



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



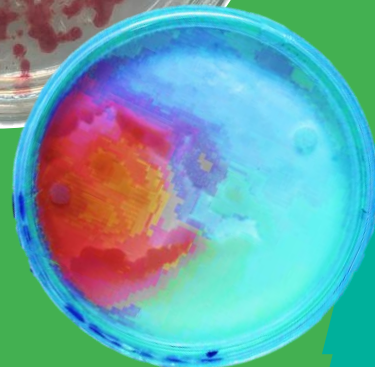
**“Evaluación del efecto de cuatro controladores biológicos sobre la Marchitez Bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) en laboratorio y vivero de Eucalipto (*Eucalyptus urograndis*)”.**



**Autores:**  
Alejandro Sanango  
Axel Triviño



**Director:**  
Ing. Mgs. Lenin Patricio Jiménez Pozo



# Introducción



# Introducción



20 M de ha

Gran adaptabilidad

Problemática sanitaria 1983

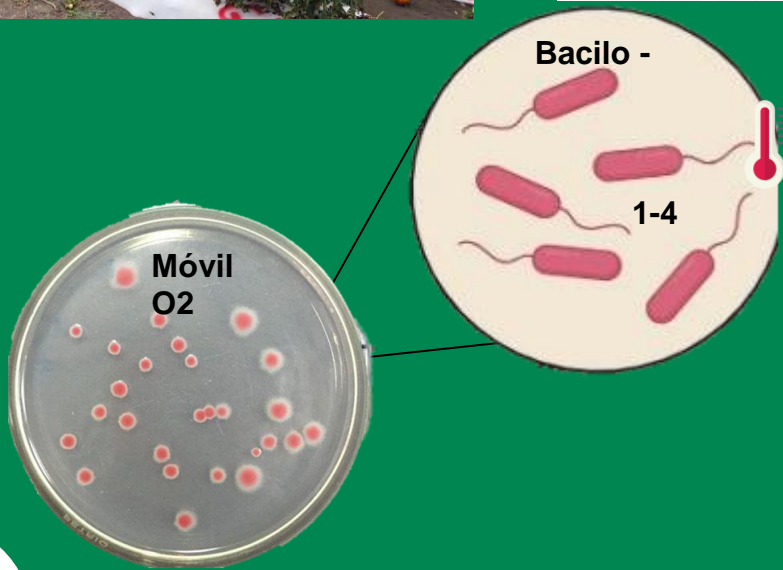
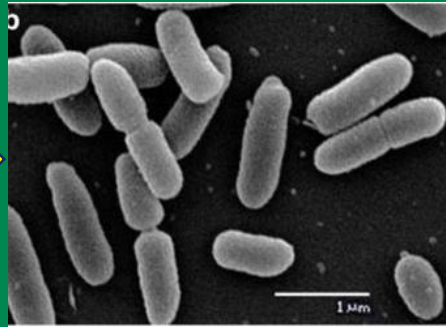
- Expansión de áreas a regiones más calientes y húmedas
- Clones susceptibles



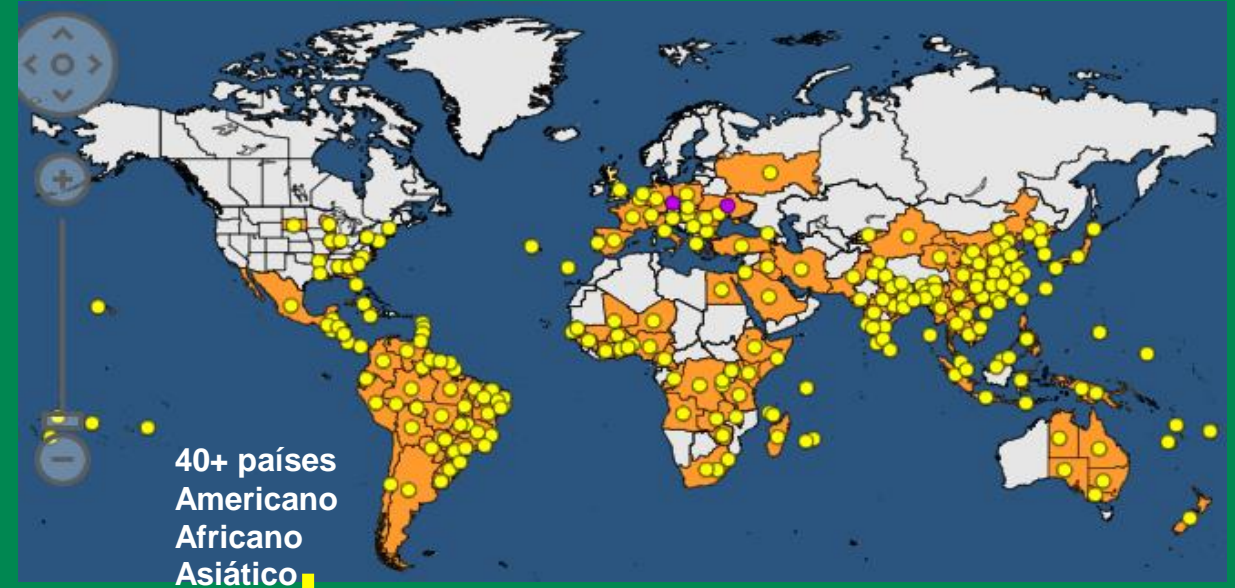
# Introducción

*(Ralstonia solanacearum)* 2da más destructiva

## Generalidades



## Distribución



**Biotrófico-Fácil diseminación**

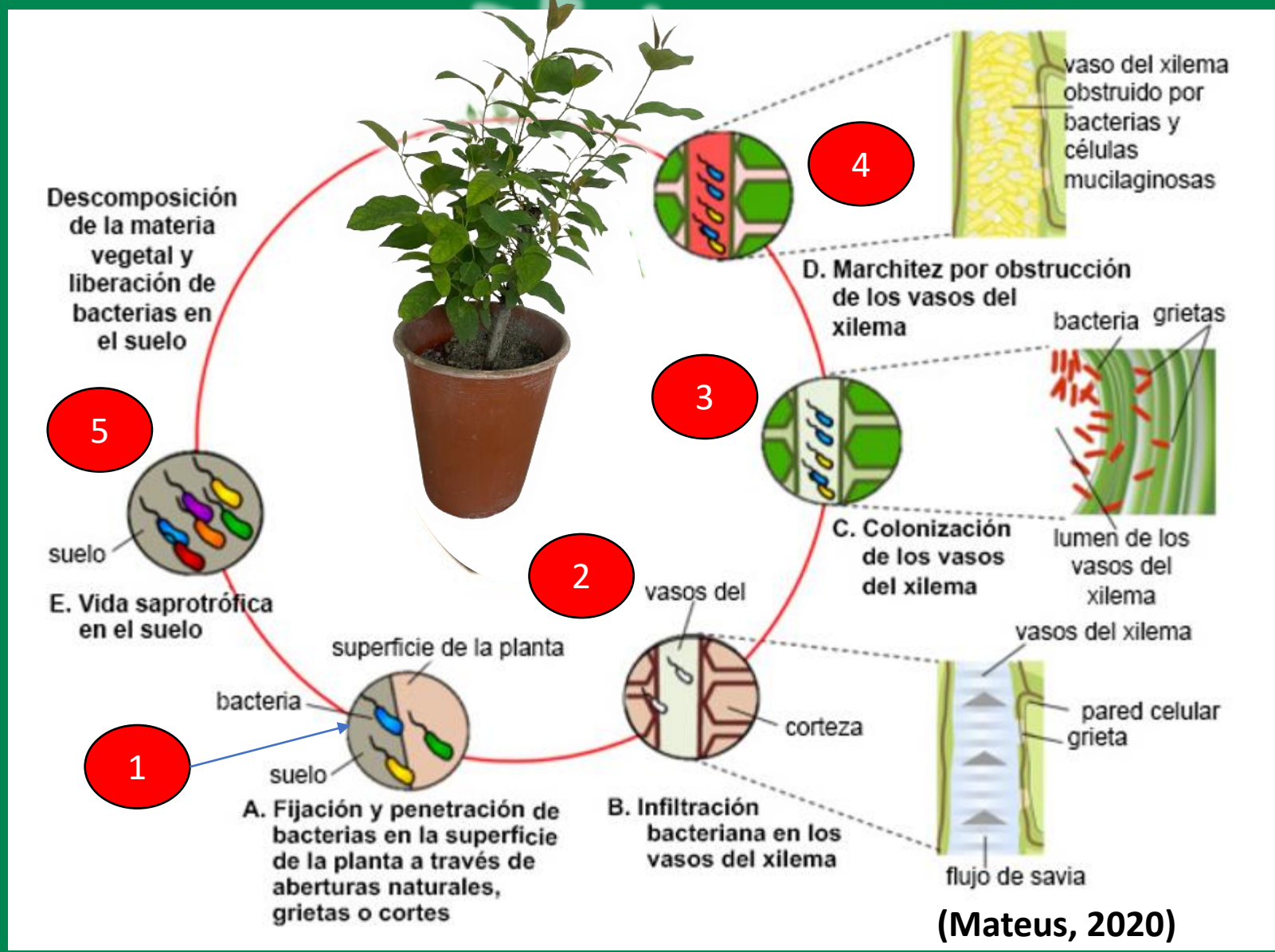
**Resistencia**

**Adaptación a climas templados y regiones tropicales y subtropicales**

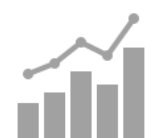
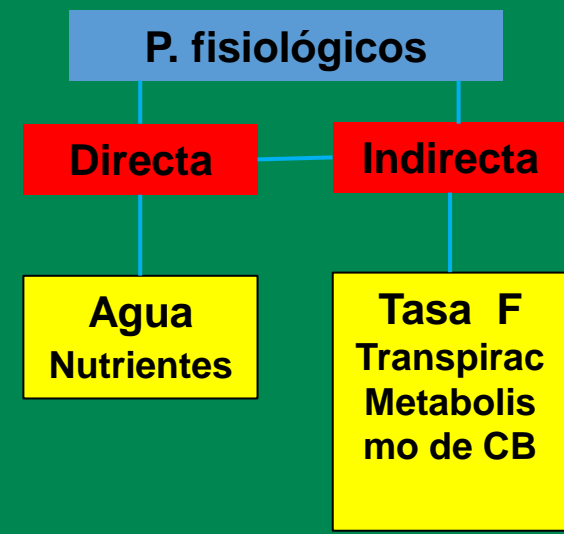
**Medios de diseminación**



