

Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE
Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga.

“Evaluación de cinco productos comerciales para el control de *Ralstonia solanacearum in vitro* como alternativa de uso en la producción orgánica.”

Elaborado por:
Jéssica Paola Paredes Loyola

Director:
Francisco Javier Flores Flor PhD.

Sangolquí-Ecuador
2023





Introducción

Objetivos

Hipótesis

Materiales y métodos

Resultados y discusión

Conclusiones

Recomendaciones



Afecta

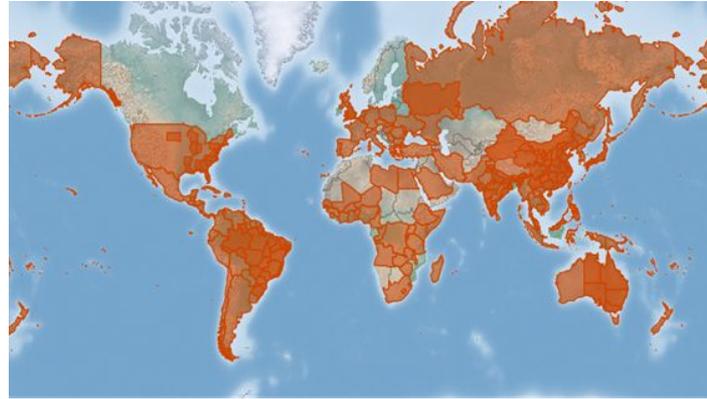
Fitopatógeno

200 especies, 50 Familias

TABLE 1

Common and scientific names of some of the primary high-value crops affected by *Ralstonia solanacearum*

| Host common name | Scientific name | Disease common name ^a |
|------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| Tobacco | <i>Nicotiana tabacum</i> | Granville wilt |
| Tomato | <i>Solanum lycopersicum</i> | Bacterial wilt |
| Potato | <i>Solanum tuberosum</i> | Bacterial wilt or brown rot |
| Pepper | <i>Capsicum</i> spp. | Bacterial wilt |
| Eggplant | <i>Solanum melongena</i> | Bacterial wilt ^b |
| Bananas | <i>Musa</i> spp. | Moko disease |
| Olive | <i>Olea europaea</i> | Bacterial wilt ^b |
| Ginger | <i>Zingiber officinale</i> | Bacterial wilt ^b |
| Geraniums | <i>Pelargonium</i> spp. | Southern wilt |
| Mulberry | <i>Morus</i> spp. | Bacterial wilt |
| Groundnut | <i>Arachis hypogaea</i> | Bacterial wilt |



- ❖ Importancia económica: Alta
- ❖ Alta letalidad
- ❖ Amplia distribución geográfica
- ❖ Amplio rango de huéspedes

Clasificación Complejo *R. solanacearum*

Filotipo I

→ *Ralstonia pseudosolanacearum*

Filotipo II

→ *Ralstonia solanacearum*

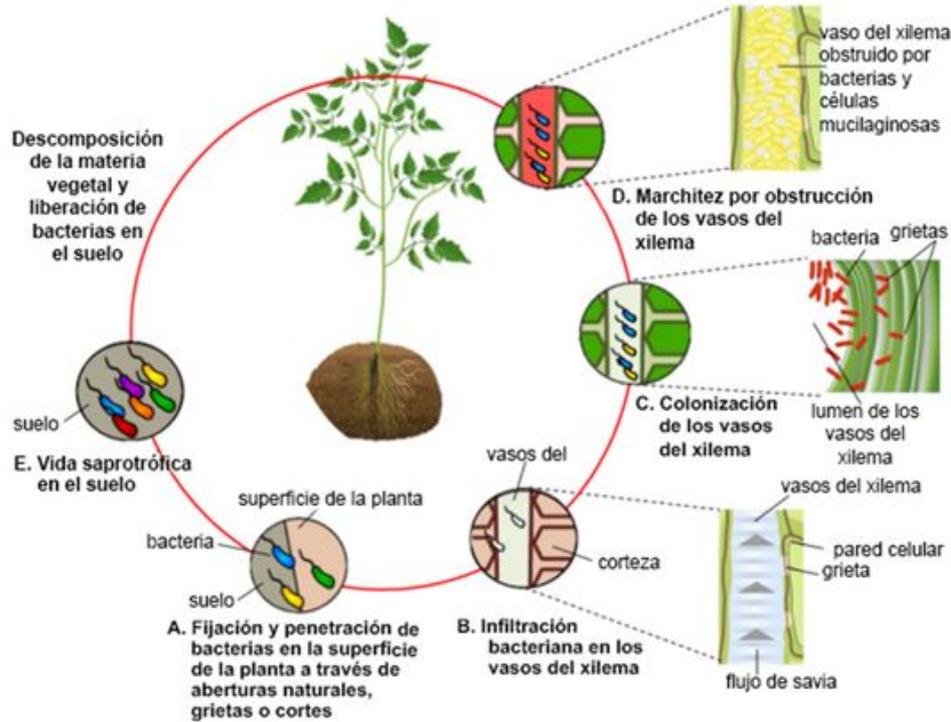
Filotipo III

→ *Ralstonia pseudosolanacearum*

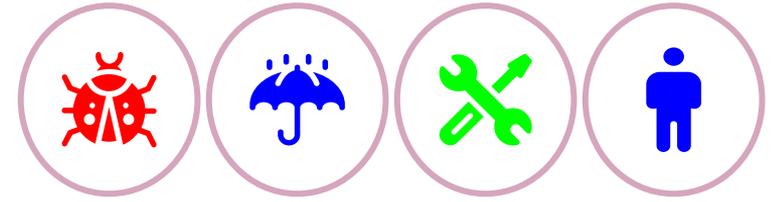
Filotipo IV

→ *Ralstonia syzygii*





Diseminación de la plaga



Insectos Agua de riego Herramientas Equipo y ropa

Control de la plaga

RESOLUCIÓN 0072

EL DIRECTOR EJECUTIVO ENCARGADO DE LA AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO

| | |
|---|---|
|  MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA |  AGROCALIDAD AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO |
| PLAN DE ACCIÓN PARA EL CONTROL DE <i>Ralstonia solanacearum</i> Raza 2 | |
| Edición No: 0 | |
| Fecha de Aprobación: 21/04/2022 | |
| PROCESO: SANIDAD VEGETAL | SUBPROCESO: CONTROL FITOSANITARIO |



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

- ❖ No pesticidas de origen sintético
- ❖ No fertilizantes de origen sintético
- ❖ No organismos modificados genéticamente
- ❖ No irradiación.



Aproximadamente el 4% de las exportaciones de banano corresponden a cultivos orgánicos



INSTRUCTIVO DE LA NORMATIVA GENERAL PARA
PROMOVER Y REGULAR LA PRODUCCIÓN
ORGÁNICA - ECOLÓGICA - BIOLÓGICA
EN EL ECUADOR



Resolución 0099 permite el uso de productos con cobre y azufre



Kopercup ®

Caldo bordelés ®

Azufrol ®

Phyton ®

Ácido
pirroleñoso

Objetivo general

Evaluar cinco productos comerciales para el control de *Ralstonia solanacearum in vitro*, como alternativa de uso en la producción orgánica.

Objetivos específicos

- Aislar la bacteria *Ralstonia solanacearum* a partir de musáceas sintomáticas.
- Identificar la bacteria *Ralstonia solanacearum* mediante diferentes indicadores.
- Evaluar *in vitro* de la eficacia de ácido piroleñoso, sulfato de cobre pentahidratado, azufre, oxiclorigo de cobre y caldo bordelés para el control de *Ralstonia solanacearum*.

Hipótesis

Al menos uno de los productos comerciales es efectivo para el control de *R. solanacearum*.

Introducción

Objetivos

Hipótesis

→ Materiales y métodos

Resultados y discusión

Conclusiones

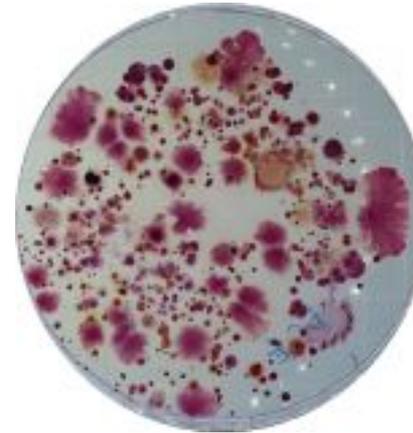
Recomendaciones



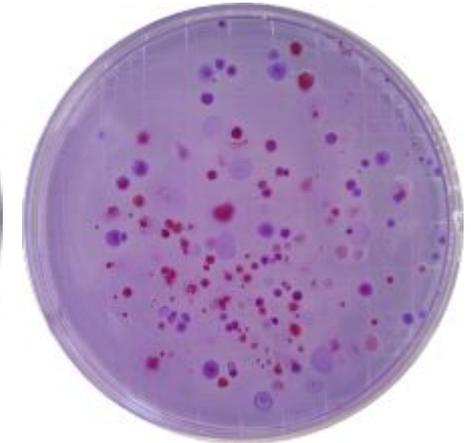


A) Fruto de banano con síntomas de podredumbre. B) Fruto de plátano con síntomas de podredumbre. C) Raquis de banano sintomático. D) Pseudotallo de plátano con síntomas.

