



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS ESPE
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

Defensa del Proyecto de Integración Curricular

**Evaluación de microorganismos antagonistas para el control biológico
in vitro de *Ralstonia solanacearum*.**

Autor: Bedón Endara, Cristian Francisco

Quiroga Lozano Cristina Alexandra M.Sc.

Septiembre de 2023

FECHA ÚLTIMA REVISIÓN: 13/12/11

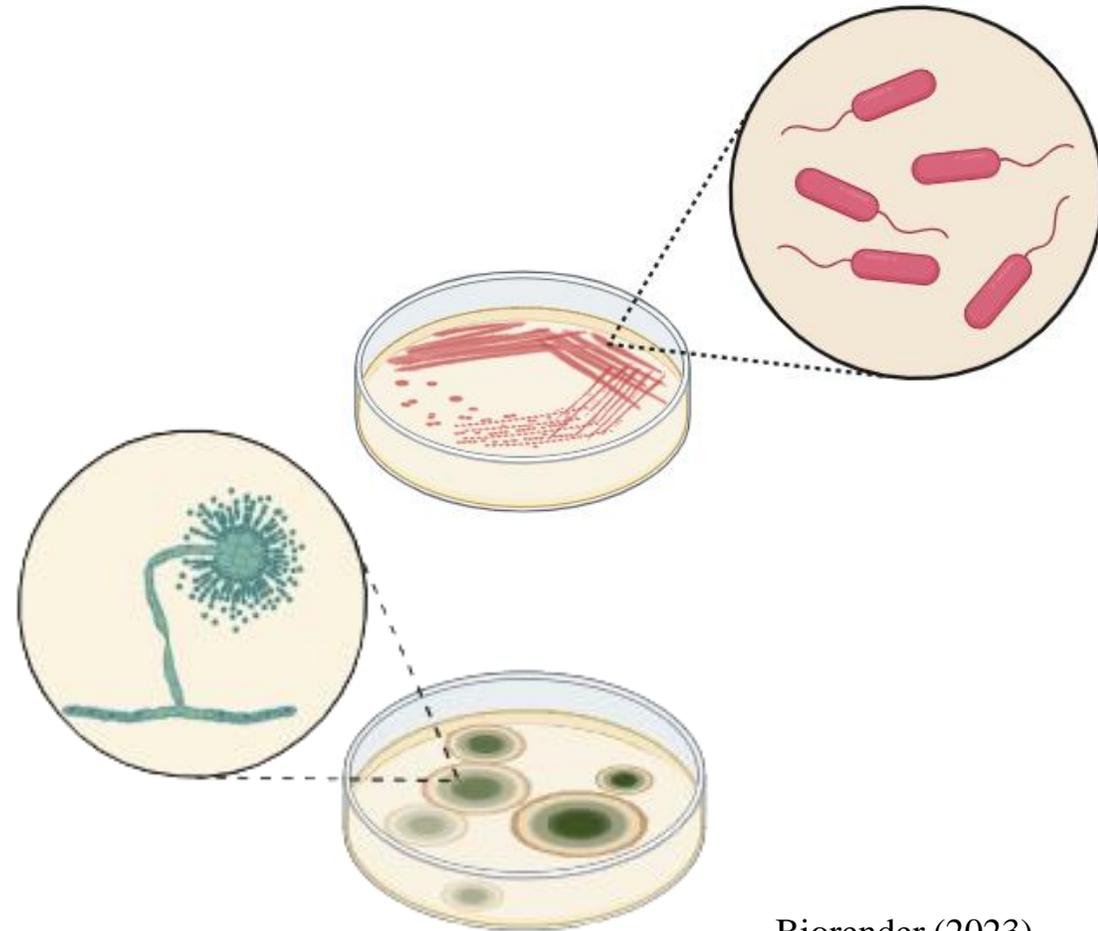
CÓDIGO: GDI.3.1.004

VERSIÓN: 1.0



Lista de contenidos

- Introducción
- Objetivos
- Materiales y Métodos
- Resultados y Discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones



Biorender (2023)



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Introducción

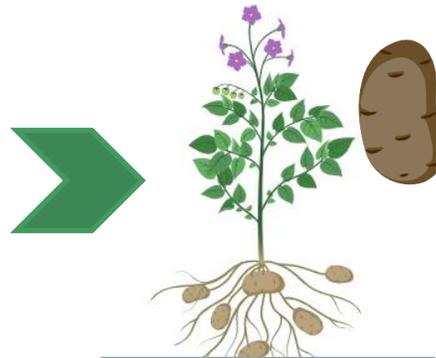
Ralstonia solanacearum es una bacteria fitopatógena y fue identificada como el agente causal de la marchitez bacteriana (Moko).

Moko es una enfermedad que provoca la marchitez rápida y muerte de las plantas a las que afecta.

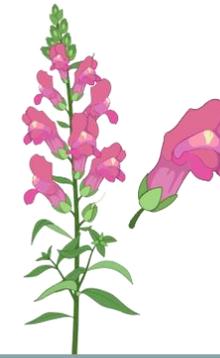
Fitopatógeno que tiene la capacidad de acabar hasta con 100% de una plantación infectada.

Afecta directamente a varios cultivos de plantas, reconocidos como cultivos de importancia económica .

Puede habitar en más de 200 hospederos, en 50 familias diferentes.



Solanáceas



Plantas ornamentales



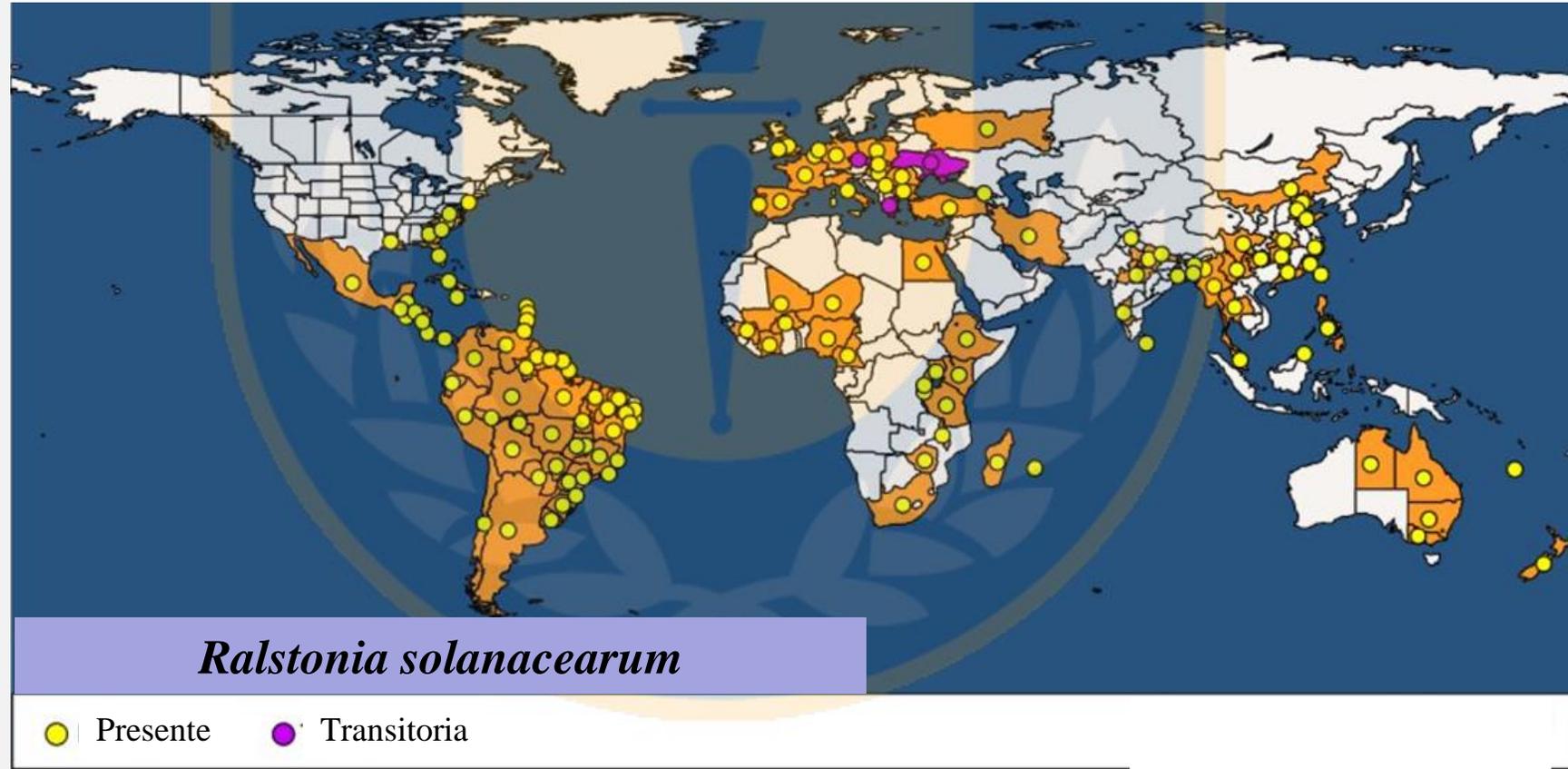
Musáceas

Catalogada como la segunda bacteria fitopatógena más destructiva a nivel mundial con graves afectaciones a la economía del sector agrícola. Pérdidas de más de USD 400 millones al año a nivel mundial.

Distribución geográfica

Asociada a:

- Microorganismo biotrófico.
- Amplio rango de hospederos.
- Adaptabilidad a climas templados, regiones tropicales y subtropicales.
- Resistencia a mecanismos de control químicos.
- Fenómenos naturales.
- Fácil diseminación de forma mecánica.
- Agua de riego contaminada con el fitopatógeno.
- Limitada rotación de cultivos.
- Exportación e importación de musáceas infectadas.



Realidad del Ecuador

En Ecuador el cultivo y la exportación de musáceas tiene una gran importancia socioeconómica, tanto a nivel de Latinoamérica como a nivel mundial.

Generando un ingreso anual de USD 2.999.555.544 (MAG, 2018).

Exportación:

- El cultivo de banano (*Musa AAA*). 15% de envíos internacionales para el país.
- El cultivo de plátano (*Musa AAB*). 17%, el quinto cultivo más relevante a escala mundial.

Desde el 2017 la producción orgánica del Ecuador cuenta con un sello distintivo que garantiza que los alimentos orgánicos se encuentren libres de agroquímicos como plaguicidas, fomentando la viabilidad ambiental y el avance en una secuencia productiva de carácter ético y responsable.



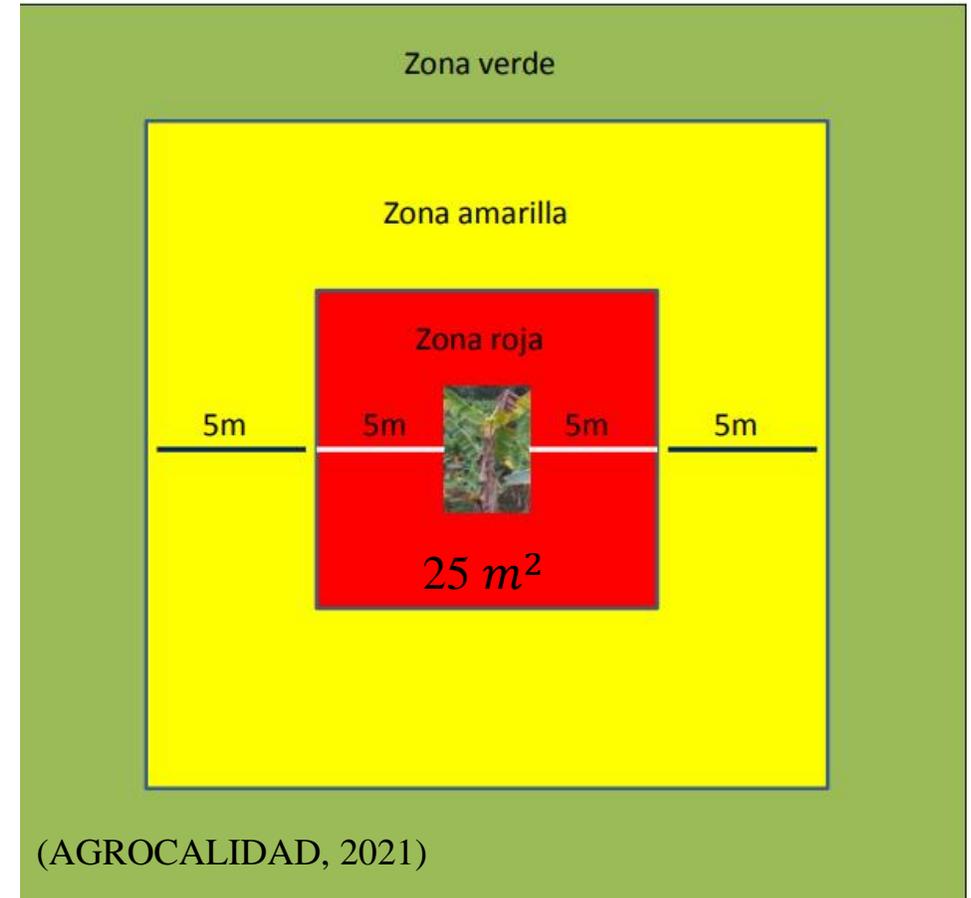
Biorender (2023)

Control de *Ralstonia solanacearum*.

- La medida recomendada para el control de la enfermedad del Moko es la erradicación total de las plantas afectadas.
- Norma Internacional sobre Medidas Fitosanitarias No. 4 - Fitosanitarias de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura – FAO
- **Limitación de zonas infectadas**
- **Erradicación:** Solución glifosato al 20% mediante una jeringa graduada. Volumen de 50 ml para ejemplares adultos y 30 ml para plántulas.
- **Desinfección:** Productos a base de hipoclorito o amonio cuaternario.
- **Tiempo sin cultivo:** 6 – 12 meses.
- Sin embargo estudios en los últimos 5 años indican que este tipo de control ya no son eficientes y causan más daños tanto al medio ambiente como al ser humano.

(FAO, 2020)

Control



Control biológico

Organismos antagonistas

- Bacterias,
- Hongos.
- Virus.
- Parásitos.
- Bacteriófagos.

Variables

- Control biológico es preventivo no curativo.

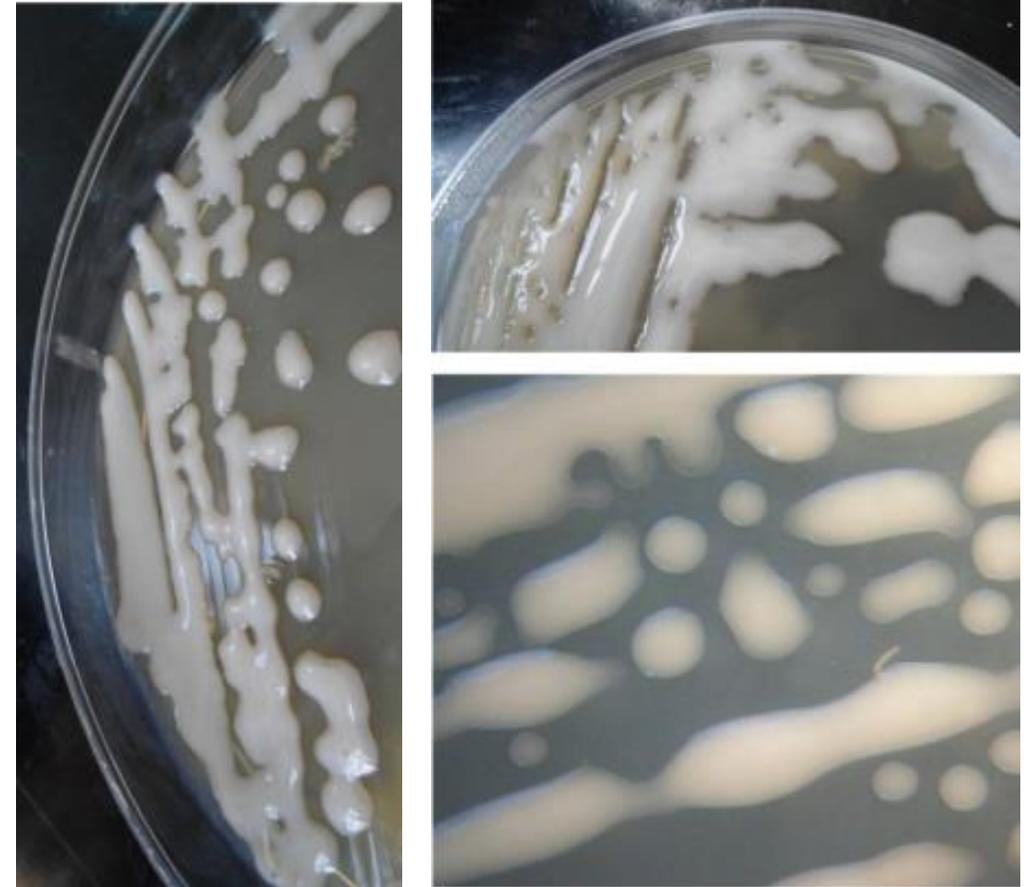


Objetivo general

Evaluar microorganismos antagonistas para el control biológico *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*.

Hipótesis

Al menos uno de los microorganismos aislados a partir de muestras de suelo, compostaje y material vegetal presentan una respuesta antagonista significativamente mayor para el control biológico *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*.



(Champoiseau, 2023).



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Objetivo específico 1

- Identificar *Ralstonia solanacearum* mediante pruebas fenotípicas y bioquímicas.

Metodología

Identificación de sintomatología de Moko en Musáceas



Muerte progresiva de musáceas jóvenes



Deseccación de la hoja bandera

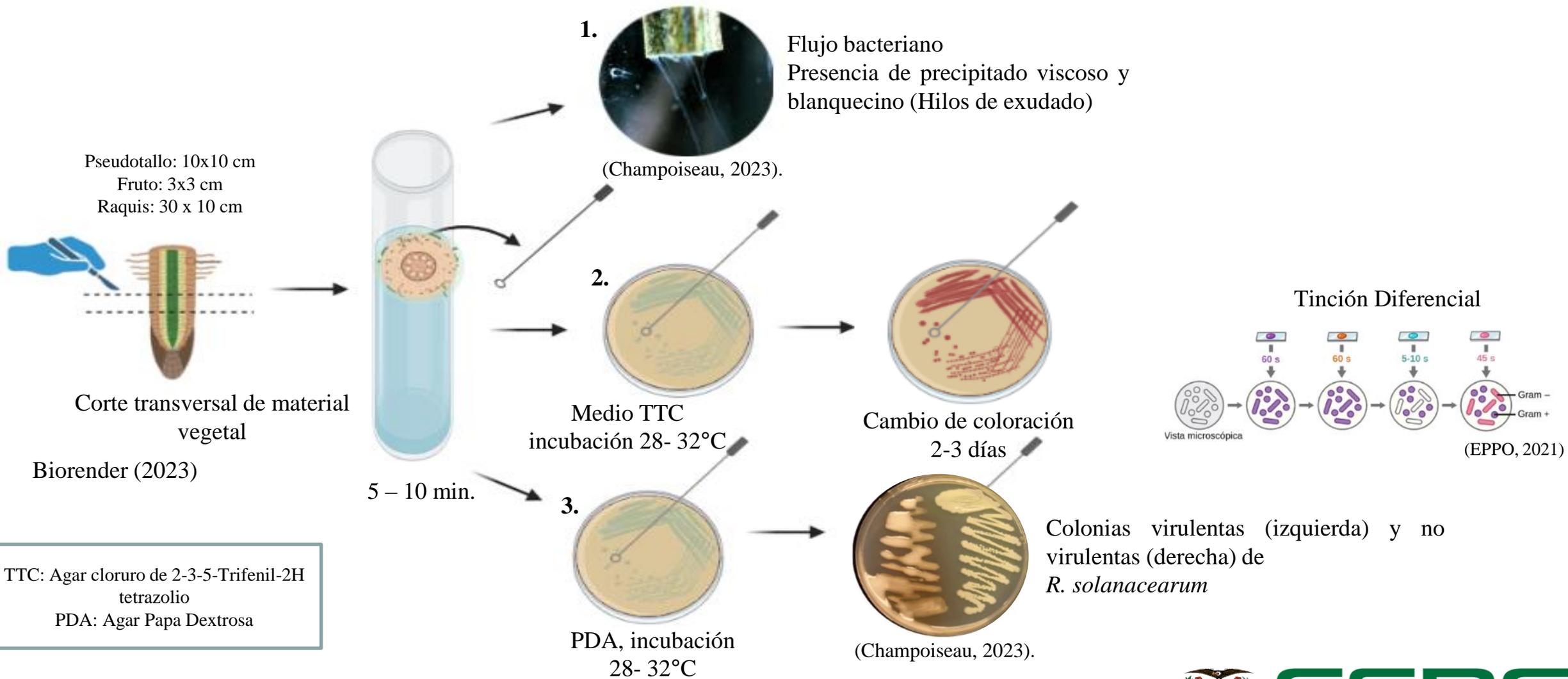


Desarrollo anormal de los frutos



Pudrición interna

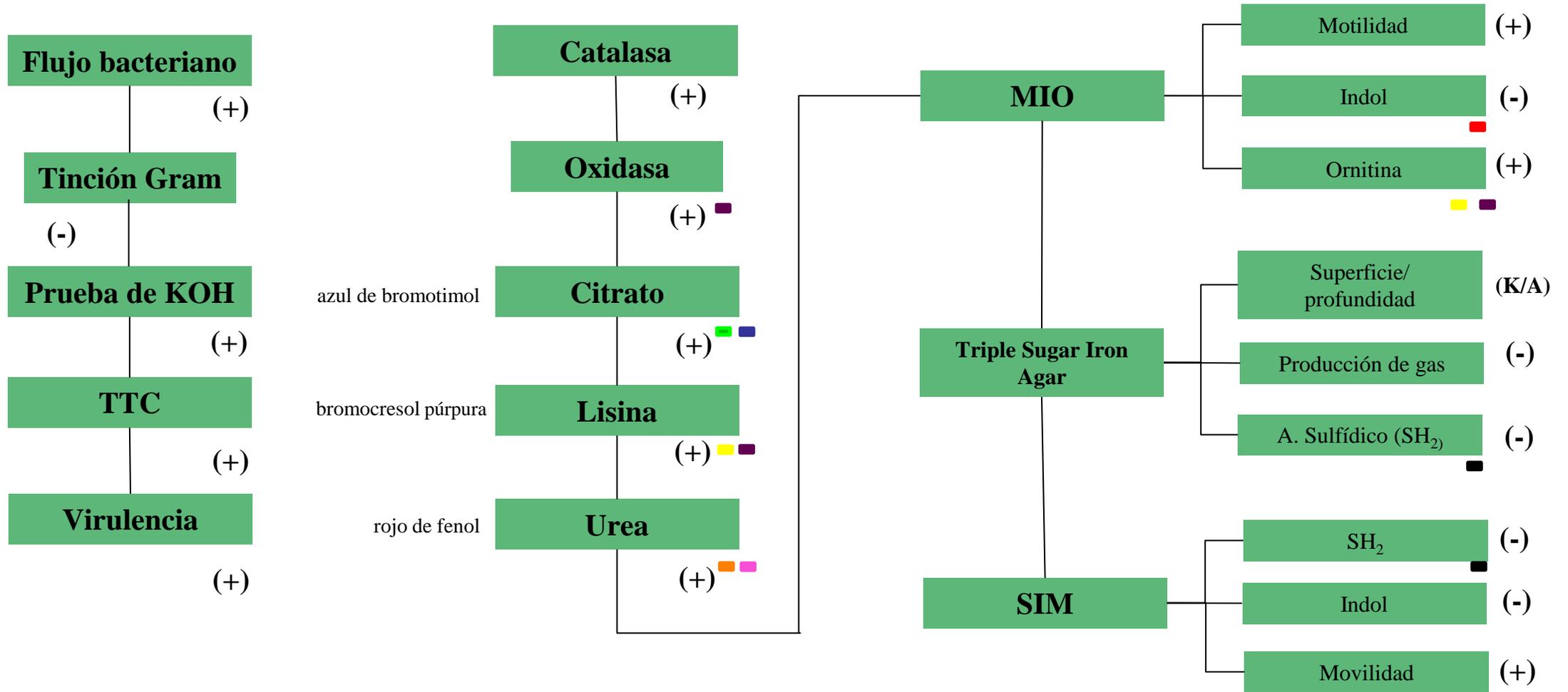
Aislamiento de *Ralstonia solanacearum*.



(Blanco et al., 2021) (Cruz, 2023).



Pruebas fenotípicas y bioquímicas para identificar *Ralstonia solanacearum*



Resultados

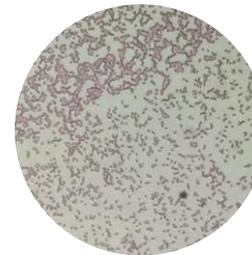
Tabla 1.

Pruebas bioquímicas

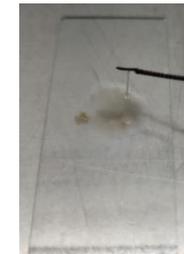
Muestra	Cepa CP01		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
Pruebas fenotípicas			
Flujo bacteriano	+	+	+
Tinción Gram	-	-	-
KOH	+	+	+
TTC	+	+	+
Virulenta	+	+	+
Pruebas Bioquímicas			
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	+	+	+
Citrato	+	+	+
Lisina	+	+	+
Urea	+	+	+



Hilos de exudado



Gram - 100X



KOH



TTC



Cepa virulenta

(AGROCALIDAD, 2023)

Nota: La tabla muestra las diferentes pruebas fenotípicas y bioquímicas para la identificación de *R. solanacearum*

(Sánchez, 2021)



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Tabla 2.

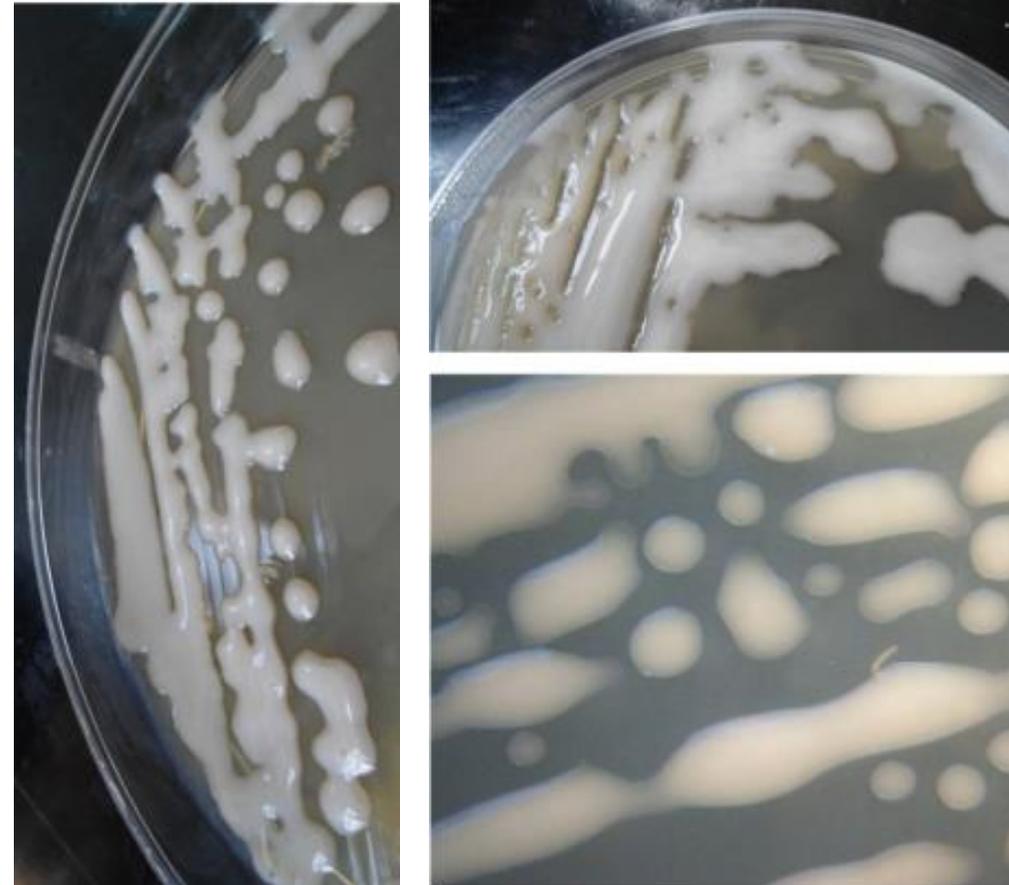
Pruebas bioquímicas

	Muestra	Cepa CP01		
		Repeticiones		
		1	2	3
		Pruebas bioquímicas		
MIO	Motilidad	+	+	+
	Indol	-	-	-
	Ornitina descarboxilasa	+	+	+
TSI	Superficie/profundidad	K/A	K/A	K/A
	Producción de gas	-	-	-
	Producción de SH ₂	-	-	-
SIM	SH ₂	-	-	-
	Indol	-	-	-
	Motilidad	+	+	+

Nota: La tabla muestra las diferentes pruebas bioquímicas para la identificación de *R. solanacearum*. K/A representa el tipo de acidificación o basicidad que produce la bacteria en el medio, con referencia al tipo de azúcar que degrada en este caso *R. solanacearum* degrada la glucosa al utilizarla como fuente de energía

Objetivo específico 2

Aislar microorganismos potencialmente antagonistas a partir de muestras de suelo, compostaje y material vegetal utilizando medios de cultivo selectivos y diferenciales.



(Champoiseau, 2023).



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Metodología

Muestras:

- Suelo
- Compost
- Material vegetal



1 kg de muestra
homogeneizada



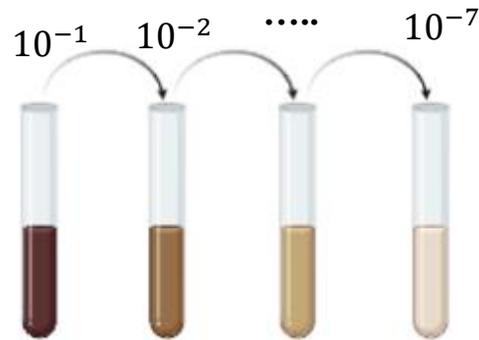
Alícuota 0,50kg



Agitación 1 hora
100 rpm en 250 ml de
agua destilada



Muestra
homogeneizada



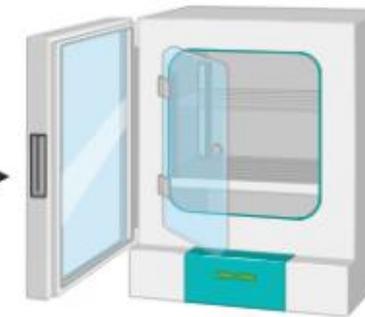
Diluciones seriadas,
siembra:
 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-7}



Agar Nutritivo



Agar Rosa Bengala +
Cloranfenicol + Diclorán
(DRBC)



Incubación 72 horas a
28 – 30°C

Biorender (2023)



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Pruebas fenotípicas y bioquímicas para identificación de microorganismos antagonistas

Muestra	Cepa CA01 (<i>Bacillus</i> spp.)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
Pruebas morfológicas			
Tinción Gram	+	+	+
KOH	-	-	-
Morfología colonia	No filamentosa	No filamentosa	No filamentosa
Coloración	Crema	Crema	Crema
Margen	Entero	Entero	Entero
Morfología micro.	bacilar	bacilar	bacilar
Esporas	+	+	+
Pruebas Bioquímicas			
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	-	-	-
Urea	-	-	-

Muestra	Cepa CA02 (<i>Bacillus</i> spp.)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
Pruebas morfológicas			
Tinción Gram	+	+	+
KOH	-	-	-
Morfología colonia	Filamentosa	Filamentosa	Filamentosa
Coloración	Blanco	Blanco	Blanco
Margen	Ondulado	Ondulado	Ondulado
Morfología micro.	bacilar	bacilar	bacilar
Esporas	+	+	+
Pruebas Bioquímicas			
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	-	-	-
Urea	-	-	-

Pruebas fenotípicas y bioquímicas para identificación de microorganismos antagonistas

Muestra	Cepa CA03 (<i>Bacillus</i> spp.)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
Pruebas morfológicas			
Tinción Gram	+	+	+
KOH	-	-	-
Morfología colonia	Filamentosa	Filamentosa	Filamentosa
Coloración	Blanco	Blanco	Blanco
Margen	Ondulado	Ondulado	Ondulado
Morfología micro.	bacilar	bacilar	bacilar
Esporas	+	+	+
Pruebas Bioquímicas			
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	-	-	-
Urea	-	-	-

Muestra	Cepa CA04 (<i>Actinomicete</i> spp.)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
Pruebas morfológicas			
Tinción Gram	+	+	+
KOH	-	-	-
Morfología colonia	Seca-rugosa	Seca-rugosa	Seca-rugosa
Morfología micro.	Filamentosa	Filamentosa	Filamentosa
Geosmina	+	+	+
DRBC	-	-	-
Pruebas Bioquímicas			
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	-	-	-
Producción de gas	-	-	-

Pruebas fenotípicas y bioquímicas para identificación de microorganismos antagonistas

Muestra	Cepa CA05 (<i>Pseudomonas</i> spp.)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
Pruebas morfológicas			
Tinción Gram	-	-	-
Morfología colonia	Lisas	Lisas	Lisas
Coloración	Claro	Claro	Claro
Margen	Mucoide	Mucoide	Mucoide
2-aminoacetofenona	+	+	+
Morfología micro.	Bastón	Bastón	Bastón
Esporas	-	-	-
Pruebas Bioquímicas			
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	+	+	+
Urea	-	-	-

Muestra	Cepa CA06 (<i>Pseudomonas</i> spp.)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
Pruebas morfológicas			
Tinción Gram	-	-	-
Morfología colonia	Lisas	Lisas	Lisas
Coloración	Claro	Claro	Claro
Margen	Mucoide	Mucoide	Mucoide
2-aminoacetofenona	-	-	-
Morfología micro.	Bastón	Bastón	Bastón
Esporas	-	-	-
Pruebas Bioquímicas			
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	+	+	+
Urea	-	-	-

Pruebas fenotípicas y bioquímicas para identificación de microorganismos antagonistas

Muestra	Cepa CA09 (<i>Trichoderma</i> spp.)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
Pruebas morfológicas			
Morfología colonia	Aterciopelada	Aterciopelada	Aterciopelada
Crecimiento	Radial	Radial	Radial
Coloración	Verdosa	Verdosa	Verdosa
Conidios	-	-	-
Morfología micro.	Fialides y conidias	Fialides y conidias	Fialides y conidias
	Hifas- septos	Hifas- septos	Hifas- septos
DRBC	+	+	+

Muestra	Cepa CA10 (<i>Trichoderma</i> spp.)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
Pruebas morfológicas			
Morfología colonia	Aterciopelada	Aterciopelada	Aterciopelada
Crecimiento	Radial	Radial	Radial
Coloración	Verdosa	Verdosa	Verdosa
Conidios	+	+	+
Morfología micro.	Fialides y conidias	Fialides y conidias	Fialides y conidias
	Hifas- septos	Hifas- septos	Hifas- septos
DRBC	+	+	+

Pruebas fenotípicas y bioquímicas para identificación de microorganismos antagonistas

Muestra	Cepa CA11 (<i>Trichoderma</i> spp.)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
Pruebas morfológicas			
Morfología colonia	Aterciopelada	Aterciopelada	Aterciopelada
Crecimiento	Radial	Radial	Radial
Coloración	Blanca	Blanca	Blanca
Conidios	-	-	-
Morfología micro.	Fialides y conidias	Fialides y conidias	Fialides y conidias
	Hifas- septos	Hifas- septos	Hifas- septos
DRBC	+	+	+

Muestra	Cepa CA08 (<i>Penicillium</i> spp.)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
Pruebas morfológicas			
Morfología colonia	Aterciopelada	Aterciopelada	Aterciopelada
Crecimiento	Radial irregular	Radial irregular	Radial irregular
Coloración	Azul verdosa	Azul verdosa	Azul verdosa
Conidios	+	+	+
Morfología micro.	Conidias	Conidias	Conidias
DRBC	+	+	+

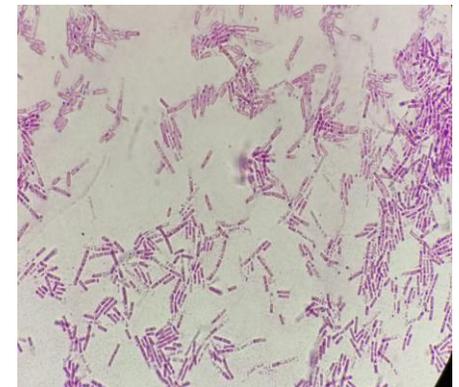
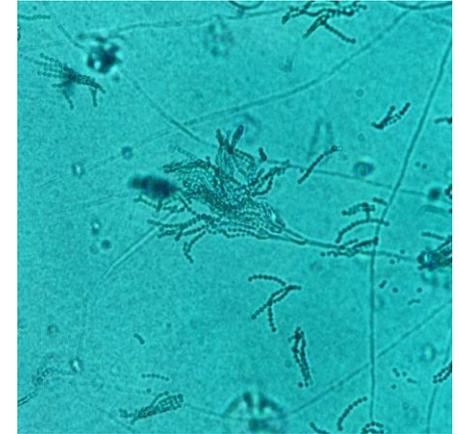
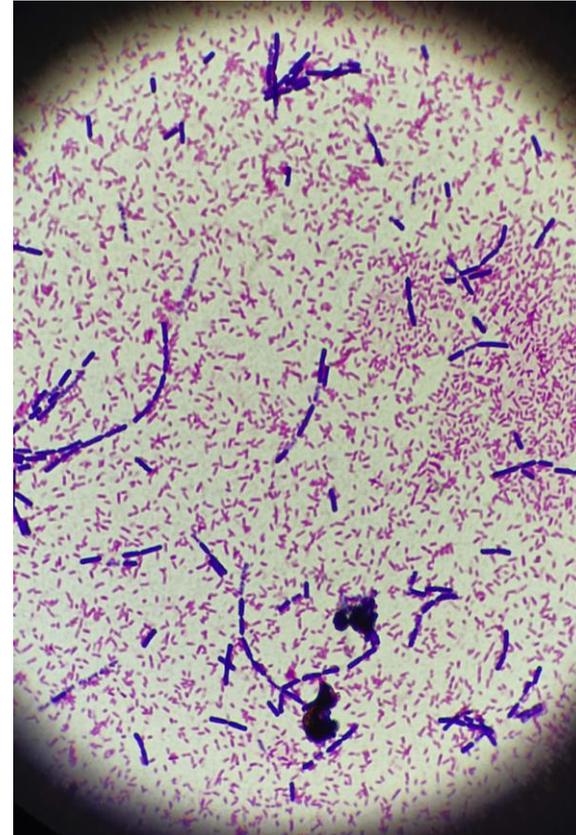
Pruebas fenotípicas y bioquímicas para identificación de microorganismos antagonistas

Muestra	Cepa CA12 (<i>Metarhizium</i> spp.)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
Pruebas morfológicas			
Morfología colonia	Algodonosa	Algodonosa	Algodonosa
Crecimiento	Radial	Radial	Radial
Coloración	Beige	Beige	Beige
Conidios	+	+	+
Morfología micro.	forma de racimo	forma de racimo	forma de racimo
DRBC	+	+	+

Muestra	Cepa CA13 (<i>Beauveria</i> spp.)		
	Repeticiones (n)		
	n1	n2	n3
Pruebas morfológicas			
Morfología colonia	Aterciopelada	Aterciopelada	Aterciopelada
Crecimiento	Radial	Radial	Radial
Coloración	Blanco	Blanco	Blanco
Conidios	+	+	+
Morfología micro.	Conidios en cadenas	Conidios en cadenas	Conidios en cadenas
DRBC	+	+	+

Objetivo específico 3

- Evaluar la respuesta antagonista de los microorganismos seleccionados para el control biológico *in vitro* de *Ralstonia solanacearum* mediante técnicas de inhibición.



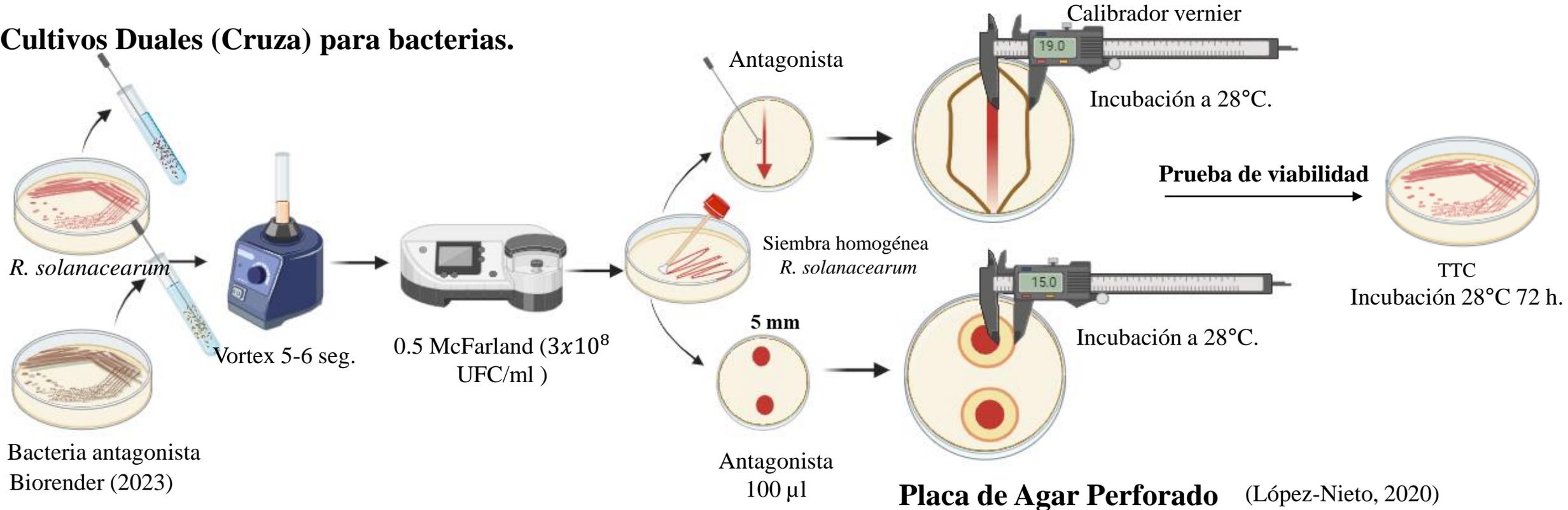
(AGROCALIDAD, 2023)



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Metodología

Cultivos Duales (Cruza) para bacterias.



Tasa de extensión radial:

$$\text{Tasa de extensión radial: } \frac{(x_2 - x_1)}{(t_2 - t_1)}$$

x = diámetro (mm)
t = tiempo (h)

Porcentaje de colonización (%):

$$PC: \frac{\text{Tasa de extensión radial}}{(r)} 100$$

r : radio de la caja Petri (mm)

Índice de inhibición (%):

$$\text{Índice de inhibición} = \frac{\text{Diámetro del halo de inhibición}}{\text{Diámetro cepa antagonista}} * 100$$

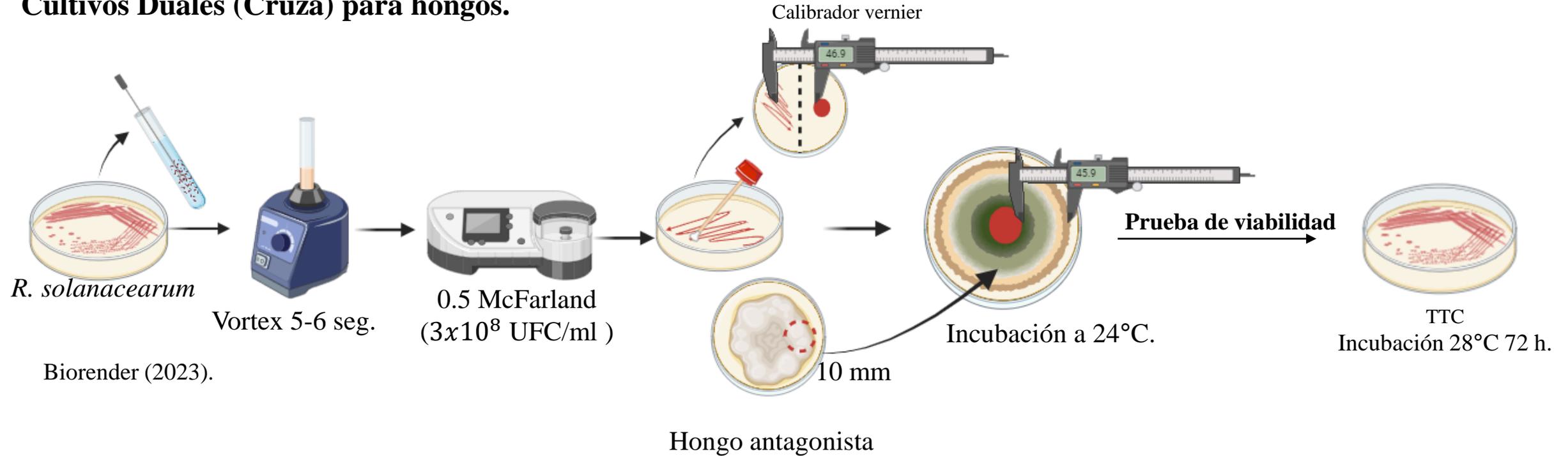
(López, 2020) (Morales, 2016).



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Metodología

Cultivos Duales (Cruza) para hongos.



Tasa de extensión radial:

$$\text{Tasa de extensión radial: } \frac{(x_2 - x_1)}{(t_2 - t_1)}$$

x = diámetro (mm)

t = tiempo (h)

Porcentaje de colonización (%)

$$PC: \frac{\text{Tasa de extensión radial}}{(r)} 100$$

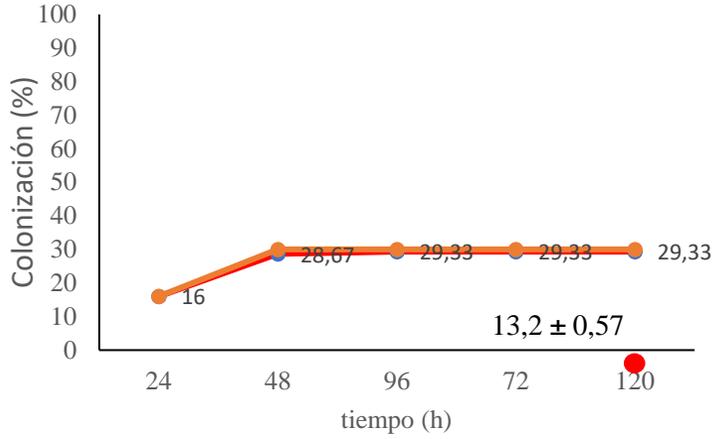
r : radio de la caja Petri (mm)

Resultados

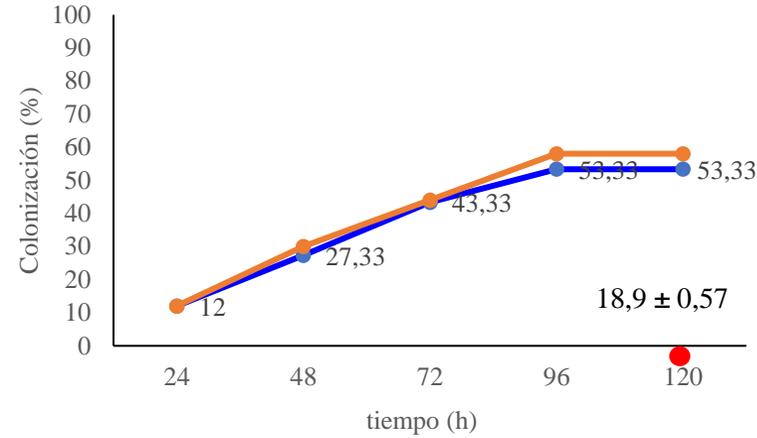
Control

Porcentaje de colonización (%):

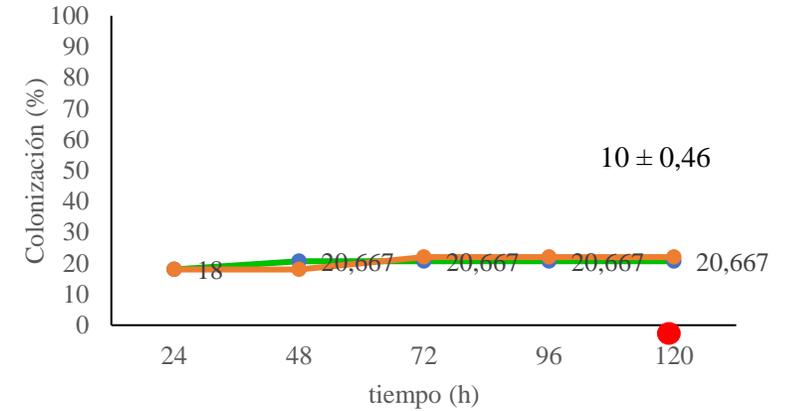
CA01



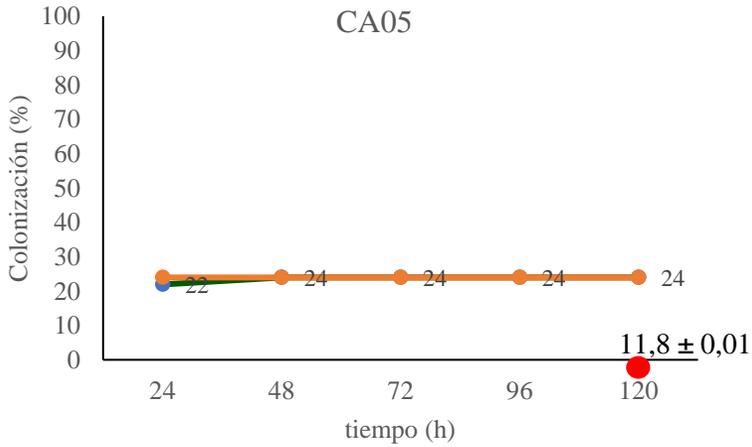
CA02



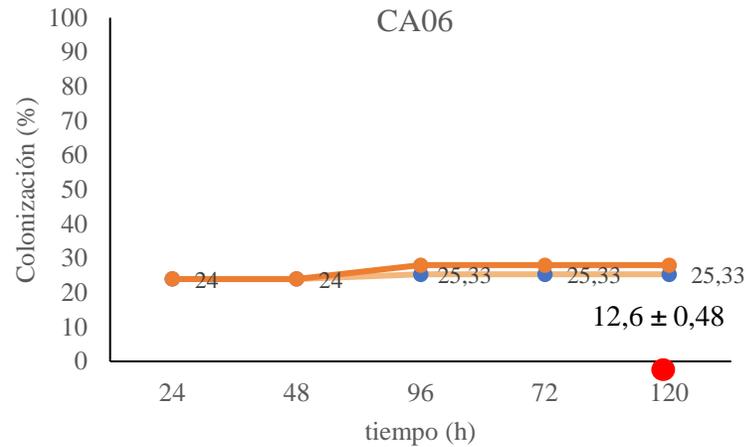
CA03



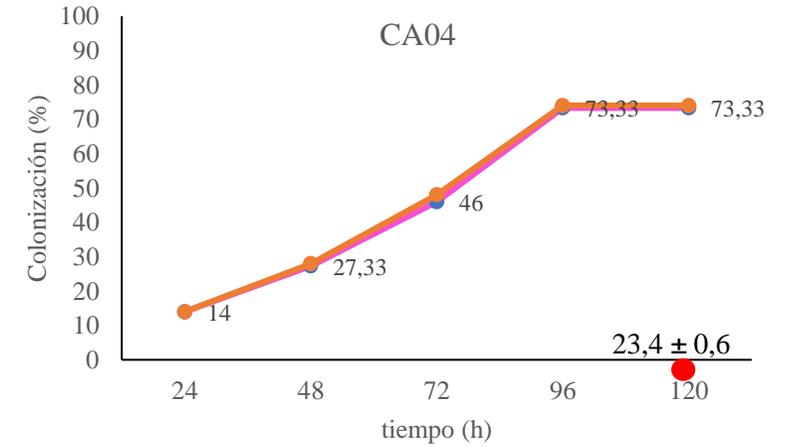
CA05



CA06

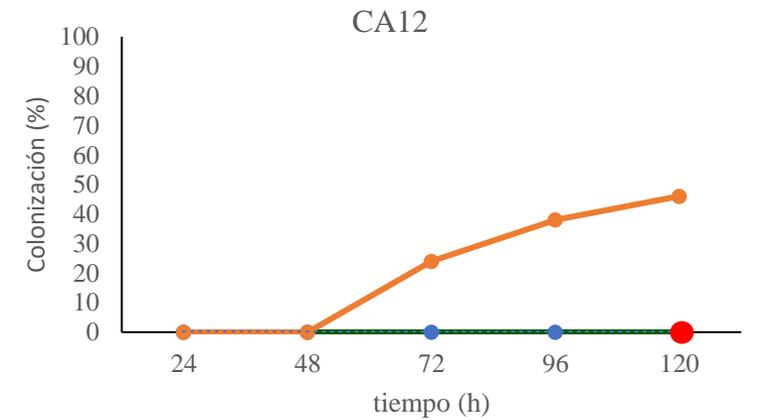
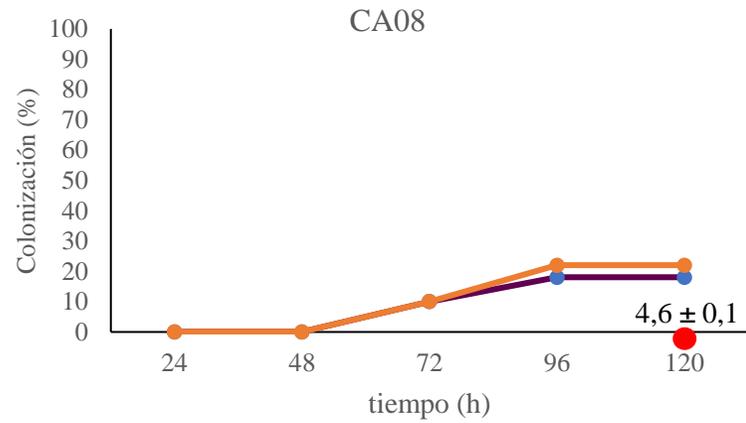
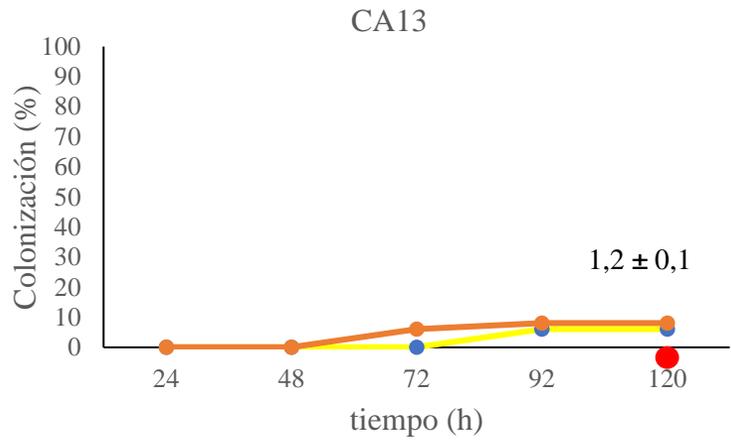
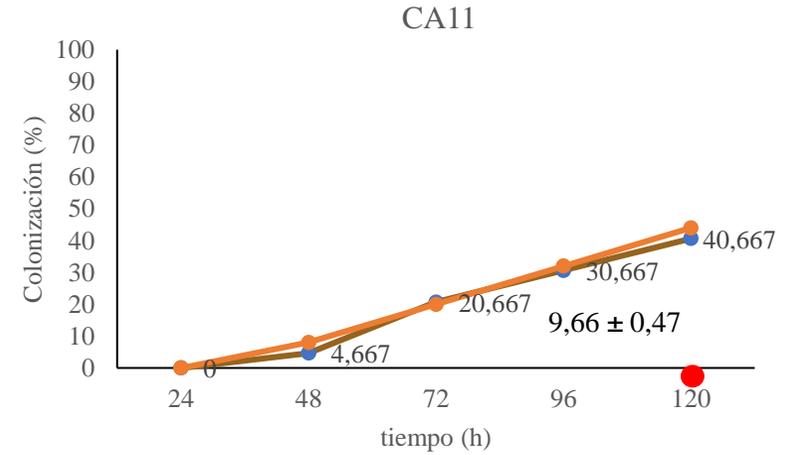
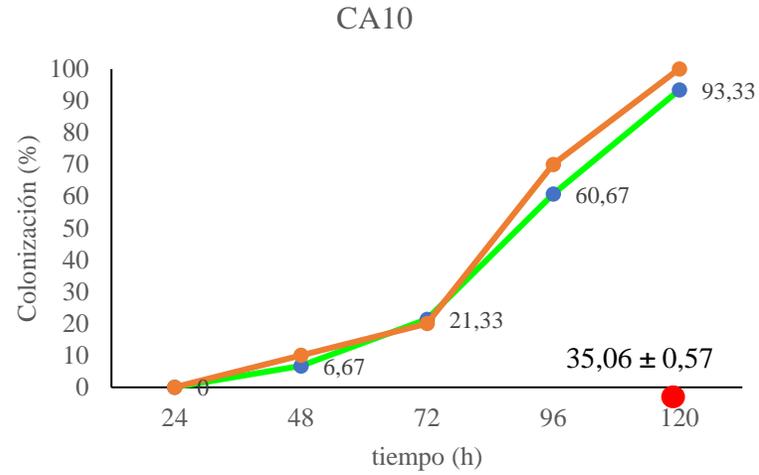
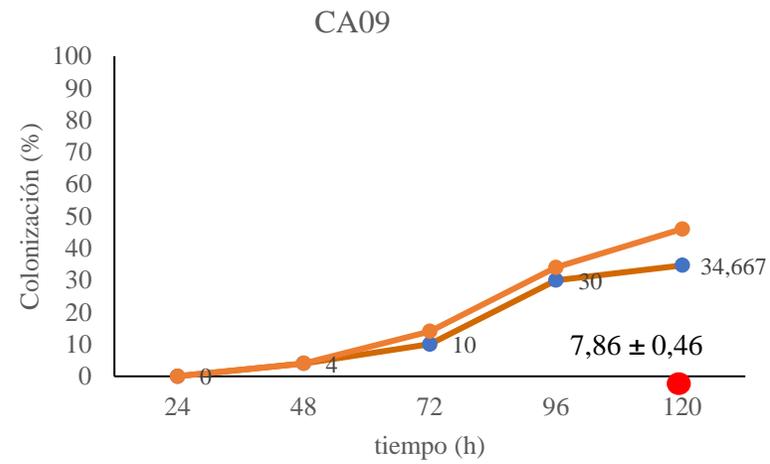


CA04



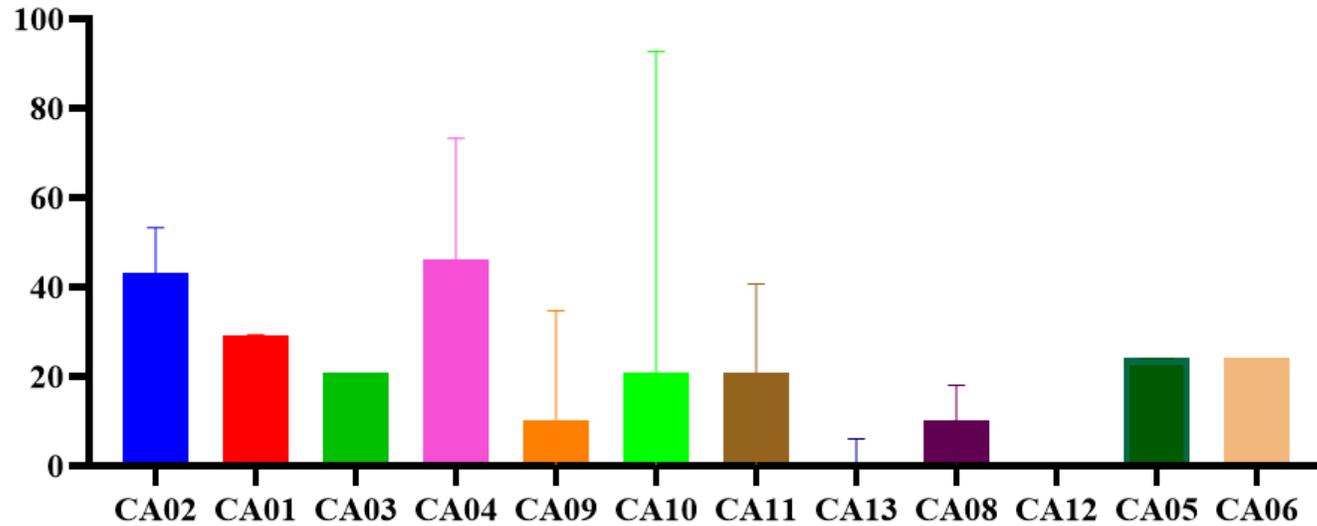
Resultados

Control

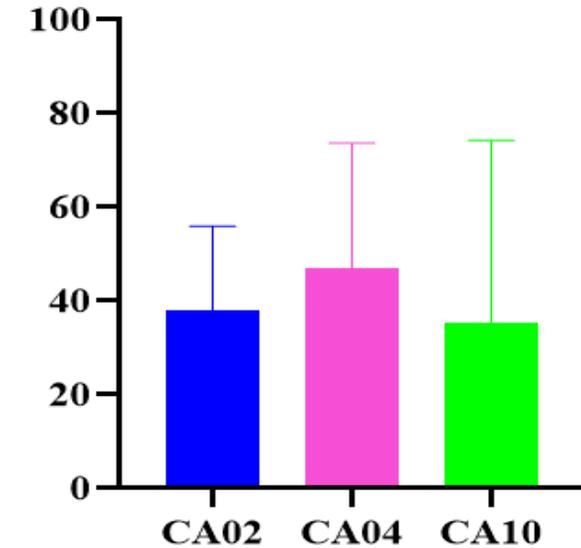


Resultados

ANOVA



Nota, Test ANOVA, prueba de Kruskal –Wallis para porcentajes de colonización de potenciales microorganismos antagonistas vs *R. solanacearum* ($H = 31,25$, $p < 0.05$)



Nota, Test ANOVA, prueba de Kruskal –Wallis para comparación entre los mejores porcentajes de colonización de potenciales microorganismos antagonistas vs *R. solanacearum* ($H = 0.6987$, $p = 0.7267$).

Resultados

Viabilidad de *R. solanacearum*

	Viabilidad de <i>R. solanacearum</i>	Grado de Viabilidad
	CA02	1
	CA04	1
	CA10	0

Nota. La viabilidad de las tres cepas antagonistas se evaluaron según Ezziiyyani et al. (2004) y Astorga-Quirós et al. (2014). Donde se observó el grado de invasión de *R. solanacearum*. Grado 0 ninguna invasión de superficie, grado 1 representa $\frac{1}{4}$ de invasión de superficie, grado 2 representa $\frac{1}{2}$ de invasión de superficie, grado 3 total invasión de la superficie.



(AGROCALIDAD, 2023)

Conclusiones

- Identificación de *Ralstonia solanacearum* mediante pruebas fenotípicas y bioquímicas a partir de muestras de musáceas con sintomatología de Moko.
- Los microorganismos aislados de muestras de suelo, compost y material vegetal pertenecen a los géneros *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Actinomicetos* spp., *Beauveria* spp., *Penicillium* spp., *Metarhizium* spp. y *Trichoderma* spp.
- Las cepas CA02, CA04, CA10 presentaron comportamiento antagonista basado en la competencia, logrando porcentajes de colonización del 53.33%, 73.33% y 92.67% ($p > 0,05$), respectivamente en comparación con las cepas aisladas y evaluadas.
- La viabilidad de *R.solanacearum* posterior al enfrentamiento con la cepa CA10 fue de grado 0 es decir sin invasión de superficie y grado 1 en las cepas CA02, CA04 que representa $\frac{1}{4}$ de invasión de la superficie del medio.
- Las cepas CA02, CA04 y CA10 identificada como antagonistas pertenecen a los géneros *Bacillus* spp., *Actinomicetos* spp y *Trichoderma* spp.
- En cuanto a las cepas antagonistas CA02, CA04, CA10, no existió diferencia significativa en su porcentaje de colonización ($p=0,7267$), sin embargo presentaron un alto grado de control en la viabilidad de *R. solanacearum*.



Recomendaciones

- El conjunto de investigaciones presentadas en este trabajo destaca las complejidades en la caracterización bioquímica de *Ralstonia solanacearum*. Se recomienda abordar su identificación precisa mediante un enfoque integral y diversas pruebas.
- Se recomienda la adopción de nuevas estrategias para controlar esta bacteria fitopatógena, como la producción masiva de metabolitos secundarios y agentes antimicrobianos.
- Se sugiere investigar más a fondo los mecanismos moleculares subyacentes a la interacción entre las cepas antagonistas y el patógeno, lo que permitiría optimizar aún más las estrategias de control biológico.
- Se destaca la necesidad de implementar medidas rigurosas de bioseguridad al trabajar con este fitopatógeno, ya que su naturaleza biotrófico podría facilitar su dispersión a través de los seres humanos



Agradecimientos



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

CARRERA DE
BIOTECNOLOGÍA

**Evaluación de microorganismos antagonistas para el control biológico
in vitro de *Ralstonia solanacearum*.**



AGROCALIDAD
AGENCIA DE REGULACIÓN Y
CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO

Cristina Quiroga M.Sc.

Mcrb. Luis Andrade

Dirección de Diagnóstico Vegetal – Laboratorio de Fitopatología
Dirección de diagnóstico animal – Laboratorios de Microbiología

MVZ. Mercy Falconi

Selena Tinoco M.Sc.

Ing. Dario Jarrín

Mcrb. Jorge Irazabal

Familia y amigos



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA