



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

PROYECTO DE TITULACIÓN

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

“Evaluación del efecto de cuatro controladores biológicos sobre la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) en laboratorio y vivero de eucalipto (*Eucalyptus urograndis*)”.

Sanango Padilla, Manuel Alejandro y Triviño Ruiz, Axel Elian

Ing. Mgs. Lenin Patricio Jiménez Pozo

Santo Domingo, 19 de marzo de 2024

Reporte de verificación de contenido



TRABAJO DE INTEGRACIÓN_SANANG...

Scan details

Scan time:
March 7th, 2024 at 14:13 UTC

Total Pages:
67

Total Words:
16508

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	1.8%	290
Minor Changes	0.5%	78
Paraphrased	0.2%	36
Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage
AI text
Human text

Plagiarism Results: (36)

Firma

Jiménez Pozo Lenin Patricio

CC: 0400725347



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA
Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Evaluación del efecto de cuatro controladores biológicos sobre la Marchitez Bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) en laboratorio y vivero de Eucalipto (*Eucalyptus urograndis*)”**. fue realizado por los señores **Sanango Padilla Manuel Alejandro y Triviño Ruiz Axel Elian**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 19 de marzo de 2024

Firma:

.....
Jiménez Pozo Lenin Patricio

C. C.:0400725347



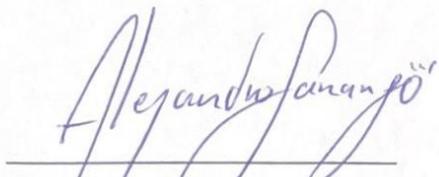
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

Responsabilidad de Autoría

Nosotros, Sanango Padilla Manuel Alejandro y Triviño Ruiz Axel Elian, con cédulas de ciudadanía n° 2350522526 y 2300374069 declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: “Evaluación del efecto de cuatro controladores biológicos sobre la Marchitez Bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) en laboratorio y vivero de Eucalipto (*Eucalyptus urograndis*)” es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 19 de Marzo de 2024

Firmas



Sanango Padilla Manuel Alejandro
C.C.: 2350522526



Triviño Ruiz Axel Elian
C.C.: 2300374069



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

Autorización de Publicación

Nosotros, **Sanango Padilla Manuel Alejandro** y **Triviño Ruiz Axel Elian**, con cédulas de ciudadanía n° 2350522526 y 2300374069, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Título: "Evaluación del efecto de cuatro controladores biológicos sobre la Marchitez Bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) en laboratorio y vivero de Eucalipto (*Eucalyptus urograndis*)"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 19 de marzo de 2024

Firmas



Sanango Padilla Manuel Alejandro
C.C.: 2350522526



Triviño Ruiz Axel Elian
C.C.:2300374069

Dedicatoria

A todos aquellos que han compartido este camino conmigo, ya sea con una palabra de aliento, un gesto de amistad.

Dedico este logro a mis queridos padres, quienes con su amor incondicional y su constante apoyo han sido mis pilares fundamentales en este camino universitario. A mi mami Zoila por su dedicación incansable y sus palabras de aliento que han sido mi fuerza en los momentos más difíciles. A mi papi Germán, por enseñarme desde pequeño el valor del estudio y por transmitirme valores que han guiado mis pasos hacia el éxito.

A mis hermanos Mary y Gelo, modelos a seguir de profesionales comprometidos y ejemplos de perseverancia. Su excelencia ha sido mi inspiración constante y su respaldo inquebrantable mi mayor fortaleza.

A mi querido sobrino Royito, recién llegado a este mundo y que vino a alegrar mi vida con su inocencia y alegría. Que este trabajo sea un legado de amor y esfuerzo para ti.

A las mascotas de la casa, Candy, Negrito, Cloey y Scrappy por siempre llenarnos de alegría con sus travesuras, lealtad y amor incondicional.

Finalmente quiero dedicar este logro a mi querido perro Bruno y a mi gato Yeezy. Bruno, mi fiel compañero, siempre esperándome cuando volvía del colegio y siguiéndome a todas partes con mis amigos. Yeezy, mi gato juguetón que con su energía inagotable siempre estuvo alegrándome mis días. Aunque ya no estén conmigo físicamente siempre los llevaré en mi corazón. Se que ahora son mis guardianes invisibles que velan por mi desde algún lugar...

Manuel Alejandro Sanango Padilla

Dedicatoria

Al pilar más fuerte de mi vida... Amada madre, este logro representa más de lo que las palabras pueden expresar. Desde el día uno fuiste mi roca, mi guía y mi inspiración. Tu constancia y fe inquebrantable en mí han sido una fuerza impulsadora detrás de cada paso en este camino. Nunca te faltaron palabras de aliento o de amor incondicional, convirtiéndote en una luz incluso en los momentos más oscuros, me has motivado a seguir adelante y por eso este trabajo es un tributo a ti, a tu amor, a tu sacrificio y a tu dedicación.

Espero así reflejar mi profunda gratitud y amor hacia ti. Pero, sobre todo, espero que sea el primero de muchos logros que pueda dedicarte en mi vida. No sería nadie sin tu apoyo, y sé que seguirás siendo mi mayor fuente de fortaleza y motivación para los desafíos que están por venir.

A mi amado padre, tu ejemplo como profesional y como ser humano ha dejado una huella permanente en mi vida. Siempre admiraré tu ética de trabajo incansable, tu integridad inquebrantable y tu compromiso con la excelencia en lo que te dedicas. Espero algún día poder emular tu éxito y sabiduría en esta carrera que empiezo. Agradezco profundamente tu apoyo y creencia en mí. En este momento, te saludo no solo como mi padre, sino también como un colega en esta profesión que tanto amamos.

A mis hermanos, Cami, Juan, Paula y Ghía; a mi tía Lore; a mi abuelita Gloria y mi mamita Flori. Espero que esta profesión me ayude a devolver todo lo que han hecho por mí.

Axel Elian Triviño Ruiz

Agradecimiento

Gracias a la vida por los desafíos que me han hecho crecer y a Dios por ser mi guía y fuente de fortaleza en cada paso de mi camino.

Agradezco al ingeniero Patricio Jiménez, mi docente tutor, cuya dedicación y expertise en el área forestal han sido fundamentales en la realización de esta tesis. Su orientación y apoyo han sido como un viento fresco en el bosque de la investigación.

Al Dr. Jaffer Mohiddin Gooty le agradezco de todo corazón por compartir su profundo conocimiento en el área de microbiología. Su generosidad y dedicación fueron vitales para llevar a cabo un trabajo de laboratorio de calidad.

Expreso mi más profundo agradecimiento a la prestigiosa empresa NOVOPAN S.A por permitirnos realizar nuestra investigación en sus instalaciones, valorando enormemente las facilidades y el apoyo recibido. Destaco especialmente la colaboración del Ing. Juan Carlos Clavijo cuyo apoyo fue fundamental para el desarrollo exitoso de este proyecto.

A mis amigos José Luis, Alexander, Anthony, Axel, Digna y Miguel, quienes han sido como una familia durante esta travesía universitaria, les agradezco por su amistad, su compañía y su apoyo incondicional. Sus risas, sus palabras de aliento y su presencia constante han hecho que esta carrera sea mucho más divertida y significativa, y por eso les estaré siempre agradecido.

Y finalmente, a Yardleycita, le doy gracias por su amor incondicional, su paciencia y su constante apoyo. Gracias por hacer cada día más especial, por compartir los buenos momentos y por estar a mi lado en los momentos difíciles.

Con gratitud sincera

Manuel Alejandro Sanango Padilla

Agradecimiento

Quisiera comenzar expresando mi gratitud a mis amigos de toda la carrera, Anthony Viteri y Alejandro Sanango, quien también me acompañó a lo largo de esta investigación. Su apoyo desde los primeros días ha sido invaluable y ha hecho que esta trayectoria académica sea más liviana y llevadera.

A los compañeros que se unieron a lo largo del camino, con quien compartí importantes momentos, he tenido la fortuna de sumarlos a mi círculo de amistades y han contribuido significativamente a mi crecimiento personal y profesional: Betty, Leo, Josué, Nohe, Tati.

Mi sincero agradecimiento al Ing. Lenín Jiménez, tutor de este proyecto, por brindarme la oportunidad de desarrollar esta investigación, y al Dr. Jaffer Gooty por su guía y apoyo en el área de laboratorio. A mis hermanos de tutor: Alexander, Digna, Darwin, Luis Ángel.

Asimismo, deseo reconocer y agradecer el valioso aporte de aquellos que me brindaron su ayuda en el análisis de los resultados de esta investigación: Ing. Jorge Lucero, Ing. Vinicio Uday, Ing. Santiago Ulloa y a Kyle Hofmann. Su experiencia fue fundamental para alcanzar conclusiones significativas en mi investigación.

No puedo pasar por alto el respaldo de la empresa Novopan, que generosamente abrió sus puertas para la realización de este estudio. También a las empresas participantes que colaboraron activamente y compartieron su conocimiento y recursos con nosotros: Ing. Jonathan Vega de Farmagro, Ing. Rody Bravo de Bayer, Ing. Fabricio Reinoso de ECB y a la Ing. Mayra Ronquillo e Ing. Diego Escobar de Microtech.

A mis primos y amigos que estuvieron presentes cada fin de semana para aliviar el estrés de la jornada académica, Leonardo Ruiz, Emilia Carvajal, Jorge Alvear.

Por último, pero no menos importante, quiero expresar mi profundo agradecimiento a mi Simo, por su confianza, apoyo, amor y paciencia que nunca me hicieron falta desde que me acompañas.

Cada uno de ustedes ha dejado una huella imborrable en mi camino hacia la culminación de esta etapa. Sin su apoyo no habría sido posible este logro.

Gracias infinitas,

Axel Elian Triviño Ruiz

Índice de contenido

Dedicatoria	I
Agradecimiento	II
Resumen	1
Abstract	2
Introducción y estado del arte	3
Estado del Arte	4
Objetivos	7
Objetivo general	7
Objetivos específicos	7
Marco teórico	8
Eucalipto	8
Género <i>Eucalyptus</i> spp	8
Híbrido	9
Eucalipto Tropical (<i>Eucalyptus urograndis</i>)	9
Taxonomía	10
Características generales.....	10
Descripción botánica	10
Usos de la madera	11
Producción de plantas clonales	11
Clonación.....	12
Marchitez bacteriana (<i>Ralstonia solanacearum</i> E.F. Smith)	12
Descripción de la bacteria <i>Ralstonia solanacearum</i>	13
Taxonomía y Nomenclatura	13
Rango de hospedadores y distribución geográfica	14
Colonización de <i>Ralstonia solanacearum</i>	15
Dinámica de <i>Ralstonia solanacearum</i> en el ingreso a la planta	16
Síntomas de <i>Ralstonia solanacearum</i> en eucalipto (<i>Eucalyptus urograndis</i>)	17
Cultivo y aislamiento	17
Medio de cultivo de Cloruro de trifeníl tetrazolio (TTC o TZC).....	18
Identificación en laboratorio	19
Observación visual	19
Prueba de liberación bacteriana	20
Observación morfológica.....	20

Inmunostrip	21
Pruebas serológicas	21
Control biológico	22
Antagonismo	22
Uso de microorganismos antagonistas e inductores de resistencia	22
Género <i>Bacillus</i> spp.	23
Género <i>Trichoderma</i> spp.	25
Productos comerciales para el control de <i>R. solanacearum</i>	27
Serenade®.....	27
Nacillus®.....	27
Ferticillus S®.....	28
Linor®	28
Trichoplus®.....	29
Metodología	30
Ubicación del lugar de investigación	30
Laboratorio.....	30
Campo	32
Materiales y equipos	33
Laboratorio.....	33
Campo	34
Productos a utilizar	34
Tratamientos.....	35
Fase de Laboratorio	36
Aislamiento de <i>Ralstonia solanacearum</i>	36
Selección de plantas madre infectadas	36
Realización de la Prueba de liberación bacteriana	36
Obtención de Muestras con la Enfermedad	37
Transporte al Laboratorio de Microbiología:	37
Procesamiento en el Laboratorio:	38
Tratamientos.....	39
Pruebas de antagonismo	39
Evaluación de la capacidad biocontroladora	42
Evaluación del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR).....	42
Diseño experimental y análisis estadístico de la fase de laboratorio.....	43
Variables evaluadas en laboratorio	43

Fase de Campo.....	43
Delimitación de las parcelas.....	43
Aplicación	43
Diseño experimental y análisis estadístico de la fase de campo	43
Variables a evaluar	44
Resultados y discusión.....	46
Fase de laboratorio	46
Aislamiento de <i>Ralstonia solanacearum</i>	46
Crecimiento radial de <i>Ralstonia solanacearum</i> en cultivo dual con los diferentes tratamientos	47
Análisis de varianza	48
Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR)	49
Análisis de varianza	50
Prueba de significancia de Duncan del PICR (%).....	51
Conclusiones y recomendaciones.....	61
Conclusiones.....	61
Recomendaciones	63
Revisión Bibliográfica	64

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica del Eucalipto Tropical.....	10
Tabla 2. Clasificación Taxonómica de <i>Ralstonia solanacearum</i>	13
Tabla 3. División de razas de <i>Ralstonia solanacearum</i> según el rango de hospedadores	14
Tabla 4. Instrucciones para la preparación del medio de cultivo TTC o TZC	18
Tabla 5. Tratamientos a evaluar en laboratorio	35
Tabla 6. Tratamientos a evaluar en campo	35
Tabla 7. Escala para determinar la eficacia de agentes de control biológico.....	42
Tabla 8. Escala de severidad ocasionada por <i>Ralstonia solanacearum</i> en plantas madre de <i>Eucalyptus urograndis</i>	45
Tabla 9. Análisis de varianza para la variable crecimiento radial de <i>Ralstonia solanacearum</i> en función del tiempo.....	48
Tabla 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial a las 120 horas	49
Tabla 11. Análisis de varianza para la variable PICR (%) evaluada a las 120 horas	50
Tabla 12. Test de Duncan para el PICR de acuerdo con los tratamientos.	51
Tabla 13. Evaluación de la capacidad biocontroladora partir del PICR	52
Tabla 14. Análisis de costos de los tratamientos.....	60

Índice de figuras

Figura 1. Fases del desarrollo de <i>Ralstonia solanacearum</i>	16
Figura 2. Mapa de ubicación geográfica de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.....	31
Figura 3. Mapa de ubicación geográfica de la "Hacienda Los Ángeles"	32
Figura 4. Identificación de plantas madre con síntomas característicos provocados por <i>Ralstonia solanacearum</i>	36
Figura 5. Prueba de liberación bacteriana en campo	37
Figura 6. Transporte de muestras en cooler	38
Figura 7. Tratamientos en el agitador orbital a 125 rpm	40
Figura 8. Medio Agar Nutritivo dispensado en cajas petri.....	41
Figura 9. Siembra del testigo y los tratamientos	41
Figura 10. Escala de severidad ocasionada por <i>Ralstonia solanacearum</i> en plantas madre de <i>Eucalyptus urograndis</i>	44
Figura 11. Cepas de <i>Ralstonia solanacearum</i> aisladas	46
Figura 12. Crecimiento radial de <i>Ralstonia solanacearum</i> en cultivo dual con los diferentes tratamientos	47
Figura 13. Porcentaje de supervivencia por tratamientos a los 50 días.....	53
Figura 14. Tendencia de la supervivencia por tratamiento durante 7 semanas	54
Figura 15. Prueba de proporcionalidad de riesgos por modelo de regresión de Cox para los tratamientos.	55
Figura 16. Proporción de plantas muertas por tratamiento con un $\chi^2 = 0,03725$	56
Figura 17. Tendencia de incidencia por tratamiento	57
Figura 18. Boxplot del área bajo la curva del progreso de la enfermedad clasificada por tratamiento.	58
Figura 19. Gráfico de frecuencias de la severidad de las plantas clasificada por tratamientos durante las cuatro primeras semanas.	59

Resumen

Ralstonia solanacearum es un patógeno destructivo que provoca la marchitez bacteriana en plantas, incluyendo el eucalipto. Su presencia extendida y la resistencia a métodos de control químico suponen una amenaza seria para la economía agrícola. El estudio investigó el impacto de controladores biológicos (*Trichoderma* spp., *Bacillus* spp.) en la bacteria *Ralstonia solanacearum* en plantas de eucalipto. En el laboratorio, se evaluó el antagonismo mediante el porcentaje de inhibición del crecimiento (PICR %), mientras que en el campo se analizó la incidencia, severidad y supervivencia de las plantas. El tratamiento T3 (*Bacillus* spp.) mostró el mayor PICR (57.23%) en laboratorio, mientras que, en el campo, la combinación de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp. (T6) resultó más efectiva. Aunque los tratamientos no afectaron la incidencia del patógeno, sí redujeron la severidad y prolongaron la supervivencia de las plantas, indicando su potencial para mitigar el daño causado por *Ralstonia solanacearum* en cultivos de eucalipto.