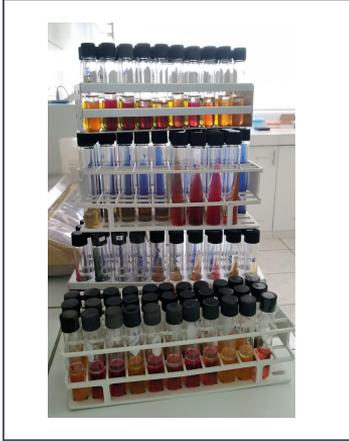
Medios de cultivo



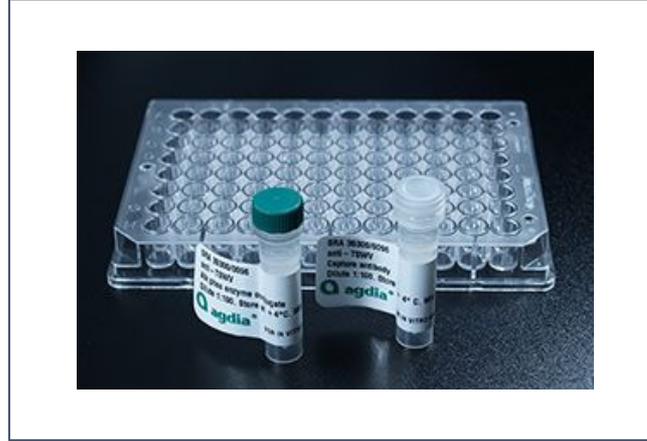
Medio TZC



Medio SMSA



Pruebas
bioquímicas



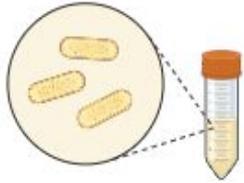
Inmunoensayo



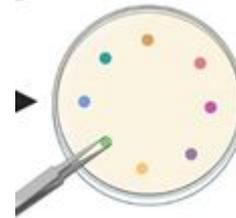
Pruebas moleculares

Difusión por disco

Solución
McFarland 0.5



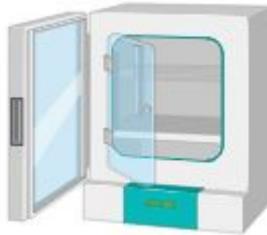
Estriado tipo césped



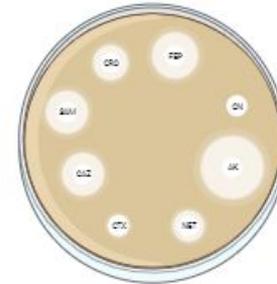
Colocación de discos



15 uL de cada
producto al 10%.



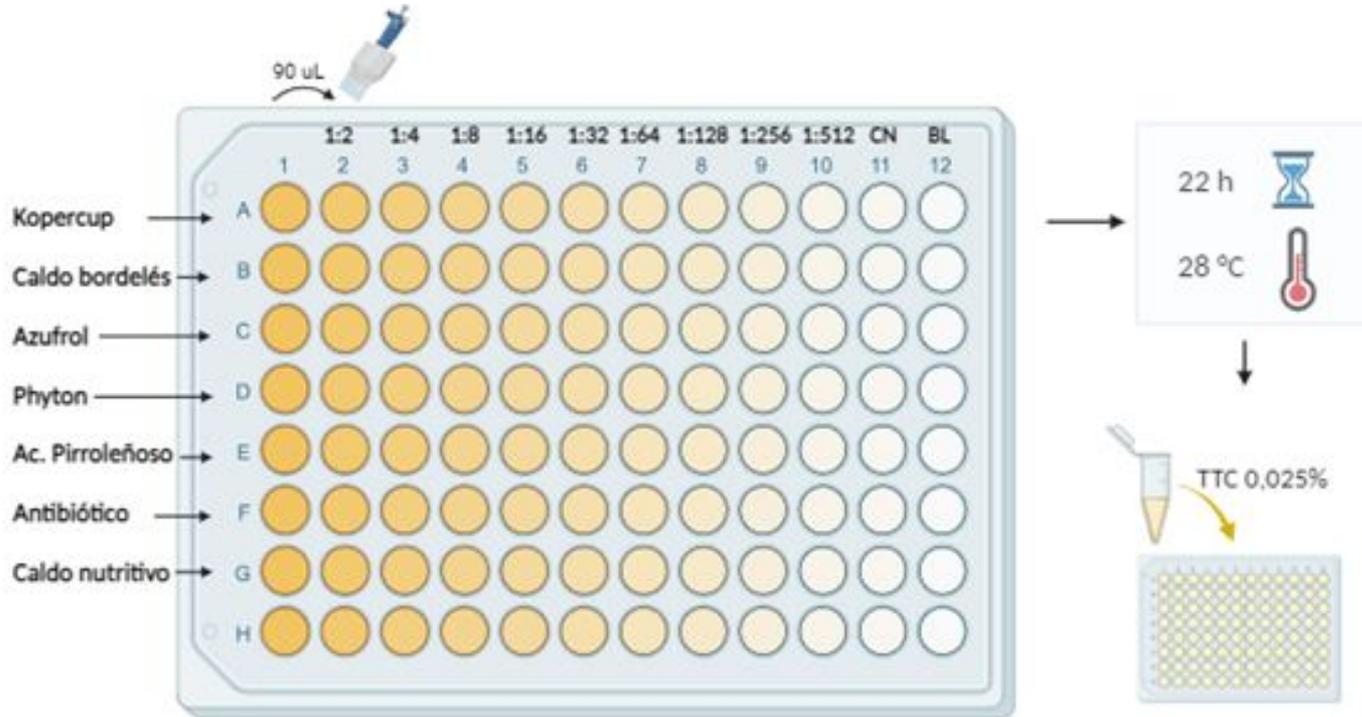
Incubación 24 h
28°C



Revisión de zonas
de inhibición

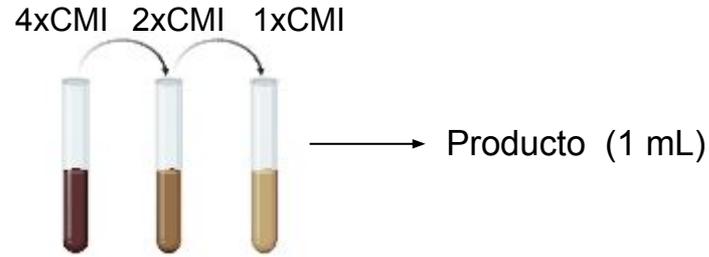


Microdilución en caldo



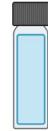
90 uL de caldo nutritivo +
90 uL de solución 10% producto + 10 uL de inóculo bacteriano.

