



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL

**“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, PROVINCIA DE LOS RÍOS”**

TRABAJO DE TITULACIÓN
**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PARA TITULACIÓN DE
GRADO**

**PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE INGENIERO FORESTAL**

FABIÁN MARCELO REMACHE REINOSO

RIOBAMBA – ECUADOR

2018

HOJA DE CERTIFICACIÓN

EL TRIBUNAL DE TRABAJO DE TITULACIÓN CERTIFICA, que el proyecto de investigación titulado: **“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 FÉ, PROVINCIA DE LOS RÍOS,** de responsabilidad del señor Fabián Marcelo Remache Reinoso ha sido prolijamente revisado, quedando autorizada su presentación.

TRIBUNAL DE TRABAJO DE TITULACIÓN



Dra. Rosa del Pilar Castro Gómez Ph.D

DIRECTORA

Fecha: 2018-04-25



Ing. Juan Hugo Rodríguez Guerra Msc.

ASESOR

Fecha: 2018-04-25

RIOBAMBA – ECUADOR

2018

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Fabián Marcelo Remache Reinoso, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados. Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 17 de Abril del 2018



Fabián Marcelo Remache Reinoso

060409785-7

AUTORÍA

La autoría del presente trabajo investigativo es de propiedad intelectual del autor y de la empresa Novopan del Ecuador S.A. conjuntamente con la Escuela de Ingeniería Forestal y de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.



Fabián Marcelo Remache Reinoso

060409785-7

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado con mucho amor a mis padres Salomón Remache y Piedad Reinoso quienes con su ejemplo de esfuerzo y perseverancia fueron mi principal motivación para llegar a culminar esta meta.

A mi esposa y compañera Anaís Carrillo, quien supo escucharme y brindarme su apoyo incondicional en los momentos más difíciles, a mi hija Valentina Remache quien fue mi motorcito que cada día al verla crecer era un motivo más para no rendirme en esta larga travesía.

A mis queridos hermanos Vinicio, Silvia y Andrés que con sus consejos y cariño fueron parte esencial en mi formación como persona y como profesional.

A mis queridos sobrinos Santy, Dylan, Luchito, Sofy y Jairito.

A mi abuelita Raquelita (+) que desde el cielo siempre me ha cuidado y guiado en cada paso que doy.

“Un día lo soñé, luego lo intenté y finalmente lo logré”

Fabían Remache R.

AGRADECIMIENTO

Primero darle gracias Dios por la salud y fortaleza de no rendirme en este largo camino, a mis queridos padres por haberme dejado la mejor herencia mi profesión.

A la Dra. Rosita Castro como directora de tesis y al Ing. Hugo Rodríguez como asesor, por su apoyo y tiempo, al igual que su paciencia y ganas para ayudarme a formarme como profesional.

A los ingenieros del departamento de plantaciones forestales de la empresa NOVOPAN DEL ECUADOR S.A. en especial a la Ing. Adriana Mejía, Ing. Luis Pinto, Ing. Jonathan Montesdeoca por la oportunidad de compartir nuevos conocimientos.

De igual manera un fraterno agradecimiento a los ingenieros Alex Erazo, Norma Lara y Eduardo Salazar por todos sus consejos y apoyo brindado.

A la empresa BIOGREEN C.A. en especial al Ing. Pedro Romo Leroux ya la Lcda. Rosmery Arrieta.

Dios les pague a todos.....

Fabián Remache R.

TABLA DE CONTENIDO

Contenido	Pág.
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABLAS	ii
LISTA DE ANEXOS.....	iii
I. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS EN EL CONTROL DE LA MARCHITEZ BACTERIANA (<i>Ralstonia solanacearum</i> E. F. Smith) PRESENTE EN PLANTACIONES DE EUCALIPTO TROPICAL (<i>Eucalyptus urograndis</i>) EN LA HACIENDA LOS ÁNGELES, CANTÓN BUENA FÉ, PROVINCIA DE LOS RÍOS.	1
II. INTRODUCCIÓN	1
A. JUSTIFICACIÓN	2
B. OBJETIVOS	3
1. Objetivo General	3
2. Objetivos Específicos.....	3
C. HIPÓTESIS.....	3
1. Hipótesis Nula.....	3
2. Hipótesis Alternante.....	3
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
A. EUCALIPTO TROPICAL (<i>Eucalyptus urograndis</i>).....	4
1. Híbrido	4
2. Clasificación Taxonómica.....	5
3. Características Generales	5
4. Descripción botánica.....	5
5. Propiedades organolépticas de la madera.....	5
Tabla 2. Propiedades organolépticas de la madera de <i>Eucalyptus urograndis</i>	5
6. Distribución y hábitat.....	6
7. Usos de la madera	6
B. MARCHITEZ BACTERIANA (<i>Ralstonia solanacearum</i> E.F. Smith).....	7
1. Marchitez bacteriana en eucalipto.....	7
2. Taxonomía	9

3.	Características de <i>Ralstonia solanacearum</i>	9
4.	Importancia del patógeno para cultivos agronómicos y forestales.....	11
5.	Colonización de <i>Ralstonia solanacearum</i>	12
6.	Interacción de <i>Ralstonia solanacearum</i> con malas hierbas.....	16
7.	Sintomatología de <i>Ralstonia solanacearum</i> en eucalipto (<i>Eucalyptus urograndis</i>) ...	16
8.	Detección de <i>Ralstonia solanacearum</i>	17
9.	Control de la Marchitez Bacteriana.....	17
C.	PATOGENICIDAD	19
1.	Pruebas de Patogenicidad.....	19
D.	CONTROL BIOLÓGICO	20
1.	Control biológico	20
2.	Control biológico de plagas forestales	21
3.	Antagonismo	22
4.	Productos comerciales para el control de <i>R. solanacearum</i>	22
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	26
A.	CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR.....	26
1.	Localización	26
B.	MATERIALES Y EQUIPOS.....	28
1.	Materiales de campo	28
2.	Materiales de Laboratorio	28
3.	Insumos	28
4.	Medio de cultivo	28
C.	METODOLOGÍA	29
1.	Fase de Campo	29
2.	Fase de Laboratorio.....	30
3.	Diseño experimental y Análisis Estadístico	33
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
1.	PRUEBAS DE PATOGENICIDAD EN PLANTAS DE EUCALIPTO TROPICAL (<i>Eucalyptus urograndis</i>)	34

2. EFECTO DE MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS FRENTE A <i>Ralstonia solanacearum</i> E.F. Smith	42
VI. CONCLUSIONES	45
VII. RECOMENDACIONES	46
VIII. RESUMEN.....	47
IX. SUMMARY	48
X. BIBLIOGRAFÍA	49
XI. ANEXOS	56

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Plantas de <i>Eucalyptus urograndis</i>	4
Figura 2.	Árbol atacado por <i>Ralstonia solanacearum</i> E.F. Smith.	8
Figura 3.	<i>Ralstonia solanacearum</i> vista en microscopio.	9
Figura 4.	Transporte de agua y nutrientes por el Xilema y Floema.	13
Figura 5.	Pus bacteriano de <i>Ralstonia solanacearum</i>	16
Figura 6.	Mapa de ubicación de la hacienda Los Ángeles	26
Figura 7.	Ubicación del Laboratorio de Fitopatología ESPOCH	27
Figura 8.	Selección de plantas de Eucalipto tropical (<i>Eucalyptus urograndis</i>)	29
Figura 9.	Traída de plantas de <i>E. urograndis</i> al laboratorio de Fitopatología ESPOCH	29
Figura 10.	Corte de árbol con síntoma de Marchitez bacteriana.	30
Figura 11.	Extracción del pus bacteriano característico de <i>Ralstonia solanacearum</i>	30
Figura 12.	Plantas de <i>Eucalyptus urograndis</i> de un año de edad.	34
Figura 13.	Trituración de hojas de <i>Eucalyptus urograndis</i>	35
Figura 14.	Test Rs ImmunoStrip Negativo.	35
Figura 15.	Inoculaciones con cepas de <i>R. solanacearum</i> en plantas de <i>E. urograndis</i> .	36
Figura 16.	Inoculación de 50 ml de caldo bacteriano	36
Figura 17.	Distribución de plantas de <i>E. urograndis</i> según dosificaciones	37
Figura 18.	Plantas de <i>E. urograndis</i> inoculadas en cámara de crecimiento	37
Figura 19.	“V” invertida síntoma característico de <i>Ralstonia solanacearum</i>	38
Figura 20.	Puntos amarillos en el centro de la hoja de <i>E. urograndis</i>	38

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica del Eucalipto tropical (<i>Eucalyptus urograndis</i>)	5
Tabla 2. Propiedades organolépticas de la madera de <i>Eucalyptus urograndis</i>	5
Tabla 3. Propiedades físicas y mecánicas del <i>Eucalyptus urograndis</i>	6
Tabla 4. Clasificación taxonómica de <i>Ralstonia solanacearum</i>	9
Tabla 5. Razas y biovariedades de <i>Ralstonia solanacearum</i>	10
Tabla 6. Clasificación de <i>Ralstonia solanacearum</i> en Biovares.	10
Tabla 7. Especies arbóreas hospederas de <i>Ralstonia solanacearum</i> E.F. Smith con variaciones en los síntomas y biovares del patógeno.	14

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Ubicación y Variables dasométricas de la toma de muestras	56
Anexo 2. Producción de plantas de <i>Eucalyptus urograndis</i> en el vivero “Los Ángeles”	56
Anexo 3. Plantas y árboles de <i>Eucalyptus urograndis</i> con síntomas de <i>R. solanacearum</i>	57
Anexo 4. Pus bacteriano síntoma característico de <i>Ralstonia solanacearum</i>	57
Anexo 5. Cepa pura de <i>Ralstonia solanacearum</i> en medio de cultivo Kelman	57
Anexo 6. Productos comerciales bio-fung y bio-prot	58
Anexo 7. Réplica de la bacteria <i>R. solanacearum</i> en medio Agar nutritivo	58
Anexo 8. Crecimiento de la bacteria <i>R. solanacearum</i> en Incubadora a 28 C°	59
Anexo 9. Caldo nutritivo con la bacteria <i>R. solanacearum</i> para prueba de patogenicidad.	59
Anexo 10. Inoculación del caldo bacteriano en plantas de <i>Eucalyptus urograndis</i>	59
Anexo 11. Distribución del diseño experimental	60
Anexo 12. Peso de 18,4g de Agar Nutritivo para medio de cultivo	60
Anexo 13. Esterilización del medio Agar Nutritivo en el Autoclave	60
Anexo 14. Obtención y solidificación del Medio Agar Nutritivo	61
Anexo 15. Pruebas de Antagonismo <i>Ralstonia solanacearum</i> - Bioprot	61
Anexo 16. Pruebas de Antagonismo <i>Ralstonia solanacearum</i> – Biofung	61
Anexo 17. Método de Cultivo Dual entre <i>R. solanacearum</i> y Bio-prot (7 repeticiones)	62
Anexo 18. Método de Cultivo Dual entre <i>R. solanacearum</i> y Bio-fung (7 Repeticiones)	62
Anexo 19. Método de Inhibición Simultánea entre <i>R. solanacearum</i> y Bio-prot (7 Repeticiones)	62
Anexo 20. Método de Inhibición Simultánea entre <i>R. solanacearum</i> y Bio-fung (7 Repeticiones)	63
Anexo 21. Observación del crecimiento radial de <i>Ralstonia solanacearum</i> con los antagonistas en el microscopio.	63

I. 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 FÉ, PROVINCIA DE LOS RÍOS.

II. INTRODUCCIÓN

La superficie plantada con eucalipto (*Eucalyptus spp.*) ha ido en aumento a nivel mundial, superando actualmente los 20 millones de hectáreas Naidoo *et al.*, (2014). Sin embargo, pese a la exitosa producción forestal, en los últimos años, se ha observado un aumento de la problemática sanitaria. Diversas enfermedades afectan actualmente las plantaciones de eucalipto (*Eucalyptus spp.*) a nivel mundial, los principales agentes causales de enfermedades son los hongos, han predominado históricamente causando manchas foliares, cancro de fuste o ramas, muerte regresiva, marchitamiento vascular y roya (*Puccinia graminis*) (Pérez *et al.*, 2010).