Palabras clave: *Ralstonia solanacearum*, marchitez bacteriana, antagonismo, eucalipto, control biológico

Abstract

Ralstonia solanacearum is a destructive pathogen that causes bacterial wilt in plants, including eucalyptus. Its widespread presence and resistance to chemical control methods pose a serious threat to agricultural economy. The study investigated the impact of biological control agents (*Trichoderma* spp., *Bacillus* spp.) on *Ralstonia solanacearum* in eucalyptus plants. In the laboratory, antagonism was evaluated through the percentage of growth inhibition (PICR %), while in the field, incidence, severity, and plant survival were analyzed. Treatment T3 (*Nacillus*.) showed the highest PICR (57.23%) in the laboratory, whereas in the field, the combination of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. (T6) was more effective. Although the treatments did not affect pathogen incidence, they did reduce severity and prolong plant survival, indicating their potential to mitigate damage caused by *Ralstonia solanacearum* in eucalyptus crops.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*, bacterial wilt, antagonism, eucalyptus, biocontrol.

Introducción y estado del arte

La marchitez bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, es una enfermedad de gran importancia económica en la mayoría de las especies vegetales cultivadas, siendo catalogada como la segunda enfermedad más destructiva del mundo (Osdaghi, 2020). Se han clasificado en distintas razas (Álvarez, et al., 2010) según el hospedante al que atacan, siendo la raza 1 aquella que está presente en el Eucalipto, donde ingresa por heridas o aberturas naturales para invadir espacios intercelulares del córtex de la raíz y el tejido vascular, provocando un marchitamiento gradual debido a la secreción de polisacáridos extracelulares que obstruyen los haces vasculares y limitan el flujo de agua y nutrientes (Mateus, 2020).

En el mundo, el género *Eucalyptus spp.*, es de las especies de plantación más importantes del mundo para la elaboración de papel, madera y tableros de mediana densidad, superando los 22,57 millones de hectáreas (Seng, et al., 2022). En Ecuador, la empresa Novopan es líder con alrededor de 8000 hectáreas, en donde, a pesar de tener estrictos controles preventivos para el manejo del patógeno, todavía se presentan pérdidas mayores al 15% en vivero.

El control biológico se busca para sustituir los pesticidas químicos, a los cuales el patógeno puede llegar a adaptarse y sobrevivir (Marina, 2018). Por esto, se considera necesaria la investigación de microorganismos antagonistas para el control de dicha enfermedad, en donde gracias a numerosos estudios se ha determinado la capacidad de géneros como *Trichoderma spp.* o *Bacillus spp.* para competir contra el patógeno. Algunos presentan la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos a través de la secreción de antibióticos o de polisacáridos (RAE, 2024) que ayudan a cubrir las estructuras de las plantas formando una capa de protección extra ante la penetración de otros microorganismos; por otro lado, existen también microorganismos que funcionan como inductores de resistencia (Ceballos et al., 2014), promoviendo la producción de ácido jasmónico en las plantas, mejorando a su vez la resistencia ante patógenos.

En campo existen muchos factores que pueden beneficiar o perjudicar el desarrollo de los microorganismos, dichos factores no siempre se encuentran al alcance del hombre para ser regulados. También es difícil simular las condiciones del suelo en un laboratorio, por lo que es imperativo abordar el problema de la Marchitez Bacteriana en ambas condiciones. Este proyecto de investigación propone utilizar cuatro controladores biológicos distintos a nivel de laboratorio, para identificar si existe un efecto antagónico contra *Ralstonia solanacearum*; y en campo, para comprobar si el efecto antagónico puede suceder en condiciones naturales.

Estado del Arte

Evaluación del Efecto de Microorganismos Antagonistas en el Control de la Marchitez Bacteriana (*Ralstonia solanacearum* E. F. Smith) en Plantaciones de Eucalipto Tropical (*Eucalyptus urograndis*)

El presente estudio realizado por (Remache F. , 2018) investiga el impacto de microorganismos antagonistas en el control de la marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* en plantaciones de eucalipto tropical. Se realizan pruebas de patogenicidad y se evalúa la eficiencia de productos comerciales bio-prot y bio-fung en condiciones de laboratorio y campo. El estudio proporciona información detallada sobre la etiología y epidemiología de la marchitez bacteriana en plantaciones de eucalipto, abordando una problemática relevante en el cultivo forestal. Se emplean metodologías rigurosas para evaluar el efecto de microorganismos antagonistas, lo que contribuye a la comprensión de posibles estrategias de control biológico. Los resultados de las pruebas de patogenicidad confirman la relación causal entre *Ralstonia solanacearum* y la marchitez bacteriana en *Eucalyptus urograndis*, fortaleciendo la base científica para futuras investigaciones y prácticas de manejo de enfermedades.

Aunque se realizan pruebas de inhibición simultánea y cultivo dual para evaluar la eficacia de los productos comerciales bio-prot y bio-fung, los resultados muestran que ninguno de ellos

presenta antagonismo frente a *Ralstonia solanacearum*. Esto sugiere limitaciones en la efectividad de estos productos como agentes de control biológico en las condiciones evaluadas.

La falta de antagonismo observada entre los microorganismos y *Ralstonia solanacearum* plantea interrogantes sobre la idoneidad de estos productos para el control de la marchitez bacteriana en plantaciones de eucalipto tropical. Se sugiere la necesidad de investigaciones adicionales para comprender mejor los mecanismos de acción y la eficacia de los agentes de control biológico en este contexto específico.

Este estudio proporciona información relevante para la presente investigación, ya que ambos abordan el control de la misma enfermedad en el mismo cultivo. Los resultados y limitaciones identificados en el artículo pueden informar el diseño y la ejecución de la investigación propuesta, contribuyendo a la generación de conocimientos científicos en el área

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

El estudio de (Bedón , 2023) revela descubrimientos significativos y áreas de oportunidad. Aunque las pruebas se llevaron a cabo en un entorno controlado de laboratorio, es fundamental reconocer que la efectividad de las cepas antagonistas puede variar considerablemente en condiciones de campo, donde están presentes una diversidad de factores ambientales y bióticos adicionales. La ausencia de evaluaciones en situaciones reales de cultivo limita la aplicabilidad directa de los resultados en la agricultura, lo que resalta la necesidad apremiante de llevar a cabo investigaciones suplementarias en ambientes agrícolas reales.

A pesar de haber identificado cepas con potencial antagonista, se enfatiza la urgencia de profundizar en la investigación para comprender completamente los mecanismos de interacción y perfeccionar las estrategias de control biológico. Además, se señala que algunas pruebas empleadas para la identificación de *Ralstonia solanacearum* pueden presentar limitaciones en

cuanto a su especificidad y sensibilidad, lo que podría impactar la exactitud de los resultados obtenidos.

Por último, se recalca la importancia de implementar medidas de bioseguridad al trabajar con *Ralstonia solanacearum*, subrayando la necesidad de precauciones adicionales al poner en práctica estas estrategias de control en el campo, con el propósito de garantizar tanto la seguridad del personal como la preservación del medio ambiente.

Objetivos

Objetivo 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 de cuatro controladores biológicos sobre *Ralstonia solanacearum* in vitro.

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 en plantas madre del jardín clonal de Eucalipto tratadas con los diferentes controladores biológicos.

Marco teórico

Eucalipto

Género *Eucalyptus* spp.

El género *Eucalyptus* spp. destaca como una categoría botánica sobresaliente, albergando especies adaptadas a una amplia variedad de hábitats, desde el nivel del mar hasta altitudes de 2,300 metros. Estas especies prosperan en una diversidad de suelos, que incluyen desde los ácidos hasta los alcalinos. Su distribución geográfica es extensa, abarcando vastas áreas en Australia y Tasmania, donde se encuentran representantes autóctonos de este género (Rokich & Bell, 1995)

Eucalyptus spp. es una de las especies de plantación más importantes en el mundo, siendo cultivada en 95 países y con una plantación superior a 22,57 millones de ha. Estas áreas de cultivo significan un recurso preciado para las industrias que depende de la fibra y madera. En países desarrollados el *Eucalyptus* spp. desempeña un rol fundamental como fuente principal de fibra para las industrias de pulpa y papel. Con el transcurso del tiempo la madera que se ha obtenido de los árboles de eucalipto ha sido empleada para la producción de madera maciza, mientras que sus fibras se han aprovechado en la fabricación de tableros de mediana densidad (Seng et al., 2022).

El género *Eucalyptus* spp. se destaca como el grupo de especies de importancia comercial más ampliamente cultivado globalmente. Entre las especies más reconocidas se encuentra *Eucalyptus grandis* y sus híbridos, que son ampliamente plantados en América del Sur y África. *Eucalyptus globulus*, por otro lado, se planta extensamente en Chile, Argentina y diversos países, mientras que *Eucalyptus deglupta* tiene presencia en varias naciones, incluyendo Uruguay y Costa Rica. Todas estas especies se utilizan en la plantación con el propósito de obtener madera para aserrío, tableros (compensados y aglomerados), así como astillas para la producción de pulpa destinada a la fabricación de papel. En el marco del proyecto

"Fomento de la reforestación comercial para la mejora y conservación de las reservas de carbono", el género *Eucalyptus spp.*, y en particular *E. deglupta*, *E. grandis*, *E. saligna* y *E. camaldulensis*, ha sido identificado como una de las especies prioritarias (Martínez, 2015)

Híbrido

En el ámbito de la botánica, la hibridación implica el cruzamiento entre dos plantas que provienen de variedades, especies o géneros diferentes, con el fin de dar origen a una descendencia híbrida que hereda características de ambas plantas progenitoras. Este proceso puede ocurrir de manera espontánea en la naturaleza o ser deliberadamente inducido por la intervención humana, con propósitos específicos como la mejora de ciertos rasgos de una planta (Plantiago, 2024).

En el contexto de un híbrido, es factible combinar las características de ambos progenitores, lo que confiere a la hibridación una nueva fuente de variación genética. Asimismo, existe la posibilidad de que los híbridos manifiesten el vigor híbrido, caracterizado por un crecimiento aún más robusto en comparación con sus progenitores (Ipinza, 2017).

Eucalipto Tropical (*Eucalyptus urograndis*)

Eucalyptus urograndis resulta del cruce entre *E. urophylla* y *E. grandis* (Ipinza, 2017), este híbrido demuestra una notable adaptabilidad a diversas regiones, condiciones de suelo y periodos de sequía (Avendaño, 2018). *Eucalyptus urograndis* presenta un crecimiento relativamente rápido, lo que lo ha convertido en el clon de más importancia económica para la industria brasileña (Leonardi et al., 2015).

Taxonomía

Tabla 1

Clasificación taxonómica del Eucalipto Tropical

Clasificación	Nombre
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Myrtales
Familia	Myrtaceae
Subfamilia	Myrtoideae
Género	<i>Eucalyptus</i>
Especie	<i>E. urograndis</i>

Características generales

El *Eucalyptus urograndis* ha sido reconocido por su rápido crecimiento, superando los 45 m³/Ha/año, esta especie generalmente alcanza alturas de hasta 25 metros, pudiendo ocasionalmente llegar a los 50 metros, con diámetros que oscilan entre 0,3 y 1,5 metros (Remache F. , 2018).

Descripción botánica

Vinueza (2012), citado por (Remache F. , 2018) menciona que esta especie se distingue por un tronco recto y cilíndrico, acompañado de una copiosa copa de follaje. La corteza exterior, también conocida como ritidoma, presenta un tono marrón claro que simula la apariencia de la piel y se despega en tiras, dejando manchas grises o pardas en la superficie interna, que posee una textura más suave. Las hojas, que se encuentran sin pecíolo, son de forma ovalada y tienen un color grisáceo, experimentando un alargamiento y adquiriendo una consistencia coriácea con

un tono azul brillante en la etapa adulta. Las flores, solitarias y de color blanco, complementan la morfología de la planta, mientras que el fruto toma la forma de una cápsula que alberga semillas de reducido tamaño.

Usos de la madera

La madera que se deriva de esta especie presenta características físicas y mecánicas altamente favorables, además de una facilidad notable para ser implementado en diversas formas, como madera sólida, muebles, laminados y también como biomasa para generar energía (Avendaño, 2018).

La madera se emplea en diversas aplicaciones, incluyendo la producción de celulosa, postes de iluminación, troncos para la industria maderera, estructuras de apoyo en la construcción, elaboración de postes, suelos de madera noble, refuerzos en entornos mineros, paneles de fibra, fuente de energía renovable, tutores para cultivos de tabaco, así como en la edificación de viviendas rurales y cercas (Ecuador Forestal, 2012)

Producción de plantas clonales

Las plantas destinadas a ser utilizadas en la producción de estacas, comúnmente referidas como pies madres, experimentan periódicas sesiones de fertilización y poda realizadas quincenalmente durante los meses de producción. Este proceso tiene como meta estimular la generación de brotes que posteriormente puedan ser recolectados en forma de estacas (Trujillo, 2017). La propagación asexual de plantas ocurre mediante el uso de esquejes o micro esquejes, empleando sustancias hormonales que favorecen el enraizamiento.

La hibridación interespecífica en *Eucalyptus* constituye la vía más ágil para obtener mejoras genéticas, mientras que la clonación se destaca como el método más eficaz para incorporar estos beneficios de la hibridación en los procedimientos de producción a nivel industrial (Assis & Rodríguez, 2014).

Clonación

La clonación de árboles forestales se utiliza con la finalidad de mejorar su material genético, gracias a esta técnica es posible la obtención de individuos idénticos genéticamente al árbol que se busca replicar. Para realizar este proceso se recurre a métodos que van desde procedimientos simples como el enraizamiento de varetas, injertos o acodos (macro propagación vegetativa), incluso llegando a procesos más complejos como cultivos in vitro. La correcta implementación de estas técnicas puede resultar en notables beneficios en términos de producción, convirtiéndose en una práctica cada vez más extendida en los actuales sistemas de producción forestal, resultando como una herramienta de suma importancia para la reproducción de plantas con atributos deseados para fines específicos (FONDEF, 2003).

Marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum* E.F. Smith)

A finales del siglo XIX, se documentó un fenómeno de marchitez afectando diversas plantas como tabaco, papa, plátano y maní en Estados Unidos, denominado "enfermedad del limo". Smith, en 1896, identificó el microorganismo responsable de esta afección como la bacteria que él llamó *Bacillus solanacearum*, conocida actualmente como *Ralstonia solanacearum*. Inicialmente descubierta en zonas sub tropicales, a lo largo de los años se han identificado nuevas cepas en diversas regiones del mundo (Scala et al., 2018).

Ralstonia solanacearum muestra una diversidad extensa de plantas que puede afectar, y los signos de la infección pueden variar según la especie específica. A pesar de estas diferencias, hay rasgos comunes en la relación entre la planta y el microorganismo. Estos rasgos incluyen el marchitamiento y amarillamiento de las hojas jóvenes, así como la liberación de un exudado bacteriano blanco en el tallo, rizoma o tubérculo recién cortado, causado por la alta densidad celular generada por la bacteria en la planta. En líneas generales, las temperaturas más altas, superiores a los 28 °C, propician un desarrollo más acelerado de los síntomas en comparación con temperaturas más bajas (Osdaghi, 2020).

Descripción de la bacteria *Ralstonia solanacearum*

Se trata de un bacilo Gram (-) con dimensiones que van desde los 0,5 a 1,0 μm x 1,5 a 4,0 μm , confiriéndole características microscópicas lo que la vuelven imperceptible a simple vista. En su estructura morfológica presenta de uno a cuatro flagelos polares que le proporciona movilidad, aeróbica y crece de manera óptima en un rango de temperatura de 28 a 30°C, tiene crecimiento rápido (Agrios, 1997).

Taxonomía y Nomenclatura

En 1914 cuando fue descubierta por Erwin Smith la bacteria *Ralstonia solanacearum* inicialmente fue denominada *Pseudomonas solanacearum*. Con el avance de las técnicas de identificación molecular esta ha sido desvinculada de otros géneros como *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Bacillus*. Actualmente la bacteria se encuentra categorizada dentro del género *Ralstonia*, una denominación establecida por Yabuuchi y colegas en el año 1995 (Osdaghi, 2020).

Tabla 2

Clasificación Taxonómica de *Ralstonia solanacearum*

Clasificación	Nombre
Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	β - Proteobacteria
Orden	Burkholderiales
Familia	Ralstoniáceas
Género	<i>Ralstonia</i>
Especie	<i>R. solanacearum</i>

(García et al., 2019)

Rango de hospedadores y distribución geográfica

La Marchitez bacteriana ha sido identificada en más de 450 especies de plantas pertenecientes a 54 familias botánicas (Habtamu *et al.*, 2022) mostrando una distribución mundial. Este amplio rango de hospedadores continúa expandiéndose, por lo que no es raro encontrar descripciones de nuevos hospedadores (Álvarez *et al.*, 2010).

Según Agrocalidad (2023), citado en (Paredes, 2023) en el continente Americano, los países que han registrado la presencia generalizada de *R. solanacearum* incluyen Colombia, Brasil, Chile, Bolivia, Venezuela, Paraguay, Uruguay, Perú y finalmente en Ecuador que ha afectado principalmente a cultivos de musáceas en las siguientes provincias: Sucumbiós, Pastaza, Orellana, Los Ríos, Manabí, Napo, Guayas, Esmeraldas, El Oro, Cotopaxi, Carchi, Bolívar y Santo Domingo de los Tsáchilas.