Macrodilución en caldo



Producto 1
3 repeticiones

Inóculo
bacteriano (1mL)



Producto +
inóculo



Siembra por estría

t=0
t=0.5 h
t= 1h
t= 2h
t= 4h
t= 8h
t=24



Introducción

Objetivos

Hipótesis

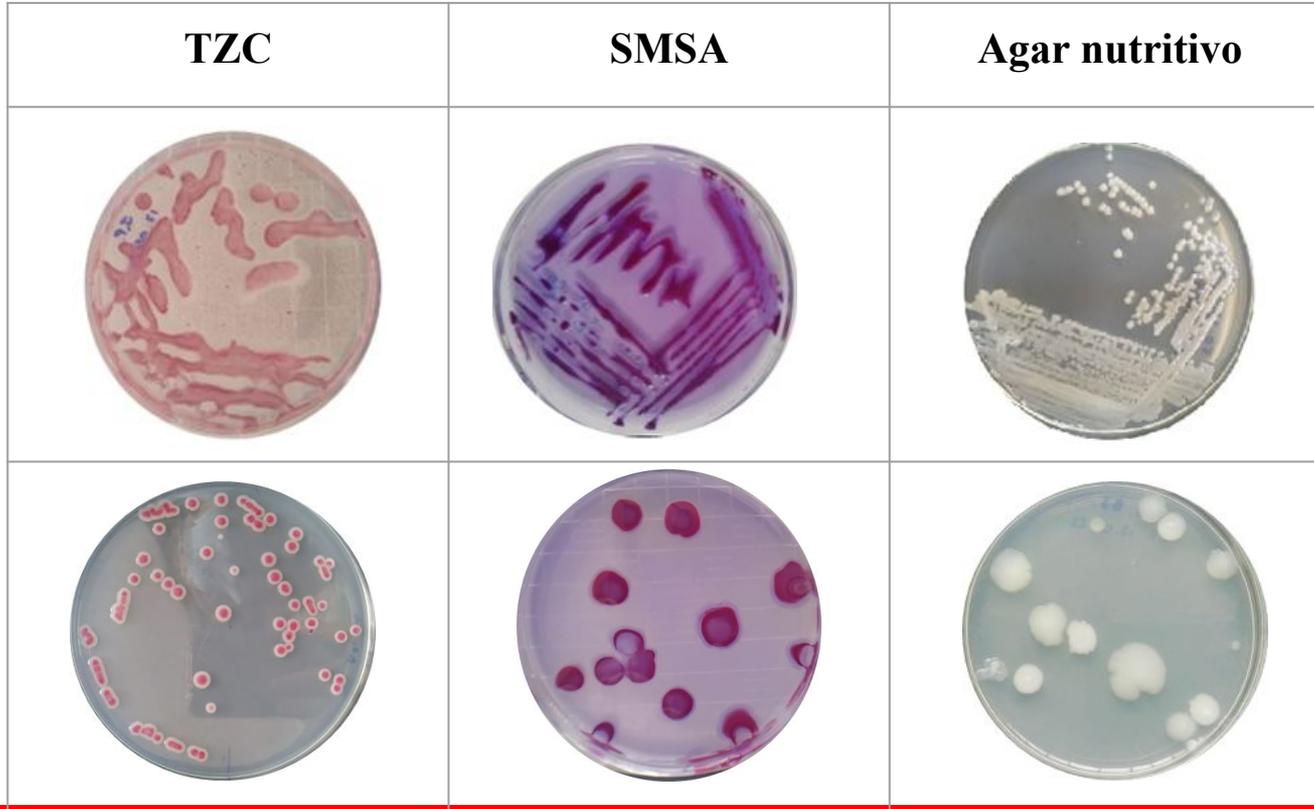
Materiales y métodos

→ Resultados y discusión

Conclusiones

Recomendaciones





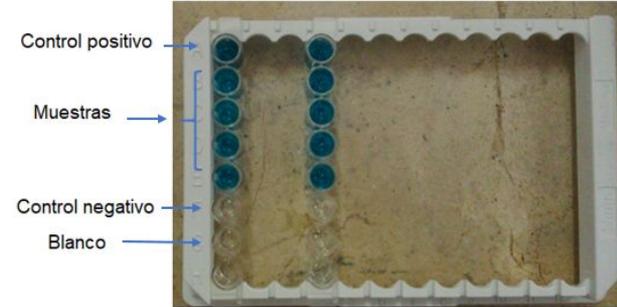
Color rosadas con un halo blanquecino alrededor, fluidas.

Colonias de más de 4 mm de diámetro.

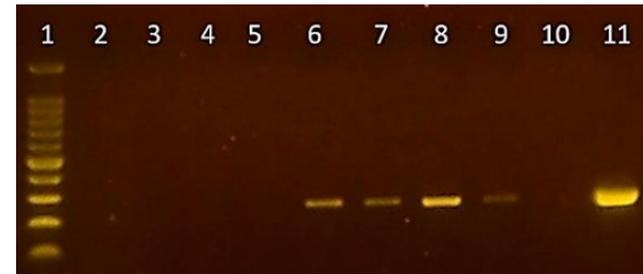
Pruebas bioquímicas

| Prueba bioquímica | Aislado 1 | Aislado 2 | Aislado 3 | Aislado 4 |
|--------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Reducción de nitratos | + | + | + | + |
| Citrato | + | + | + | + |
| Licuefacción de gelatina | - | - | - | - |
| Arginina dihidrolasa | - | - | - | - |
| Óxido Fermentación | + | + | + | + |
| Tinción Gram | - | - | - | - |
| Catalasa | + | + | + | + |
| Oxidasa | + | + | + | + |
| KOH 3% | + | + | + | + |

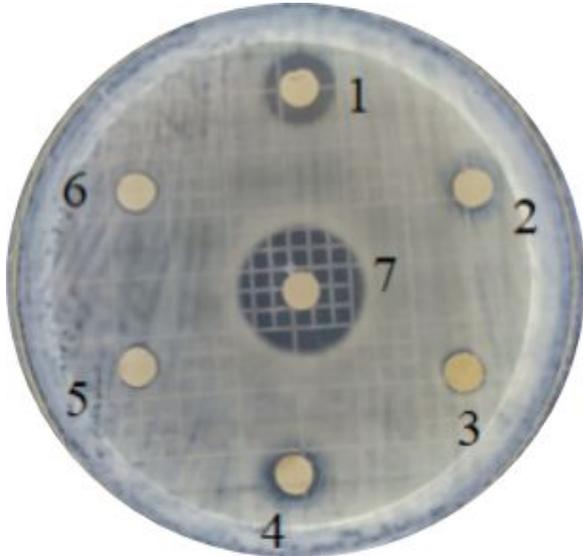
Inmunoensayo



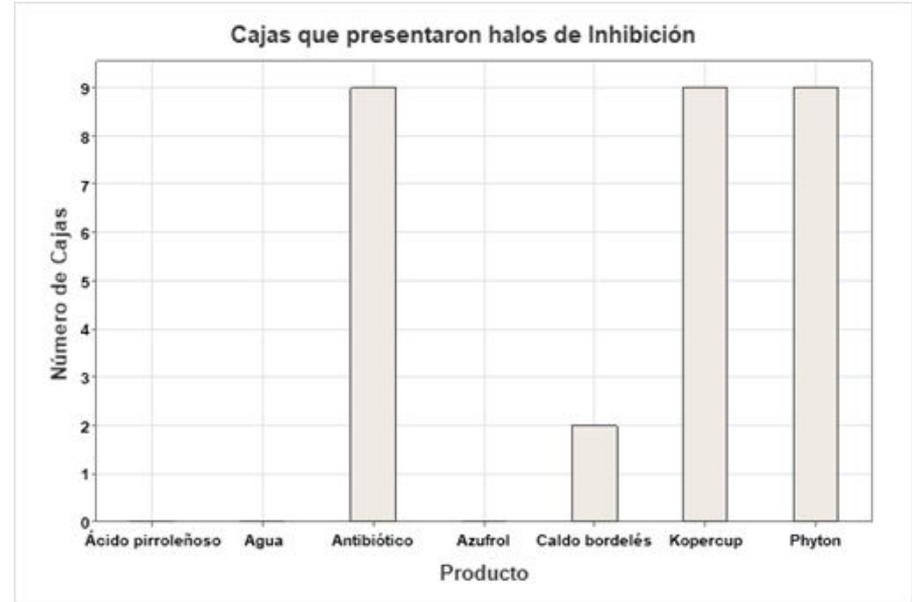
Pruebas moleculares



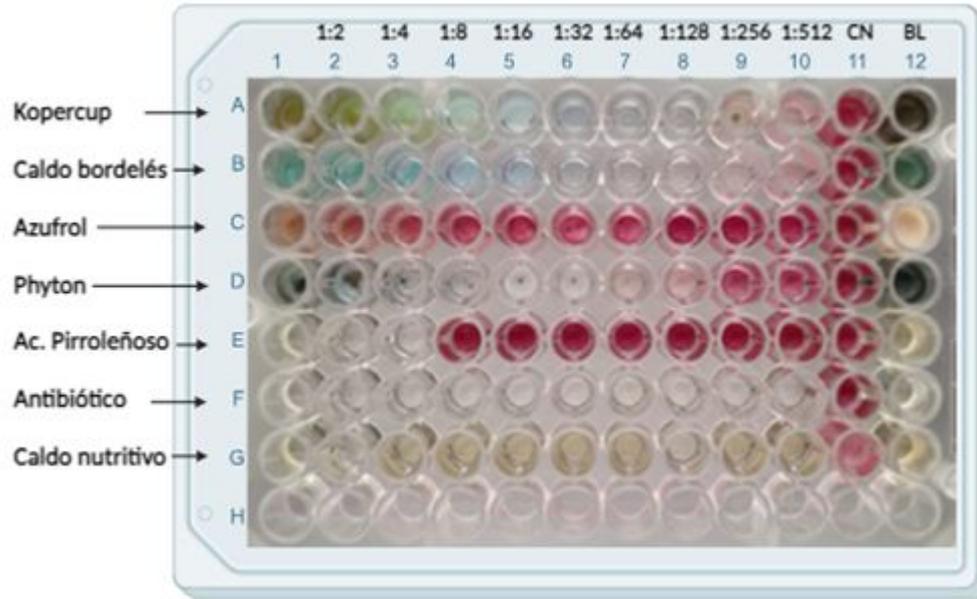
Difusión por disco



1)Kopercup, 2) Caldo Bordelés, 3) Azufrol, 4) Phytton, 5) Ácido pirroleñoso, 6) Agua destilada, 7) Antibiótico OBacter.



Microdilución en caldo

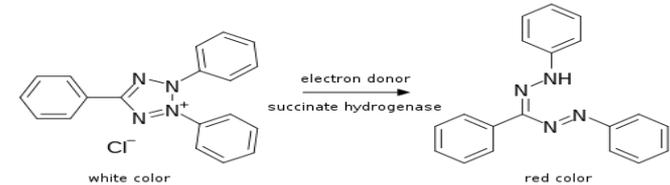


Nota. Elaborado en Biorender.

Análisis Probit con 95% de confianza

Concentración mínima inhibitoria de los productos utilizados.

| Productos | Concentración mínima inhibitoria (mg/mL) |
|------------------|--|
| Kopercup | 1.38 |
| Caldo bordelés | 2.78 |
| Azufrol | Ninguna |
| Phyton | 4.54 |
| Ácido Píroleñoso | 18.79 |



cloruro de
2,3,5-trifenil-2H-tetrazolio

TPF rojo
(1,3,5-trifenilformazán)



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

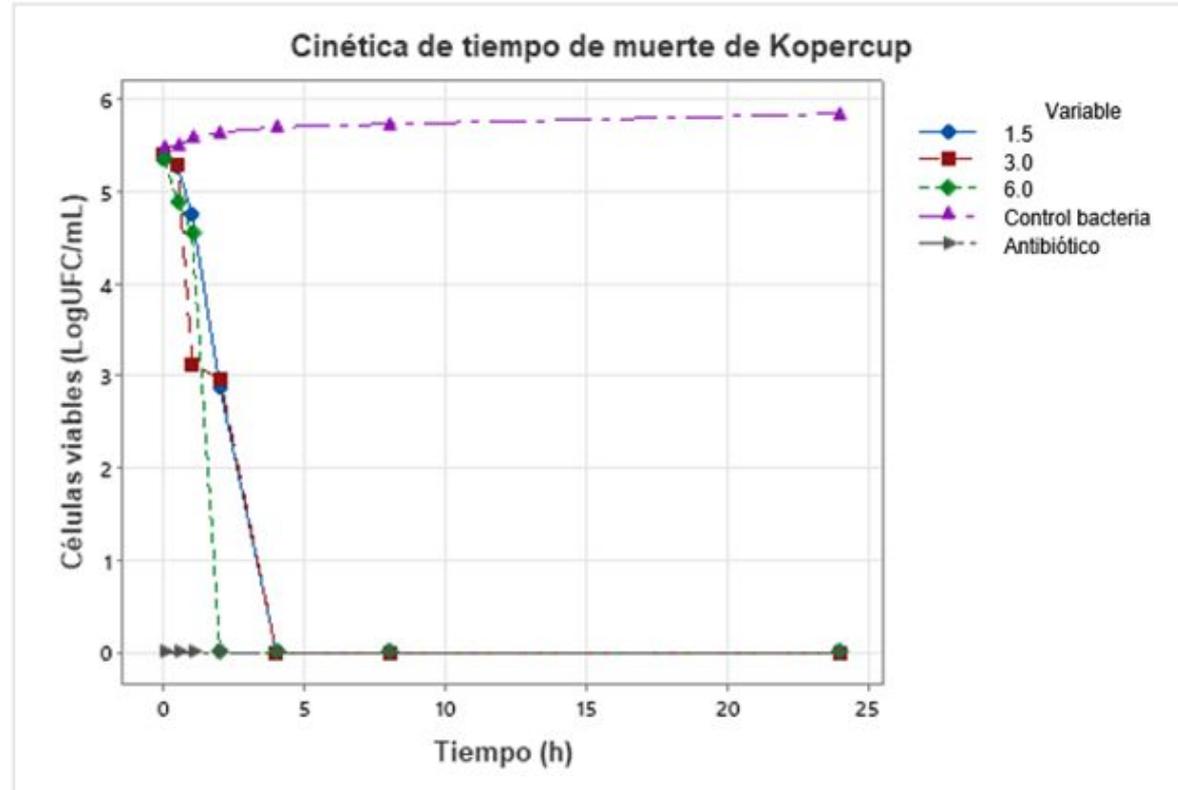
Macrodilución en caldo

Compuestos son bactericidas o bacteriostáticos

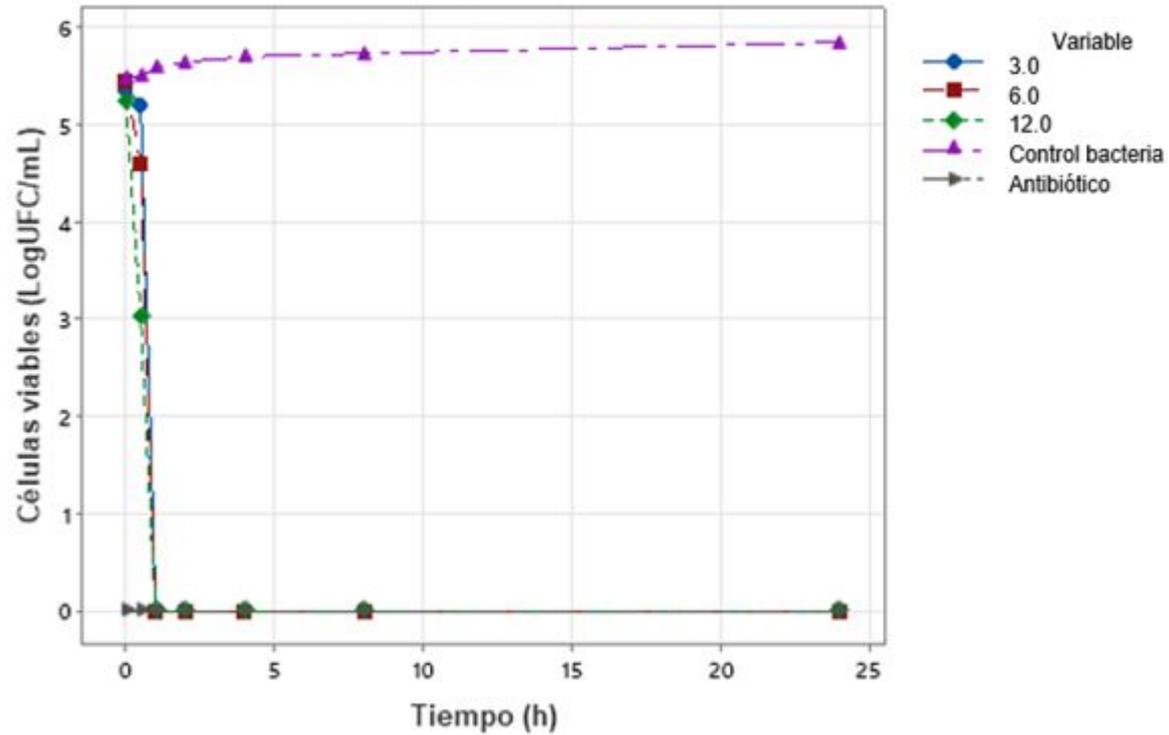
Disminución superior a 3 log 10 veces en las unidades formadoras de colonias

Concentraciones mínimas bactericidas de los compuestos probados

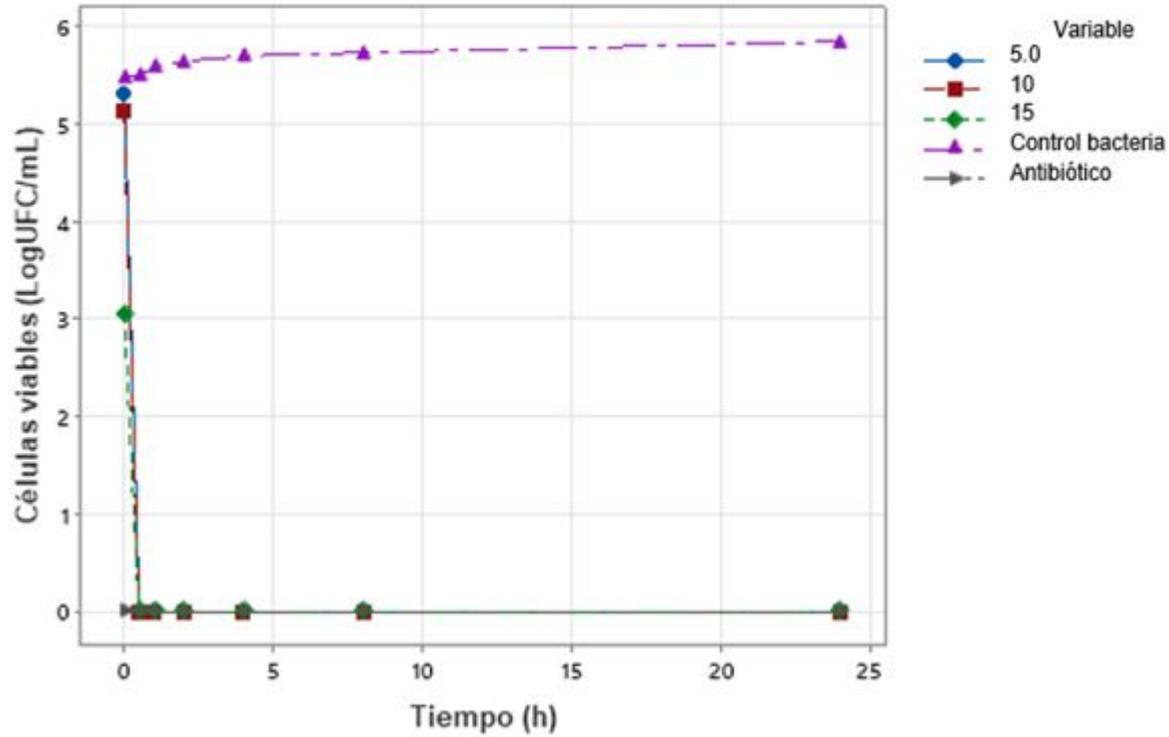
| Productos | Concentración mínima bactericida (mg/mL) |
|------------------|--|
| Kopercup | 1.5 |
| Caldo bordelés | 3.0 |
| Azufrol | Ninguna |
| Phyton | 5.0 |
| Ácido Piroleñoso | 76 |