Sin embargo en los últimos años la ocurrencia de agentes causales de origen bacterianos ha tomado relevancia, se tiene hasta el momento tres grupos de enfermedades bacterianas asociadas a especies de *Eucalyptus spp.*, como son i) manchas foliares, ii) tizón apical y iii) marchitamiento vascular. Estas enfermedades son relativamente recientes, cuya información disponible está dispersa y relacionada a los lugares en donde se reportó (Pérez *et al.*, 2010).

El eucalipto (*Eucalyptus spp.*) después de su introducción para fines comerciales, originalmente en el Estado de Sao Paulo (Brasil), se mantuvo prácticamente libre de enfermedades hasta el inicio de 1970. Sin embargo, la expansión de las áreas plantadas a regiones más calientes y húmedas, procedencias, familias o clones susceptibles, ciclos sucesivos de la especie y el estrechamiento de la base genética han favorecido la incidencia de varias enfermedades en vivero y campo (Alfenas & Mafia, 2006).

La marchitez bacteriana del eucalipto, causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi *et al.*, (1995) constituye potencialmente una de las principales enfermedades de la especie. Esta enfermedad es de gran importancia, en virtud de la

naturaleza sistémica de las infecciones, de los daños causados y de las diversas características del patosistema que dificultan su control (Alfenas *et al.*, 2004).

La bacteria puede ser transmitida por herramientas de corte e implementos forestales, lo que puede aumentar la diseminación de la enfermedad e incluso inviabilizar la conducción del rebrote. En vivero, la transmisión de la bacteria durante la preparación de mini estacas puede resultar en una difusión eficaz por las plantas contaminadas (Mafia, 2006).

En el Ecuador, a través del subproceso de vigilancia fitosanitaria realizado por la coordinación Agrocalidad–Sucumbíos y mediante resultados de laboratorio Agrocalidad – Tumbaco, se determina la presencia de focos aislados de la bacteria *Ralstonia solanacearum* raza 2, presente en el cultivo de plátano. Determinado el problema se inicia con el proceso legal respectivo notificando a los dueños de los predios afectados y capacitándoles sobre la determinación visual de los síntomas de la enfermedad y la metodología respectiva para la erradicación de las plantas afectadas (Agrocalidad, 2014).

En conjunto con los gobiernos locales y la dirección del MAGAP – Sucumbíos, se gestiona los recursos logísticos necesarios para proceder a la erradicación de focos en los lotes musáceas afectados por esta bacteria, para lo cual se realiza la aplicación de glifosato diluido al 20% inyectado de forma helicoidal desde la base del tallo, dando como resultado la muerte de la planta. Eliminando 153 plantas ubicadas en tres predios de las parroquias General Farfán y Jambelí, en un área total de 6 ha de cultivo (Agrocalidad, 2014).

A. JUSTIFICACIÓN

NOVOPAN DEL ECUADOR S.A. es una empresa forestal camino a la excelencia que genera, procesa y optimiza el uso del recurso natural, creando productos de madera de alta calidad y valor agregado para satisfacer las necesidades de los clientes, con alta tecnología, convirtiendo a la empresa en autosustentable para el abastecimiento de su materia prima.

Para tal motivo la empresa ha visto la necesidad de tener un programa de investigación sobre el control de plagas y enfermedades ya que estas provocan pérdidas a nivel de vivero y plantaciones, se requiere realizar un diagnóstico de posibles agentes

microbianos que disminuyan las pérdidas provocadas por la bacteria *Ralstonia solanacearum*.

Es prioritario dar solución a esta problemática por las fuertes inversiones que realiza año a año la empresa, ya que su meta es mejorar y crecer en el ámbito social, ambiental y económico.

Además con el uso de los productos comerciales Bio-fung y Bio-prot se busca controlar la propagación de la bacteria hacia las plantaciones Eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*).

B. OBJETIVOS

1. Objetivo General

a. Evaluar el efecto de microorganismos antagonistas en el control de (*Ralstonia solanacearum* E. F. Smith) presente en plantaciones de Eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*) a nivel de laboratorio.

2. Objetivos Específicos

a. Realizar pruebas de patogenicidad en plantas de *Eucalyptus urograndis* en condiciones semicontroladas, utilizando cepas de *Ralstonia solanacearum*.

b. Evaluar la eficiencia de los productos comerciales bio-prot y bio-fung en el control de la marchitez bacteriana.

C. HIPÓTESIS

1. Hipótesis Nula

Ninguno de los microorganismos antagónicos evaluados ayuda a controlar *Ralstonia solanacearum* en la plantación de Eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*).

2. Hipótesis Alternante

Alguno de los microorganismos antagónicos ayuda a controlar *Ralstonia solanacearum* en la plantación de Eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*).

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A. **EUCALIPTO TROPICAL (*Eucalyptus urograndis*)**

El eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*) es un híbrido entre (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*) considerada un especie de rápido crecimiento mayor a 45 m³/Ha/año. Crece normalmente hasta 25 metros de altura, en ocasiones alcanza los 50 metros con diámetros de 0,3 a 1,5 metros de diámetro (Carvalho, 2003).

En el Ecuador el *Eucalyptus urograndis* se encuentra plantado en la provincia de Esmeraldas en una superficie inicial de 1000 ha en la zona de Muisne, Tonchigue y Sua (Ecuadorforestal, 2012).



Fuente: (<http://www.novopan.com.ec>)

Figura 1. Plantas de *Eucalyptus urograndis*

1. Híbrido

Un híbrido se conoce como el producto de cruzamiento natural o artificial entre 2 genotipos diferentes. En especies forestales, híbrido se refiere al cruzamiento entre especies (híbridos interespecíficos) y algunas veces entre orígenes bien diferentes dentro de una misma especie (híbridos intraespecíficos). Los híbridos heredan las características de sus padres de una manera intermedia, dado que se hereda tanto lo bueno como lo malo, es muy recomendable utilizar los mejores genotipos como padres (Nickles, 1992).

2. Clasificación Taxonómica

Tabla 1. Clasificación taxonómica del Eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*).

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Myrtales
Familia	Myrtaceae
Subfamilia	Myrtoideae
Género	Eucalyptus
Especie	<i>E. urophylla</i> X <i>E. grandis</i>

Fuente: (PyCmaderas, 2013)

3. Características Generales

El *Eucalyptus urograndis* presenta una excelente resistencia al déficit hídrico, la madera es considerada moderadamente ligera, con núcleo diferenciado, su regeneración ocurre a través de la brotación de cepas. El ritmo de crecimiento y el rendimiento volumétrico son generalmente superiores, cuando se comparan a otras especies convencionales (crecimiento en diámetro 20% superior a otras especies), puede llegar hasta un 15% más que la altura convencional (Bentec, 2007).

4. Descripción botánica

Posee un tronco recto y cilíndrico, copa frondosa, corteza exterior (ritidoma) es marrón clara con aspecto de piel y se desprende a tiras dejando manchas grises o pardas sobre la corteza interior, más lisa. Sus hojas son sésiles, ovaladas y grisáceas, alargándose y tornándose coriáceas y de un color azulado brillante en adultas. Flores blancas y solitarias, su fruto es una cápsula y sus semillas son pequeñas (Vinueza, 2012).

5. Propiedades organolépticas de la madera

Tabla 2. Propiedades organolépticas de la madera de *Eucalyptus urograndis*

Color	Amarillo pálido
Veteado	Poco diferenciado
Textura	Mediana
Grano	Recto a entrecruzado
Sabor	No distintivo
Brillo	Mediano

Durabilidad	Se están efectuando pruebas de individuos de las plantaciones de Esmeraldas. Sin embargo, literatura menciona que la albura no es muy durable, y el duramen lo es mejor.
Trabajabilidad	Responde adecuadamente a cepillado, taladrado, enclavado.

Fuente: (PyCmaderas, 2013)

6. Distribución y hábitat

Originario de Australia y Tasmania, es un grupo de rápido crecimiento, en el que se cuentan cerca de 700 especies de Eucalipto, distribuidas en regiones, especialmente de climas mediterráneos, tropicales o subtropicales. Se localiza también en México, Brasil, Guatemala, Nicaragua, Costa Rica, Colombia, Ecuador y Chile (PyCmaderas, 2013).

7. Usos de la madera

Su madera es utilizada para celulosa, postes de alumbrado, trozas para aserrados, puntales para construcción civil, fabricación de postes, suelos de parquet, soportes en minas, tableros de fibras, biomasa para energía, tutores para tabaco, para construcción de ranchos y cercos (PyCmaderas, 2013).

8. Propiedades físicas y mecánicas

Tabla 3. Propiedades físicas y mecánicas del *Eucalyptus urograndis*

Densidad aparente	450 a 550 kg/m ³ -liviana
Dureza	300 a 500 blanda
Flexión	Resistente
Compresión	Muy resistente
Tracción	Resistente
Preservación	Acepta preservantes sin dificultad

Fuente: (Ecuadorforestal, 2012)

9. Clones

En su forma más común, el mejoramiento forestal se da por la selección de individuos superiores, identificados en plantaciones comerciales, las cuales pueden ser vegetativamente multiplicadas, o restablecidas en un delineamiento adecuado para la

comprobación de su superioridad genética, para la producción de semillas o para la propagación comercial (PyCmaderas, 2013).

10. Producción de Clones

Los criterios para la producción de clones son los siguientes:

- Selección de individuos genéticamente superiores
- Individuos bien adaptados a determinado sitio (clima y suelos)
- Individuos saludables, resistentes a plagas y enfermedades
- Individuos con las características de interés del seleccionador (volumen, densidad, fibras, etc.)

B. MARCHITEZ BACTERIANA (*Ralstonia solanacearum* E.F. Smith)

1. Marchitez bacteriana en eucalipto

Recientemente, la incidencia de la marchitez bacteriana resultó en serios perjuicios en viveros clonales en los estados de Bahía, Espírito Santo, Maranhão y Minas Gerais. Además de las pérdidas provenientes del descarte de plantas, minicepas y plantas vegetativas contaminadas, la incidencia de la enfermedad resultó alta en costos, para la erradicación del patógeno, construcción de adaptaciones en las estructuras de vivero, para minimizar los riesgos de nuevas contaminaciones.

Se suman a ello los perjuicios referentes a las alteraciones de los cronogramas de plantación y la eliminación de determinados clones élite de eucalipto (*Eucalyptus spp*), esto lo menciona (Alfenas *et al.*, 2006).



Fotografía: (Remache. F, 2017)

Figura 2. Árbol atacado por *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith.

La marchitez bacteriana en mini jardín clonal fue diagnosticada por primera vez por el equipo del Laboratorio de Patología Forestal y Genética de la Interacción Planta Patógeno de la UFV en abril de 2006. Sin embargo, por algún tiempo, la enfermedad permaneció con su etiología desconocida, en virtud del ineditismo y de la enfermedad la manifestación de síntomas que, a primera vista, se confunden con tensiones abióticas (falta de agua), principalmente en razón de la siembra de plantas pasadas y con malformación radicular. En este último caso, las minicepas expresaban más intensamente los síntomas (Mafia, 2006).

En Brasil, a pesar de su gran impacto en cultivos agronómicos, especialmente en tomate y papa, la marchitez bacteriana es una enfermedad relativamente reciente para la eucalipto cultura. Su primera ocurrencia data del inicio de la década de 1980, cuando Sudo *et al.*, (1983) relataron la enfermedad en plantaciones de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) y bracinga (*Mimosa scabrella* Benth).

Posteriormente, la enfermedad fue observada en eucalipto en la entonces Compañía Monte Dorado, en Pará, en 1984 y posteriormente en la Camargo Corrêa (Tucuruí, Pará) y en la Copener (Bahía). En 1985, Dianese y Takatsu identificaron la biovar 1 de *R. solanacearum* a partir de cultivos de la bacteria originarios de plantas de eucalipto cultivadas en Monte Dourado, Pará. Otros tres aislados del patógeno, originarios del Pará y de Bahía, que se identificaron como biovar 1 (Robbs *et al.*, 1988).

2. Taxonomía

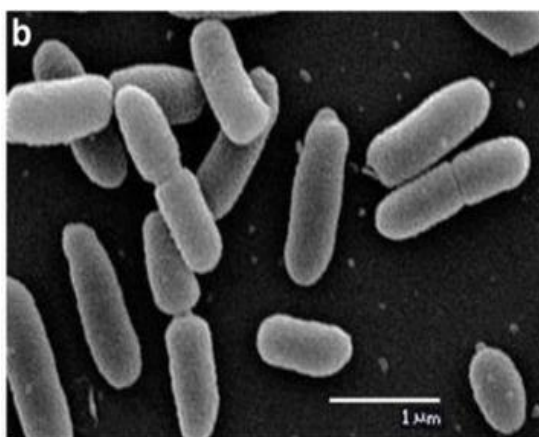
Tabla 4. Clasificación taxonómica de *Ralstonia solanacearum*

Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Beta Proteobacteria
Orden	Burkholderiales
Familia	Ralstoniaceae
Género	Ralstonia
Especie	<i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith 1896) Yabuuchi <i>et al.</i> , 1996

Fuente: (Agrocalidad, 2013)

3. Características de *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum (Smith, 1896) Yabuuchi *et al.*, (1995), descrita anteriormente como *Bacillus solanacearum*, *Pseudomonas solanacearum*, *Burkholderia solanacearum*, entre otras muchas sinonimias, se presenta como una bacteria gram-negativa, aeróbica, móvil por uno a cuatro flagelos polares, en forma de bastón con 0,5 - 0,7 x 1,5 - 2,5 μm y no fluorescente (OEPP & EPPO, 2004).



Fuente: (Sousa, 2016.)

Figura 3. *Ralstonia solanacearum* vista en microscopio.

Las colonias normales son lisas, fluidas, irregularmente redondeadas y opacas. En medio de Kelman, que contiene tetrazolio, las colonias virulentas son de centro rojizo y bordes blancos, mientras que las avirulentas son totalmente rojas (Kelman, 1954).

El patógeno realiza la penetración en los hospedantes por medio de heridas en el sistema radicular y en los lugares de emergencia de raíces secundarias. La diseminación de la bacteria ocurre en grandes distancias por medio de infecciones latentes en material vegetal para plantaciones, así como también por productos y sub-productos para consumo y/o para la industria (Gutarra *et al.*, 1995).

En pequeñas distancias, la bacteria puede ser diseminada por herramientas y equipos utilizados durante las prácticas agrícolas, y potencialmente por insectos y por el propio hombre (Supriadi *et al.*, 2001).

La supervivencia en el suelo ocurre por largos períodos (células viables pero no cultivables), en asociación con la materia orgánica y las malas hierbas.

Tradicionalmente, *R. solanacearum* ha sido dividida en cinco biovares y en cinco razas, con base en propiedades bioquímicas y en la reacción sobre una gama de hospedantes, respectivamente. Sin embargo, no hay una relación perfecta entre la diferenciación de razas y la clasificación en biovares (Buddenhagen & Kelman, 1964).

Tabla 5. Razas y biovariedades de *Ralstonia solanacearum*

Raza	Anfitrión Distancia	Distribución geográfica	Biovar
1	Amplio	Asia, Australia América	3,4 1
2	Plátano, otras <i>Musa spp.</i>	Caribe, Brasil, en todo el mundo	1
3	Papa (<i>Solanum tuberosum</i>), geranio (<i>Geranium spp.</i>), algunas otras especies.	En todo el mundo, excepto en Canadá	2
4	Jengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	Asia	3,4
5	Mora (<i>Rubus ulmifolius</i>)	China	5

Fuente: (Adaptado de Daughtrey 2003)

Tabla 6. Clasificación de *Ralstonia solanacearum* en Biovares.

Pruebas fisiológicas	Biovares				
	1	2	3	4	5
Utilización de disacáridos					
Celobiosa	-	+	+	-	+
Lactosa	-	+	+	-	+

Maltosa	-	+	+	-	+
<u>Oxidación de alcoholes</u>					
Dulcitol	-	-	+	+	-
Manitol	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	-

Fuente: (Adaptado de French *et al.*, 1995.)

4. Importancia del patógeno para cultivos agronómicos y forestales

La marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* fue reportada por primera vez en Estados Unidos en 1896 por Erwin F. Smith, en papa (*Solanum tuberosum*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y berenjena (*Solanum melongena*) (Hayward, 1994). En Brasil, la enfermedad fue descrita por Von Parseval, en 1922, en papa, en el Estado de Rio Grande do Sul (Takatsu & Lopes, 1997).

Actualmente, *R. solanacearum* es considerada una de las bacterias fitopatógenas más importantes del mundo, en virtud de los grandes daños causados, de su amplia distribución geográfica, de la extensa gama de huéspedes y de las dificultades de control. La bacteria causa enfermedad en más de 200 especies de plantas, englobando aproximadamente 50 familias botánicas (Hayward, 1991).

La gama de hospederos incluye no sólo solanáceas, sino también leguminosas, algunas monocotiledóneas y varias especies arbóreas (Genin & Boucher, 2002).

En el caso de los cultivos de mayor importancia económica y con mayor número de estudios, se pueden citar: papa (*Solanum tuberosum* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), Berenjena (*Solanum melongena* L.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), pimiento (*Capsicum annuum* L.), pimienta (*Capsicum frutescens* L.), plátano (*Musa spp.*) jengibre (*Zingiber officinale* Rosc.) y maní (*Arachis hipogaea* L.) (Kelman, 1953; Pereira, 1990; Hayward, 1991; Hayward, 1994; Lopes & Takatsu, 1997).

En virtud de su gran importancia, *R. solanacearum* fue uno de los primeros patógenos de plantas con el genoma totalmente secuenciado (Denny, 2000). Se sabe que el patógeno es endémico en diferentes regiones tropicales y subtropicales del mundo (Genin & Boucher, 2002).

En la ausencia del hospedero, la bacteria es capaz de sobrevivir en el suelo por períodos prolongados, en asociación con la materia orgánica o con malas hierbas, sin evidenciar

síntomas (Hayward, 1991), así como puede entrar en estado de dormición, permaneciendo como células viables, pero no cultivables, según lo constatado para varios microorganismos de suelo (Grey & Steck, 2001).

Existen fuertes evidencias de que varias especies forestales son anfitriones de *R. solanacearum*. Sin embargo, los informes sobre la declinación de los árboles son limitados Supriadi *et al.*, (2001). Para el eucalipto (*Eucalyptus spp.*), Liang *et al.*, (1992) reportó una incidencia de 2-10%, mientras que la diseminación de la enfermedad constituye una amenaza para el desarrollo de las plantas, en el sur de China.

Una situación similar se encuentra para la casuarina (*Casuarina equisetifolia*), en esa misma región, donde la enfermedad está presente por 30 años (Liang & Guo, 1992). La marchitez bacteriana en eucalipto en el sur de China fue reportada en 1982 (Cao, 1982). Desde su primer relato, el patógeno ha causado grandes pérdidas, que pueden alcanzar en promedio 30 - 40% (Li & Wu, 1996; Lin *et al.*, 1996).

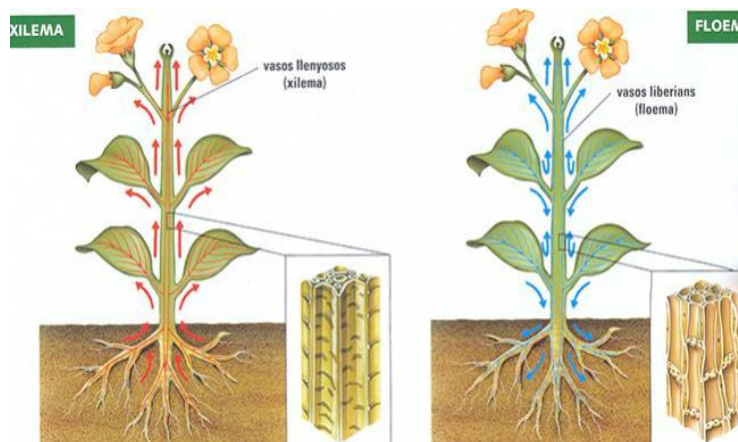
En general, los síntomas en plantas arbóreas infectadas por *R. solanacearum* son marchitez permanente, decoloración y bloqueo de los tejidos vasculares. Sin embargo, los síntomas típicos pueden variar de acuerdo con la especie hospedera (Tabla 7). Los aislados del patógeno obtenido de un hospedante pueden infectar otras especies (Tabla 8), dificultando el control (Supriadi *et al.*, 2001).