# ECOLOGÍA

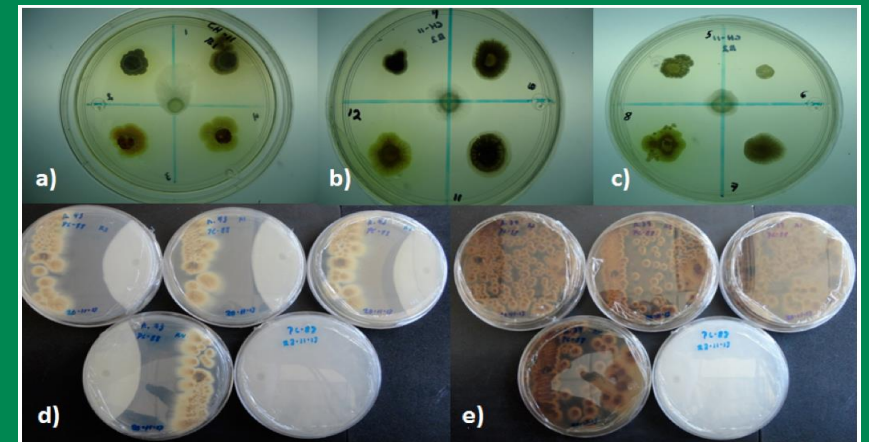


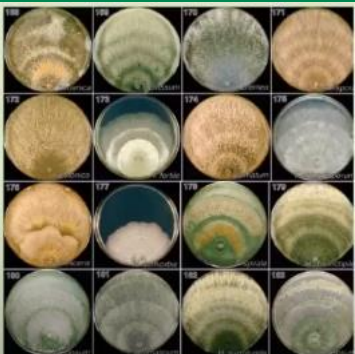
- 1-Adhesión
- 2-Xilema
- 3-Colonización
- 4- Obstrucción-marchitamiento
- 5 - Muerte



# Introducción

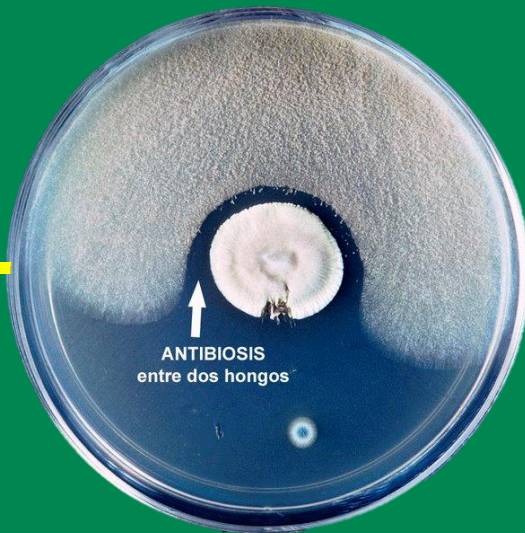
- NOVOPAN empresa forestal- genera-procesa-optimiza: productos de madera de alta calidad y va.. Necesidades.
- Empresa autosustentable – abastecimiento de materia prima
- Programa de investigación sobre el control de enfermedades
- Pérdidas a nivel de vivero. 8500 plantas madre 2023
- Diagnóstico de posibles agentes microbianos- reducir perdidas por R.s.





efectivo y duradero  
**Antagonismo**  
Interacción competitiva

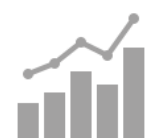
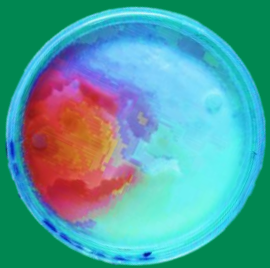
**Antibiosis**  
Crecimiento-supervivencia.  
Antibióticos, ácidos grasos, metabolitos



ANTIBIOTICOS

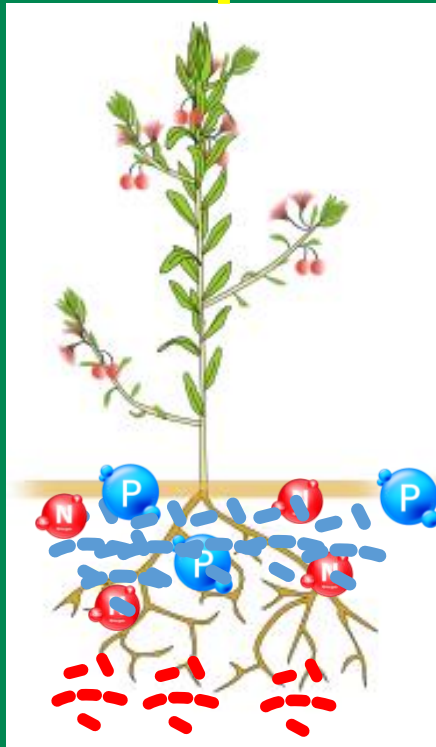
ÁCIDOS GRASOS

METABOLITOS



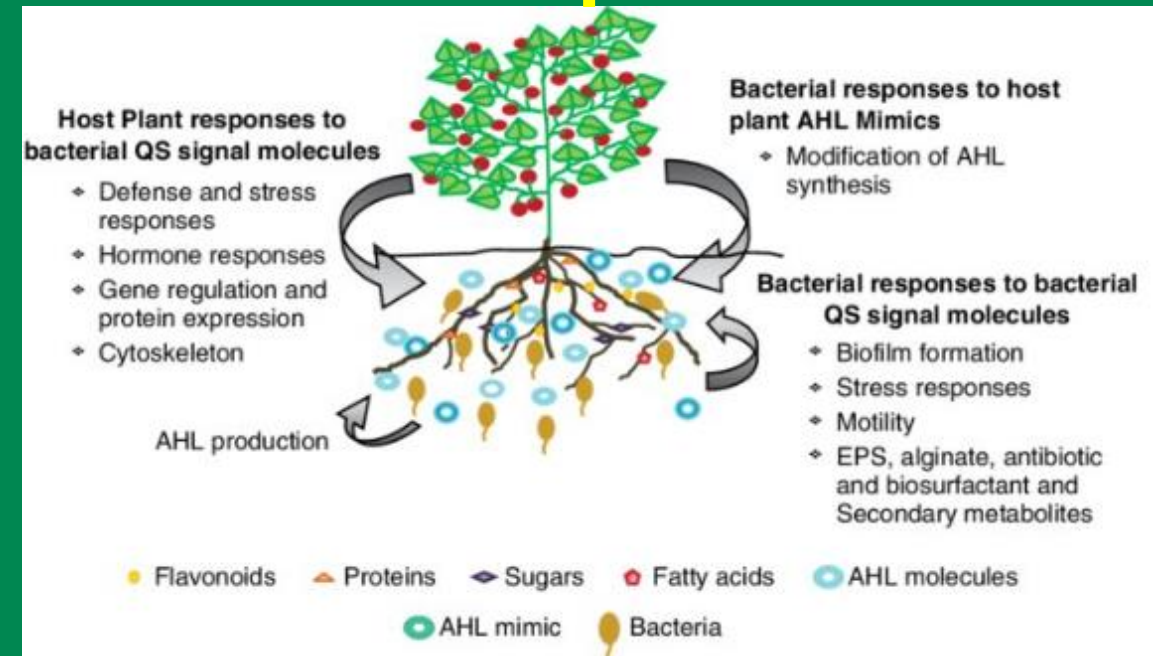
# Espacio y nutrientes

1ero en colonizar-  
uso de recursos  
Menos espacio-  
nutrientes



# Quorum sensing

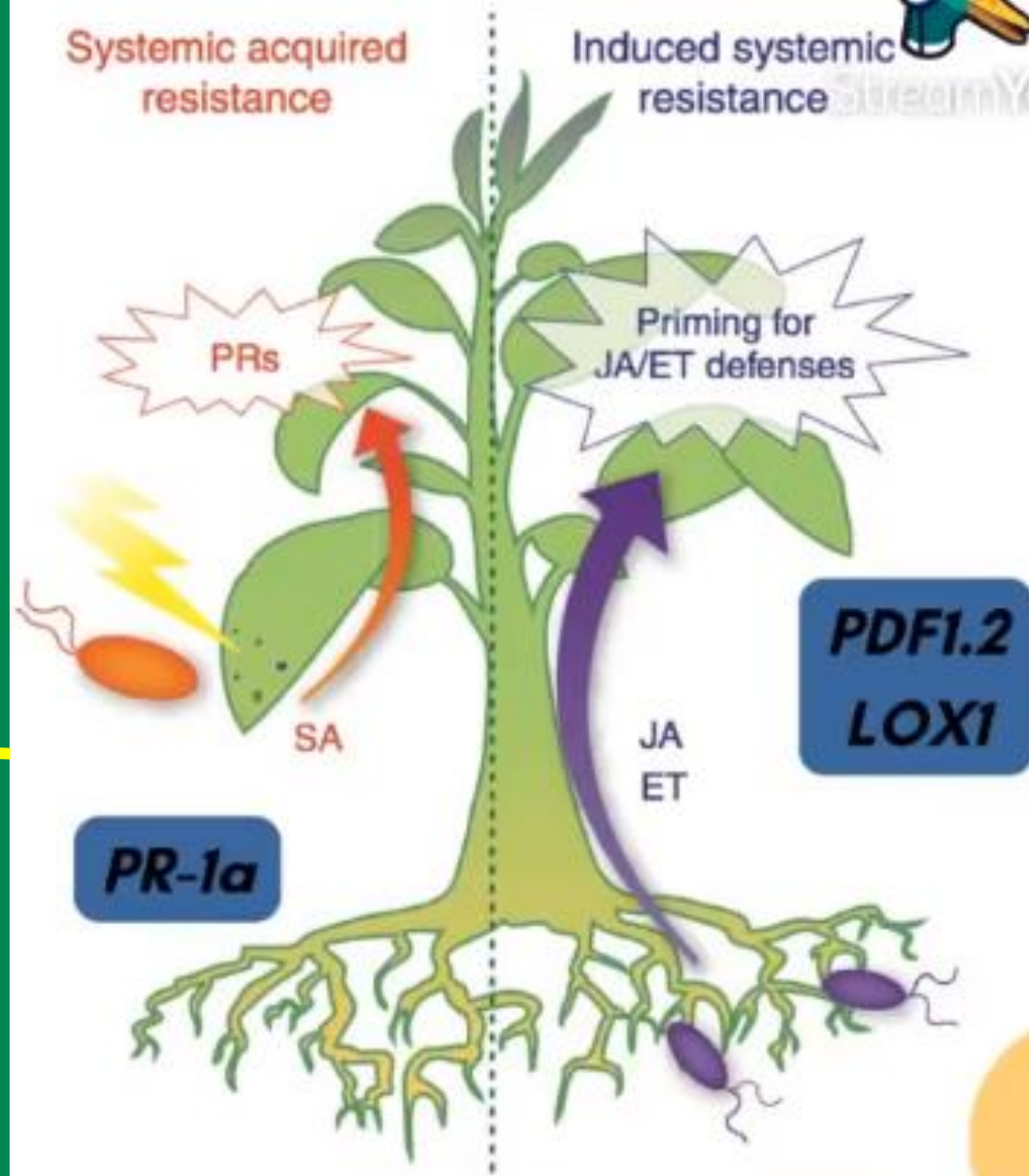
Señales químicas –  
producción de  
sustancias



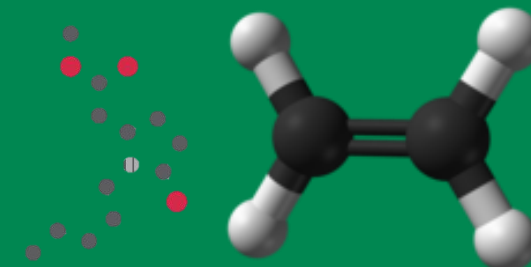


# Antagonismo

ISR



Fito hormonas: JA-ET



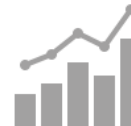
Genes: PDF1.1-LOX1



(Pieterse et al., 2009)



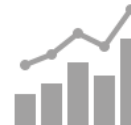
# |Objetivos



# Objetivos

## General

Evaluar el efecto de cuatro controladores biológicos sobre la Marchitez Bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) en laboratorio y vivero de Eucalipto (*Eucalyptus urograndis*).



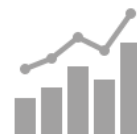
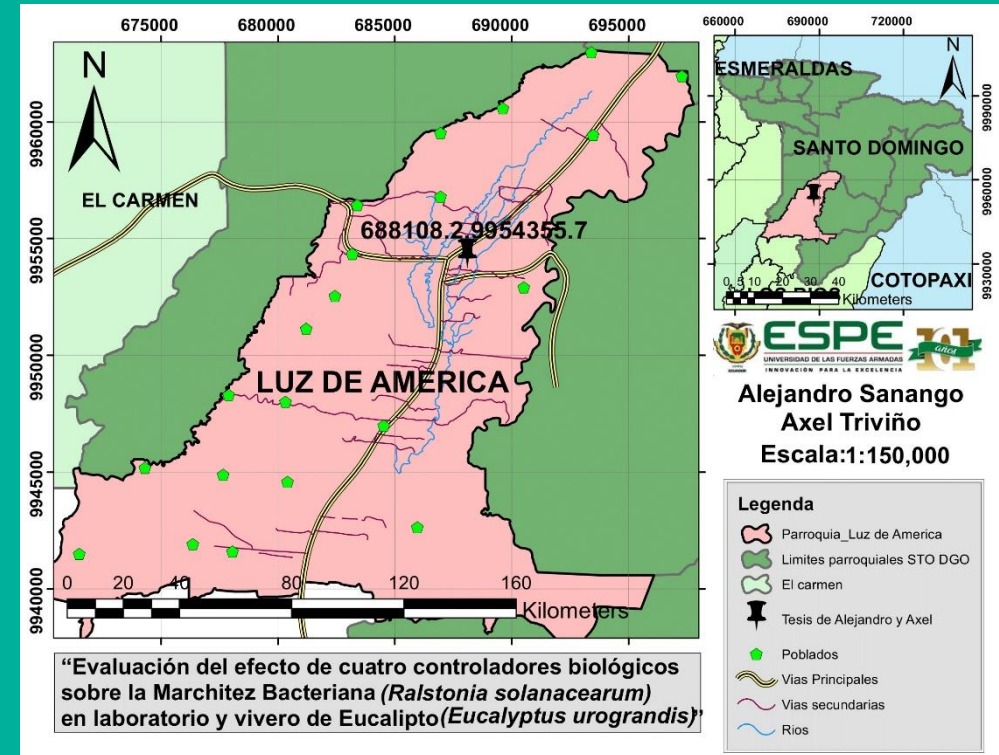
# Objetivos

## Específicos

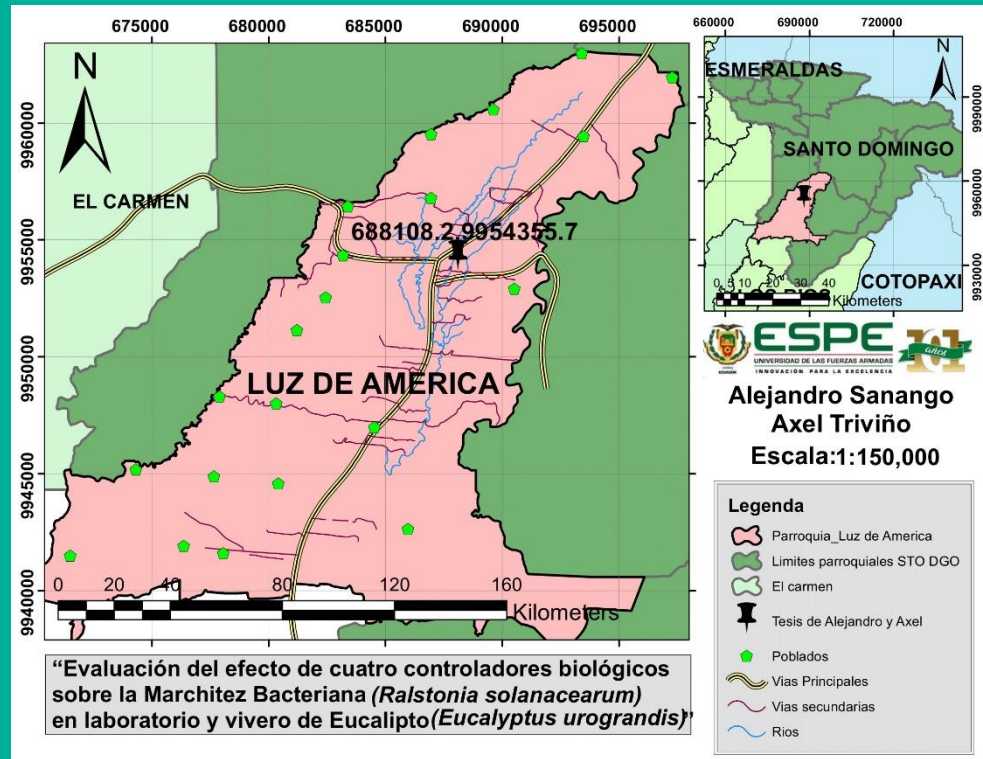
- Determinar el efecto antagonista in vitro de los tratamientos sobre *Ralstonia solanacearum*.
- Valorar la incidencia de *Ralstonia solanacearum* en plantas madre del jardín clonal de Eucalipto tratadas con los diferentes controladores biológicos.
- Determinar el porcentaje de supervivencia



# Ubicación



# Fase de laboratorio: Laboratorio de Microbiología



# Fase de Campo: Vivero “Los Ángeles” de NOVOPAN



## Ubicación Ecológica

Zona de Vida	Bosque húmedo tropical (bh-T)
Altitud	149 msnm
Temperatura	24 -26 °C
Precipitación	2605 mm/año
Humedad relativa	76 %
Heliofanía	660 horas luz

# Ubicación



# | Materiales



# Materiales

## LABORATORIO



Utensilios de  
 microbiología

Equipos de  
 esterilización

Medios de cultivo

## CAMPO



Plantas madre

Insumos biológicos

Equipos de  
 aplicación

Pruebas  
 inmunostrip





# | Metodología



# Metodología

## Tratamientos evaluados en laboratorio

Tratamiento	Producto comercial	Dosis
T1	Serenade	15 mL/L
T2	Ferticillus S	15 mL/L
T3	Nacillus	1 g/L
T4	Linor	15 mL/L
T5	Trichoplus	1 g/L
T6	Linol + Trichoplus	15 mL/L + 1g/L
T0	Testigo	Ninguna



## Campo

Tratamiento	Producto comercial	Dosis
T1	Serenade	15 mL/L
T2	Ferticillus S	15 mL/L
T3	Nacillus	1 g/L
T4	Linol + Trichoplus	15 mL/L + 1g/L
T0	Testigo	Ninguna



Producto	Descripción
Serenade	Suspensión concentrada de <i>Bacillus subtilis</i> 1x10 <sup>9</sup> ufc/g
Ferticillus S	Emulsión que incluye variedades de <i>Bacillus velezensis</i> 1x10 <sup>9</sup> ufc
Nacillus	Agente antibacteriano conformado por <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> y <i>Brevibacillus brevis</i>
Linor	Conjunto de cepas distintas de bacterias pertenecientes al género <i>Bacillus spp.</i>
Trichoplus	Distintas cepas del hongo <i>Trichoderma spp.</i>



# Metodología

Laboratorio



## Características de la unidad experimental

Numero de tratamientos	7
Numero de repeticiones	4
Número de unidades experimentales	28



Campo

## Características de la unidad experimental

Numero de tratamientos	5
Numero de repeticiones	4
Número de unidades experimentales	20
Número de unidades básicas	15
Número total de unidades básicas	300

## Diseño experimental

Se estableció un **DCA**  
**Análisis de varianza**  
**Test de Duncan (0,005)**

**Diseño cuadrado aleatorizado**

**Análisis de varianza**

**Chi-cuadrado**

**Separación de medias Duncan (0,05)**

## Variables evaluadas

**Crecimiento radial**

**Incidencia (%)**

**Severidad**

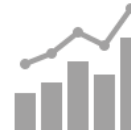
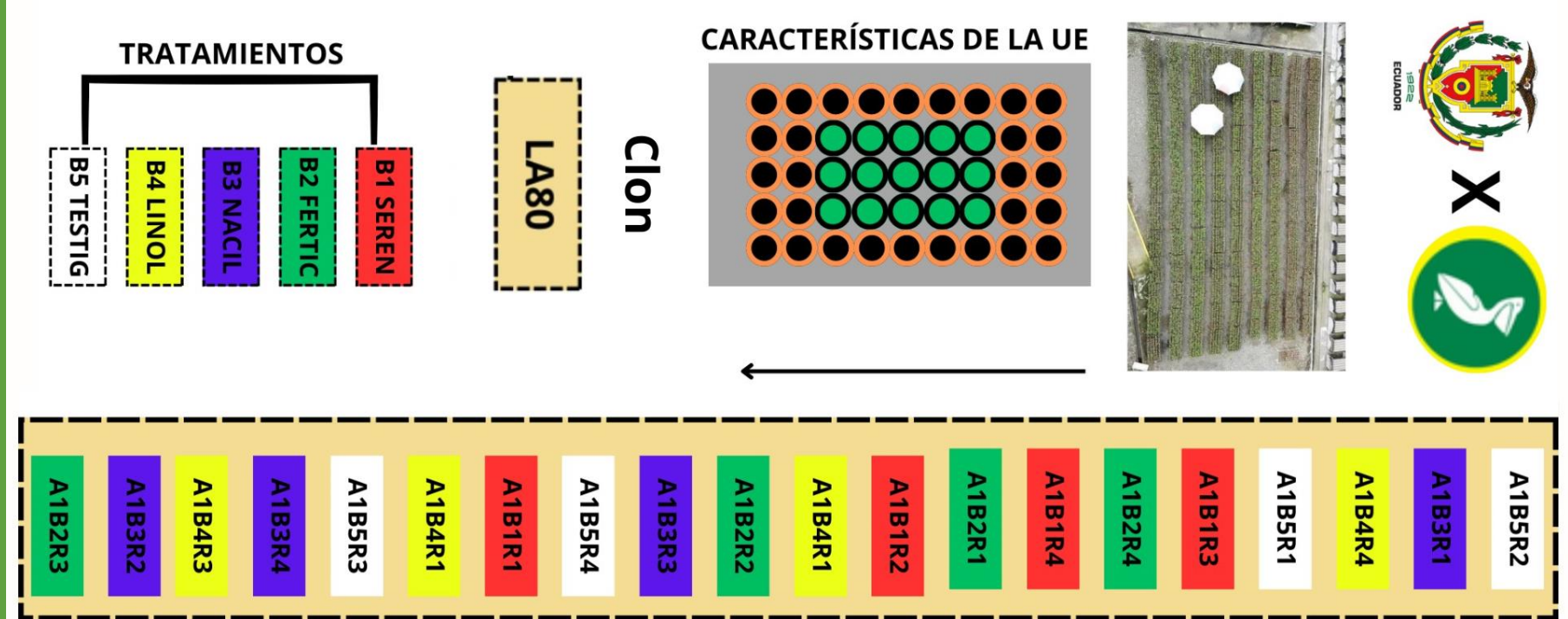
**Supervivencia (%)**



# Metodología

## Croquis

Campo



# Metodología

## Aislamiento de *Ralstonia solanacearum*



Identificación



Prueba de campo



Prueba rápida



Traslado a laboratorio



# Metodología

## Aislamiento de *Ralstonia solanacearum*

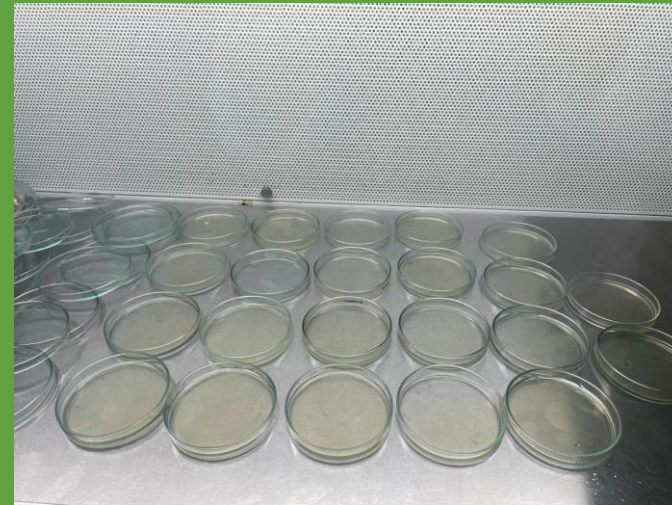


**Desinfección y  
maserado**



Caseína
Peptona
Glucosa
Agar
TTC 1%

**Preparación  
medio Kelman  
TTC**



**Siembra con asa  
bacteriológica  
48 horas  
28°C**

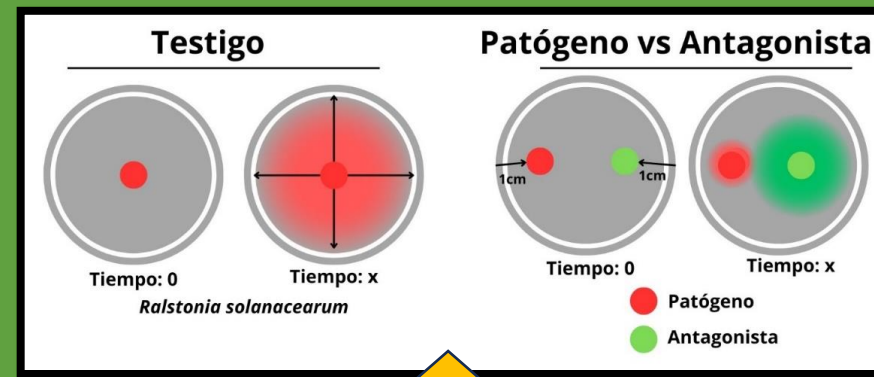


**48 horas  
28°C**



# Metodología

## Pruebas de Antagonismo

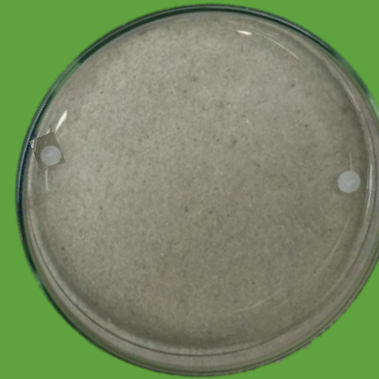


24 h 125 rpm

Inoculación del caldo nutritivo con los diferentes tratamientos



Preparación de agar nutritivo



Inoculación de tratamiento frente a R.s en discos de papel

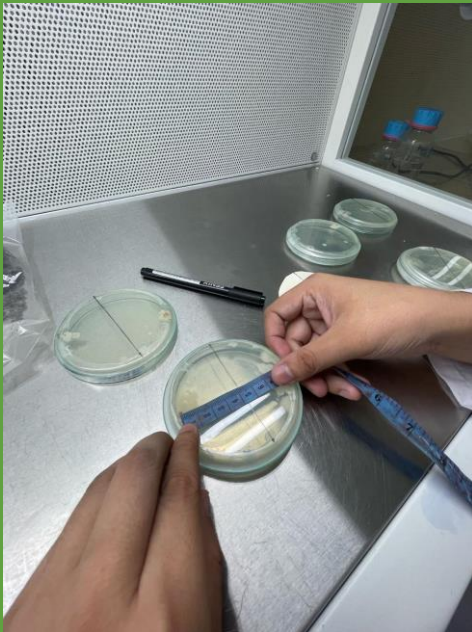


120 h  
28 °C



# Metodología

**Variables evaluadas:**  
**Crecimiento radial**



48 horas

72 horas

120 horas

**Determinación del PICR %**  
*Suarez et al (2008)*

$$PICR = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \cdot 100$$

**Evaluación del potencial biocontrolador**  
(Ezziyyani et al., 2004)

Potencial Biocontrolador	Capacidad Inhibitoria	Grado
Muy malo	0% PICR del antagonista sobre la colonia de <i>R. solanacearum</i>	0
Malo	25% PICR del antagonista sobre la colonia de <i>R. solanacearum</i>	1
Deficiente	50% PICR del antagonista sobre la colonia de <i>R. solanacearum</i>	2
Bueno	75% PICR del antagonista sobre la colonia de <i>R. solanacearum</i>	3
Muy bueno	100% PICR del antagonista sobre la colonia de <i>R. solanacearum</i>	4





# Metodología

## Aplicación de los Tratamientos



100 mL/planta

## Monitoreos Semanales



## Variables Estudiadas

**Supervivencia (%)**  
**Incidencia (%)**  
**Severidad**

## Escala de Severidad



# Metodología

## Aplicación de los Tratamientos



100 mL/planta

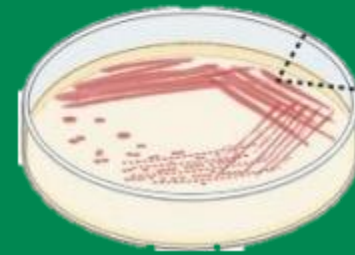
## Monitoreos Semanales



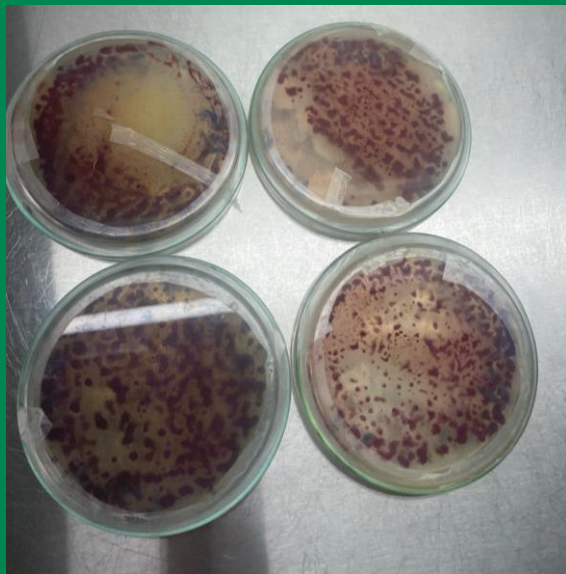
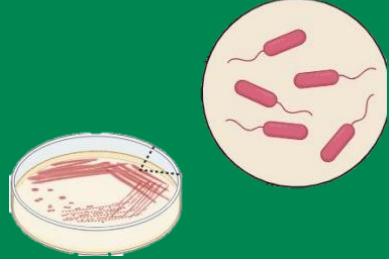
## Escala de Severidad



# | Resultados



# Aislamiento de *Ralstonia s.*



## Resultados

Evaluación del crecimiento 48 h



Desarrollo característico de R.s

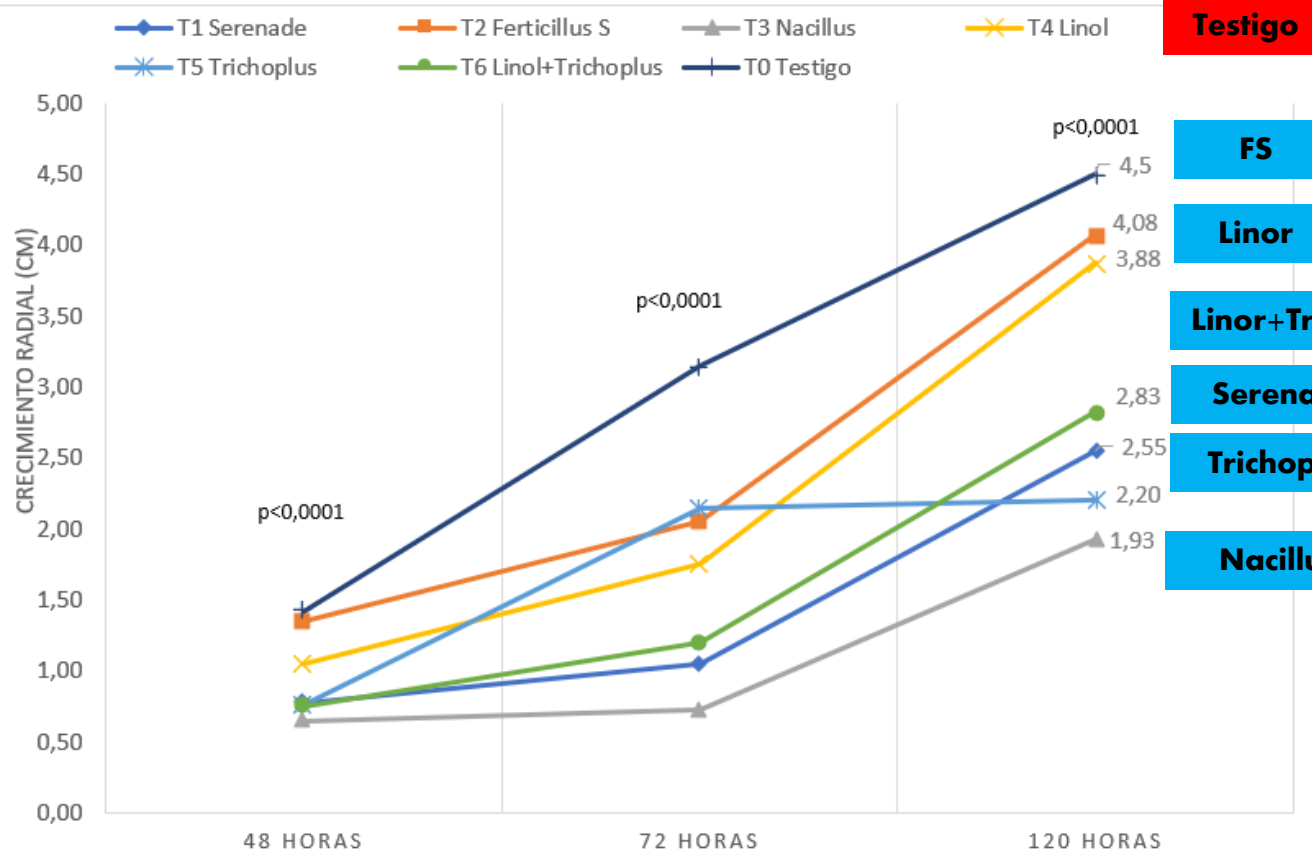
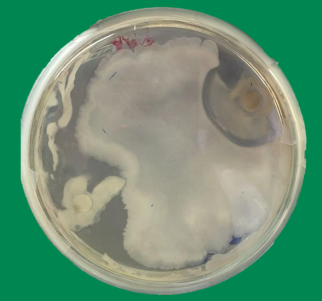
Medio TTC posee selectividad para R.s, permite crecimiento-inhíbe otros

**García (2008)**

**Gutarra (2018)**



# Crecimiento radial de R.s



- Testigo**
- FS**
- Linor**
- Linor+Tricho**
- Serenade**
- Trichoplus**
- Nacillus**

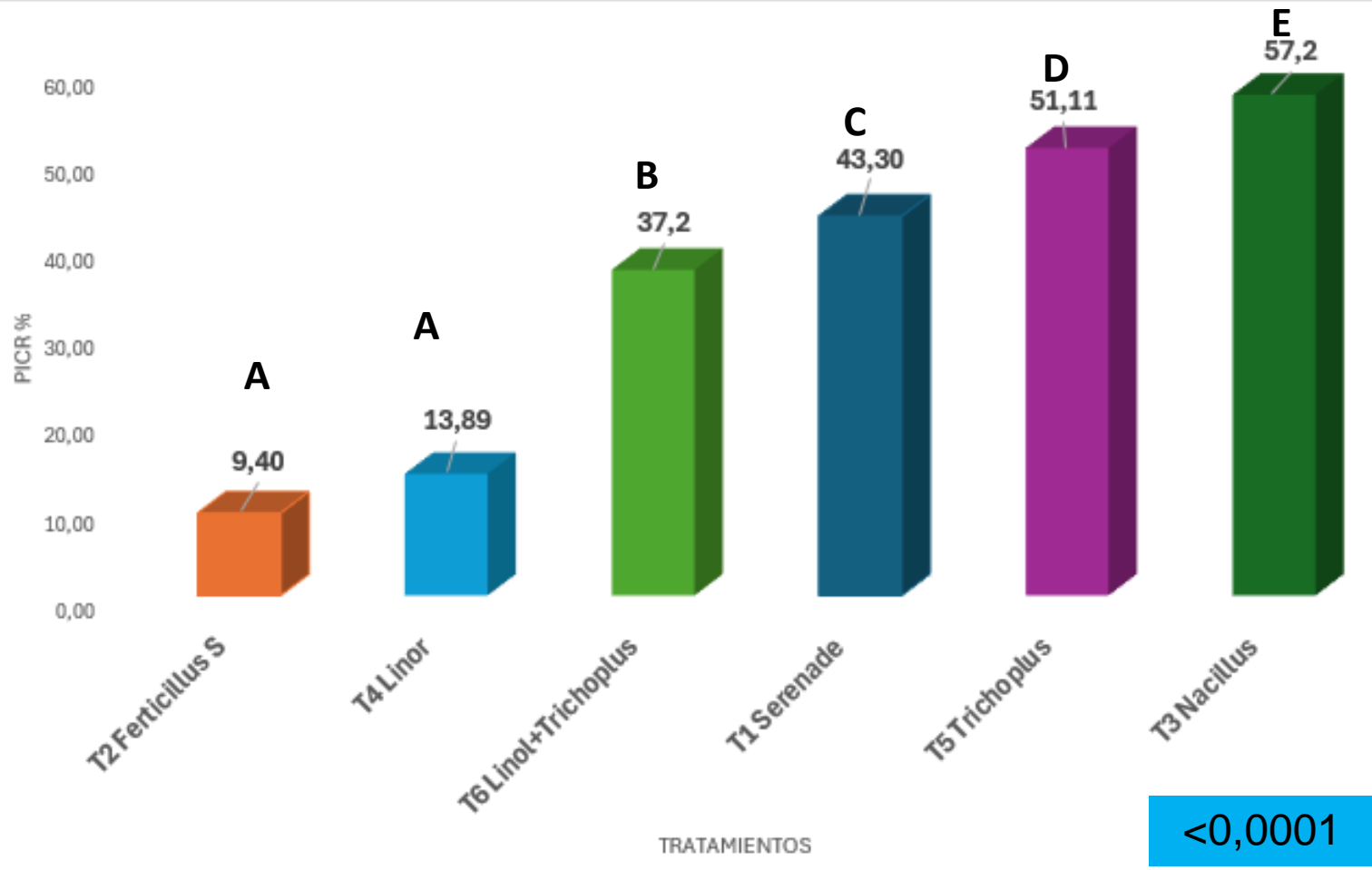
- T3 Nacillus** → **1,93 cm**
- T5 Tricho+** → **2,20 cm**
- Testigo** → **4,5 cm**

		48h			72h			120h		
F.V.	gl	CM	Pvalor	gl	CM	Pvalor	gl	CM	Pvalor	
Tratamiento	6	0,39	<0,0001	6	2,7	<0,0001	6	4,03	<0,0001	
Error	21	4,90E-03		21	0,02		21	0,03		
Total	27			27			27			
CV		7,21			8,56			5,55		

ANOVA: <math>< 0,0001</math>



# PICR % a las 120 horas



T3 Nacillus 57,23 %

T5 Tricho+ 51,11%

(Martínez et al., 2013) y (Astorga et al., 2014)

*Bacillus* y  
*Trichoderma* +  
actividad inhibitoria:  
Antibiosis  
competencia espacio  
y nutrientes

<0,0001

(Soto et al, 2018)

Combinación de  
agentes biológicos  
no siempre  
potencian su acción

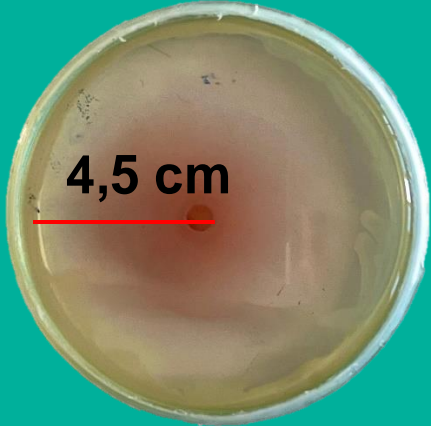
(Remache, 2018) 0% de Antagonismo

(Bedón, 2023) +50% de Antagonismo

Duncan



**Testigo**



**T1Serenade**



**T2Ferticillus**



**T3Nacillus**



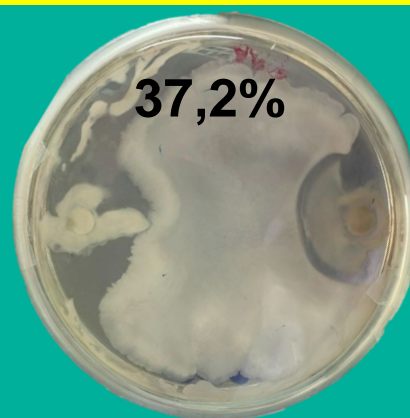
**T4Linor**



**T5Trichoplus**



**T6 Linor+Tricho+**



# Evaluación del potencial biocontrolador

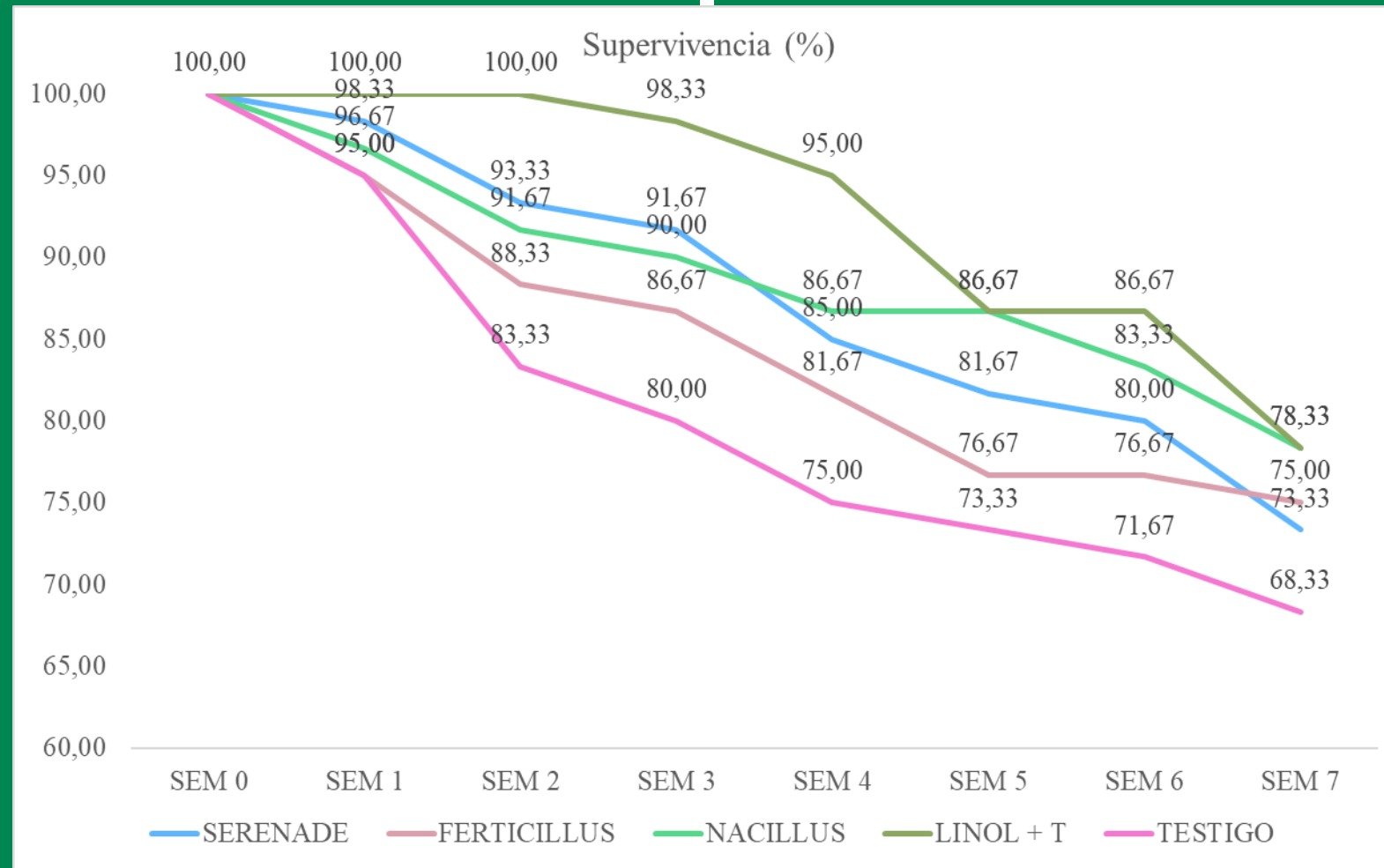
(Ezziyani et al., 2004)

Tratamiento	PICR %	Potencial	Grado
T3 Nacillus	57.33%	Bueno	3
T5 Trichoplus	51.11%	Bueno	3
T1 Serenade	43.33%	Deficiente	2
T6 Linor+Tricho+	37.22%	Malo	1
T4 Linor	13.89%	Muy malo	0
T2 Fercicillus S	9.45%	Muy malo	0

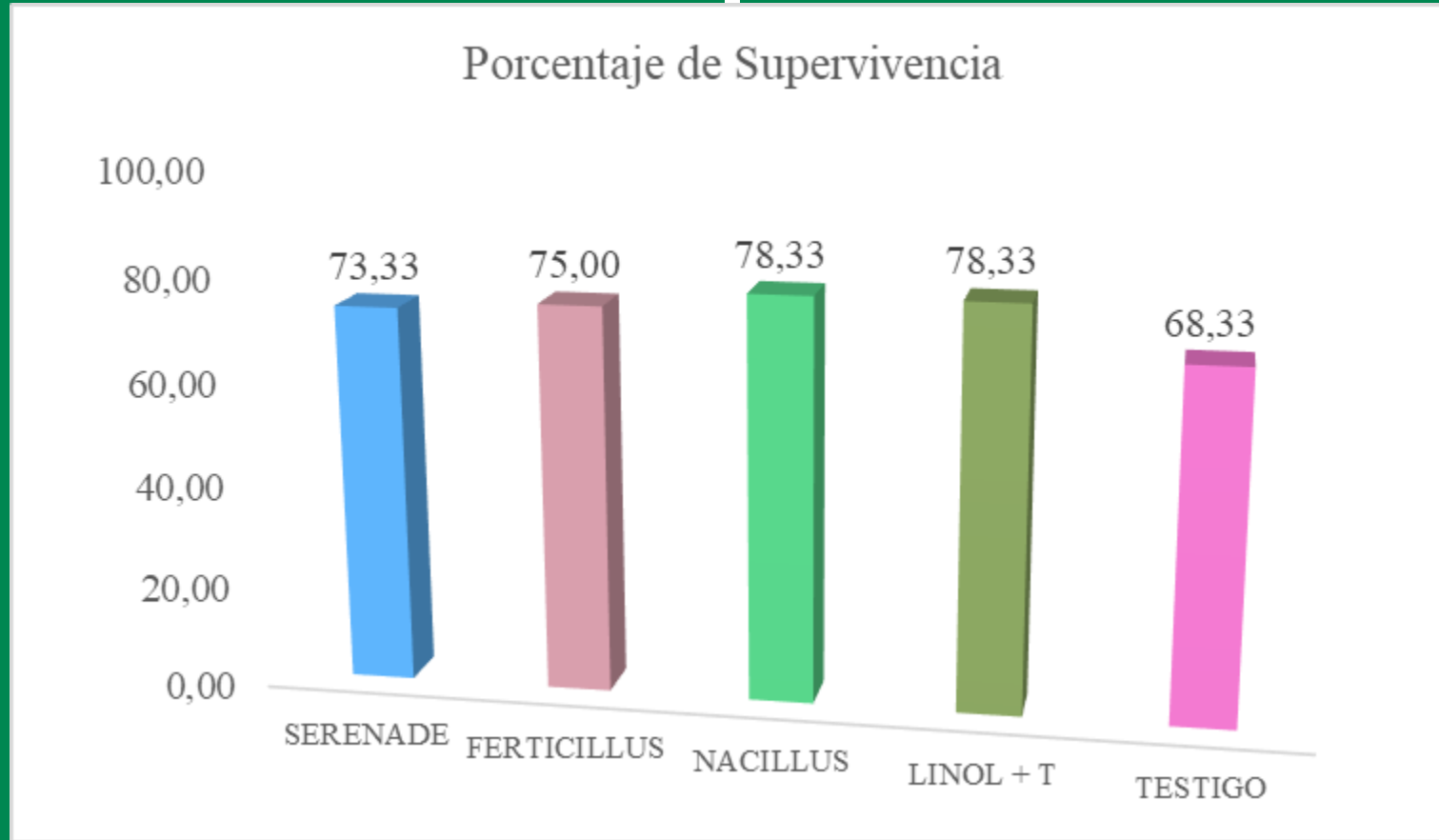




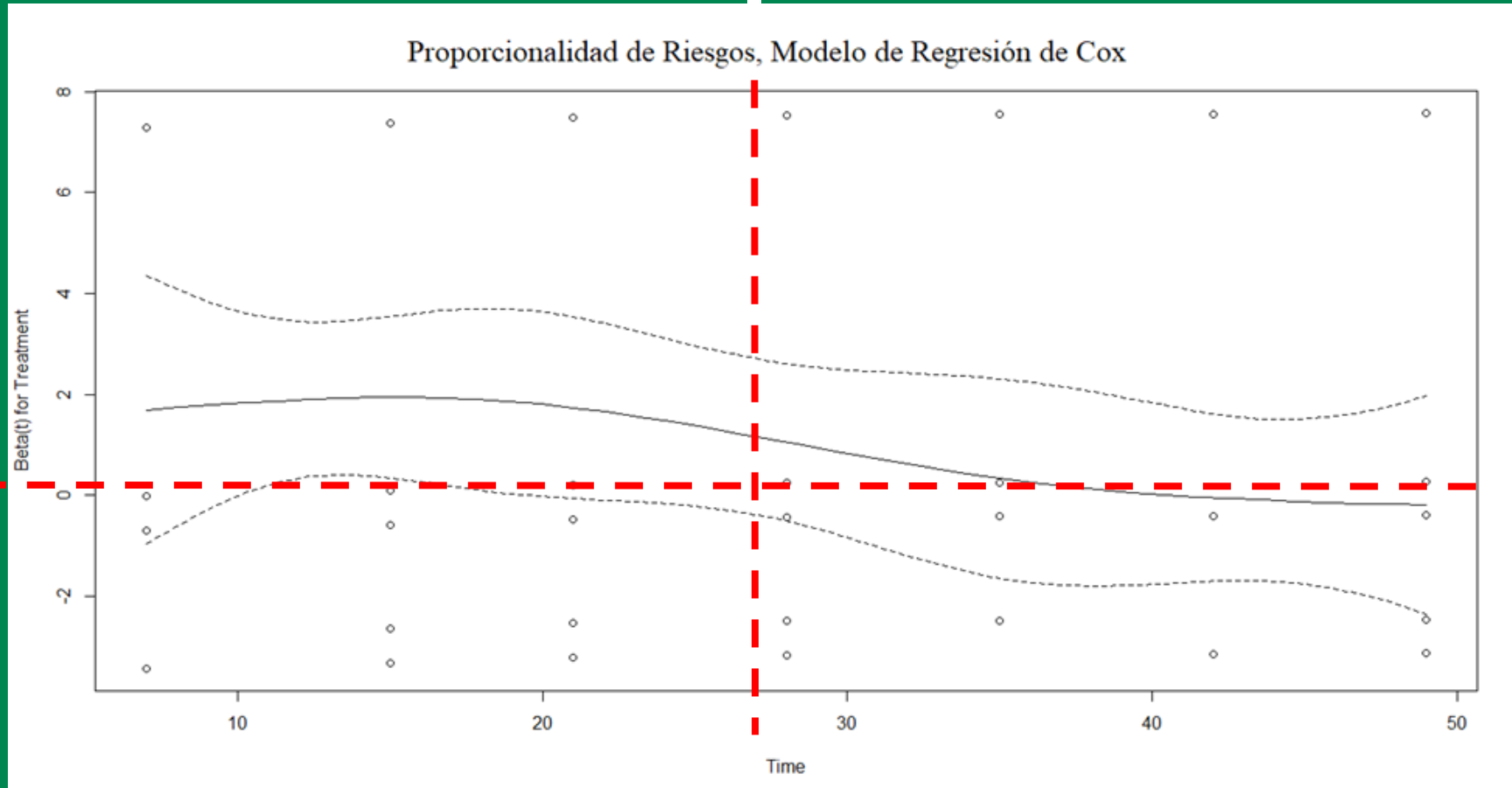
# Supervivencia (%)



# Supervivencia (%)



# Supervivencia (%)

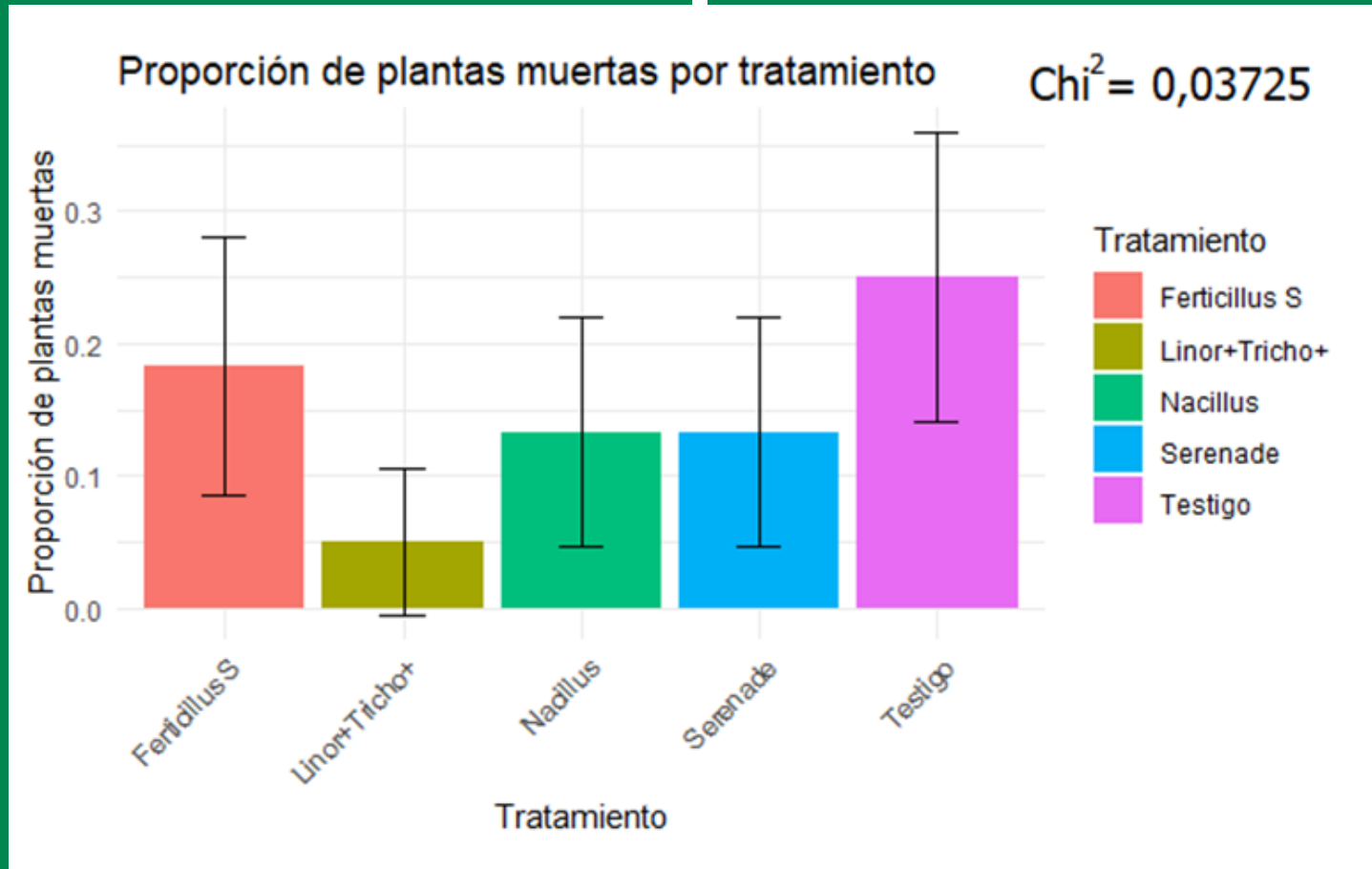


Proporción plantas jóvenes/viejas



# Supervivencia (%)

28 días

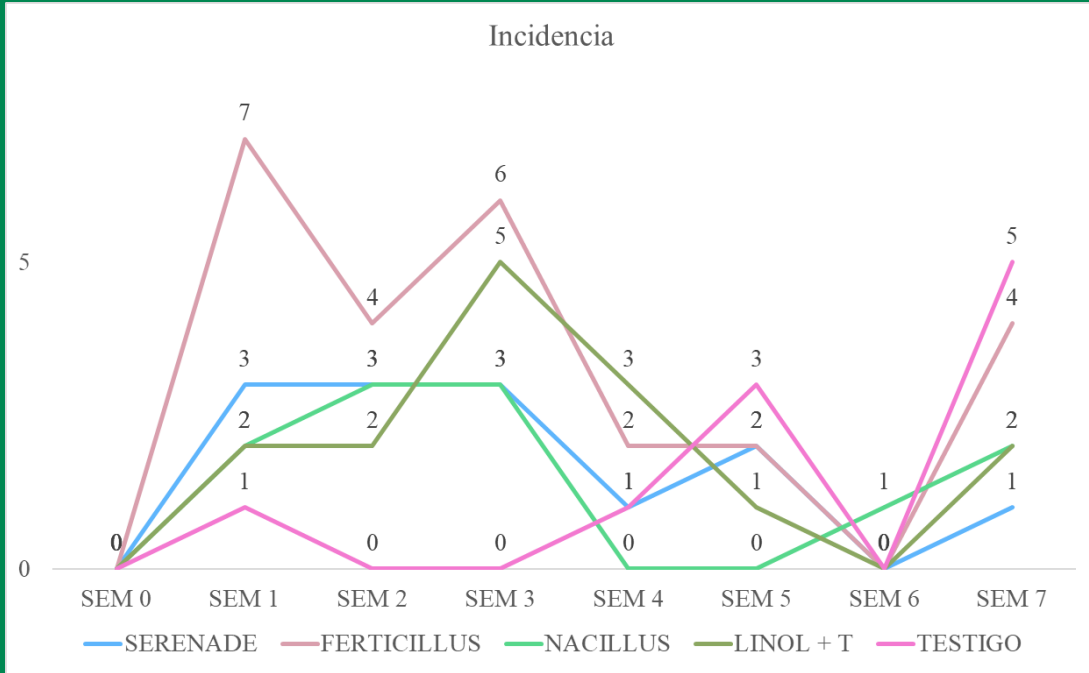


Villareal, et al., 2018



# Incidencia (%)

Tendencia de la incidencia clasificada por tratamientos durante 49 días

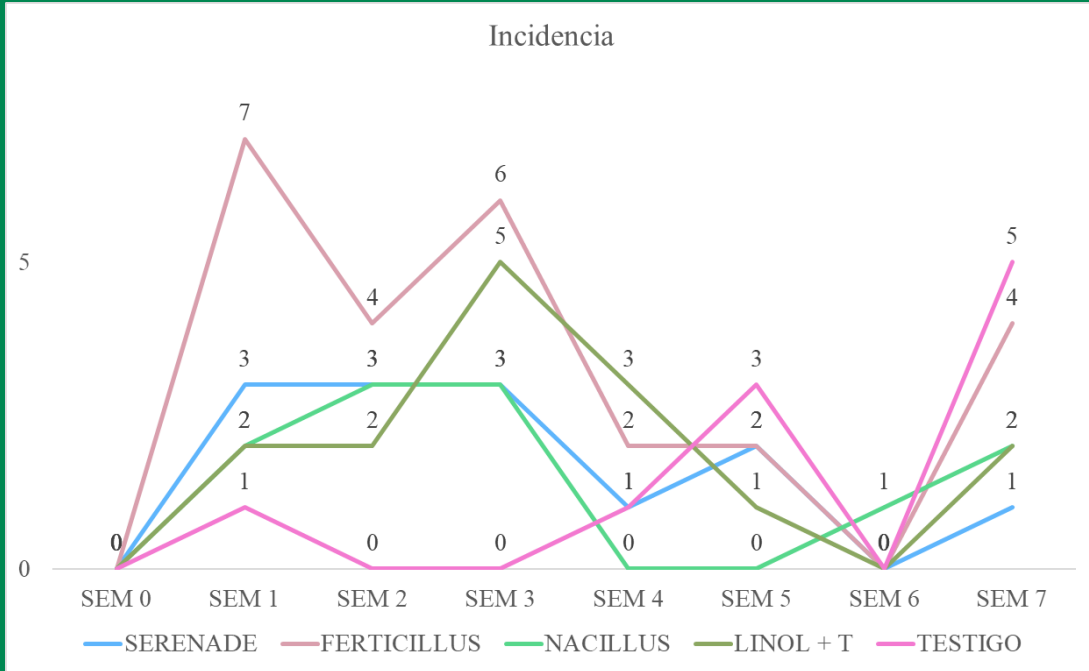


Resultados

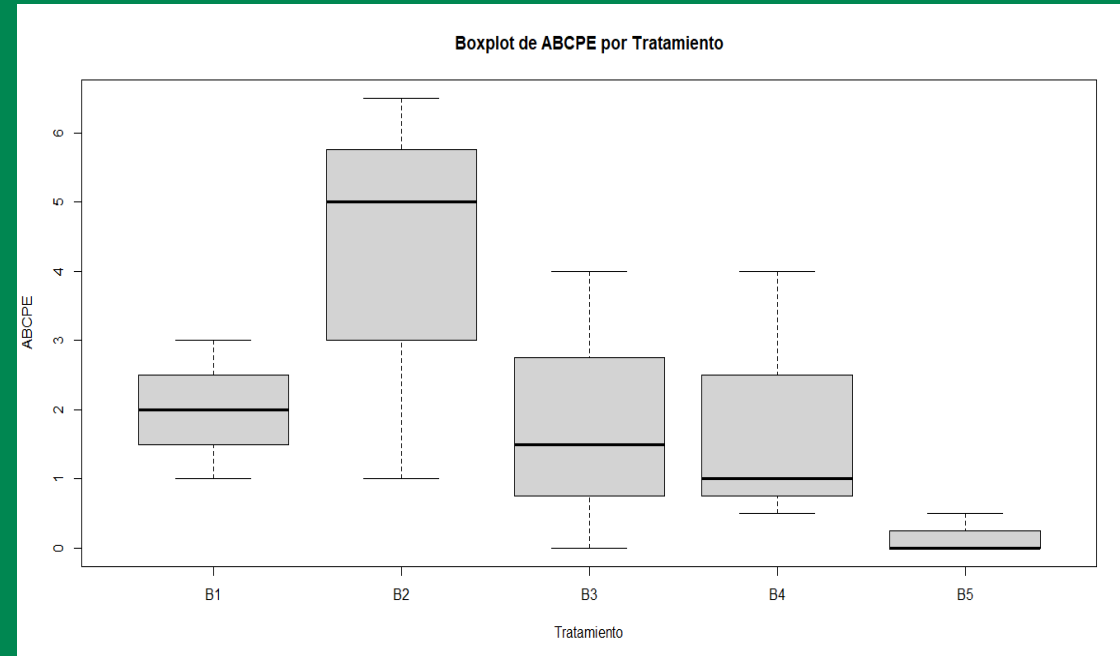


# Incidencia (%)

Tendencia de la incidencia clasificada por tratamientos durante 49 días



Boxplot para el área bajo la curva de progreso de la enfermedad por tratamiento.



Resultados

(p 0,204).

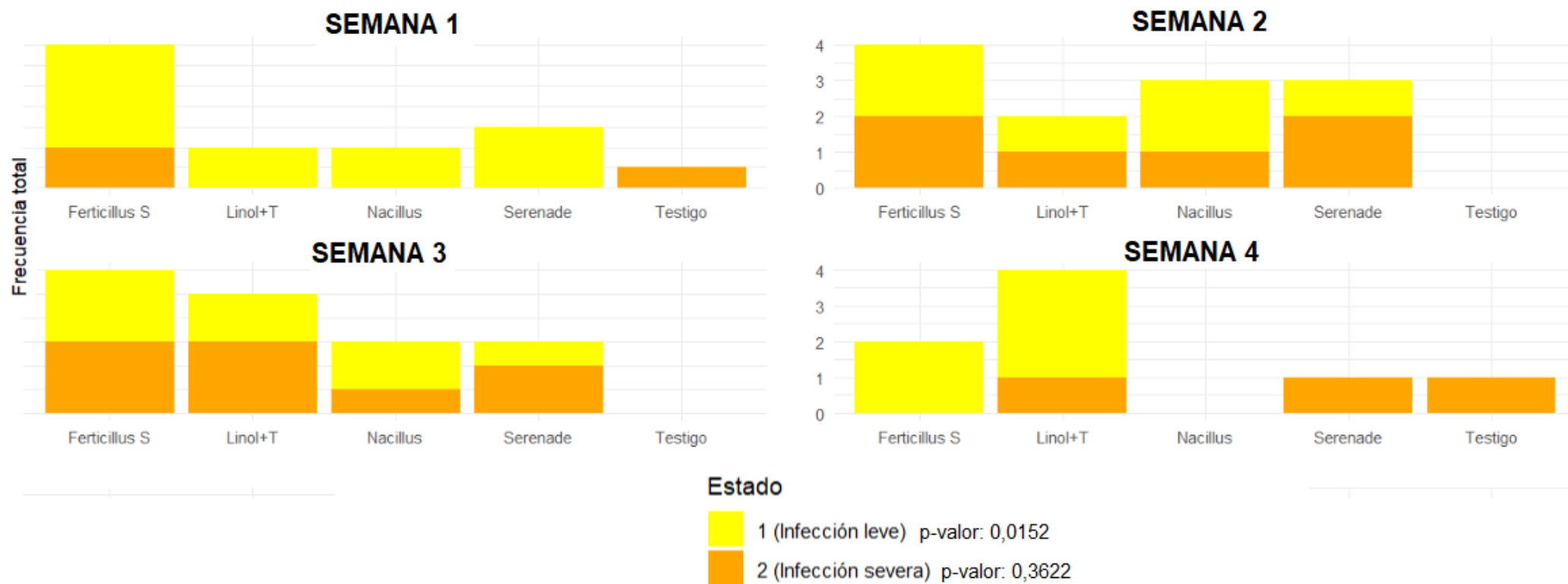


# Severidad



# Severidad

Frecuencia de plantas por severidad y semana



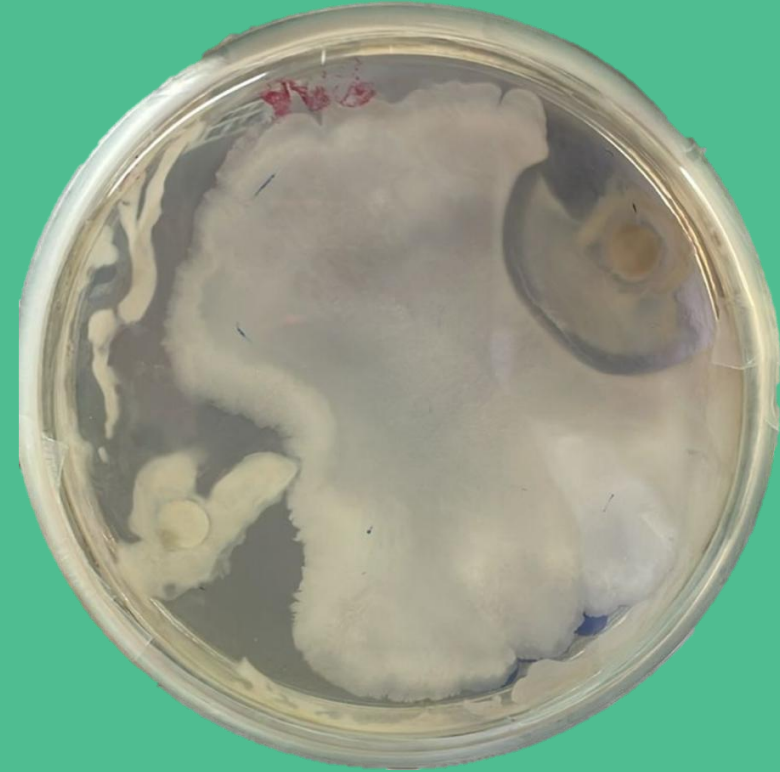
López, M; et, al.  
2020

Cevallos, G; Álvarez, E  
2011

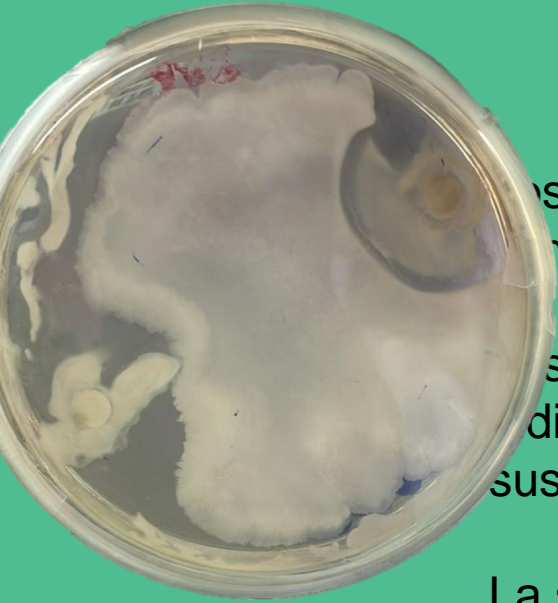




# | Conclusiones



# Conclusiones



Los mejores resultados de antagonismo obtenidos in vitro se evidencian en el T3 (Nacillus), con un total del 57,2% de PICR, seguido por el T5 (Trichoplus), con un total de 51% de PICR.

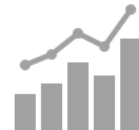
Los porcentajes de incidencia no difieren entre los tratamientos a lo largo del tiempo, indicando que *Ralstonia solanacearum* es una bacteria altamente agresiva y persistente en el sustrato.

La severidad difiere entre tratamientos, específicamente en el testigo, donde sólo se alcanzan a encontrar plantas con infección severa o muertas. Lo que demuestra que los tratamientos ejercen funciones sobre la planta y el patógeno para reducir el daño causado y prolongar la vida de la planta.

El porcentaje de supervivencia presenta diferencia durante los primeros 28 días del experimento, estableciendo que es posible mitigar el daño causado por *R. solanacearum*, pero no controlar al patógeno.



# | Recomendaciones



# Recomendaciones

Se recomienda realizar estudios para entender mejor los mecanismos de acción de las cepas individuales y las interacciones entre los diferentes agentes de control biológico, principalmente la combinación de *Bacillus* spp. con *Trichoderma* spp.

Se recomienda realizar investigaciones que para determinar si efectivamente los agentes de control biológico inducen a la ISR realizando mediciones de jasmonato y etileno.

Replicar el experimento con modificaciones en dosis, cantidad de solución por planta, frecuencia y modo de aplicación para verificar si es posible mejorar la mitigación del daño causado por *R. solanacearum* en plantas madre de eucalipto.

Clasificar las plantas madre por edad, ya que unas pueden requerir de menos cuidados que las plantas nuevas, que son más susceptibles al ataque del patógeno.





**Gracias por su atencion**