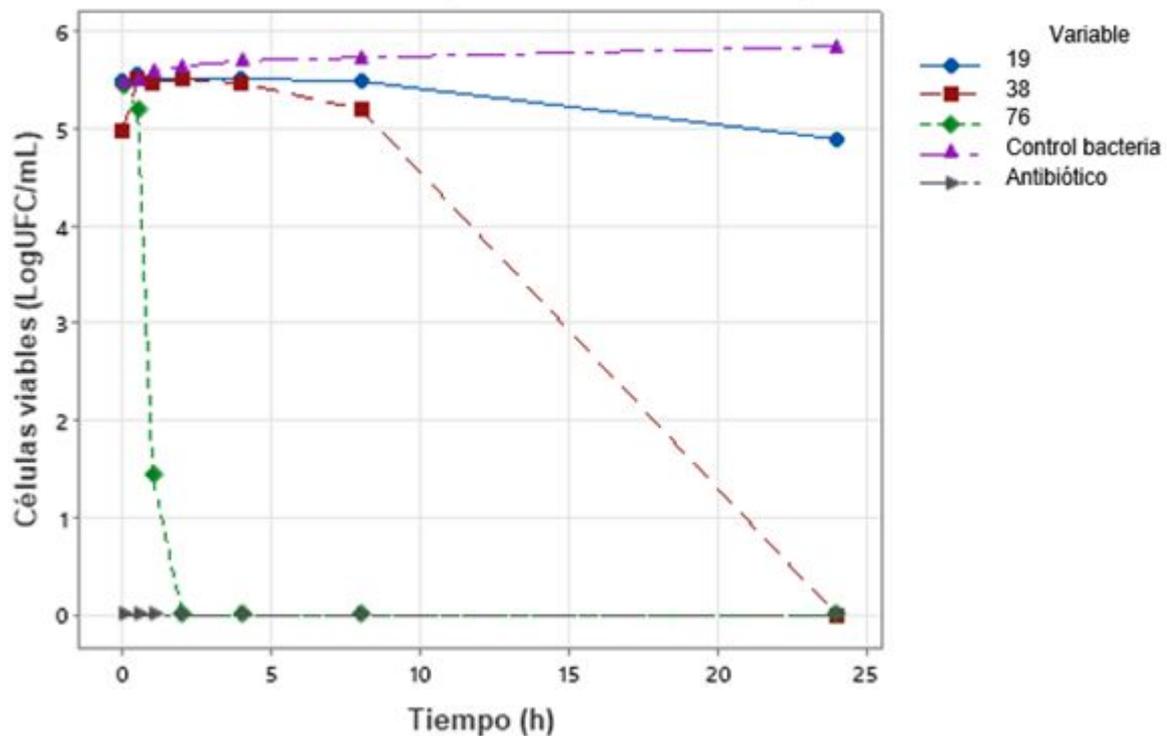
Cinética de tiempo de muerte de Caldo bordelés



Cinética de tiempo de muerte de Phyton



Cinética de tiempo de muerte de Ácido pirroleñoso





Oxícloruro de cobre

Compuestos de cobre

- ❖ Generación de especies reactivas del oxígeno.
- ❖ Inactivación de enzimas
- ❖ Exceso de cobre: permeabilidad de membranas, conductancia en membranas.



Linoleato de cobre



Sulfato de cobre pentahidratado



Ácido acético
Cetona
Alcoholes

Efecto antimicrobiano a ciertas concentraciones

Contenido

Introducción

Objetivos

Hipótesis

Materiales y métodos

Resultados y discusión

Conclusiones

Recomendaciones



Conclusiones

- ❖ Se aislaron varias cepas de bacterias encontradas en muestras con síntomas de *Moko* en Musáceas, para este propósito se utilizaron los medios TZC y SMSA, las características observadas en ambos medios estaban relacionadas con *R. solanacearum*.
- ❖ Las pruebas bioquímicas, serológicas y moleculares confirmaron la identidad taxonómica de cuatro de los aislados de los cuales se seleccionó y trabajó con tres en los próximos ensayos.
- ❖ Los ensayos de difusión en disco son insuficientes para determinar si existe inhibición de los productos probados frente a *R. solanacearum* ya que presenta varias limitaciones entre ellas el tipo de papel de los discos, la cantidad utilizada en cada uno, la difusión del producto en el agar, entre otras.



- ❖ La determinación de la concentración mínima inhibitoria CMI se llevó a cabo con un ensayo de microdilución colorimétrico en placa, mediante un análisis Probit al 95% de confianza se determinó que las CMI son las siguientes: Kopercup 1.5 mg/mL, Caldo bordelés 3.0 mg/mL, Azufrol, no mostró una CMI a las dosis probadas, Phyton 5.0 mg/mL y Ácido piroleñoso 19 mg/mL.
- ❖ El ensayo de Macrodilución permitió realizar curvas de letalidad bacteriana, los resultados muestran que los productos y sus dosis efectivas para generar un efecto bactericida (CMB) sobre una concentración de $2-3 \times 10^5$ UFC/mL de la bacteria *R. solanacearum* son: Kopercup, bactericida desde la dosis más baja correspondiente a la CMI (1.5 mg/mL). Caldo bordelés, efectiva como bactericida desde su CMI (3.0 mg/mL), Phyton, efectiva como bactericida desde su CMI (5.0 mg/mL) y Ácido piroleñoso mostrando un efecto bactericida únicamente en la dosis 4 veces su CMI (76 mg/mL).

Recomendaciones

- ❖ El análisis realizado en este proyecto es *in vitro*, se recomienda llevar estos resultados a campo y probar diferentes métodos de aplicación, y así saber si las dosis y los productos aquí descritos son útiles para la erradicación o control de la bacteria *Ralstonia solanacearum*.
- ❖ Los ensayos de determinación de la Concentración mínima inhibitoria CMI en microplacas tienen la opción de tener un análisis mucho más preciso cuando se leen las absorbancias de cada placa, se recomienda estandarizar un proceso de medición de células viables por espectrofotometría.

Agradecimientos



Francisco Javier Flores Flor PhD.

Director del proyecto UIC

Ing. Jairo Guevara Andrade

**Tutor empresarial del proyecto
UIC**



AGROCALIDAD

AGENCIA DE REGULACIÓN Y
CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA