. Agronomía. Universidad Nacional de Colombia, vol. 26. Núm. 2, pp. 256- 265.
- Denny TP. 2006. Plant pathogenic species. Pp: 573-644. Gnanamanickam SS (Ed.). PlantAssociated Bacteria. Springer. Printed in the Netherlands. 710p.
En línea: [http://sistemas2.senasica.gob. Mx/mcrfi/](http://sistemas2.senasica.gob.mx/mcrfi/) Fecha de consulta: febrero de 2016.
- Engelbrecht, M. C. and Hatting, M. J. 1989. Numerical analysis of phenotypic feature of *Pseudomonas solanacearum* affecting *Arachis hypogaea*. International bacterial Wilt symposium, Kaoshiung: Arciar, 1992: 245-251.
- Eguez, V. 2000. Control biológico de la sigatoka negra en banana con Microorganismo Eficaces en dos zonas del trópico de Cochabamba. Proyecto CONCADE agencia de Estados Unidos para el desarrollo internacional. Cochabamba, Bolivia. Pág. 25.
- Feakin, D. S. 1997. Pest control in bananas. Manual N. D. Centre for overseas pest research, London. 125 p.
- Fucikovsky, Z. L. 1991. Avance del moko del plátano en México. Centro de Fitopatología del Colegio de Postgraduados, Montecillos Estado de México. 81 p.
- FUNDASES (Fundación de Asesoría para el Sector Rural CO). 2007. EM Microorganismo Eficaces. Bogotá. Consultado el 30 de agosto 2013. En <http://www.fundases.com/p/em01.html>
- Granada, G. 2002. Manejo integrado del Moko en cultivos de banano y plátano. Taller sobre alternativas al uso de bromuro de metilo para el control del Moko en banano. Ministerio del Medio Ambiente, Bogotá, 13 p.
- Granada, G.A. 1996. Supervivencia de *Pseudomonas solanacearum* Raza 2, bajo condiciones de zona platanera del Quindío. pp. 95-96. En: Comité Departamental de Cafeteros del Quindío. Tecnología del eje cafetero para la siembra y explotación rentable del cultivo del plátano. Tercer informe técnico, 1994-1996. Corpoica. Armenia.
- Graham, J. and Lloyd, A. B. 1978. *Solanum cinereum* R. Br., a wild host of *Pseudomonas solanacearum* biotype II. Journal of the Australian Institute of Agricultural Science 44:124-126.
- González, P. M. 1987. Enfermedades del cultivo de banano. Programa de Comunicación Agrícola. Asociación Bananera Nacional. San José, Costa Rica. 31 p.

- Gómez, C. E. A. 2005. Aislamiento, identificación y caracterización del agente causante del Moko de plátano, *Ralstonia solanacearum* raza 2, provenientes de las plantaciones afectadas en Colombia. Tesis para obtener el título de maestro en microbiología y agrícola y veterinaria. Pontificia universidad javierana facultad de ciencia. Carrera de microbiología agrícola y veterinaria. Págs. 29-33.
- Goszczyńska, T., Serfontein, S. 2000. Introduction to practical phytobacteriology. First edition. Safrinet. Pretoria- South Africa. Pág. 83.
- Hayward, A.C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of phytopathology. 29: 64- 87.
- He, L. Y., Sequeira, L. and Kelman, A. 1983. Characteristic of strains of *Pseudomonas Solanacearum* from China. Plant Disease 67 (12): 1357-1361.
- Ito, S., Ushijima, Y., Fujill, T., Tanaka, Kameya-iwaki, M., Yoshiwara, S. and Kishi, F. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil Using a semiselective medium and PCR technique. Journal of Phytopathology. 146:379-384.
- Jackson, M. y L. González. 1981. Persistence of *Pseudomonas solanacearum* (race 1) in a naturally infested soil in Costa Rica. Phytopathology 71: 690-693.
- Kelman, A. 1953. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: A literature.
- Kelman, A. and Sequeira, L. 1965. Root-to-root spread of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 55:304-309.
- Lozano, J. C. and Sequeira, L. 1970. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infiltration technique. Phytopathology 60: 833-838
- Martins, J. M., Takatsu, A. and Uesugi, C. 2001. Colonizacão radicular de plantas cultivadas por *R. solanacearum* biovars 1,2 e 3. Scientia Agricola. 58(3): 833-838.
- Ploetz. R.C. 1994. Compendium of Tropical Fruit Diseases. APS PRESS. St. Paul, Minnesota. USA. 88 p.
- Pradhanang, P. M.; M.T. Momol; S.M. Olson. 2003. Effects of plant essential oil on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. Plant Disease, 87 (4): 423-427.
- Ramírez S. G. y C. J. C. Rodríguez. 1997. Manual de producción de plátano para Tabasco y Norte de Chiapas. Folleto Técnico No. 13. División Agrícola. INIFAP. México. 80 p.

- Ramírez S. G., Castellano, B. A, Lázaro, C. H. y Gil, A. A. 2006. Distribución e incidencia del Moko o marchitez bacteriana del plátano (*Ralstonia solanacearum* raza 2) en Tabasco. XIX Reunión Científica- Tecnológica y agropecuaria Tabasco. Págs. 324-328.
- Review and bibliography. North Carolina Agric. Exp. Station Tech. Bull. 99: 194.
- Rojas, S. 1992. Supervivencia de la bacteria *Pseudomonas solanacearum* E.F Smith, en el suelo bajo diferentes formas de manejo. Resúmenes de investigaciones en el Piedemonte Amazónico. ICA- C.I. Macagual, Caquetá. pp. 5, 6.
- Roldan, D., Salazar, M., Tejada, M. y Pena. Febrero 2002. Actualizado octubre 2016. Caracterización de la cadena del plátano en Colombia. Documento de trabajo No 10. Ministerio de la agricultura y desarrollo rural. Bogotá, Colombia. Pág. 41.
- Rodríguez, C. J. C. 2001. El moko del plátano en Tabasco (*Ralstonia Solanacearum*). XIV Reunión Científica Tecnológica Forestal y Agropecuaria. Pág. 1-5.
- Salazar, P. C. 2005. Paquete tecnológico para el cultivo del plátano. Número 001. Pág. 2-10. EDITORIAL?
- Sánchez. T. E. 2000. Etiología y distribución de la marchitez del plátano (*Musa AAA* subgrupo Cavendish) en Teapa, Tabasco. Tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad Autónoma Chapingo.
- SENASICA-SAGARPA. 2016. Módulo de Consulta de Requisitos Fitosanitarios para la importación de productos. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).
- Smith, J.J., Offord, L. C., Holderness, M., and Saddler, G.S. 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (Synonim *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenia. *Applied Environ Microbiol.* 61: 4263-4268.
- Sneath, P.H., Bread, R.S., Murray, E.G., and Smith, R.N. 1986. *Bergeys manual of etermination bacteriology.* William and Wilkins Co., London, 0pp: 232.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria 2010.
- Stover, RH. 1972. Banana plantain and abaca disease. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surry.
- Tapiero, A., L., Alexis, M. y Rodríguez, S.M. 2007. Dispersión de *ralstonia solanacearum* en suelos cultivados con plátano en el pie de monte llanero. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria* (2007) 8(1), 52-60.

- Thurston, H. D. 1984. Tropical Plant Disease. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 208 p.
- Van Elsas, J., P. Kastelein, P. van Bekkum, J. van der Wolf, P. de Vries y L. van Overbeek. 2000. Survival of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2, the causative agent of potato brown rot in field and microcosm soils in temperate climates. *Phytopathology* 90: 1358-1366.
- Vázquez, E. O. 2004. Efecto de la aplicación de microorganismos eficaces (EM) a diferentes concentraciones para el manejo de añublo bacteriano en el cultivo del palmito (*Bactris gasipaes* k). trabajo de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo con el grado de Licenciatura, Universidad EART, Guácimo, Costa Rica 60 pág.
- Villareal Fuentes. J.M. 2002. Agronomía en banano. Universidad autónoma de Chiapas IV. Huehuetan, Chiapas, México. Pág. 1-3.
- Yabuuchi E; Kosako Y; Yano I; Hotta H; Nishiuchi Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1986) comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. *Microbiology and Immunology* 39(11): 897–904.
- Yu, Q. Álvarez, A.M. Moore, P.H Zee, F. Kim, M.S de Silva, A. Heperly, P.R. Ming, R. 2003. Molecular diversity of *Ralstonia solanacearum* Isolated from Ginger in Hawaii. *Phytopathology*. 93: 1124- 1130.