R. solanacearum se ha clasificado en cinco razas según el rango de hospedadores:

Tabla 3

División de razas de Ralstonia solanacearum según el rango de hospedadores

Razas	Hospedante Natural	Distribución
1	Solanáceas como chile, pimiento dulce, berenjena, papa, tabaco y tomate. cultivos no solanáceos como frijol, cacahuete y girasol, plantas ornamentales, árboles como Eucalipto, sapote negro, chirimoya y neem.	Cinco continentes, incluida Europa, excluyendo los estados miembros de la Unión Europea
2	Variedades de <i>Musa</i> spp. y a Heliconia silvestre y ornamental.	Zonas tropicales de América del Sur y Filipinas

Razas	Hospedante Natural	Distribución
3	<i>Capsicum</i> spp., berenjena, geranio, papa y tomate, así como a malezas como <i>Solanum dulcamara</i> y <i>S. nigrum</i> .	Todos los continentes
4	Jengibre y a especies relacionadas como mioga y patumma	Asia
5	<i>Morus</i> spp	China

Nota: Razas de *Ralstonia solanacearum* con sus hospedantes naturales y distribución geográfica (Álvarez et al.,2010).

Colonización de *Ralstonia solanacearum*

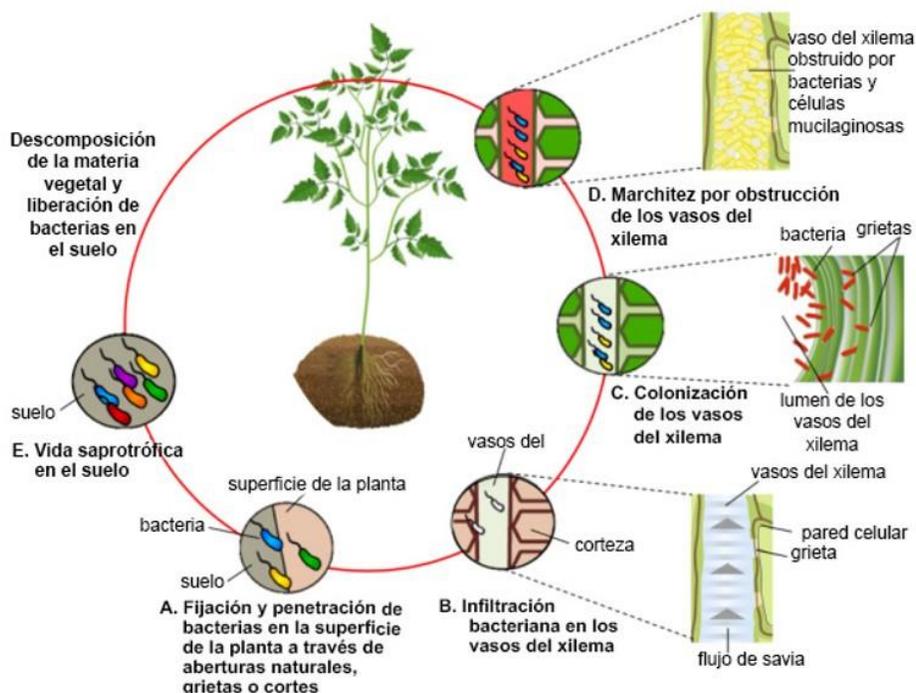
R. solanacearum ingresa a su hospedero por medio de las heridas o aberturas naturales como los puntos de emergencia de raíces laterales (Mateus, 2020). No tiene la capacidad de penetrar el tejido vegetal (Remache F. , 2018). Este patógeno invade los espacios intercelulares del córtex de la raíz y el tejido vascular, incluyendo los vasos del xilema, su desplazamiento a través de estos tejidos provoca un marchitamiento gradual, provocado por la secreción de polisacáridos extracelulares que obstruyen los haces vasculares y limitan el flujo (Mateus, 2020). Melgar et al. (2012) referenciado por (Remache F. , 2018) menciona que el incremento en la viscosidad del xilema se deriva del aumento en la producción de polisacáridos altamente polimerizados, dando lugar a taponamientos.

R. solanacearum tiene un impacto sobre los procesos fisiológicos de la planta, de manera directa afecta el transporte de agua y nutrientes y de manera indirecta reduce la tasa fotosintética, transpiración y la conductancia estomática y por ende alteraciones en el metabolismo de carbohidratos hasta llegar a la muerte de la planta (Mateus, 2020).

Dinámica de *Ralstonia solanacearum* en el ingreso a la planta

Figura 1

Fases del desarrollo de *Ralstonia solanacearum*



(Tariq y Sachin, 2021) describe la ecología de la bacteria de la siguiente manera:

Las bacterias son atraídas por las sustancias liberadas por las raíces de la planta huésped, se adhieren a la superficie de estas y penetran a través de grietas, cortes y otras aperturas naturales.

Una vez en la raíz, las bacterias atraviesan la capa exterior de la planta, conocida como corteza, hasta alcanzar los vasos del xilema, que son los conductos por donde circula la savia desde el suelo hasta las partes superiores de la planta.

Una vez dentro de los vasos del xilema, las bacterias colonizan estos espacios, formando comunidades que obstruyen el flujo normal de agua. En la imagen adjunta se muestra cómo las bacterias se infiltran en el interior de los vasos del xilema.

Las bacterias ocupan y llenan los vasos del xilema con sus células y mucílagos, una sustancia viscosa compuesta principalmente por polisacáridos. Esta obstrucción interrumpe el flujo de agua, lo que resulta en el marchitamiento de la planta.

Finalmente, la planta afectada experimenta un marchitamiento severo que puede llevar a su muerte. Con el tiempo, las partes marchitas de la planta se descomponen y las bacterias retornan al suelo en espera de encontrar otro hospedador adecuado.

Síntomas de *Ralstonia solanacearum* en eucalipto (*Eucalyptus urograndis*)

En el entorno natural, los signos iniciales de la enfermedad se manifiestan mediante el marchitamiento y la pérdida de las hojas más cercanas al suelo. Cuando las plántulas contaminadas sirven como fuente de infección, los cortes transversales del tallo revelan un oscurecimiento progresivo de la madera desde el centro. En contraste, cuando las infecciones se producen posteriormente a la siembra, se observa un oscurecimiento que se extiende desde la corteza hacia el interior de la madera. En este escenario, las grietas en la corteza, causadas por condiciones como la temperatura excesiva del suelo, la falta de agua o el anegamiento de la base, actúan como puntos de entrada para *Ralstonia solanacearum*. En general, los árboles más afectados presentan complicaciones como deformidades en las raíces y, en casos más graves, el anegamiento de la base, lo que puede resultar en el subdesarrollo o incluso la muerte de las plantas (Reginaldo, 2006).

Cultivo y aislamiento

La bacteria *R. solanacearum* se puede obtener de material vegetal que presenta síntomas mediante el uso de medios de cultivo no selectivos convencionales, tales como el agar nutritivo (AN), agar glucosa Peptona levadura (YPGA), agar peptona sacarosa (SPA) o el Agar de Kelman con tetrazolio (TZC)

A pesar de ser necesario la desinfección de las muestras vegetales con agentes químicos como el hipoclorito de sodio antes de la siembra, se ha observado que en la planta pueden surgir

infecciones secundarias o proliferar poblaciones significativas de saprófitos. En este contexto, se recomienda llevar a cabo dicho procedimiento en medios semiselectivos, utilizando preferentemente el medio modificado Medio semi electivo Sur África (mSMSA) o el medio Sequeira. Para proceder con la siembra de las muestras vegetales, es esencial preparar suspensiones bacterianas con diluciones apropiadas y posteriormente transferirlas a placas de los medios mencionados mediante técnicas de extensión o estriado. Estas placas deben ser incubadas durante un periodo de 2-6 días a una temperatura de 28°C (EPPO, 2022).

Medio de cultivo de Cloruro de trifenil tetrazolio (TTC o TZC)

El medio de cultivo con TTC facilita la identificación de *Ralstonia solanacearum* mediante la observación de colonias con características específicas, permitiendo así su aislamiento selectivo y posterior análisis.

Tabla 4

Instrucciones para la preparación del medio de cultivo TTC o TZC

Medio	Cantidad por litro
Caseína	1 g
Peptona	10 g
Glucosa	5 g
Para medio sólido:	
Agar	17 g
Cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) 1 %	5 mL
Se debe ajustar el pH en un rango de 6,5 a 7	

Nota: (García et al., 2019); (Gutarra & Herrera, 2018)

Se debe colocar la solución de TTC en el medio después de haber sido esterilizado, cuando esté a una temperatura de 45°C (tibio).

Identificación en laboratorio

Los métodos de laboratorio destinados a identificar la presencia de bacterias pueden abarcar ensayos de desarrollo, pruebas serológicas como ELISA y microscopía de inmunofluorescencia. Asimismo, se lleva a cabo el aislamiento de las bacterias en medios que son selectivos o semi selectivos. Tras el proceso de aislamiento, se requiere realizar la caracterización de las cepas a través de pruebas fisiológicas, bioquímicas y de patogenicidad (Punja et al., 2008). EPPO (2022) menciona que para realizar la indentificación se debe utilizar al menos dos pruebas basadas en principios bioquímicos .

Se pueden emplear métodos serológicos, como pruebas de tiras reactivas y ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas. Asimismo, las pruebas bioquímicas, como el sistema BIOLOG, análisis de ácidos grasos, proteínas y técnicas basadas en ácidos nucleicos, también se encuentran entre las opciones disponibles para este propósito (Osdaghi, 2020).

Entre las pruebas que se implementaran en este trabajo de investigación tenemos a la observación visual, prueba de liberación bacteriana, observación morfológica de colonias, pruebas rápidas inmunostrip y diagnóstico inmunológico por ELISA.

Observación visual

En este proceso, se compara una planta que muestra signos de enfermedad con una que se encuentra en buen estado, evaluando características como el color, la forma y la densidad de las hojas, además de observar cambios en el sistema de raíces, la presencia de manchas o necrosis en tallos y hojas, y la aparición de esporangios, entre otros aspectos. Sin embargo, confiar únicamente en la observación visual no basta para realizar un diagnóstico completo. Para obtener resultados más confiables, resulta esencial llevar a cabo otros tipos de estudios. (Khakimov et al., 2022)

Prueba de liberación bacteriana

Cuando se presume la presencia de marchitez causada por *Ralstonia solanacearum*, se recomienda tomar una sección de la parte inferior del tallo y sumergirla en un recipiente de agua transparente para verificar la liberación de bacterias del tallo. En el caso de manchas en las hojas, se aconseja realizar cortes finos en los bordes de las lesiones, montarlos en una gota de agua sobre una lámina de microscopio, cubrirlos con un portaobjetos y examinarlos al microscopio para determinar la posible presencia de liberación bacteriana, cuyo proceso puede tomar entre 10 y 15 minutos (Goszczyńska et al., 2000).

Observación morfológica

Se deben considerar diversas características como el tamaño, la forma y la pigmentación de la colonia. En cuanto a las características morfológicas, estas abarcan aspectos como la forma, el tamaño, la textura, la elevación, los tipos de bordes y la consistencia, entre otros (Goszczyńska et al., 2000).

En medios de cultivo de composición nutricional general, las cepas virulentas de *Ralstonia solanacearum* presentan colonias de tono blanco crema perlado, de forma plana, irregular y con una consistencia fluida, con frecuencia presentando verticilos característicos en el centro. En contraste, las formas avirulentas de *Ralstonia solanacearum* manifiestan colonias butíricas de tamaño reducido, con una morfología redonda y una estructura no fluida, exhibiendo un color blanco crema en su totalidad. En medios de cultivo de tetrazolio y en el SMSA de Kelman, las colonias adquieren una tonalidad rojo sangre. En el caso de las formas avirulentas de *Ralstonia solanacearum*, las colonias butíricas presentan un diámetro pequeño, una forma redonda y una consistencia no fluida, mostrando una tonalidad completamente rojo oscuro en estos medios específicos (García et al., 2019).

Inmunostrip

Se sugiere el uso del ImmunoStrip de Rs como una herramienta eficaz para la detección rápida de *R. solanacearum* según las pautas del Plan de Recuperación del USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos) para *Ralstonia solanacearum*, específicamente para la Raza 3, Biovar 2. Es necesario realizar una prueba adicional de confirmación para identificar la raza y biovariedad de las muestras que resulten positivas (Agdia, 2024).

(Obrador et al., 2017) recomienda la incorporación sistemática de inmunotiras como una medida eficaz para fortalecer el proceso de diagnóstico de *Ralstonia solanacearum* en el ámbito de campo. Estas pruebas son basadas en la capacidad de anticuerpos específicos para reconocer y ligar a antígenos, específico a *R. solanacearum* (Patrice, 2009).

Pruebas serológicas

Las técnicas serológicas empleadas en la identificación de bacterias son instrumentos analíticos versátiles que se utilizan para diversos objetivos, ofreciendo pruebas indirectas de las conexiones causales en el ámbito de la detección bacteriana en plantas. La serología se destaca como una elección provechosa, oportuna y rentable para realizar análisis a gran escala de muestras con síntomas. El ensayo de inmuno absorción ligado a enzimas (ELISA) representa una evaluación que fusiona la especificidad de los anticuerpos con cambios visuales para identificar un objetivo específico. Los anticuerpos tienen la capacidad de reconocer antígenos específicos vinculados a un patógeno vegetal particular; aunque los anticuerpos policlonales han sido exitosos en la detección del patógeno, no siempre exhiben la suficiente especificidad, a diferencia de los anticuerpos monoclonales, que son más específicos, pero también más costosos. Diversos métodos para identificar la unión entre anticuerpo y antígeno están disponibles, frecuentemente implicando la conjugación del anticuerpo con una enzima capaz de inducir un cambio de color al agregar un sustrato (Scala et al., 2018).

Control biológico

En una definición más actualizada, abordando tanto la fitopatología como la entomología, se establece que el control biológico implica el empleo de organismos vivos para suprimir una plaga, disminuir su población o atenuar su impacto, con el objetivo de hacerla menos abundante o perjudicial (Marina, 2018).

El control biológico de plagas en la agricultura busca principalmente: minimizar los impactos perjudiciales de las plagas y las consiguientes pérdidas económicas, disminuir o sustituir la utilización de pesticidas químicos, e incorporar estrategias compatibles y sinérgicas para potenciar la eficacia en el control de plagas.

Los estudios preliminares en el ámbito del control biológico de *R. solanacearum* han mostrado resultados prometedores. La aplicación de diversas cepas bacterianas con propiedades antagonistas hacia *R. solanacearum* como agentes de control ha demostrado efectividad, especialmente en entornos de invernadero y pruebas de campo bajo condiciones estrictamente controladas (Patrice, 2009).

Antagonismo

Se refiere a la interacción entre organismos o sustancias que conduce a la inhibición de la actividad de uno de ellos, como se observa en la capacidad de los antibióticos para afectar la actividad bacteriana (RAE, 2024).

Uso de microorganismos antagonistas e inductores de resistencia

La utilización de *Trichoderma* spp., bacterias con efecto antagonista como *Bacillus* spp. y productos biológicos contribuye a restaurar el equilibrio biológico en el suelo. Este enfoque resulta en una marcada disminución de las poblaciones de organismos patógenos, como *R. solanacearum*, o compete activamente con ellos (Ceballos et al., 2014)

Los principales métodos empleados por los microorganismos en el control biológico de patógenos son: la antibiosis, que implica la producción de sustancias por un microorganismo

para inhibir o destruir a otro microorganismo; y la competencia, donde dos o más microorganismos compiten por recursos alimenticios o espacio, lo que resulta en la escasez de elementos necesarios para el crecimiento del patógeno (Caviedes, 2017). Por otro lado confieren de manera indirecta mecanismos de resistencia a las plantas (Corrales *et al.*, 2017).

Género *Bacillus* spp.

La categoría de microorganismos llamada *Bacillus* spp. abarca diversos bacilos Gram positivos que son anaerobios facultativos. Estos microorganismos pueden residir en variados hábitats, incluyendo suelo, agua, aire y desechos de plantas en descomposición. Los *Bacillus* son reconocidos por sus diversas aplicaciones, como la capacidad de colonizar las raíces de las plantas. Esta colonización desempeña un papel en la defensa de las plantas (Vargas, 2018).

La relación entre el género *Bacillus* y el entorno terrestre puede manifestarse de dos maneras principales. En primer lugar, de forma directa, cuando *Bacillus* actúa en la rizosfera, donde puede descomponer materia orgánica como residuos de plantas, animales y compuestos como hidrocarburos. Además, en este papel, *Bacillus* puede estimular la producción de antibióticos, promover el crecimiento de plantas y participar en procesos como la fijación de nitrógeno y la solubilización de fosfatos. En segundo lugar, de manera indirecta, *Bacillus* puede influir en la producción de compuestos que combaten patógenos o inducen mecanismos de resistencia (Corrales *et al.*, 2017).

Actualmente, se investiga ampliamente varias especies del género *Bacillus*, como *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis*, con el fin de disminuir la incidencia de enfermedades agrícolas relevantes. Estas cepas emplean diversas estrategias para prevenir el establecimiento y desarrollo de organismos fitopatógenos. Dichas estrategias abarcan desde la producción de antibióticos hasta la secreción de sideróforos, enzimas líticas, toxinas y la inducción de la resistencia sistémica de la planta (IRS) (Villareal *et al.*, 2018).

El género *Bacillus* sobresale por su habilidad para generar una amplia gama de antibióticos que frenan el crecimiento de agentes perjudiciales para las plantas. Entre estos, los

lipopéptidos cíclicos no ribosomales son los más estudiados. Estos compuestos están compuestos por un péptido circular unido a una cadena de ácido graso, y se clasifican en tres grupos: iturinas, fengicinas y surfactinas, dependiendo de su composición de aminoácidos y la longitud de la cadena grasa. Su síntesis ocurre mediante complejos enzimáticos conocidos como sintetasas de péptidos no ribosomales, los cuales operan independientemente del ARN mensajero. Las iturinas, fengicinas y surfactinas son renombradas por su eficacia contra bacterias y hongos. Estos lipopéptidos actúan antimicrobianamente al interactuar con la membrana celular de bacterias o hongos, provocando la formación de poros y ocasionando un desequilibrio osmótico, lo que conduce finalmente a la muerte de los microorganismos que afectan a las plantas (Villareal *et al.*, 2018).

La utilización de cepas del género *Bacillus* para inducir respuestas sistémicas y proteger cultivos agrícolas como el tomate, el pimiento, el frijol y el arroz ha sido ampliamente estudiada y documentada. *Bacillus* es capaz de producir una amplia variedad de moléculas que actúan como inductores de respuestas sistémicas en las plantas. Estas moléculas incluyen lipopéptidos, fitohormonas y compuestos volátiles (Villareal *et al.*, 2018).

Bacillus desencadena otros mecanismos de defensa en las plantas, los cuales implican alteraciones en la estructura de la pared celular al promover la acumulación de lignina (Singh *et al.*, 2016).

La aplicación de *Bacillus subtilis* sobre las hojas promovió la activación de la Resistencia Sistémica Inducida (ISR) en las plantas tratadas, estimulando la vía del ácido jasmónico. Además, se incrementó la síntesis de compuestos secundarios como flavonoides, fitoalexinas y auxinas. Se detectaron también variaciones en los niveles de esteroides y terpenos, junto con un aumento en la concentración de glucosinolatos (Pretali *et al.*, 2016). Aunque los mecanismos de protección de las plantas inducidos por elicitores se activan a través de diferentes vías metabólicas, se ha observado que un microorganismo puede desencadenar múltiples mecanismos de defensa. Este fenómeno ha sido evidente en plantas de trigo, donde la

inoculación con *Bacillus* spp. resultó en la producción incrementada de varias proteínas PR y metabolitos secundarios como el ácido gálico y el ácido ferúlico, lo que otorgó resistencia contra *Bipolaris sorokiniana* (Villareal *et al.*, 2018).

El despliegue de la respuesta defensiva en las plantas se inicia con la generación de diversos metabolitos secundarios, tales como antioxidantes, fitoalexinas y hormonas vegetales que responden al estrés, como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET). Este mecanismo defensivo también conlleva la activación de la vía fenilpropanoide general, que favorece la síntesis de lignina, y la participación de otras hormonas vegetales, como el ácido abscísico (ABA), los brassinosteroides y las auxinas (Pretali *et al.*, 2016). Es bien sabido que las Bacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas pueden colaborar con las plantas en la lucha contra enfermedades, ya sea compitiendo con los patógenos o induciendo la Resistencia Sistémica Inducida (ISR). A diferencia de la Respuesta Sistémica Adquirida (SAR), la ISR no depende de las vías del ácido salicílico (SA), sino que está regulada por el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET). Numerosos estudios han corroborado que las Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB pueden ser aplicadas en una amplia variedad de plantas modelo y cultivos, tanto para controlar enfermedades como para promover el crecimiento (Pretali *et al.*, 2016).

Género *Trichoderma* spp.

El hongo *Trichoderma* spp. se destaca como un antagonista que combate numerosos fitopatógenos, lo que lo convierte en una elección ampliamente adoptada para el control biológico de diversas plagas y enfermedades (Hidalgo, 2020). Su ubicuidad, la facilidad con la que puede ser aislado y cultivado, así como su rápido crecimiento en una variedad de sustratos, posibilitan la obtención de niveles elevados de inóculos en un corto período de tiempo, sin representar amenazas para las plantas superiores (Agamez *et al.*, 2009).

Este agente de biocontrol genera antibióticos y otros productos metabólicos secundarios que poseen diversos mecanismos de acción contra los microorganismos fitopatógenos. Entre

ellos se encuentran: Pachibasin, clasificado en el grupo de los octacetidos; Trichodermin, perteneciente a los monoterpenos o tricotecanos; Trichorzianinas, metabolitos antifúngicos altamente solubles que, al adherirse a las esporas, mantienen su actividad fúngica durante períodos prolongados (3-4 meses); y Gliotoxin, con propiedades antibióticas dirigidas tanto contra bacterias como hongos (Howell et al., 2000).

La actividad antagónica de las especies de *Trichoderma* implica mecanismos como microparasitismo, antibiosis y competencia por nutrientes. Además, de forma indirecta, estas especies ejercen una acción biorreguladora al estimular mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos en las plantas, induciendo así la resistencia sistémica a enfermedades y contribuyendo al mejoramiento del crecimiento y desarrollo vegetal (Michel et al., 2020).

La eficacia de *Trichoderma* en la disminución de las pérdidas causadas por diversos patógenos del suelo, como la marchitez provocada por *Ralstonia solanacearum*, posibilita la prevención de infecciones precoces en plántulas de distintos cultivos (Bettiol et al., , 2014).

Trichoderma es capaz de inducir a la resistencia por medio de su sistema inmune, induciendo a la producción de ácido salicílico y también hay una inducción a la expresión de genes asociados a la resistencia sistémica adquirida, en la vía de la ISR induce a la producción de jasmonato y etileno. *Trichoderma* tiene la capacidad de inducir un proceso conocido como priming, el cual prepara a las plantas para una defensa más rápida y efectiva cuando se enfrentan a patógenos. Este priming tiene efectos transgeneracionales, lo que significa que las plantas inoculadas por *Trichoderma* transmiten esta resistencia mejorada a sus descendientes. Este fenómeno se debe a la heredabilidad materna inducida por *Trichoderma*, lo que sugiere que existe un ajuste epigenético en el genoma de las plantas que es inducido por *Trichoderma* y que puede ser transmitido a las generaciones posteriores (Dautt, 2022).

Productos comerciales para el control de *R. solanacearum*

Serenade®

Descripción

SERENADE® es una suspensión concentrada de *Bacillus subtilis* (Cepa QST 713) 1.34% Aditivos 98.66%, con 13,4 gramos de ingrediente activo por litro de producto comercial. 1×10^9 ufc/g (BAYER, 2024).

Mecanismo de acción

Los lipopéptidos presentes en la formulación actúan sinérgicamente, perforan la membrana celular del patógeno ocasionando su muerte. Inhiben la formación del tubo germinativo evitando su colonización y previenen la germinación de esporas (BAYER, 2024).

Dosis

1 a 5 litros por hectárea dependiendo el tipo de acción que se requiera del insumo (BAYER, 2024).

Nacillus®

Descripción

Se trata de un agente antibacteriano biológico que está conformado por variedades naturales de los organismos de control biológico *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Brevibacillus brevis* (Bio Insumos, 2024).

- *Bacillus subtilis* cepa Antumávida 0.602% p/p (6,02 g/Kg)
- *Bacillus subtilis* cepa Vilcún 0.602% p/p (6,02 g/Kg)
- *Bacillus licheniformis* cepa Mallerauco 0.602% p/p (6,02 g/Kg)
- *Brevibacillus brevis* cepa Maguellines 0.602% p/p (6,02 g/Kg)
- *Brevibacillus brevis* cepa Maguellines I 0.602% p/p (6,02 g/Kg)

- Coformulantes c.s.p. 100% p/p (1 Kg)

Mecanismo de acción

Las cepas de *Bacillus* spp. y *Brevibacillus brevis* empleadas ejercen una acción bactericida mediante competencia, antibiosis y depredación sobre bacterias fitopatógenas (Bio Insumos, 2024).

Dosis

1 kg por hectárea (Bio Insumos, 2024).

Ferticillus S®

Descripción

Incluye diversas variedades de *Bacillus velezensis*, en una concentración de 1.0×10^9 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro de biopreparado. También contiene agentes dispersantes y estabilizantes (ECB, 2024).

Mecanismo de acción

Genera antibióticos Bacilysin e iturin, los cuales tienen una alta toxicidad para los hongos patógenos. Además, al establecerse en las raíces, estimula a la planta para producir fitoalexinas, fortaleciendo su resistencia contra el ataque de hongos, bacterias y nematodos (ECB, 2024).

Dosis

1 a 4 litros por hectárea dependiendo el tipo de acción que se requiera del insumo (ECB, 2024).

Linor®

Descripción

Se trata de un conjunto de aminoácidos que se producen a través del proceso de fermentación utilizando diversas especies y cepas distintas de bacterias pertenecientes al género *Bacillus*. Estas bacterias fueron previamente aisladas de suelos agrícolas en Ecuador (Microtech, 2024).

Mecanismo de acción

Proporciona nutrientes esenciales a las plantas gracias a su alto contenido de aminoácidos que son absorbidos de manera rápida y eficaz. Además, estimula la producción de hormonas responsables del crecimiento y la defensa de las plantas. Favorece el desarrollo tanto de las hojas como de las raíces, lo que resulta en una mayor superficie de absorción de nutrientes. Además, ofrece soporte en momentos de estrés, especialmente en condiciones de frío, altas temperaturas o exposición a pesticidas (Microtech, 2024).

Dosis

2 a 4 litros por hectárea (Microtech, 2024).

Trichoplus[®]**Descripción**

Se trata de un conjunto de microorganismos benéficos obtenidos de suelos agrícolas en Ecuador. Este conjunto está compuesto por diversas especies y distintas cepas del hongo *Trichoderma* (Microtech, 2024).

Mecanismo de acción

Fomenta la síntesis de ácido indol-acético, una hormona vegetal natural que regula el crecimiento de raíces y hojas. Esto impulsa el desarrollo de raíces, lo que a su vez aumenta la superficie de absorción, favoreciendo así un mayor crecimiento foliar. Además, contribuye a la solubilización de minerales quelatados en el suelo, facilitando su disponibilidad para las plantas (Microtech, 2024).

Dosis

1 gramo por litro (Microtech, 2024).

Metodología

Ubicación del lugar de investigación

La investigación estuvo conformada por dos fases, una de laboratorio y una de campo, en la fase de laboratorio, se llevó a cabo un estudio para determinar la capacidad antagonista de productos biológicos frente a *Ralstonia solanacearum*. En la fase de campo, se aplicaron los productos biológicos seleccionados en plantas madre de eucalipto para evaluar su efecto en el control de *Ralstonia solanacearum*.

Al combinar ambas fases, se obtuvo una evaluación completa de la eficacia de los productos biológicos en el control de *Ralstonia solanacearum*, desde su actividad in vitro hasta su aplicación práctica en el campo.

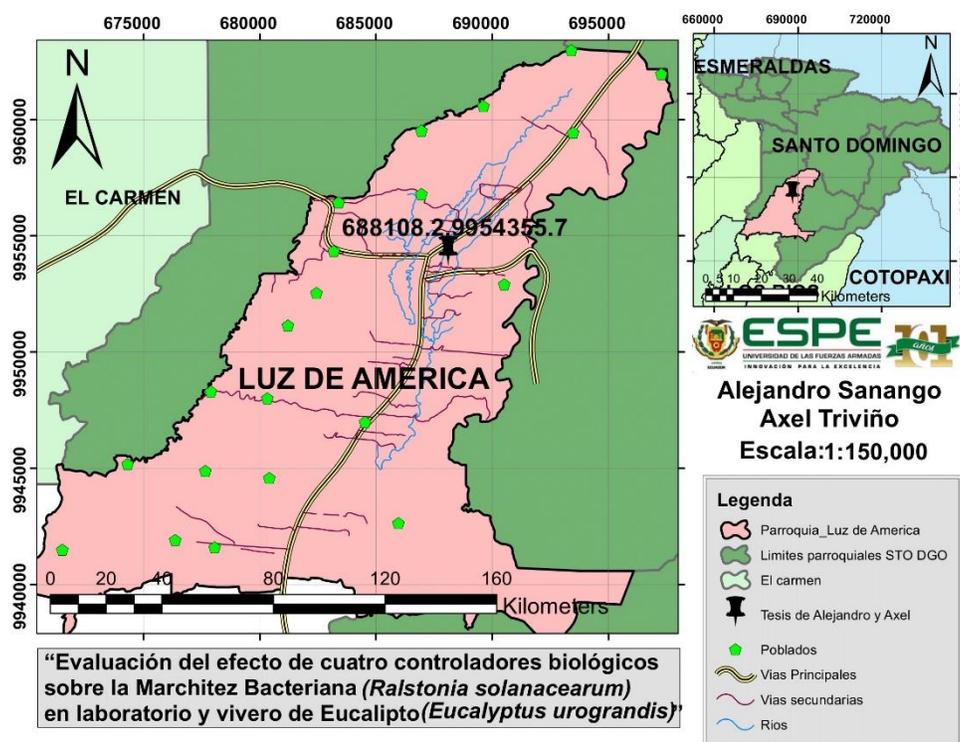
Laboratorio

Ubicación geográfica

La fase de laboratorio se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE", en la sede Santo Domingo, ubicada en la parroquia Luz de América, provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.

Figura 2

Mapa de ubicación geográfica de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE



Ubicación política.

- País: Ecuador
- Provincia: Santo Domingo de los Tsáchilas
- Cantón : Santo Domingo
- Parroquia: Luz de América
- Dirección: Km 24 vía Santo Domingo-Quevedo

(Cabrera y Velasco , 2023)

Ubicación Ecológica

- Zona de vida: Bosque Húmedo Tropical
- Altitud: 270 m.s.n.m
- Precipitación: 2980 mm/año

- Humedad relativa: 89%
- Temperatura: 24-26°C
- Heliofanía: 660 horas luz

(Cabrera & Velasco , 2023)

Campo

Ubicación geográfica

El área de investigación se centra en el vivero ubicado en la hacienda "Los Ángeles", localizada en la parroquia Patricia Pilar del cantón Buena Fe, en la provincia de Los Ríos.

Figura 3

Mapa de ubicación geográfica de la "Hacienda Los Ángeles"



Ubicación política

- País: Ecuador
- Provincia: Los Ríos
- Cantón: Buena Fe

- Parroquia: Patricia Pila
- Dirección: Km 24 vía Santo Domingo-Quevedo

Ubicación ecológica

- Zona de vida: Bosque Húmedo Tropical
- Altitud: 149 m.s.n.m
- Precipitación: 2265 mm/año
- Humedad relativa: 76%
- Temperatura: 24-26°C
- Heliofanía: 660 horas luz

(Remache F. , 2018); (Remache et al., 2017)

Materiales y equipos

Laboratorio

Materiales

Cajas petri, vasos de precipitación de 500 mL, probeta, micropipetas, tubos de ensayo, gradilla, guantes de nitrilo, asas de siembra, autoclave, incubadora, cámara de flujo laminar, refrigeradora, papel parafilm, mecheros, agitador vórtex, tijera, papel toalla, alcohol industrial, alcohol antiséptico, plancha de calentamiento.

Insumos

Muestras de plantas de eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*) con síntoma de *Ralstonia solanacearum*, Productos comerciales; Serenade, Nacillus, Ferticillus S, Linor, Trichoplus.

Medios de cultivo

Medio Kelman con TTC (glucosa, peptona, caseína y Agar).
Agar Nutriente.

Campo

Materiales

Fundas ziploc para la obtención de muestras de plantas infectadas, tijera de podar, piola, etiquetas, cámara celular, libreta, esferos, calculadora, baldes, cooler, vaso transparente, agua, bombas de fumigación (1L), baldes (20L), jeringas (20 mL), balanza, cámara fotográfica.

Insumos

Prueba rápida Inmunostrip. Productos comerciales: Serenade, Fercicillus S, Linor, Trichoplus y Nacillus

Productos a utilizar

Se procedió a la selección de cuatro productos biológicos de diversas fuentes comerciales, considerando su potencial para contrarrestar la bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum*. Esta elección se fundamentó en las propiedades identificadas o propuestas de los productos, que podrían incidir en la supresión de su crecimiento y actividad dañina.

El procedimiento de selección se sustentó en una exhaustiva revisión de la literatura científica y técnica relacionada con el control biológico de *Ralstonia solanacearum*, así como en investigaciones previas que hayan analizado la eficacia de productos similares contra este patógeno. Se privilegiaron aquellos productos que presentaron pruebas prometedoras de actividad antimicrobiana o capacidad para fortalecer la resistencia de las plantas frente a la infección.

Cada producto biológico elegido posee una formulación única, con ingredientes activos y mecanismos de acción específicos, suministrados por distintos fabricantes o proveedores. Esta diversidad permite explorar enfoques y estrategias variadas para el control de *Ralstonia solanacearum*.

Tratamientos**Tabla 5***Tratamientos a evaluar 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

Tabla 6*Tratamientos a evaluar en campo*

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

Fase de Laboratorio

Aislamiento de *Ralstonia solanacearum*

Selección de plantas madre infectadas

Se procedió a identificar y seleccionar cinco plantas madre de *Eucalyptus urograndis* del Clon LA80 que presentaban síntomas característicos de marchitez bacteriana. Estos síntomas incluyeron marchitez, necrosis foliar, amarillamiento de hojas y manchas en los tallos.

Figura 4

*Identificación de plantas madre con síntomas característicos provocados por *Ralstonia solanacearum**



Realización de la Prueba de liberación bacteriana

Para confirmar la presencia de bacterias en los tallos de las plantas seleccionadas, se realizó una prueba rápida, la cual consistió en cortar una sección de la parte inferior del tallo de cada planta y sumergirla en un recipiente de agua transparente. Se observó la posible liberación de bacterias desde el tallo hacia el agua, utilizando la aparición de un flujo lechoso o nublado como indicador.

Figura 5

Prueba de liberación bacteriana en campo



Nota: En la figura se muestra la capacidad de *Ralstonia solanacearum* para generar hebras de exudado viscoso en presencia del agua (Bedón , 2023).

Obtención de Muestras con la Enfermedad

Una vez confirmada la presencia de bacterias mediante la prueba rápida, se obtuvieron muestras de tejido afectado de las plantas identificadas. Estas muestras fueron etiquetadas de manera precisa, indicando la planta de origen y el área específica de donde se tomó la muestra.

Transporte al Laboratorio de Microbiología:

Las muestras etiquetadas se transportaron al laboratorio de microbiología en condiciones adecuadas para preservar la integridad y viabilidad de las bacterias presentes en ellas , para esto fue necesario utilizar un cooler.

Figura 6

Transporte de muestras en cooler

***Procesamiento en el Laboratorio:***

En el laboratorio, se realizó un detallado procesamiento de las muestras con el fin de llevar a cabo el aislamiento de *Ralstonia solanacearum*. En primer lugar, se llevó a cabo una minuciosa desinfección superficial de las muestras para eliminar cualquier contaminante externo que pudiera influir en los resultados. A continuación, se procedió a la homogeneización o trituración de las muestras para obtener una suspensión bacteriana concentrada y representativa.

Posteriormente, estas suspensiones bacterianas fueron introducidas en medios de cultivo selectivos especialmente diseñados para favorecer el crecimiento de *Ralstonia solanacearum*. Entre estos medios, se utilizó el Agar de Kelman con tetrazolio (TTC), conocido por proporcionar un entorno adecuado para el desarrollo de *Ralstonia solanacearum* y facilitar su detección mediante la formación de colonias características.

La inoculación en el medio de Agar de Kelman con TTC se llevó a cabo con sumo cuidado y precisión, asegurando una distribución uniforme de las muestras. Este medio selectivo ofrece

las condiciones óptimas para el crecimiento de *Ralstonia solanacearum* lo que permite su identificación y un aislamiento efectivo.

Una vez inoculadas las muestras en el medio de cultivo, se procedió a incubar las placas a la temperatura de 28°C durante 24 horas para favorecer el desarrollo bacteriano. Durante el proceso de incubación, se realizaron observaciones periódicas para identificar la formación de colonias bacterianas características de *Ralstonia* spp.

Posteriormente, una vez obtenidas las cepas de *Ralstonia solanacearum*, se llevó a cabo una identificación adicional utilizando pruebas inmunostrip. Este método permitió verificar de manera efectiva que las colonias crecidas en el medio de cultivo efectivamente correspondían a *Ralstonia* spp, proporcionando una confirmación adicional de los resultados del aislamiento bacteriano.

Tratamientos

Pruebas de antagonismo

Para las pruebas de antagonismo se midió y vertió 350 ml de agua destilada en un matraz de fondo redondo de capacidad adecuada. Luego, se pesaron 7 g de polvo de caldo nutritivo y se agregaron al agua en el matraz. Posteriormente, se mezcló bien el contenido del matraz para asegurar la disolución completa del polvo de caldo nutritivo en el agua. Se tapó el matraz con papel de aluminio para evitar la contaminación durante la esterilización.

El matraz se colocó en el autoclave y se esterilizó a una temperatura de 121°C durante 20 minutos. Terminada la esterilización, se retiró el matraz del autoclave y se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de manipularlo.

Se dispensaron 50 ml de caldo nutritivo estéril en 7 matraces. En cada uno de los matraces, se añadió 1 ml de cada tratamiento utilizando una pipeta estéril y se rotularon. En otro matraz, se utilizó un asa bacteriológica esterilizada para transferir una pequeña porción de la

colonia de *Ralstonia solanacearum* previamente aislada al caldo nutritivo estéril. Al final, se taparon todos los matraces con gasas y se procedió a colocarlos en el agitador orbital durante 24 horas a 125 rpm.

Figura 7

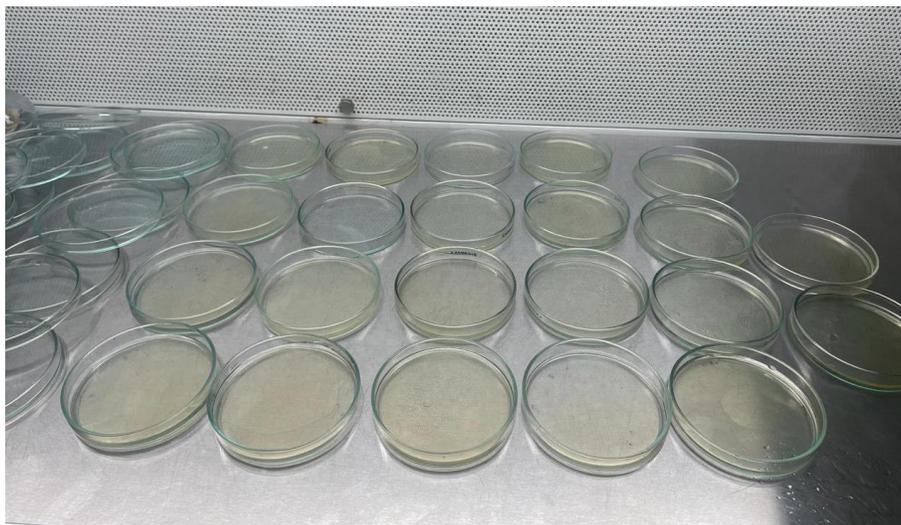
Tratamientos en el agitador orbital a 125 rpm



Transcurridas las 48 horas se procedió a medir 28 gramos de Agar y se agregaron al frasco Boeco de 1000 ml. Se añadieron 1000 ml de agua destilada al frasco, asegurándose de que el Agar estuviera completamente disuelto. Posteriormente, se esterilizó el medio de cultivo en el autoclave a una temperatura de 121°C durante 20 minutos. Una vez completado el ciclo de esterilización, se retiró el frasco del autoclave y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se preparó un área de trabajo estéril en la cámara de flujo laminar y se dispensó el medio en cajas petri.

Figura 8

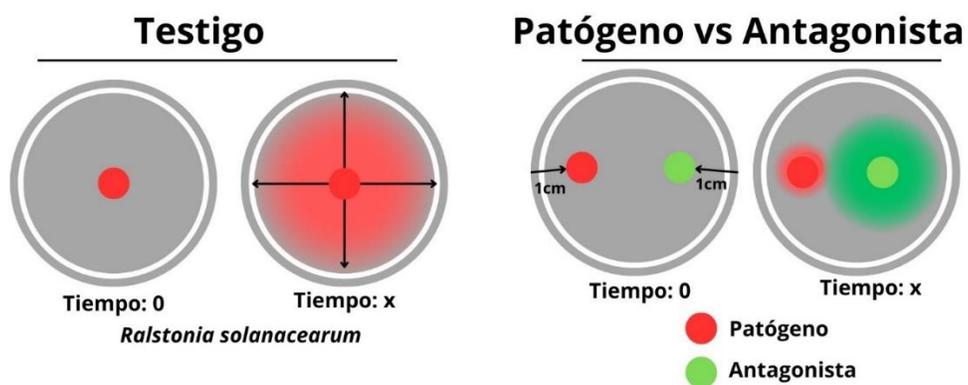
Medio Agar Nutritivo dispensado en cajas petri



Una vez que el medio Agar nutritivo se solidificó, se humedecieron discos de papel filtro de 0,5 cm en cada uno de los tratamientos previamente inoculados en caldo nutritivo y se procedió a colocar cada disco de papel filtro a 1 cm del borde de la caja Petri y al otro extremo otro disco de papel filtro humedecido con el caldo nutritivo que se inoculó *Ralstonia solanacearum*.

Figura 9

Siembra del testigo y los tratamientos



Nota: En la figura se indica la manera en la que se realiza la siembra dual de la bacteria patógena y el antagonista a un centímetro del borde de la caja Petri, mientras que par el testigo que contiene solo el patógeno se siembra en el centro.

Se taparon adecuadamente las cajas Petri para evitar la contaminación y se dejaron en la incubadora durante 120 horas a una temperatura de 28°C para favorecer el crecimiento bacteriano. Se realizaron toma de datos a las 48, 72 y 120 horas para determinar el crecimiento radial y el PICR.

Evaluación de la capacidad biocontroladora

Para determinar la eficacia de los microorganismos como agentes de control biológico, se adaptó la escala de evaluación establecida por Ezziyyani y colaboradores (2004), referenciada por (Remache F. , 2018).

Tabla 7

Escala para determinar la eficacia de agentes de control biológico

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

Evaluación del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR)

Para evaluar la capacidad de los microorganismos para inhibir el crecimiento de los patógenos, se empleó un método que implica el cultivo conjunto de cada patógeno con los microorganismos evaluados, junto con sus respectivos controles, y luego se calculó el grado de antagonismo utilizando la siguiente formula:

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

Donde:

R₁: Radio del patógeno testigo

R₂: Radio del patógeno en cultivo dual

Diseño experimental y análisis estadístico de la fase de laboratorio

Se estableció un diseño completamente al azar con 4 repeticiones para cada tratamiento más un testigo absoluto (solo se sembró el patógeno) y se comparó el valor final del PICR para identificar si hubo diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, para ello se realizó un análisis de varianza y comparación de medias por el método de Duncan (0,05).

Variables evaluadas en laboratorio

- Diámetro de la colonia del patógeno

Fase de Campo

Delimitación de las parcelas

Se establecieron unidades experimentales conformadas por 15 plantas cada una, dando un total de 20, y por lo tanto, 300 unidades básicas.

Aplicación

Se emplearon las dosis especificadas en la Tabla 6, y se realizaron aplicaciones edáficas con un volumen de 100 mL por planta. Dichas aplicaciones fueron realizadas cada 15 días, durante los 2 meses de evaluación, dando un total de cuatro aplicaciones.

Diseño experimental y análisis estadístico de la fase de campo

Se empleó un Diseño Cuadrado Aleatorizado, con 5 tratamientos y cuatro repeticiones. Cada repetición consta de 15 unidades básicas (plantas).

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una prueba de análisis de varianza y una separación de medias por DMS (0,05).

Variables a evaluar

Semanalmente se evaluaron las siguientes variables mediante observación:

- Incidencia (%)
- Severidad (Figura 7)
- Mortalidad (%)

"Se llevó a cabo una evaluación exhaustiva de la severidad de *Ralstonia solanacearum* mediante una escala específica que categoriza los síntomas foliares en cinco grados progresivos de daño. Esta escala, que va desde el grado 1 hasta el grado 5, se diseñó para discernir la magnitud del impacto patogénico en las hojas infectadas. En el nivel más bajo de la escala, el grado 1 indica una afectación mínima y discreta, mientras que en el extremo superior, el grado 5 representa la máxima severidad, caracterizada por una necrosis y descomposición foliar generalizada, reflejando el deterioro extremo y la devastación causados por la infección avanzada de *Ralstonia solanacearum*."

Figura 10

Escala de severidad ocasionada por Ralstonia solanacearum en plantas madre de Eucalyptus urograndis



Tabla 8

Escala de severidad ocasionada por Ralstonia solanacearum en plantas madre de Eucalyptus urograndis.

Grado	Descripción
1	Sensación flácida al tocar.
2	Marchitez evidente, con pérdida significativa del color verde intenso.
3	Flacidez muy evidente, con ocasional presencia de amarillamiento en algunos casos.
4	Amarillamiento y necrosis, con flacidez muy avanzada y pérdida de la forma original.
5	Necrosis total, hojas totalmente deformadas.

Resultados y discusión

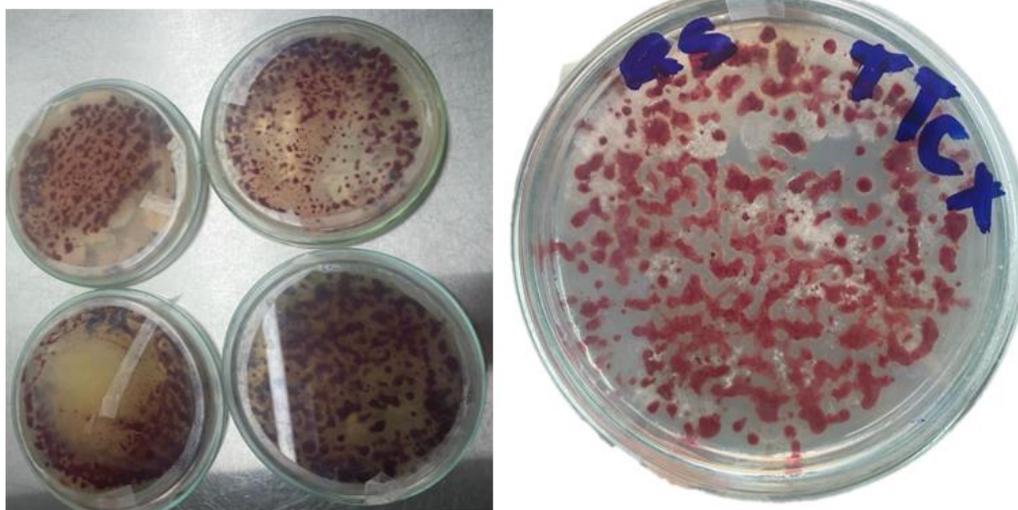
Fase de laboratorio

Aislamiento de *Ralstonia solanacearum*

Después de un período de incubación de 48 horas, se llevó a cabo la evaluación del crecimiento en los medios de cultivo. Se observó un desarrollo característico en el medio de cultivo Kelman con TTC. Dado que este medio posee selectividad hacia *Ralstonia solanacearum*, permitiendo su crecimiento mientras inhibe el desarrollo de otros microorganismos, se pudo confirmar la presencia de *Ralstonia solanacearum*. Crecimiento

Figura 11

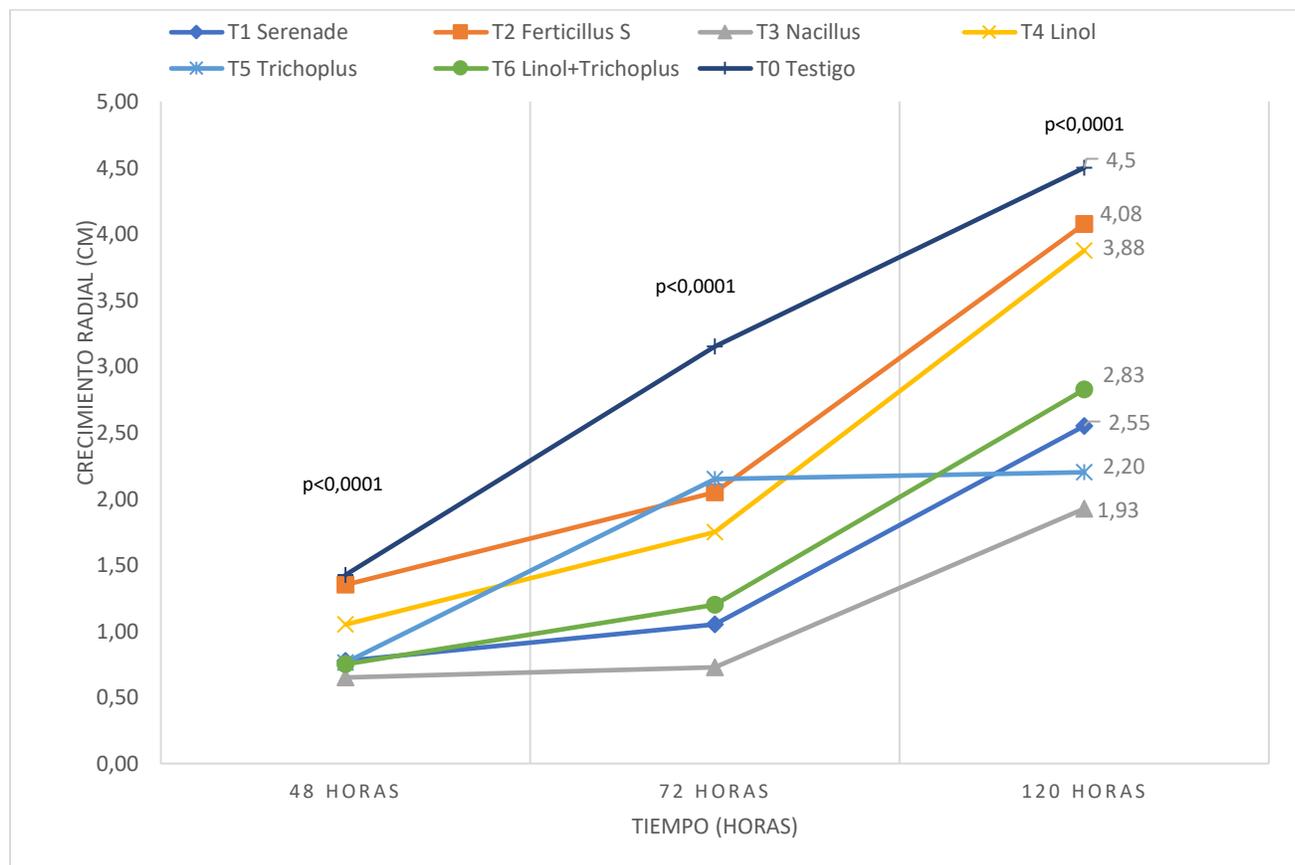
Cepas de Ralstonia solanacearum aisladas



Crecimiento radial de *Ralstonia solanacearum* en cultivo dual con los diferentes tratamientos

Figura 12

Crecimiento radial de *Ralstonia solanacearum* en cultivo dual con los diferentes tratamientos



Nota: La gráfica muestra la tendencia de crecimiento de *R. solanacearum*.

Después de analizar los resultados mediante el análisis de varianza (tabla 9), se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en su capacidad para inhibir el crecimiento de *Ralstonia solanacearum* a lo largo del tiempo (48 horas, 72 horas y 120 horas).

A las 48 horas, se observó una reducción significativa en el crecimiento radial de *Ralstonia solanacearum* en los tratamientos T1 (Serenade), T3 (Nacillus) y T5 (Trichoplus) en comparación con el grupo de control T0. Estos tratamientos exhibieron una eficacia superior al resto, indicando

un efecto inhibitorio temprano sobre el crecimiento del patógeno. Por otro lado, los tratamientos T2 (Ferticillus S) y T4 (Linol) mostraron una disminución menos notable en el crecimiento radial en este punto temporal, aunque aún demostraron cierta actividad inhibidora.

A las 72 horas, se mantuvo la tendencia de los tratamientos T1 (Serenade), T3 (Nacillus) y T5 (Trichoplus) en la supresión del crecimiento radial, evidenciando su eficacia continua. Por otro lado, los tratamientos T2 (Ferticillus S) y T4 (Linol) mostraron un aumento en el crecimiento radial, aunque en menor medida que el control T0.

Finalmente, a las 120 horas, los tratamientos más efectivos en la reducción del crecimiento radial fueron T1 (Serenade), T3 (Nacillus), T5 (Trichoplus) y T6 (Linol+Trichoplus). Estos tratamientos mantuvieron una inhibición significativa del crecimiento radial en comparación con el control T0. Por otro lado, los tratamientos T2 (Ferticillus S) y T4 (Linol) siguieron siendo menos efectivos en la supresión del crecimiento radial, mostrando un crecimiento más cercano al grupo de control T0.

Análisis de varianza

Tabla 9

*Análisis de varianza para la variable crecimiento radial de *Ralstonia solanacearum* en función del tiempo.*

F.V.	48h			72h			120h		
	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

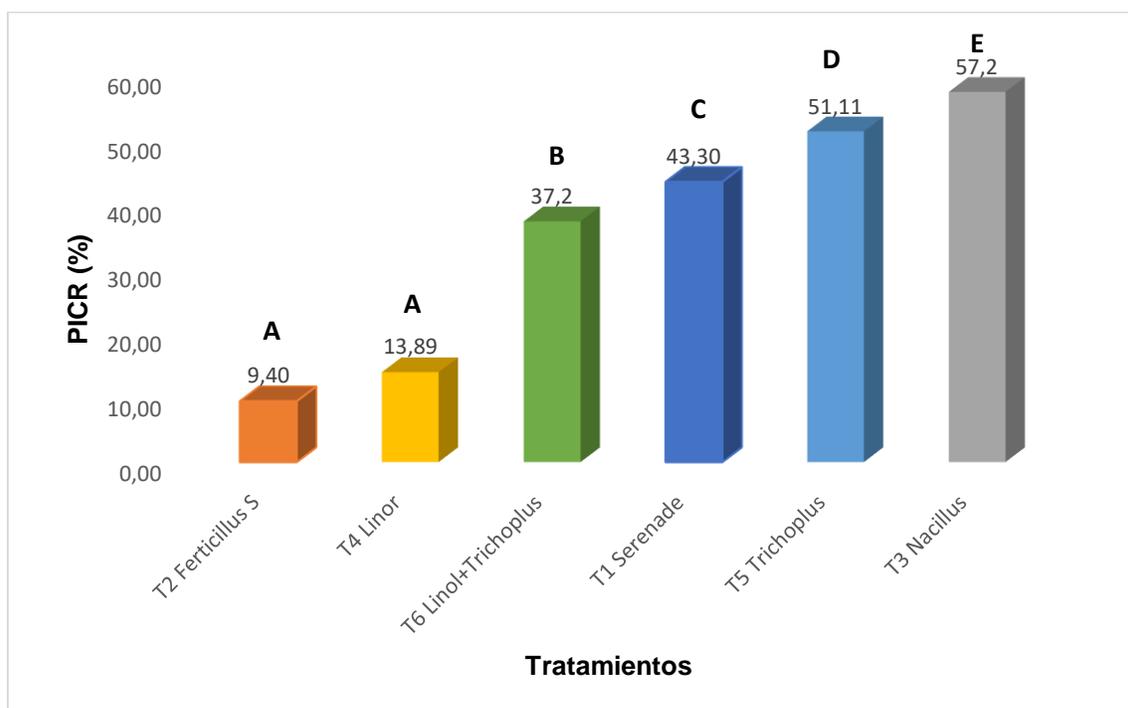
Nota: La tabla expone el análisis de varianza para la variable crecimiento radial de *Ralstonia solanacearum* en función del tiempo a un nivel de significancia al 5%, en este caso se demostró

diferencia estadísticamente significativa para la variable tratamiento a las 48, 72 y 120 horas ($p < 0,0001$).

Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR)

Tabla 10

Porcentaje de inhibición del crecimiento radial a las 120 horas



A las 120 horas de la inoculación, se observaron variaciones significativas en los niveles de inhibición del crecimiento de *Ralstonia solanacearum* entre los diferentes tratamientos biológicos evaluados.

El tratamiento T3 (Nacillus) demostró ser el más efectivo, con un porcentaje de inhibición del 57.2%. Esto indica que el producto Nacillus logró reducir significativamente el crecimiento de la bacteria patógena en el cultivo dual en comparación con los otros tratamientos.

Siguiendo de cerca, el tratamiento T5 (Trichoplus) mostró un porcentaje de inhibición del 51.00%, lo que sugiere una efectividad similar a la del tratamiento Nacillus en la supresión del crecimiento de *Ralstonia solanacearum*.

Por otro lado, el tratamiento T1 (Serenade) exhibió un porcentaje de inhibición del 43.30%, demostrando una capacidad moderada para reducir el crecimiento del patógeno en comparación con los tratamientos Nacillus y Trichoplus.

El tratamiento T6 (Linol+Trichoplus) mostró un porcentaje de inhibición del 37.2%, indicando una eficacia intermedia en la inhibición del crecimiento bacteriano.

Por otro lado, los tratamientos T4 (Linor) y T2 (Ferticillus S) presentaron los porcentajes de inhibición más bajos, con valores de 13.89% y 9.40% respectivamente, lo que sugiere una menor efectividad en la reducción del crecimiento de *Ralstonia solanacearum* en comparación con los otros tratamientos evaluados.

Análisis de varianza

Tabla 11

Análisis de varianza para la variable PICR (%) evaluada a las 120 horas

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamiento	7702,83	5	1540,57	96,81	<0,0001
Error	286,45	18	15,91		
Total	7989,28	23			
CV	11,28				

Nota: La tabla expone el análisis de varianza para la variable porcentaje de inhibición del crecimiento radial, a un nivel de significancia del 5%, se demostró diferencia estadísticamente significativa para los tratamientos ($p < 0,0001$).

Prueba de significancia de Duncan del PICR (%)

Tabla 12

Test de Duncan para el PICR de acuerdo con los tratamientos.

Tratamiento	Medias	n	E.E.	Rangos
T2 Fericillus S	9,45	4	1,99	A
T4 Linol	13,89	4	1,99	A
T6 Linol+Trichoplus	37,22	4	1,99	B
T1 Serenade	43,33	4	1,99	C
T5 Trichoplus	51,11	4	1,99	D
T3 Nacillus	57,23	4	1,99	E

Nota: Las letras asignadas a cada tratamiento significan conjuntos donde las medias no tienen diferencias significativas. En este caso, los tratamientos T2 y T4 se agrupan en A, es decir no tienen diferencias significativas, mientras que el resto de los tratamientos si se difieren estadísticamente.

Inicialmente, se destaca la variabilidad en la capacidad antagonista frente a la bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum* entre las distintas cepas bacterianas pertenecientes al género *Bacillus* spp. evaluadas. Específicamente, el producto Nacillus (T3) demostró la mayor capacidad de inhibición, alcanzando un 57,2% de PICR, mientras que Fericillus S (T2) mostró un nivel mucho más bajo, con un 9,4%. Según (Ceballos *et al.*, 2014) (Villareal *et al.*, 2018), la eficacia de cada cepa bacteriana como agente de biocontrol depende de su especificidad de acción y de la producción de metabolitos antimicrobianos dirigidos a cada patógeno en particular.

En cuanto al producto que contiene el hongo antagonista *Trichoderma* spp., Trichoplus (T5), presentó un PICR del 55%, similar al de la mejor cepa bacteriana (T3). Esto respalda lo documentado por (Martinez *et al.*, 2013) y (Astorga *et al.*, 2014) acerca de la alta actividad inhibitoria de estos hongos contra la bacteria fitopatógena *R. solanacearum*, mediante la

activación de varios mecanismos simultáneos, incluyendo antibiosis, micoparasitismo y competencia eficiente por nutrientes y espacio.

El tratamiento Serenade (T1), basado en *Bacillus* spp., mostró una eficacia intermedia con un 43,3% de inhibición del crecimiento radial de *Ralstonia solanacearum*. Esto sugiere que tiene un efecto moderado en el control biológico de este patógeno bacteriano. Según lo indicado por (Villareal *et al.* , 2018) , es probable que las cepas presentes en el producto Serenade tengan una tasa de producción relativamente menor de lipopéptidos antibacterianos y otras sustancias bioactivas en comparación con la cepa más efectiva, que corresponde al tratamiento Nacillus (T3).

Respecto al tratamiento combinado de bacterias *Bacillus* spp. y el hongo *Trichoderma* spp., Linor + Trichoplus (T6), mostró una inhibición moderada del 37,2% sobre el crecimiento de la bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum*. Aunque no se observó un efecto potenciador de la mezcla microbiana sobre la acción individual del hongo *Trichoderma* (T5), estos resultados coinciden con lo sugerido por (Soto *et al.*, 2018) sobre un posible efecto aditivo parcial entre diversos agentes microbianos de control biológico.

Evaluación de la capacidad biocontroladora

Basándonos en la escala proporcionada y los porcentajes de inhibición del crecimiento radial (PICR) para cada tratamiento, se pudo asignar un nivel de potencial biocontrolador.

Tabla 13

Evaluación de la capacidad biocontroladora partir del PICR

Tratamiento	PICR	Potencial
T1(Serenade)	43.3%	Malo
T2 (Ferticillus S)	9.40%	Muy malo
T3 (Nacillus)	57.2%	Bueno

T4 (Linor)	13.89%	Muy malo
T5 (Trichoplus)	51%	Bueno
T6 (Linor +Trichoplus)	37.02%	Deficiente

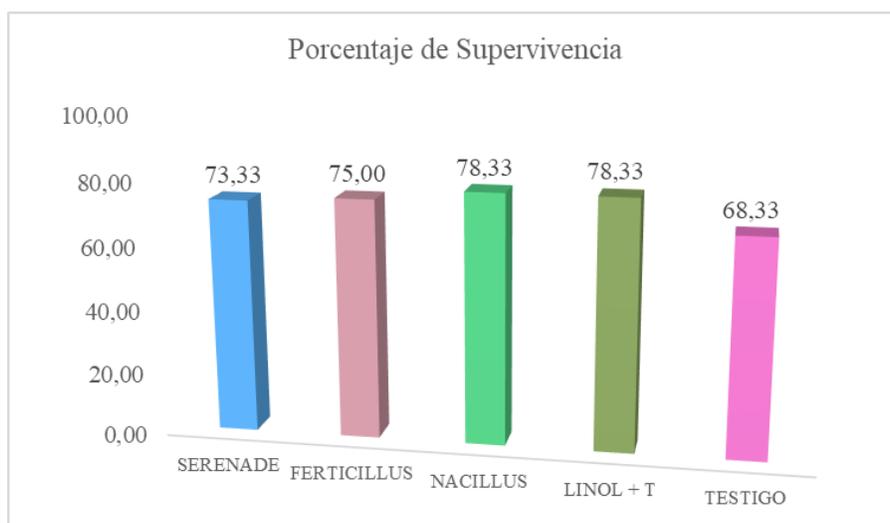
Nota: La tabla presenta una descripción de los distintos tratamientos junto con su Potencial de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) frente a *Ralstonia solanacearum*. Cada tratamiento está identificado por una etiqueta T seguida de un número. En la columna "Potencial", se evalúa la eficacia relativa de cada tratamiento.

CAMPO

Supervivencia

Figura 13

Porcentaje de supervivencia por tratamientos a los 50 días



La supervivencia evaluada durante 50 días demostró que el testigo alcanzó una un 68%, seguido por Serenade con 73% y Ferticillus S con 75%; Nacillus y Linol+Trichoplus de 78,33%, superando al testigo absoluto con un 10%. Sin embargo, no se presentó diferencia estadística en el análisis de varianza.

Por otro lado, la tendencia de la supervivencia cambió drásticamente con el paso del tiempo para todos los tratamientos, sin embargo, mediante análisis visual de la Figura 14 parecería existir una gran diferencia entre el testigo y uno de los tratamientos durante las primeras semanas del ensayo, mientras que al finalizar, son similares.

Figura 14

Tendencia de la supervivencia por tratamiento durante 7 semanas

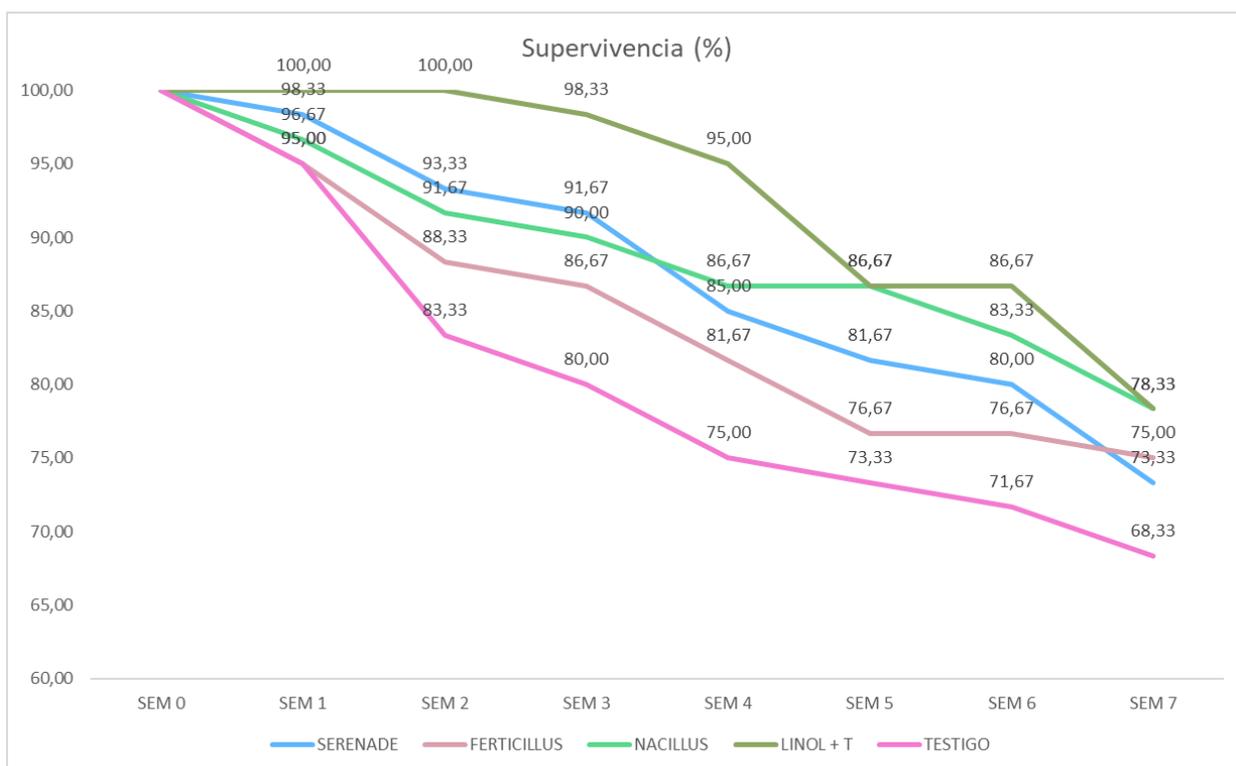
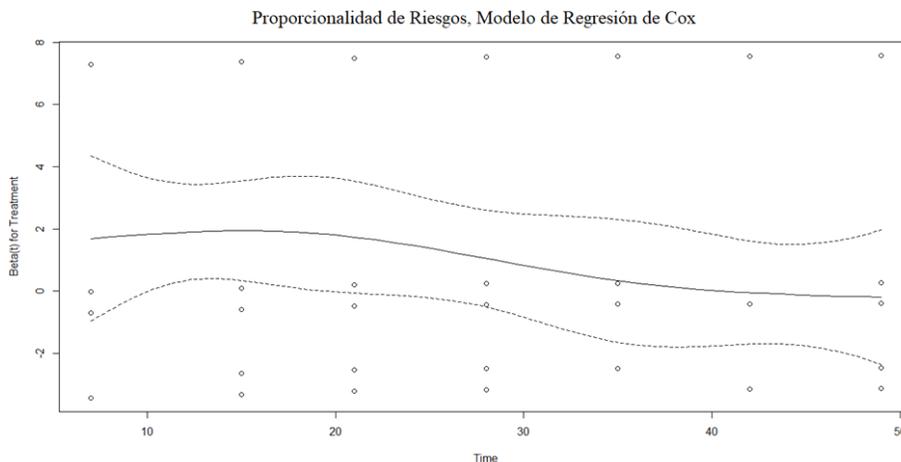


Figura 15

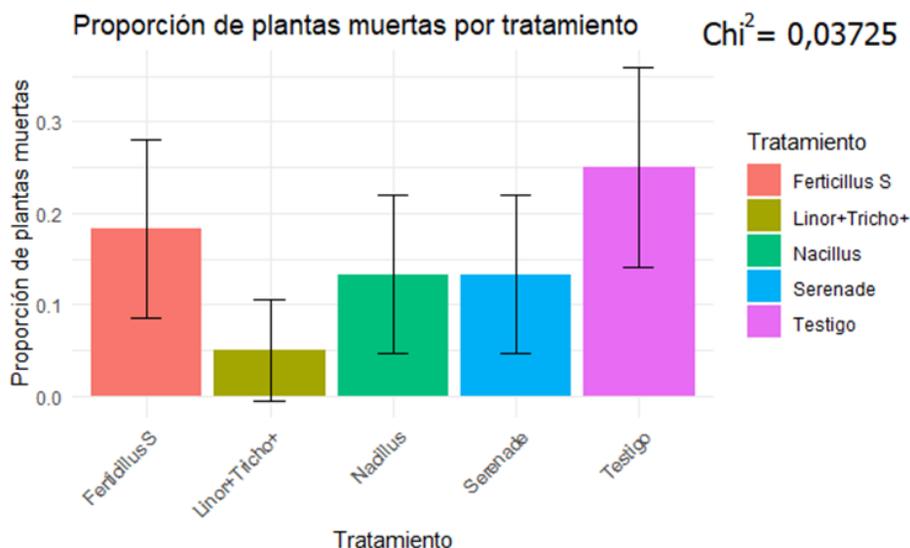
Prueba de proporcionalidad de riesgos por modelo de regresión de Cox para los tratamientos.



El modelo de regresión de Cox (Figura 15) es un método estadístico utilizado para pronosticar la probabilidad de que un evento se produzca, en este caso, confirma que en las primeras semanas (alrededor de 28 días) los tratamientos tienen una fuerte influencia sobre la variable evaluada en las plantas. Mientras que, al final del experimento, dicho efecto decrece hasta ser casi nulo. Por esta razón, se realizó una prueba de Chi cuadrado durante los primeros 28 días para analizar si es que realmente existe diferencia significativa entre tratamientos. Para posteriormente calcular los intervalos de confianza para la proporción de plantas muertas y realizar una gráfica (Figura 16) para diferenciar los tratamientos.

Figura 16

Proporción de plantas muertas por tratamiento con un $\text{Chi}^2 = 0,03725$.



Los intervalos de confianza graficados alcanzan rangos similares entre la mayoría de los tratamientos, entendiéndose que no difieren entre ellos. Sin embargo, el tratamiento de Linor+Trichoplus no presenta diferencia con los tratamientos, pero sí con el testigo, indicando que éste se posiciona como el mejor tratamiento durante los primeros 28 días de evaluación. La figura 13 ya nos había mencionado previamente que a los 50 días estas diferencias desaparecen.

Este cambio ocurre porque en cada unidad experimental, debido a la limitada disponibilidad de unidades básicas, existe una proporción de plantas jóvenes y viejas; este primer grupo, al ser más susceptibles, son las primeras en morir; las viejas, al tener mayor contenido de lignina y sistema radicular más definido, toleran y conviven con el patógeno. En los últimos días del experimento, la mayor parte de las plantas jóvenes ya habían muerto a causa de *Ralstonia solanacearum*, es por esto que, los porcentajes de supervivencia no difieren entre tratamientos. Pero, en un inicio, las plantas jóvenes del testigo resultaron ser más susceptibles al ataque del patógeno que aquellas que fueron tratadas, especialmente las que recibieron la aplicación de Linor+Trichoplus. Las plantas tratadas presentan menor susceptibilidad ante *R. solanacearum*.

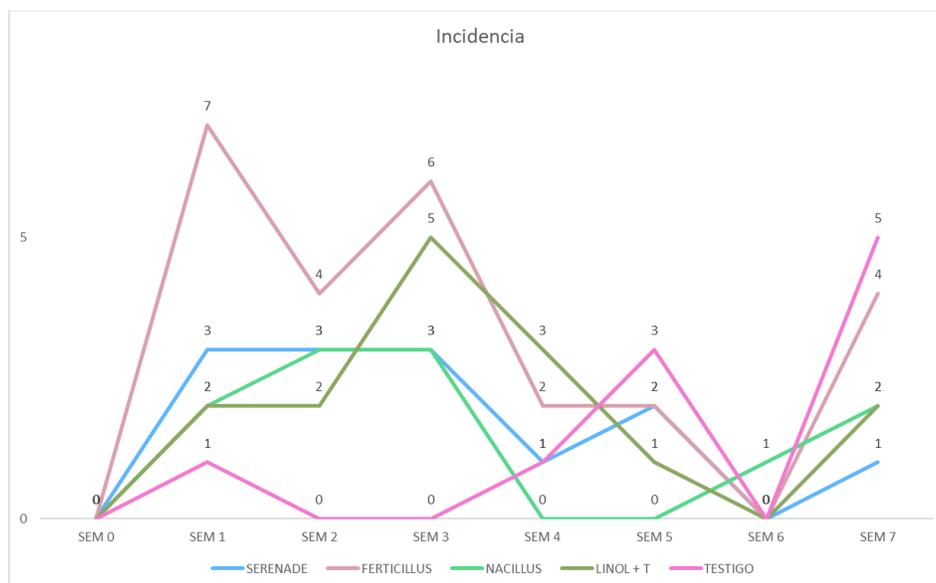
por las propiedades de cada controlador biológico, como mencionaba (Villareal *et al.*, 2018) pueden ejercer antagonismo ya sea por la competencia de espacio y nutrientes, antibiosis o de manera indirecta por medio de la inducción sistémica de resistencia.

Incidencia

La incidencia es el número de plantas infectadas por *Ralstonia solanacearum* existentes por tratamiento. Se pensaría que en los tratamientos debería haber menor incidencia del patógeno gracias a la acción de los controladores biológicos, sin embargo, la Figura 17, nos muestra lo contrario. El testigo presenta el menor número de plantas infectadas cada semana y hasta el final del experimento.

Figura 17

Tendencia de incidencia por tratamiento



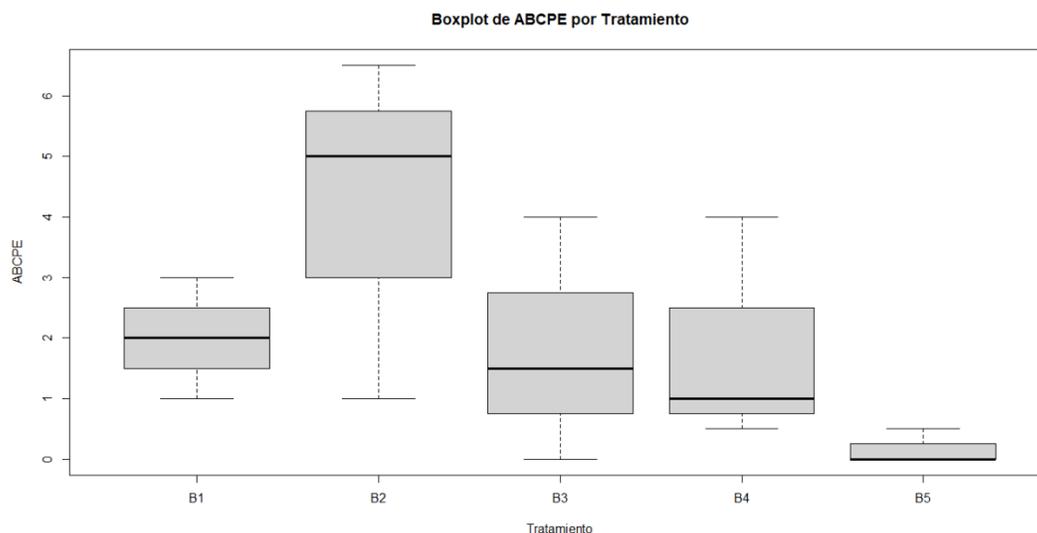
Esto sucede puesto que, si bien los controladores biológicos no están manteniendo a las plantas sanas, sí que están ayudándolas a soportar el ataque del patógeno durante un tiempo mayor. Por lo que, si relacionamos esta tendencia de la incidencia con la de la supervivencia (Figura 14), es apreciable que, aunque el testigo tenga la menor cantidad de plantas infectadas,

tiene la mayor cantidad de plantas muertas. Esto sucede porque las plantas del testigo no resisten al patógeno más de 7 días, lo que provoca que no se evidencie la infección en el monitoreo semanal; mientras que, en los tratamientos, las plantas infectadas podrían tardar de 7 a 15 días en perecer, como promedio.

Para evaluar la incidencia, se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad, calculada mediante la fórmula: $ABCPE = ((y_i + y_{i+1}) / 2) (t_{i+1} - t_i)$ (Nieto, M; et al., 2020). En donde, a pesar de que en la gráfica de tendencia (Figura 17) parecería que existe diferencia en las primeras semanas, los análisis de varianza realizados decretaron que no (p -valor:0.204); siendo muy fácil observar esto mediante el siguiente boxplot (Figura 18), en donde los bigotes de cada tratamiento llegan a tener valores similares, indicando que no existe diferencia estadística entre ellos.

Figura 18

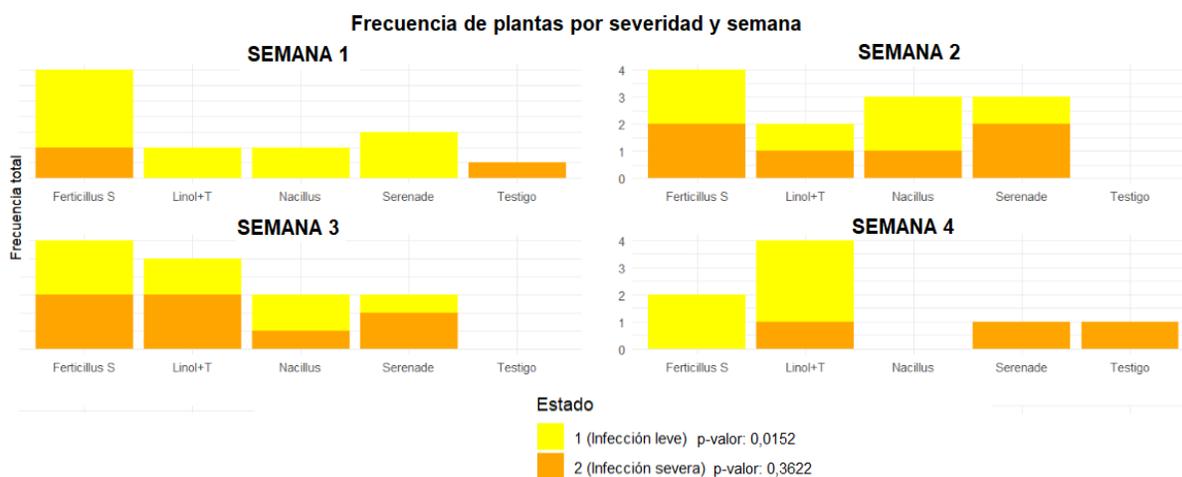
Boxplot del área bajo la curva del progreso de la enfermedad clasificada por tratamiento.



Severidad

Figura 19

Gráfico de frecuencias de la severidad de las plantas clasificada por tratamientos durante las cuatro primeras semanas.



La severidad está relacionada con la incidencia, puesto que esta cataloga la gravedad de la enfermedad en cada planta en una escala del 1-5 (Figura 10). En la Figura 19, se catalogaron como “Infección Leve” aquellas plantas en estado de severidad 1 y 2, mientras que se catalogaban como “Infección Severa” aquellas en estados 3, 4 y 5. El testigo presenta datos de severidad que difieren de los de los tratamientos, comprobados con un ANOVA comparando la cantidad de casos de infección leve (p-valor: 0,0152) en cada tratamiento, mientras que para los casos de infección severa no se presentaron diferencia significativa.

Como se mencionó anteriormente, las plantas del testigo eran más susceptibles al ataque de *Ralstonia solanacearum*. Debido a esto, durante los monitoreos semanales las plantas en estados iniciales de infección eran indetectables y simplemente se hallaban las plantas ya muertas; por otro lado, las plantas de los tratamientos presentaron síntomas iniciales que fueron observables durante varios monitoreos hasta que finalmente las plantas morían. Recalcando que, los tratamientos no lograron controlar la enfermedad al punto de eliminarla, pero sí mitigar la

agresividad de la misma, prolongando la vida de la planta. Esto coincide con los ensayos realizados en plátano (*Musa AAB Simmonds*) de Ceballos, et al., (2011) y Mateus (2020), en donde *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* y *T. harzianum* redujeron la severidad y la incidencia causada por *R. solanacearum*. Por otro lado, López, et al., (2020) encontró efectos similares en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) utilizando cepas de *Trichoderma* spp.

Análisis de Costos

Tabla 14

Análisis de costos de los tratamientos

Tratamientos	Costo (\$)	Dosis	Solución/planta (mL)	Producto/planta (mL)	Costo/Planta (\$)
Linol+trichoplus	25	15 ml+1 g	100	1,5 + 0,1	0,0224
Serenade	14	15 ml	100	1,5	0,021
Ferticillus	12,5	15 ml	100	1,5	0,01875
Nacillus	120	0,5 g	100	0,05	0,006
Testigo				0	0

Nacillus, a pesar de tener el costo por kilogramo de producto más alto, se posiciona como el tratamiento más económico debido a su baja dosis por litro de agua, en comparación con el resto de los controladores biológicos. Mientras que, Linol+Trichoplus se destaca por ser uno de los tratamientos más costosos, ya que está compuesto por dos productos independientes. No es posible calcular el beneficio a obtener de cada tratamiento ya que las plantas madre no representan una ganancia económica para la empresa, ni los esquejes producidos por las mismas; ya que todo lo utilizan para abastecer sus necesidades.

Conclusiones y recomendaciones

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.

Se pudo determinar que existen diferencias significativas en la capacidad de las diferentes cepas de *Bacillus* spp. para la inhibición del crecimiento de *Ralstonia solanacearum*.

La mezcla de bacterias *Bacillus* spp. y el hongo *Trichoderma* spp. en Linor + Trichoplus (T6) tuvo un efecto moderado en la reducción del crecimiento de *R. solanacearum*. Aunque, no se notó un incremento en la acción del hongo Trichoderma (T5) cuando se combinó con las bacterias *Bacillus* spp.

Para la variable incidencia, no se encontró diferencia estadísticamente significativa al realizar los análisis sobre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad. Dando a entender que *R. solanacearum* está constantemente atacando al cultivo sin importar el tratamiento.

En cuanto a la variable severidad, se obtuvo una diferencia estadística en los casos acumulados para infecciones leves (p-valor: 0,0152). Relacionado con la variable incidencia, aunque *R. solanacearum* ataque a todos los tratamientos por igual, la agresividad puede disminuir gracias a los tratamientos. Es así que en el testigo únicamente se encontraron plantas muertas o con un avanzado progreso de la enfermedad; mientras que en los tratamientos, las plantas se mantuvieron con niveles bajos del patógeno durante un corto período de tiempo hasta que aumentó de manera paulatina, causando finalmente la muerte.

Por último, el porcentaje de supervivencia final fue estadísticamente similar en todos los tratamientos, sin embargo, el modelo de regresión de Cox aplicado en los datos defiende que el efecto de los tratamientos es más fuerte al inicio del experimento que al final. Por lo cual, se optó

por realizar una prueba de Chi-cuadrado comparando plantas sanas versus plantas muertas acumuladas hasta 28 días de iniciado el experimento, en donde se encontró diferencia significativa entre tratamientos (p-valor: 0,03725), siendo Linor+Trichoplus el tratamiento con mejor supervivencia.

En el conjunto de todas las variables evaluadas en campo, Linor+Trichoplus se posiciona como el mejor tratamiento en esta investigación, sin embargo, también es el más costoso.

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.

Si bien se pudo reducir la agresividad de *R. solanacearum*, no se pudo detener. Por esta razón, se recomienda realizar ajustes en la dosis, frecuencia y modo de aplicación de los tratamientos; lo que permitirá que las poblaciones de los controladores biológicos se reproduzcan a mayor velocidad y se mantengan durante más tiempo. Así también, es recomendable que las plantas madre estén organizadas por edad, puesto que las que ya llevan tiempo establecidas no requieren de un mayor cuidado ante el patógeno, mientras que las jóvenes son mucho más susceptibles al ataque de *R. solanacearum*, haciendo necesaria la aplicación de tratamientos preventivos.

En cuanto al porcentaje de incidencia, el testigo demostró tener los valores más bajos, esto debido a que *R. solanacearum* presentaba mayor agresividad en dichas plantas debido a una mayor susceptibilidad, provocando que no fuesen visibles los síntomas durante cada revisión; por lo que, se recomienda reducir la frecuencia de los monitoreos, para poder evaluar cuántos días tarda una planta de cada tratamiento en morir desde que presenta los primeros síntomas de *R. solanacearum*.

En varios análisis estadísticos efectuados no se presentó diferencia estadística entre tratamientos, por lo cual, si bien Linor+Trichoplus resultó ser el mejor tratamiento, es recomendable replicar el ensayo con las modificaciones anteriormente mencionadas y con un enfoque de análisis costo/beneficio.

Revisión Bibliográfica

- Agamez, E., Barrera, J., & Oviedo, L. (2009). *Evaluación del antagonismo y multiplicación de Trichoderma en sustrato de plátano en medio líquido estático*. Obtenido de Revista Scielo: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2009000300005
- Agdia. (2024). *Agdia ImmunoStrip® for Ralstonia solanacearum (Rs)*. Obtenido de Agdia: <https://orders.agdia.com/agdia-immunostrip-for-rs-isk-33900>
- Agrios, G. N. (1997). *Plant pathology*. San Diego.
- Álvarez, B., Biosca, E., & López, M. (Enero de 2010). *On the life of Ralstonia solanacearum, a destructive bacterial plantpathogen*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/267772811_On_the_life_of_Ralstonia_solanacearum_a_destructive_bacterial_plant_pathogen#fullTextFileContent
- Assis, F., & Rodríguez, F. (2014). *La propagación vegetativa de eucaliptos en Chile*. Obtenido de https://www.eucalyptus.com.br/artigos/2014_Propagacion+Vegetativa+Eucalyptus+Chile.pdf
- Astorga, K., Meneses, K., Zuñiga, C., Brenes, J., & Rivera, W. (2014). *Evaluación del antagonismo de Trichoderma sp. y Bacillus subtilis contra tres patógenos del ajo*. Obtenido de <https://doi.org/10.18845/tm.v27i2.1929>
- Avendaño, F. M. (2018). *Comportamiento del Eucalyptus urograndis en suelos con cobertura de Pteridium sp. a 784 m.s.n.m, centro poblado de Omayá distrito de Pichari - Cusco, 2015*. Obtenido de https://repositorio.unsch.edu.pe/bitstream/UNSCH/3164/1/TESIS%20AF03_Mau.pdf
- BAYER. (2024). *Ficha técnica Serenade*. Obtenido de <https://agroactivocol.com/wp-content/uploads/2021/11/SERENADE-.pdf>

- Bedón , C. (2023). *Evaluación de microorganismos antagonistas para el control biológico in vitro de Ralstonia solanacearum*. Obtenido de Repositorio Institucional de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/37544/3/T-ESPE-058532.pdf>
- Bettiol, W., Rivera, M., Mondino, P., Montealegre, J., & Colmenárez, Y. (2014). *Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe*. Obtenido de <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1012615/1/2014LV01.pdf>
- Bio Insumos. (2024). *Ficha técnica: Nacillus®*. Obtenido de https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/nacillus_wp_etiqueta_extension_brasica_y_lechuga.pdf
- Cabrera , Y., & Velasco , R. (2023). *Evaluar dos híbridos de maíz y tres densidades de siembra (1.5, 2, 2.5 kg/m2) en la producción de forrajeverde hidropónico*. Obtenido de Repositorio ESPE: <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/36879/1/T-ESPESD-003319.pdf>
- Caviedes, E. (2017). *Evaluación in vitro e in vivo de microorganismos aislados de suelos arroceros para el control de Rhizoctonia sp. Agente csusal del añublo de la vaia del arroz (Oryza sativa)*. Obtenido de Repositorio de la Universidad de Los Llanos: <https://repositorio.unillanos.edu.co/bitstream/handle/001/2983/1122652442.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ceballos, G., Álvarez, E., & Bolaños , M. (2014). *Reducción de poblaciones de Ralstonia solanacearum raza 2 (Smith) en plátano (Musa AAB Simmonds) con aplicación de extractos de Trichoderma sp. (Alexopoulus y Mims) y bacterias antagonistas*. Obtenido de Acta Agronómica, vol. 63, núm. 1, 2014, pp. 1-11: <https://www.redalyc.org/pdf/1699/169930903011.pdf>

- Ceballos, G., Álvarez, E., & Bolaños, M. (2014). *Reducción de poblaciones de Ralstonia solanacearum raza 2 (Smith) en plátano (Musa AAB Simmonds) con aplicación de extractos de Trichoderma spp. (Alexopoulos y Mims) y bacterias antagonistas*. Obtenido de Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal: <https://www.redalyc.org/pdf/1699/169930903011.pdf>
- Corrales, L., Caycedo, L., Gómez, M., Ramos, S., & Rodríguez, J. (2017). *Bacillus spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos*. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702017000100046
- Dautt, M. (06 de junio de 2022). *Inducción de la resistencia sistémica en plantas mediada por Trichoderma*. Obtenido de Microorganismos y agricultura: <https://www.youtube.com/watch?v=yJL24UwAlwY>
- ECB. (2024). *Ficha técnica; Fericillus S*. Obtenido de ECB Bio Insumos Agrícolas: <https://www.ecbiotech.com/productos>
- Ecuador Forestal. (2012). *Ficha Técnica número 10: Eucalipto Tropical*. Obtenido de <https://ecuadorforestal.org/fichas-tecnicas-de-especies-forestales/ficha-tecnica-no-10-eucalipto/>
- EPPO. (2022). *Ralstonia solanacearum, R. pseudosolanacearum and R. syzygii (Ralstonia solanacearum species complex)*. Obtenido de EPPO STANDARD ON DIAGNOSTICS: <https://doi.org/10.1111/epp.12837>
- FONDEF. (2003). *Clonación de árboles forestales*. Obtenido de Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico: <https://www.conicyt.cl/fondef/2003/05/14/clonacion-de-arboles-forestales/#:~:text=La%20clonación%20de%20árboles%20forestales,árbol%20que%20se%20quiere%20replicar.>

- García, R. O., Kerns, J. P., & Thiessen, L. (22 de Enero de 2019). *Ralstonia solanacearum Species Complex: A Quick Diagnostic Guide*. Obtenido de The American Phytopathological Society: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHP-04-18-0015-DG>
- Goszczyńska, T., Serfontein, J., & Serfontein, S. (2000). *Introduction to Practical Phytobacteriology*. Obtenido de <https://ipmil.cired.vt.edu/wp-content/uploads/2014/06/Practical-Bacteriology-Guide-copy.pdf>
- Gutarra, L., & Herrera, J. (2018). *Protocolos de Ralstonia solanacearum*. Obtenido de Manual de laboratorio para Ralstonia solanacearum en CIP: http://potpathodiv.org/static/papers/ManualLaboratory_PI.pdf
- Habtamu, M., Mulugeta, K., & Fassil, A. (2022). *Isolation and characterization of Ralstonia solanacearum causing wilt disease in tomato*. Obtenido de Archives of Phytopathology and Plant Protection: <https://doi.org/10.1080/03235408.2022.2164161>
- Hidalgo, R. (2020). *Trichoderma: Hongo fungicida usado en tratamientos foliares del suelo y el control de diversas enfermedades producidas por hongos*. Obtenido de Revista Caribeña de Ciencias Sociales: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjCz_TByseEAxXGSzABHRWBAKEQFnoECDIQAQ&url=https%3A%2F%2Fdialnet.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F9037959.pdf&usg=AOvVaw3ZF9X_s5wIIcR3RLiMldc8&opi=89978449
- Howell, C., Hanson, L., Stipanovic, R., & Puckhaber, L. (2000). *Induction of Terpenoid Synthesis in Cotton Roots and Control of Rhizoctonia solani by Seed Treatment with Trichoderma virens*. Obtenido de National Library of Medicine: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18944616/>

- Ipinza, R. (2017). *Selección y Mejoramiento Genético*. Obtenido de https://www.researchgate.net/profile/Roberto-Ipinza/publication/323267812_Seleccion_y_Mejoramiento_Genetico_para_Condiciones_Adversas_Hibridos/links/5a8c28cd458515b8af97f1e9/Seleccion-y-Mejoramiento-Genetico-para-Condicion-Adversas-Hibridos.pdf
- Khakimov, A., Salakhutdinov, I., Omolikhov, A., & Utaganov, S. (2022). *Traditional and current-prospective methods of agricultural plant diseases detection: A review*. Obtenido de IOP Conference Series: Earth and Environmental Science: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/951/1/012002>
- Leonardi, G., Carlos, N., Mazzafera, P., & Balbuena, T. (2015). *Eucalyptus urograndis stem proteome is responsive to short-term cold stress*. Obtenido de Scielo Brasil: <https://www.scielo.br/j/gmb/a/h4MMBxfBcwnkvdL7GyJWppd/?lang=en>
- Marina, A. (2018). *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros*. Obtenido de Corporación colombiana de investigación agropecuaria: <https://editorial.agrosavia.co/index.php/publicaciones/catalog/download/21/13/160-1?inline=1>
- Martinez, B., Infante, D., & Reyes Yusimy. (2013). *Trichoderma spp. y su función en el control de plagas en los cultivos*. Obtenido de Rev. Protección Veg. Vol. 28 No. 1 : <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n1/rpv01113.pdf>
- Martínez, H. A. (2015). *Eucalipto (Eucalyptus spp.): condiciones para su cultivo "Fomento de la reforestación comercial para la mejora y conservación de las reservas de carbono"*. Obtenido de Forest Monitoring System for REDD+ Costa Rica: <https://www.onfcr.org/wp-content/uploads/media/uploads/documents/genero-eucalipto.pdf>

- Mateus, D. (2020). *Respuesta fisiológica inducida por bioestimulantes en plantas de plátano (Musa AAB) sometidas a estrés bióticos (Ralstonia solanacearum) en condiciones de vivero*. Obtenido de Repositorio Universidad Nacional de Colombia: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/79189/1121835531.2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Michel, A., Hernández, J., Toledo, R., Sabino, J., & Romero, T. (2020). *Capacidad antagónica de Trichoderma spp. nativa contra Phytophthora parasitica y Fusarium oxysporum aislados de cultivos de Jamaica*. Obtenido de Revista Fitotecnia mexicana: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802019000300235#:~:text=La%20actividad%20antagónica%20de%20las,biorreguladora%20de%20forma%20indirecta%2C%20promueven
- Microtech. (2024). *Ficha técnica: Linor*. Obtenido de <https://www.microtech.bio/wp-content/uploads/2019/08/FT-LINOR.pdf>
- Obrador, J., Tzec, M., Canto, B., & Higuera, I. (2017). *Técnicas para el aislamiento, identificación y caracterización molecular de cepas de Ralstonia solanacearum relacionadas a Moko del plátano*. Obtenido de Revista mexicana de fitopatología: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092017000300509
- Osdaghi, E. (06 de abril de 2020). *Ralstonia solanacearum (bacterial wilt of potato)*. Obtenido de CABI Digital Library: <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.45009>
- Paredes, J. (2023). *Evaluación de cinco productos comerciales para el control de Ralstonia solanacearum in vitro como alternativa de uso en la producción orgánica*. Obtenido de Repositorio de la Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE": <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/37415/1/T-ESPE-058466.pdf>

- Patrice, G. (2009). *Ralstonia solanacearum raza 3 biovar 2* . Obtenido de El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos – Programa de Iniciativa Nacional de Investigaciones : https://plantpath.ifas.ufl.edu/rsol/RalstoniaPublications_PDF/Ralstonia_solanacearum_ES_PDF.pdf
- Plantiago. (2024). *Hibridación*. Obtenido de <https://plantiago.com/es/aprender/hibridacion/>
- Pretali, L., Bernardo, L., Butterfield, T., Trevinsam, M., & Lucini, L. (2016). *Botanical and biological pesticides elicit a similar Induced Systemic Response in tomato (Solanum lycopersicum) secondary metabolism*. Obtenido de Phytochemistry: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942216300668?via%3Dihub>
- Punja, Z. K., Boer, S. H., & Sanfacon, H. (2008). *Biotechnology and plant disease management*. Obtenido de https://www.researchgate.net/profile/Tibebu-Chane/publication/335920082_Biotechnological_tools_for_detection_identification_and_management_of_plant_diseases/links/5daf043892851c577eb99430/Biotechnological-tools-for-detection-identification-and-management-
- RAE. (2024). *Real Academia Española*. Obtenido de <https://dle.rae.es/antagonismo>
- Reginaldo, M. (2006). *Symptomatology, etiology, and control of eucalypt bacterial wilt. 2006. 96 f. Tese (Doutorado em Etiologia; Epidemiologia; Controle)* -. Obtenido de Universidade Federal de Viçosa: <https://locus.ufv.br//handle/123456789/1039>
- Remache , F. (2018). *Evaluación del efecto de microorganismos antagonistas en el control de la marchitez bacteriana (Ralstonia solanacearum e. F. Smith), presente en plantaciones de eucalipto tropical (Eucalyptus urograndis) en la hacienda Los Ángeles, cantón Buena Fe*. Obtenido de Repositorio, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Recursos Naturales. Escuela de Ingeniería Forestal: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/8492/1/33T0179.pdf>

- Remache, M., Carrillo, M., Mora, R., Durango, W., & Morales, F. (2017). *Macronutrient absorption and N uptake efficiency, in maize promising hybrid. Patricia Pilar, Ecuador*. Obtenido de Agronomía Costarricense, Scielo: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0377-94242017000200103
- Rokich, D. P., & Bell, D. T. (1995). *Light Quality and Intensity Effectss on the Germination of species from the Jarrah (Eucalyptus marginata) forest of western Australia*. Obtenido de Australian Journal of Botany: <https://www.publish.csiro.au/bt/BT9950169>
- Scala, V., Pucci, N., & Loreti, S. (01 de marzo de 2018). *The diagnosis of plant pathogenic bacteria: a state of art*. Obtenido de Frontiers in Bioscience (Elite Edition), 10(3), 449-460.: <https://doi.org/10.2741/E832>
- Seng, L., Wei, L., Kristak, L., & Tahir, P. (2022). *Engineering Wood Products from Eucalyptus spp*. Obtenido de Advances in Materials Science and Engineering: <https://doi.org/10.1155/2022/8000780>
- Singh, U., Malvija, D., Wasiullah, Singh, S., Imran, M., Pathak, N., . . . Sharma, A. (2016). *Compatible salt-tolerant rhizosphere microbe-mediated induction of phenylpropanoid cascade and induced systemic responses against Bipolaris sorokiniana (Sacc.) Shoemaker causing spot blotch disease in wheat (Triticum aestivum L.)*. Obtenido de Applied Soil Ecology: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092913931630350X>
- Soto, F., Claudia, T., Aqueveque, P., & Johannes, B. (2018). *MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS QUE INHIBEN EL DESARROLLO DE PATÓGENOS EN POST-COSECHA DE LIMONES (Citrus limon L.)*. Obtenido de https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0719-