5. Colonización de *Ralstonia solanacearum*

La penetración de *R. solanacearum* se produce por medio de heridas en el sistema radicular y en los lugares de emergencia de raíces secundarias. Después de la penetración, la bacteria coloniza los espacios intercelulares de la corteza de la raíz y del parénquima vascular, culminando con la desestructuración de las paredes celulares, lo que facilita, en una segunda etapa, la diseminación por el sistema radicular (Vasse *et al.*, 1995).

Al igual que todas las bacterias fitopatógenas *Ralstonia solanacearum* es incapaz de penetrar el tejido vegetal intacto, y para ingresar dentro de la planta utiliza las diminutas heridas naturales causadas por la emisión de nuevas raíces, heridas causadas por herramientas al realizar prácticas de cultivo en el suelo y en la parte aérea (deshierbe, podas, amarre etc.) o bien causadas por insectos o nematodos. Especies del nematodo agallador (*Meloidogyne spp.*) son particularmente importantes porque en adición al

daño que provocan por si mismos magnifican el problema al favorecer las infecciones de la bacteria por las heridas que causan en las raíces (Melgar *et al.*, 2012).



Fuente: (www.portalfruticola.com)

Figura 4. Transporte de agua y nutrientes por el Xilema y Floema.

En la figura 4 observamos que en los vasos del xilema, la población bacteriana rápidamente alcanza altos niveles de población ($> 1 \times 10^{10}$ ufc/g de tejido fresco, ejemplo en los tomates (*Solanum lycopersicum*), seguidamente con la aparición del síntoma de la marchitez y culminando con la muerte de la plantas (Denny, 2000).

Las bacterias alcanzan los elementos del xilema grandes y se diseminan en la planta, donde se multiplican, una vez establecidos en los vasos del xilema, las bacterias pueden ingresar a los espacios intercelulares de las células del parénquima en la corteza y médula en varias áreas de la planta. Aquí *Ralstonia solanacearum* es capaz de disolver las paredes celulares y crear bolsas viscosas de bacterias y desechos celulares. La producción de polisacáridos altamente polimerizados aumenta la viscosidad del xilema, lo que resulta en taponamiento (Melgar *et al.*, 2012).

Puesto que la bacteria se multiplica aceleradamente en el sistema de microscópicos vasos conductores de agua dentro de las raíces y tallos, al exprimir entre los dedos el extremo de una sección basal del tallo de una planta afectada se puede observar que de un anillo en la orilla fluyen pequeñas gotas lechosas que contienen millones de bacterias, la presencia de este flujo bacteriano es utilizado como un método simple para el diagnóstico confirmativo de ocurrencia de Marchitez bacteriana (Melgar *et al.*, 2012).

Tabla 7. Especies arbóreas hospederas de *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith con variaciones en los síntomas y biovars del patógeno.

Hospedero	Familia Botánica	Nombre Común	Síntomas	Biovar	País	Referencia
<i>Archontophoenix alexandrae</i> H. Wendl & Drude	Arecaceae	Palmera real de Australia	Secado de hojas, decoloración de tejidos, marchitez	3	Queensland (Australia)	Akiew (1990).
<i>Anacardium occidentale</i> L.	Anacardiaceae	Cajú	Pudrición radicular, caída de hojas	3	Indonesia	Shiomi <i>et al.</i> , 1989
<i>Syzygium aromaticum</i> L. Merr. & Perry	Myrtaceae	Clavero de la India	Pudrición de raíces, Infecciones limitadas en la base del vástago; patógenos secundarios	-	Indonesia	Eden-Green & Adhi, 1986.
<i>Annona squamosa</i> L. e A. cherimola Mill.	Annonaceae	Anón	Muerte súbita de árboles jóvenes y declive de árboles adultos	3	Queensland (Australia), Taiwan	Mayers & Hutton (1987); Hsu (1991).
<i>Eucalyptus</i> spp.	Myrtaceae	Eucalipto	Marchitez	1,3,3,3	Brasil, China, África do Sul, Australia.	Dianese & Dristig (1993); Wu & Liang (1988); Coutinho <i>et al</i> (2000); Askiew & Tevorrow, 1994.
<i>Cassuarina equisetifolia</i> L.	Casuarinaceae	Casuarina	Marchitez	3,4	China	He (1986); Liang & Guo (1992).
<i>Moringa oleifera</i> Lam.	Moringaceae	Moringa	Pérdida de turgencia y desfoliado	-	India	Estelitta <i>et al.</i> (1997)
<i>Leucaena glauca</i> Benth.	Mimosaceae	Leucena	-	-	-	Bradbury (1987).
<i>Pongamia pinnata</i> (L.) Pierre	Leguminoseae	Pongamia	-	-	-	Bradbury (1987).
<i>Morus alba</i> L.	Moraceae	Morera	Marchitez, amarillamiento y necrosis de hojas, desfoliado y daños en las raíces.	3,5	China, India	He (1986); Mathews <i>et al.</i> (1993).
<i>Azadirachta indica</i> Juss.	Meliaceae	Neem	Marchitez y pudrición de raíces.	3	Queensland (Australia)	Diatloff <i>et al.</i> 1993)
<i>Myristica fragrans</i> L.	Myristicaceae	Árbol de nuez	Oscurecimiento y secado de hojas, daños en el sistema radicular.	-	Kerala (India)	Mathews <i>et al.</i> (1993)
<i>Olea europea</i> L.	Oleaceae	Olivo	-	3,4	China	He (1986)
<i>Tectona grandis</i> L.	Verbenaceae	Teca	-	3	Malasia, Indonesia	Hayward (1964); Mitchell (1962)
<i>Eugenia javanica</i> Lam.	Myrtaceae	Jambo rosa	-	-	Taiwan	Hayward (1994)

Fuente: Adaptado de Supriadi *et al.*, (2001)

Tabla 8. Inoculaciones cruzadas considerando diferentes especies arbóreas hospedantes de *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith.

Origen del aislado	Gama de hospederos	Referencia
Olivo (<i>Olea europea</i>)	Olivo, berenjena, patata, tomate, pimiento, almendras.	He (1986)
Casuarina (<i>Casuarina equisetifolia</i>)	Casuarina, berenjena, patata, tomate, almendras.	He (1986)
Morera (<i>Morus alba</i>)	Morera, berenjena, patata.	He (1986)
Anón (<i>Annona squamosa</i>)	Anón, tomate, patata, pimiento.	Mayers & Hutton (1987)
Eucalipto (<i>Eucalyptus spp.</i>)	Eucalipto, casuarina, tomate, almendras, tabaco y patata	Liang <i>et al.</i> (1992)
Cajú (<i>Anacardium occidentale</i>)	Cajú, tomate, pimiento, berenjena	Shiomi <i>et al.</i> (1989)

Fuente: (Supriadi *et al.*, 2001)

6. Interacción de *Ralstonia solanacearum* con malas hierbas

En cuanto a los niveles de susceptibilidad al patógeno, las plantas dañinas pueden ser altamente susceptibles y evidenciar síntomas típicos de marchitez bacteriana, como en el caso de *Crassocephalum crepidioides* (Benth) S. Moore (Asteraceae); ser tolerantes y evidenciar pocos síntomas de marchitez, como *Portulaca oleracea* L. (Portulacaceae) y existe una creciente evidencia de hospederos que bajo ciertas condiciones, permanecen asintomáticos o con ligeros síntomas de infección, por ejemplo, *Solanum carolinense* L. (Hayward, 1994 & Tussime, 1997).

7. Sintomatología de *Ralstonia solanacearum* en eucalipto (*Eucalyptus urograndis*)

Los síntomas de la enfermedad en el campo, inicialmente, se caracterizan por marchitez y deshojada basal de la planta. Cuando la fuente de inóculo son las plantas contaminadas, cortes perpendiculares del tallo evidencian oscurecimiento del leño desde la región central.

En cambio, para infecciones que ocurren después de la siembra, el oscurecimiento puede ser notado en el sentido de la cáscara hacia el interior del leño. En este último caso, las grietas en la cáscara, causadas por la temperatura excesiva del suelo, el déficit hídrico y por ahogamiento de recolección, constituyen puertas de entrada a la bacteria. Generalmente, los árboles más afectados presentan problemas de malformación radicular, lo que dependiendo de la intensidad, causa subdesarrollo o muerte de las plantas. El diagnóstico de la enfermedad es fácilmente realizado por la prueba de exudación de pus bacteriano (Alfenas *et al.*, 2004 y Ferreira & Milani, 2002).



Fuente: (<http://www.clonareucalipto.com.br>)

Figura 5. Pus bacteriano de *Ralstonia solanacearum*

Porciones del tallo infectado, cuando se mantienen sumergidas con sus bases en agua y dentro de una cámara húmeda, evidencian después de algunos minutos, exudación de pus bacteriano, en forma de gotitas sobre la superficie. En la parte del tallo sumergido en el agua, se observa también la exudación de pus bacteriano, en forma de una niebla clara. La prueba de exudación también se puede realizar en gota de agua, con el auxilio de un microscopio de luz (Alfenas *et al.*, 2006).

8. Detección de *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum puede ser diseminada dentro y entre países por suelo, agua y materiales para plantaciones con infección latente (Ciampi *et al.*, 1980 y Hayward, 1991). Así, para fines cuarentenarios, es necesario disponer de procedimientos rápidos y sensibles. Tradicionalmente, la detección de este patógeno depende de una serie de pruebas bioquímicas realizadas para colonias puras, lo que demanda gran consumo de tiempo e inviabiliza estos procedimientos para cuarentena y otros objetivos.

La técnica de detección más común, pero menos sensible, consiste en el cultivo del patógeno en medio de cultivo diferencial (Kelman, 1954). Otras técnicas aún incluyen el uso de métodos de métodos serológicos (ELISA o inmunofluorescencia) (Janse, 1998, Robinson, 1993) o pruebas de patogenicidad en plantas hospederas (Graham & Lloyd, 1978).

En general, estas técnicas son inadecuadas, en términos de especificidad, sensibilidad de detección y del tiempo necesario, especialmente para la detección de la bacteria a partir del suelo. Sin embargo, la amplificación de ADN ofrece varias ventajas en relación a las técnicas clásicas (Poussier *et al.*, 2002).

9. Control de la Marchitez Bacteriana

Ralstonia solanacearum es una bacteria cosmopolita, variable desde el punto de vista fisiológico y molecular, vascular y que asocia al sistema radicular de varias plantas cultivadas y dañinas, en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Lopes & Takatsu, 1997).

El uso de la resistencia de plantas para el control de la marchitez bacteriana, tanto para especies agrícolas como forestales, es difícil, en virtud de la alta variabilidad en la población del patógeno y de interacciones con factores del ambiente. La expresión de la

resistencia está fuertemente correlacionada con condiciones ambientales como temperaturas elevadas y altos niveles de humedad del suelo (Mew & Ho, 1977).

Infestación por nemátodos (Napiere, 1980 y Cadet *et al.*, 1989) y la variabilidad de la agresividad de los aislados locales de *R. solanacearum* son también factores relacionados con el aumento de la severidad de la enfermedad o con la ruptura de la resistencia (Prior & Steva, 1990; Darasse *et al.*, 1998 y Coelho Neto *et al.*, 2003).

Recientemente, se ha encontrado un gen recesivo (RRS1-R), que confiere resistencia a *R. solanacearum* en *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.) (Deslandes *et al.*, (2002). Para eucalipto, Wu & Liang (1988b) observaron variaciones en el nivel de resistencia para ciertas procedencias, siendo el *E. grandis* x *E. urophylla*, *E. saligna*, *C. citriodora* e *E. exserta* F.Muell. más resistentes a la marchitez bacteriana.

El control de la marchitez bacteriana, para varios hospedantes, no ha sido efectivo. Los programas de mejoramiento para el control por resistencia de plantas no han alcanzado éxito en razón, entre otros factores, de la gran variabilidad de aislados del patógeno y de la interacción con diversos factores bióticos y abióticos (Javier, 1994).

La rotación de cultivos también presenta limitación, considerando la gran gama de hospedantes del patógeno (Lopes & Takatsu, 1997).

Dianese & Dristig (1993) concluyeron, por medio de inoculaciones artificiales, que aislados de eucalipto fueron virulentos a *E. deglupta* Blume, *E. microcorys* F. Muell., *E. pilularis* Smith, *E. punctata* D.C., *E. pyrocarpa* L. Johnson & D. Blaxell, *E. robusta* Sm., *E. saligna*, *E. urophylla*, Las especies *E. camaldulensis*, *C. citriadora*, *E. cloeziana* F. Muell, *E. deanei* Maiden, *E. pellita*, *E. grandis*, *E. resinifera* Sm., *E. tereticornis* e *E. torelliana* F. Muell fueron consideradas, por los autores, como tolerantes.

Na China, Li & Wu (1996) observaron que especies de rápido crecimiento como *E. urophylla*, *E. grandis*, *E. saligna* y los híbridos (*E. grandis* x *E. urophylla*) o (*E. urophylla* x *E. grandis*), con menos de dos años, son más susceptibles. A partir de observaciones de campo, fue comprobado que el híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*) más utilizado en la plantación es también altamente susceptible (Lin *et al.*, 1996 y Shi *et al.*, 2000).

El control biológico, aunque todavía necesita mayores estudios, ha surgido como una alternativa prometedora. El uso de *Streptomyces sp.* fue efectivo en el control de la marchitez en papa (*Solanum tuberosum*), en plátano (*Mussa spp*) y en tomate (*Solanum lycopersicum*) (Moura & Romeiro, 1999).

Hay evidencias experimentales de que el tratamiento de plantas de eucalipto con aislados específicos de *Pseudomonas fluorescens*, del tipo PGPR (rizobacterias) constituye una de las alternativas de control (Ran *et al.*, 2005; Mafia, 2004 y Teixeira *et al.*, 2001).

Los experimentos con hongos ectomicorrícicos también apuntan a otra forma de control biológico de la enfermedad (Gong *et al.*, 1999).

C. PATOGENICIDAD

La realización y determinación de la patogenicidad es un paso muy importante en la identificación de bacterias fitopatógenas. Las pruebas de patogenicidad no están estandarizadas y dependen de la relación entre el hospedero y el patógeno Goszczyńska *et al.*, (2000).

Debido a que existen dificultades para verificar todas las características de una bacteria y diferenciar entre especies, algunos grupos de bacterias fitopatógenas sólo pueden ser diferenciadas por su patogenicidad en plantas, ya que sólo atacan determinadas especies de plantas como ejemplo *Pseudomonas syringae* pv. tomate, patógeno únicamente de tomate (*Solanum lycopersicum*). Esto se debe a que algunas bacterias como *R. solanacearum* son muy restringidas en cuanto a su rango de hospederos, mientras que en otras es más amplio Goszczyńska *et al.*, (2000).

1. Pruebas de Patogenicidad

La patogenicidad es la capacidad de ciertos organismos para incitar el desarrollo de una enfermedad infecciosa. Cuando existen lesiones de una enfermedad se asocia con varios entes vivos, no siendo todos los agentes causales de la enfermedad. La aplicación de los postulados de Koch permiten llegar a determinar el agente causal de una enfermedad desconocida (Loor, 2008).

a. Postulados de Koch

Los postulados de Koch fueron formulados por Robert Koch, a partir de experimentos con *Mycobacterium tuberculosis*, para establecer la etiología de la tuberculosis, actualmente esta metodología ha sido generalizada para el resto de las enfermedades infecciosas. El protocolo de Koch no puede ser aplicado siempre con el rigor requerido cuando se trata de patógenos obligados que no crecen en medios sintéticos de laboratorio (Volcy, 2008).

1) Postulados de Koch

- El patógeno es asociado estrictamente y siempre con enfermedad en todas las plantas enfermas absolutamente sin excepciones (Agrios, 2005).
- El patógeno, como potencial agente causante, debe ser aislado desde las plantas con los síntomas y establecido en cultivo puro. Esto puede ser difícil con parásitos obligados, pero las metodologías modernas han ido evolucionando para satisfacer este requisito (Agrios, 2005).
- Las plantas sanas de prueba deben ser de la primera especie y cultivo, y la inoculación de una planta sana debe reproducirse exactamente los síntomas iguales. Esto puede ser difícil cuando el organismo es aislado de un cultivo desconocido. El completo rango de síntomas se debe reproducir idénticamente a la planta enferma inicial, tomando en consideración las diferencias entre la planta inicial y la planta de prueba, el ambiente y la salud del inóculo (Agrios, 2005).
- El patógeno debe ser re-aislado de la planta inoculada y la identidad confirmada como iguales a la aislante original. El organismo recuperado debe ser idéntico al aislante original, sin ninguna excepción (Agrios, 2005).

D. CONTROL BIOLÓGICO

1. Control biológico

Es un método que emplea organismos vivos para reducir la densidad de la población de otros organismos plaga. Una plaga es cualquier organismo que produce un daño o

reduce la disponibilidad y la calidad de un recurso humano. Los recursos abarcan desde la salud humana hasta plantas o animales destinados a fines alimenticios, de producción, o al esparcimiento (ejm: mascotas y plantas en áreas recreativas). Para el manejo de plagas existen varios métodos alternativos: el uso de productos de síntesis química (plaguicidas); cultivos genéticamente modificados resistentes a plagas; control biológico; o bien la combinación de una a más de estas tácticas, el manejo integrado de plagas (Hajek, 2004).

2. Control biológico de plagas forestales

Un ejemplo conocido de la implementación de un control biológico clásico y aumentativo como tácticas participantes dentro de un programa de manejo integrado de plagas forestales, es el caso del uso de varios parasitoides y un nemátodo entomopatógeno para controlar la avispa barrenadora de los pinos *Sirex noctilio* (Himenóptera: Siricidae). Esta especie es una de las principales plagas del cultivo de *Pinus spp.* a nivel mundial, y una potencial amenaza para los bosques nativos de América del norte donde recientemente ha ingresado (Haack *et al.*, 2002).

Otro ejemplo que merece la pena mencionar es el caso de *Agrilus planipennis* (Coleóptera: Buprestidae), una plaga conocida como el “barrenador esmeralda del fresno”, que ataca los fresnos (*Fraxinus spp.*), árboles de gran importancia económica en Norteamérica. Los adultos emergen en primavera-verano y se alimentan de las hojas del árbol. Las hembras depositan sus huevos en las grietas de la corteza o dentro de ella y al eclosionar, las larvas hurgan y se alimentan del cambium y floema realizando galerías que cortan el flujo de agua y de nutrientes dentro del árbol, causando por ende, la muerte del mismo (Haack *et al.*, 2002).

Un último ejemplo de control biológico clásico dirigido a una plaga forestal, es el caso del uso del parasitoide *Torymus sinensis* (Himenóptera: Torymidae) originario de China, para controlar a la “avispa de la agalla del castaño”, *Dryocosmus Kuriphilus* (Himenóptera: Cynipidae). La avispa *D.kuriphilus*, también nativa de China, ataca diferentes especies de árboles de castaño (*Castanea spp.*) y fue introducida accidentalmente en Japón, Corea y Estados Unidos a mediados del siglo XX y en Europa recientemente, convirtiéndose en una importante plaga a nivel mundial (Moriya *et al.*, 2003; Rieske, 2007; Graziosi y Santi, 2008).

3. Antagonismo

Es una interacción entre microorganismos donde uno interfiere con el otro, es decir causa la pérdida o la actividad de uno de ellos. Esta es la base sobre la que se sustenta el verdadero control biológico de microorganismos fitopatógenos en las plantas (Pérez, 2004).

4. Productos comerciales para el control de *R. solanacearum*

a. **BIO-FUNG**

1) Descripción del producto

- Nombre comercial: Bio-fung
- Ingrediente activo: cepas de *Trichoderma spp.*
- Composición: Mezcla de soluciones muy concentradas de varias cepas vivas y esporas de *Trichoderma spp.*

2) Modo de empleo

El producto al ser disuelto en agua limpia y pura sin químicos puede aplicarse directamente al follaje por aspersión, además en viveros puede ser utilizado en drench. Puede ser aplicado por avioneta, bomba de motor, bomba de mochila, aspersión. Importante es agitar antes de mezclar para aplicar (Biogreen, 2010).

3) Mecanismo de acción

Su composición permite una translocación a distintos sitios próximos de las plantas, protegiendo sectores enteros. El producto actúa por acción directa y por exclusión. Forma una capa protectora revistiendo la dermis de tallos, hojas y raíces a ser tratadas. Este revestimiento impide muy eficientemente el ataque de hongos y bacterias patógenas (Biogreen, 2010).

4) Beneficios

- El producto es un excelente acondicionador de suelos, bioactivando la zona radicular logrando una muy buena absorción de nutrientes en las plantas tratadas, mayor productividad, brillo y verdor.
- Por su formulación, a pesar de ser un producto orgánico, imprime beneficios en las plantas muy rápidamente. El producto al estar encapsulado da una protección de largo plazo (Biogreen, 2010).

5) **Compatibilidad**

Con la mayoría de los productos agroquímicos excepto con fungicidas. Este producto es compatible con todos los productos de reacción ligeramente ácida, neutra es decir PH final entre 6 y 7,5. Antes de utilizar limpiar todos los recipientes boquillas, bombas y sus mangueras para no dejar residuos anteriores de materiales que pudiesen disminuir la eficacia de los productos (Biogreen, 2010).

6) **Advertencias y Precauciones**

- El producto no es patógeno, caustico, corrosivo o tóxico.
- Debido a que se trata de un producto biológico los riesgos que este guarda para la salud humana y animal es mínimo.
- En caso de contaminación lavar con agua y jabón las áreas expuestas.
- En caso de ingestión puede producir trastornos estomacales. No inducir al vomito. (Biogreen, 2010).

7) **Dosificación del producto**

Un litro a dos por hectárea, dependiendo del tipo de acción que se quiera del producto. En compostaje 1 litro por cada 20m³. En viveros 50cc/litro de agua (Biogreen, 2010).

b. **BIO-PROT.**

1) **Descripción del producto**

- Nombre comercial: Bio-prot
- Ingrediente activo: cepas de *Bacillus spp.*

- Composición: Mezcla de soluciones muy concentradas de varias cepas vivas de *Bacillus spp.*

2) Modo de empleo

El producto disuelto puede aplicarse directamente por aspersión. Puede ser aplicado por avioneta, bomba de motor, bomba de mochila, inyección en el sistema de riego, aspersión directa (Biogreen, 2010).

3) Mecanismos de acción

El producto actúa por exclusión. Forma una capa protectora revistiendo la dermis de tallos, hojas y raíces a ser tratadas. Este revestimiento impide muy eficientemente el ataque de hongos y bacterias patógenas. Por ende la protección es de largo plazo. El producto a nivel potencializa ampliamente la absorción de elementos esenciales (Biogreen, 2010).

4) Beneficios

- El producto actúa rápidamente inclusive induciendo el crecimiento de selectos microorganismos benéficos, formando una capa protectora revistiendo el suelo y hojas.
- Tiene un efecto acondicionador del suelo marcado al potenciar la transformación de amonio a nitratos, estos últimos sirviendo de gran fertilizante (Biogreen, 2010).

5) Compatibilidad

Con la mayoría de los insecticidas, fungicidas, herbicidas, foliares que se recomiendan en los cultivos. No compatible con bactericidas, bacteriostático o soluciones muy salinas. El PH óptimo de aplicación es entre 6 a 7.5. Este producto es compatible con todos los productos de reacción ligeramente ácida, neutra o ligeramente básica. Además es compatible con aceite agrícola (Biogreen, 2010).

6) Advertencias y precauciones

- El producto no es patógeno, caustico, corrosivo o tóxico.

- Debido a que se trata de un producto biológico los riesgos que este guarda para la salud humana y animal es mínimo.
- En caso de contaminación lavar con agua y jabón las áreas expuestas.
- En caso de ingestión puede producir trastornos estomacales. No inducir al vomito.

7) Dosificación del producto

20 hasta 50 ml por cada litro de agua en viveros o plantas pequeñas, 1 a 2 litros por ha, o 1 L por cada 20 metros cúbicos de materia orgánica cruda dependiendo del tipo de acción que se quiera del producto.

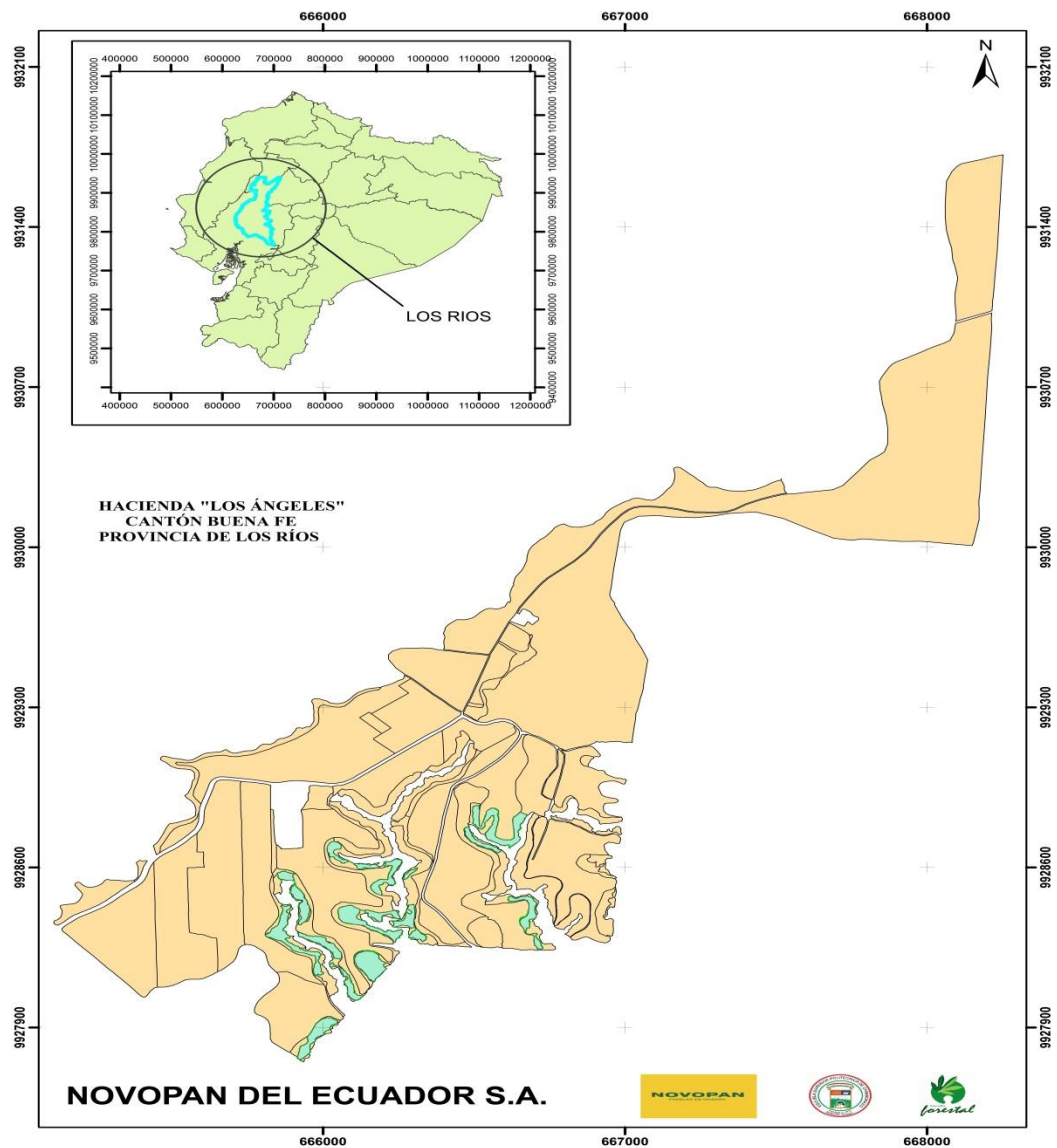
IV. MATERIALES Y MÉTODOS

A. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR

1. Localización

a. Campo

El área de estudio es una plantación comercial que se encuentra ubicada en la hacienda “Los Ángeles”, parroquia Patricia Pilar, cantón Buena Fe, provincia de Los Ríos. Perteneciente a la empresa Novopan del Ecuador S.A. y que cuenta con un área de 300 ha.



Fuente: (Novopan S.A., 2017)

Figura 6. Mapa de ubicación de la hacienda Los Ángeles

b. Laboratorio

El trabajo de investigación se realizó en los Laboratorios del Departamento de Sanidad Vegetal, sección Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales.



Fuente: (Google Maps, 2018)

Figura 7. Ubicación del Laboratorio de Fitopatología ESPOCH

c. Ubicación Geográfica

Coordenadas Proyectadas UTM Zona 17S, DATUM WGS 84

Altitud: 149 msnm.

X: 0038608

Y: 7930624

Fuente: (Estación meteorológica NOVOPAN S.A.)

d. Características climáticas

Temperatura media anual: 23 -35°C

Precipitación media anual: 2265 mm

Humedad relativa anual: 76%

Fuente: (Anuarios Meteorológicos del INAMHI-PDOT, 2011)

e. **Clasificación ecológica**

Bosque Húmedo Tropical

Fuente: (Ministerio del Ambiente, 2012)

Clima: Tropical Megatérmico Húmedo

Fuente: (Agroprecisión – PDOTCLA, 2011)

B. MATERIALES Y EQUIPOS

1. Materiales de campo

Bolsas plásticas para recolección de muestras, machete, botas, guantes, pala, GPS, mapa, recipiente para conservación de muestras (cooler), cámara fotográfica, lápices, libreta de campo.

2. Materiales de Laboratorio

Cajas Petri de plástico, frascos de vidrio de 1000 ml, pipetas, tubos de ensayo, bandejas plásticas, guantes de látex, mascarilla, espátula, agujas de disección, jeringuillas estériles, papel filtro, micro pipeta, asa de inoculación, maski, algodón, papel film, alcohol industrial, cloro, porta y cubre objetos, marcador de vidrio, cámara de flujo laminar, estufa bacteriológica, autoclave, microscopio, balanza analítica digital, mechero de Bunsen, refrigeradora, calculadora, computadora, agitador orbital con plancha calefactor.

3. Insumos

Plantas de eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*), Productos comerciales Bio-prot, Bio-fung, cepas de *Ralstonia solanacearum*.

4. Medio de cultivo

Medio de Kelman, Agar Nutritivo, Caldo Papa Dextrosa.

C. METODOLOGÍA

1. Fase de Campo

a. Pruebas de patogenicidad

Se seleccionó 20 plantas de Eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*) del vivero “Los Ángeles” lo más homogéneas posibles, en cuanto a edad, altura, diámetro, procedencia y sobre todo que no presenten características de estar enfermas.



Fotografía: (Remache. F, 2017)

Figura 8. Selección de plantas de Eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*)



Fotografía: (Remache. F, 2017)

Figura 9. Traída de plantas de *E. urograndis* al laboratorio de Fitopatología ESPOCH

b. Aislamiento de *Ralstonia solanacearum*.

- Se ubicó y tumbó 5 árboles con sintomatología de estar atacados con pus bacteriano, las cuales correspondieron a diferentes coordenadas (Anexo 1).
- Una vez obtenida las muestras con la enfermedad se etiquetó y trasladó al laboratorio para su respectivo aislamiento.



Fotografía: (Remache. F, 2017)

Figura 10. Corte de árbol con síntoma de Marchitez bacteriana



Fotografía: (Remache. F, 2017)

Figura 11. Extracción del pus bacteriano característico de *Ralstonia solanacearum*

2. Fase de Laboratorio

a. Para cumplir con el primer objetivo: Realizar pruebas de patogenicidad en plantas de *Eucalyptus urograndis*, utilizando cepas de *Ralstonia solanacearum*.

1) Réplica de *Ralstonia solanacearum*

Una vez obtenida la cepa de *R. solanacearum* se procedió a replicar en 20 cajas Petri con el siguiente protocolo:

- Se utilizó un frasco BOECO de 1000 ml, para posteriormente pesar 11,5g de agar nutritivo en la Balanza Analítica Digital.
- Se colocó los 11,5g de agar nutritivo en un frasco BOECO con 500 ml de agua destilada.
- Se llevó al autoclave para su esterilización a una temperatura de 125 C°.
- Una vez terminado el proceso de esterilización se trasladó el frasco con el medio de cultivo a la cabina laminar BIOBASE. Donde en condiciones totales de asepsia se dispensó el medio agar nutritivo en 20 cajas Petri para su posterior solidificación.
- Una vez solidificado el medio de cultivo, con el asa de transferencia se realizó la siembra de la bacteria, se utilizó el método de cultivo por estrías.
- Se dejó en la incubadora a una temperatura promedio de 30 C°. La bacteria creció 5 días después.

2) Preparación del Caldo Nutritivo

- Se pesó 4,8g de Caldo Papa Dextrosa y se colocó en cuatro frascos ERLLENMEYERS de 500 ml.
- Se colocó 200 ml de agua destilada en cada frasco. Se elaboró unos tapones a base de gasa para cubrir los cuatro ERLLENMEYERS y se confeccionaron los capuchones de papel aluminio.
- Los cuatro frascos se los ingreso al autoclave para su esterilización a una temperatura promedio de 120 C°.
- Una vez esterilizados los cuatro frascos ERLLENMEYERS se los colocó en el agitador a una temperatura de 30 C° y 100 rpm.
- Al cabo de 120 horas (5 días) en el agitador la bacteria creció, el caldo tomó una coloración amarillenta turbia.

3) Inoculación en plantas de *Eucalyptus urograndis*

- Para confirmar que las plantas se encontraban totalmente sanas se utilizó el test Rs ImmunoStrip, para lo cual se procedió a triturar las hojas de las plantas en un mortero.

- Se realizó las inoculaciones en nueve plantas de *Eucalyptus urograndis* con tres dosis 10, 30 y 50 ml de caldo bacteriano y tres plantas quedaron como testigo en total se utilizó 12 plantas de 1 año de edad. Para la inoculación se utilizó jeringuillas esterilizadas de 5 ml, las plantas fueron ubicadas en el vivero de la Facultad de Recursos Naturales.
- Además se realizó evaluaciones diarias a partir del segundo hasta el día 37 después de la inoculación.

b. Para cumplir el segundo objetivo: Evaluar la eficiencia de los productos comerciales bio-prot y bio-fung en el control de la marchitez bacteriana

1) Pruebas de Antagonismo

- Se pesó 18,4g de agar nutritivo en la Balanza Analítica Digital.
- En una probeta se midió 800 ml de agua destilada y luego se puso en un frasco BOECO.
- Se colocó el agar nutritivo en el frasco con agua destilada, para luego llevar al autoclave para su esterilización.
- Después de dos horas se llevó el medio de cultivo a la cámara de flujo laminar BIOBASE para colocar en las 30 cajas Petri.
- Se dejó que se enfríe para que el medio se solidificara.
- Para las pruebas de antagonismo se utilizó la metodología del cultivo dual Castro *et al.*, 2015.
- En el caso de la bacteria se inoculó cepas de *Ralstonia solanacearum* en un medio agar PDA.
- Se utilizó 14 cajas Petri, 7 se rayaron hasta la mitad con el patógeno y se colocaron 3 estrías perpendiculares del bicontrolador bioprot a 2cm entre cada una.
- Las otras 7 también se rayaron hasta la mitad con el patógeno y se puso una gota del biocontrolador biofung en la parte inferior de la caja Petri.
- Se sembró cepas de *R. solanacearum* y luego con ayuda de una micropipeta se colocaron de manera radial gotas de los biocontroladores. Se dejó incubar durante 48 horas a 29 C°.

2) Evaluación de la capacidad biocontroladora

Para la evaluación de la capacidad biocontroladora de los microorganismos se empleó la escala utilizada por Ezziyyani *et al.*, 2004 (Tabla 9).

Tabla 9. Escala para la evaluación antagónica de biocontroladores.

Grado	Capacidad Antagónica	Potencial Biocontrolador
0	Ninguna invasión de la superficie de la cepa patógena	Muy malo
1	¼ invasión de la superficie de la cepa patógena	Malo
2	½ invasión de la superficie de la cepa patógena	Deficiente
3	Total invasión de la superficie de la cepa patógena	Bueno
4	Total invasión de la superficie de la cepa patógena esporulación sobre ella.	Muy bueno

3. Diseño experimental y Análisis Estadístico

Para la prueba de patogenicidad se utilizó un Diseño Completo al Azar con tres repeticiones y tres testigos en total se utilizaron 12 plantas. Para la capacidad antagónica mediante la escala de Ezziyyani *et al.*, 2004, con siete repeticiones y un control absoluto.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD EN PLANTAS DE EUCALIPTO TROPICAL (*Eucalyptus urograndis*)

Las plantas inoculadas se evaluaron a partir del segundo día cada 24 horas durante un período de 37 días, hasta la aparición de síntomas similares a los detectados en campo como: flacidez, oscurecimiento anaranjado de las hojas, necrosis foliar, marchitez y muerte.



Fotografía: (Remache. F, 2018)

Figura 12. Plantas de *Eucalyptus urograndis* de un año de edad

Para asegurarnos que el material se encontraba sano se utilizó el test ImmunoStrip, lo cual es similar a lo descrito por (Janse, 1988; Robinson, 1993) que menciona que otra de las técnicas utilizadas para comprobar que las plantas de *Eucalyptus urograndis* se encuentran libres de la bacteria *Ralstonia solanacearum* son los métodos serológicos (ELISA o inmunofluorescencia) o pruebas de patogenicidad en plantas hospedadas.

R. Solanacearum es afectada por la temperatura, humedad del suelo y otros factores físicos y químicos del suelo, siendo más favorables las temperaturas altas de 28 C° a 35 C° (Iglesia, 2008). En climas fríos menos de 18 C°, y en altitudes superiores a 2500 msnm, la bacteria crece muy lentamente y convive en la planta, como infección latente, sin ocasionar daños aparentes ni presentar síntomas visibles.



Fotografía: (Remache. F, 2018)

Figura 13. Trituración de hojas de *Eucalyptus urograndis*



Fotografía: (Remache. F, 2018)

Figura 14. Test Rs ImmunoStrip Negativo.

Se inyectó las dosis de caldo bacteriano en la base del tallo para que así tuviera una mejor penetración al sistema radicular y al tallo de la planta.



Fotografía: (Remache. F, 2018)

Figura 15. Inoculaciones con cepas de *R. solanacearum* en plantas de *E. urograndis*



Fotografía: (Remache. F, 2018)

Figura 16. Inoculación de 50 ml de caldo bacteriano

Las plantas fueron conservadas en una cámara de crecimiento, con temperatura controlada en un rango de 25-28 C° y una humedad del 70-80%.



Fotografía: (Remache. F, 2018)

Figura 17. Distribución de plantas de *E. urograndis* según dosificaciones



Fotografía: (Remache. F, 2018)

Figura 18. Plantas de *E. urograndis* inoculadas en cámara de crecimiento

Las plantas presentaron los primeros síntomas a los 18 días después de la inoculación con unos puntos de color amarillo claro que iban desde el centro hasta los bordes, se observó una forma de “V” invertida síntoma típico de déficit hídrico, la cual fue producida por la bacteria que al momento de formar colonias taponaban los conductos xilema y floema los cuales eran el canal de paso por el que se transportaban agua y nutrientes hacia las hojas de las plantas, lo cual es similar a lo reportado por Gutarra *et al.*, 2001 quien menciona que el patógeno realiza la penetración en los hospederos por medio de heridas en el sistema radicular y en los lugares de emergencia de raíces secundarias.



Fotografía: (Remache. F, 2018)

Figura 19. “V” invertida síntoma característico de *Ralstonia solanacearum*



Fotografía: (Remache. F, 2018)

Figura 20. Puntos amarillos en el centro de la hoja de *E. urograndis*

A los 25 días después de la inoculación se pudo evidenciar los síntomas de marchitez, las hojas presentaron lesiones grandes, irregulares con una coloración amarillo claro, se encogieron y secaron y por consiguiente declinaron.



Fotografía: (Remache. F, 2018)

Figura 21. Amarillamiento y flacidez en la hojas de *E. urograndis*



Fotografía: (Remache. F, 2018)

Figura 22. Síntomas a los 25 días después de la inoculación

Los resultados de las pruebas de patogenicidad para verificar si la bacteria *Rasltonia solanacearum* E.F. Smith era el agente causal del marchitamiento bacteriano en plantas *Eucalyptus urograndis*, mostraron que a los 37 días después de la inoculación de la bacteria en plantas sanas se replicaron los síntomas de la enfermedad observadas en campo (flacidez, oscurecimiento anaranjado de las hojas, necrosis foliar, marchitez y muerte), lo que permitió identificar a la bacteria como el agente causal de la Marchitez bacteriana en plantas de Eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*).



Fotografía: (Remache. F, 2018)

Figura 23. Marchitez en plantas inoculadas con dosis de caldo bacteriano



Fotografía: (Remache. F, 2018)

Figura 24. Plantas testigo de *Eucalyptus urograndis*

Estos resultados coinciden con (Mafia, 2006) que menciona: Los síntomas observados y los análisis ultra estructurales de los tejidos infectados indican que en minicepas infectadas la obstrucción de los vasos por el material capsular y la pérdida de capilaridad vascular resultante de la degradación enzimática de los vasos del xilema reducen la translocación de agua, ocasionando los síntomas de marchitez y muerte de la planta.

La naturaleza leñosa del eucalipto (*Eucalyptus spp.*) puede determinar la baja frecuencia de marchitez, que generalmente ocurre sólo en minicepas con sistema radicular afectado. Varias especies forestales son anfitriones de *R. solanacearum*. Sin embargo, los informes sobre la declinación de árboles son limitados. Aunque los síntomas típicos varían con la especie hospedera, en general, plantas arbóreas infectadas por *R. solanacearum* presentan síntomas de marchitez permanente, decoloración interna del leño y obstrucción vascular por masas de células bacterianas y material capsular (Supriadi *et al.*, 2001).

La detección de la bacteria en minicepas y plantas asintomáticas sugiere que la enfermedad presenta un desarrollo lento y que, bajo determinadas condiciones ambientales y de predisposición del huésped, hay aumento de colonización de los tejidos y expresión de los síntomas. En el sistema actual de producción de plantas clonales de eucalipto, la colecta intensiva de brotes para estacas y la realización de podas drásticas en minicepas inducen la muerte de raíces, lo que resulta la debilitación fisiológica de las plantas, haciéndolas más vulnerables a la infección. Además, la frecuente fertirrigación y la temperatura elevada del vivero favorecen la multiplicación y diseminación del patógeno en mini jardín clonal (Mafia, 2006).

Además en eucalipto (*Eucalyptus spp.*), existen diferencias entre los síntomas de la enfermedad en minicepas y plantas en el campo. Las minicepas infectadas presentan una menor turgencia de los tejidos foliares, pero raramente alcanzan punto de marchitez permanente, desolladura y necrosis foliar en forma de "V" invertido (Ferreira & Milani, 2002).

Por otro lado la severidad de la enfermedad varía de acuerdo a las condiciones ambientales. La marchitez bacteriana del eucalipto (*Eucalyptus spp.*) ocurre anualmente de abril a noviembre, siendo más severa de julio a agosto, por un período más cálido y húmedo (Liang *et al.*, 1992).

En China, Li & Wu (1996) observaron que las especies de crecimiento rápido como *E. urophylla*, *E. grandis*, *E. saligna* y los híbridos *E. grandis x E. urophylla* o *E. urophylla x E. grandis*, con menos de dos años, son altamente susceptibles. Las diferencias en cuanto al nivel de resistencia para una misma especie pueden estar relacionadas con el uso de procedencias distintas, lo que debe ser mejor investigado.

2. EFECTO DE MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS FRENTE A *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith

Para determinar el efecto antagónico entre los microorganismos se utilizó dos métodos: Inhibición simultánea y Cultivo dual. Si bien las técnicas utilizadas en este trabajo son comúnmente ensayos inmunológicos, representan ser las adecuadas para poder evaluarlo, debido a que se logra visualizar en un medio sólido la actividad productora de metabolitos tóxicos de una cepa antagonista hacia la que es sensible.

Para la prueba de Inhibición simultánea se observó que el 100% de los casos ambas crecieron, surgiendo así un efecto sinérgico entre: *Ralstonia solanacearum* vs Biofung y *Ralstonia solanacearum* vs Bioprot.



Fotografía: (Remache. F, 2018)

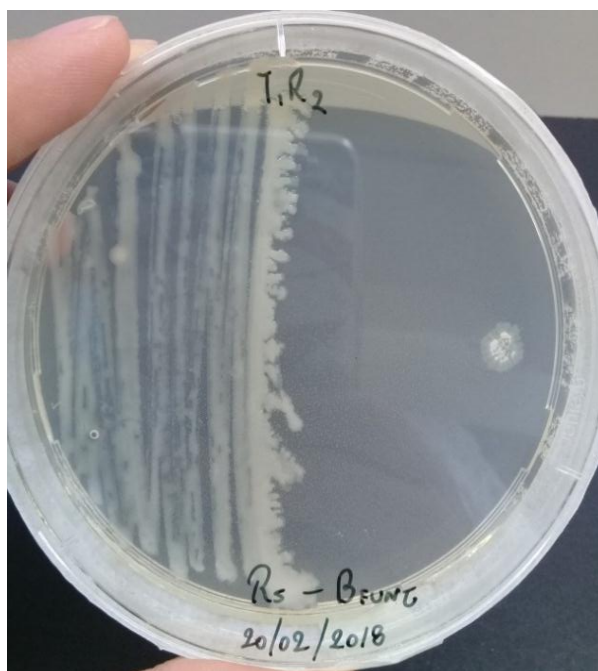
Figura 25. Inhibición simultánea entre *Ralstonia solanacearum* vs Biofung



Fotografía: (Remache. F, 2018)

Figura 26. Inhibición simultánea entre *Ralstonia solanacearum* vs Bioprot

Para la prueba de cultivo dual se observó que los biocontroladores biofung (*Trichoderma spp.*) y bioprot (*Bacillus spp.*) no presentaron antagonismo contra la bacteria *Ralstonia solanacearum*.



Fotografía: (Remache. F, 2018)

Figura 27. Cultivo dual entre *Ralstonia solanacearum* vs Biofung



Fotografía: (Remache. F, 2018)

Figura 28. Cultivo dual entre *Ralstonia solanacearum* vs Bioprot

Diferentes especies del género *Trichoderma spp.* y *Bacillus spp.* son el ingrediente activo de bioproductos comerciales que se emplean para el control de patógenos de cultivos de gran importancia económica, pues sus principales mecanismos de acción son: antibiosis, competencia, microparasitismo e inducción de resistencia (Castro *et al.*, 2015), por lo cual probablemente contra *Ralstonia solanacearum* no tuvieron efecto al realizar la prueba de antagonismo (Cultivo dual), que de acuerdo a la escala de (Ezziyani *et al.*, 2004a) su grado correspondió a 0, es decir su capacidad antagónica fue ninguna, la invasión de la superficie de la cepa patógena y potencial biocontrolador muy malo, tanto bio-fung como bioprot. Y en la prueba de Inhibición simultánea hubo un efecto sinérgico es decir ambos crecieron tanto bioprot - *R.solanacearum* y biofung - *R.solanaceraum*.

En estudios realizados por Suryanarayana *et al.*, (2013), se menciona que en algunas especies al entrar en contacto con el hospedero, este solvente no interfiere con la síntesis de AHL, por lo tanto se sigue dando la producción de factores de virulencia, síntesis de exopolisacáridos, formación de biofilms, producción de antibióticos, pigmentos y movilidad (“swarming”). Además se ha visto que cepas pertenecientes al género *Pseudomonas spp.* son capaces de degradar 1.9 nmol de cloroformo por minuto.

No obstante, se requiere profundizar en otros estudios para comprender los mecanismos involucrados en el efecto antagónico de estos agentes de control biológico en el patosistema *Eucalyptus urograndis* – *R. solanacearum* y evaluar su eficacia en el campo.

VI. CONCLUSIONES

1. Mediante las pruebas de patogenicidad se confirmó que la bacteria *Ralstonia solanacearum* es la causante de la marchitez bacteriana en plantas de Eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*).
2. De los productos comerciales bio-fung y bio-prot utilizados en las pruebas de inhibición simultánea y cultivo dual, ninguna presentó antagonismo frente a la bacteria *Ralstonia solanacearum*. Además de que existieron casos en donde tanto la bacteria a antagonizar como las antagónicas crecieron.

VII. RECOMENDACIONES

- 1.** El control biológico, aunque todavía necesita mayores estudios, ha surgido como una alternativa prometedora. Existen evidencias experimentales de que el tratamiento en plantas de eucalipto (*Eucalyptus spp.*) con aislados específicos de *Pseudomonas fluorescens*, del tipo PGPR (rizobacterias) constituye una de las alternativas de control.
- 2.** Los experimentos con hongos ectomicorríticos también apuntan a otra forma de control biológico de la enfermedad.
- 3.** Es necesario realizar ensayos en campo para identificar las especies y variedades más adecuadas, con el fin de buscar fuentes de resistencia y nuevas estrategias de control de la enfermedad. Estos ensayos deben ser realizados, en diferentes áreas o regiones, trabajando en suelos naturalmente infectados.

VIII. RESUMEN

La presente investigación propone: evaluar el 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, provincia de los Ríos. La empresa NOVOPAN DEL ECUADOR S.A. ha visto la necesidad de tener un programa de investigación sobre el control de plagas y enfermedades, se realizaron pruebas de patogenicidad en plantas de *Eucalyptus urograndis* en condiciones semicontroladas utilizando cepas de *R. solanacearum* y además se evaluó la eficiencia de los productos comerciales bioprot y biofung. El diseño experimental utilizado fue el Diseño Completamente al Azar (DCA) con siete repeticiones y un control absoluto. Se utilizó el test ImmunoStrip para comprobar que las plantas se encontraban sanas, se inoculó tres dosis (10, 30 y 50 ml) de caldo bacteriano y a los 37 días todas las plantas presentaron los mismos síntomas flacidez, amarillamiento y marchitez. Se efectuó dos métodos de antagonismo: Inhibición simultánea y Cultivo dual con los productos comerciales frente a *R. solanacearum* donde su grado de control fue cero, es decir su capacidad antagónica fue ninguna, la invasión de la superficie de la cepa patógena y potencial biocontrolador muy malo tanto biofung como bioprot, en base a lo obtenido en esta investigación. Se recomienda el uso de aislados específicos de *Pseudomonas fluorescens* del tipo PGPR (Rizobacterias) y también con hongos ectomicorrízicos apuntan a otra forma de control biológico de la enfermedad.

Palabras clave: MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS – PATOGENICIDAD – CEPA - EUCALIPTO TROPICAL.

Por: Fabián Remache



IX. SUMMARY

The present investigation proposes: to evaluate the effect of antagonistic microorganisms in control of the Bacterial Wilt (*Ralstonia solanacearum* E.F. Smith) present in the plantation of tropical Eucalyptus (*Eucalyptus urograndis*) in Los Angeles farm, Buena Fe canton, province of Los Ríos. Company NOVOPAN DEL ECUADOR S.A. has the need of a research program on control of pests and diseases, pathogenicity tests conducted on plants of *Eucalyptus urograndis* under semi-controlled conditions using strains of *R. solanacearum* and the efficiency of commercial biotrap and biofung products also evaluated. The experimental used design was the Completely Random Design (DCA) with seven repetitions and an absolute control. The ImmunoStrip test used to verify that the plants were healthy, three doses (10, 30, and 50 ml) of bacterial broth inoculated and at 37 days all the plants showed the same symptoms of flaccidity, yellowing and wilting. Two methods of antagonism took place: Simultaneous inhibition and Dual culture with the commercial products face *R. solanacearum* where its control degree was zero, that is, its antagonistic capacity was none, the invasion of the surface of pathogenic strain and bio-controller potentially very bad both biofung and bioprot, based on what obtained in this investigation. The research paper recommends the use of specific isolates of *Pseudomonas fluorescens* of the PGPR type (Rhizobacteria) and with ectomycorrhizal fungi point to another form of biological control of the disease.

Keywords: MICROORGANISMS ANTAGONISTS- PATHOGENICITY- CEPA- TROPICAL EUCALYPTUS.



X. BIBLIOGRAFÍA

1. Alfenas, A. C. & Mafia, R. G. (2003). *Controle integrado de doenças em viveiros clonais e aspectos relativos à ferrugem (Puccinia psidii) do eucalipto*. Fitopatología Brasileira 28:156-163. Recuperado el 10 de enero del 2018, disponible en : http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582005000400003
2. Alfenas, A. C. & Mafia, R. G. (2006). *Manejo integrado de doenças do eucalipto em viveiro*. In: *Tecnologías alternativas para o controle de pragas e doenças*. Venzon, M., Júnior, T.J.P., Pallini, A. (Eds). Viçosa UFV ; EPAMIG. p.81-101. 378p. Recuperado el 03 de enero del 2018, Disponible en: <http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/1039/texto%20completo.pdf?sequence=1>
3. Alfenas, A. C., Zauza, E. A. V., Mafia, R. G. & Assis, T. F. (2004). *Clonagem e doenças do eucalipto*. Imprensa Universitária. p. 442. Recuperado el 18 de enero del 2018, Disponible en: <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp082045.pdf>
4. Alfenas, A. C., Mafia, R. G., Sartório, R. C., Binoti, D. H .B., Silva, R. R., Lau, D. & Vanetti, C. A. (2006). *Ralstonia solanacearum em viveiros clonais de eucalipto no Brasil*. Fitopatología Brasileira. (no prelo). Recuperado el 08 de enero del 2018, Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/fb/v31n4/05.pdf>
5. Agrocalidad. (2013). Ficha técnica número #4bi Marchitez Bacteriana (*Ralstonia solanacearum* E.F.Smith). *Sintomatología y daños*. Recuperado el 17 de enero del 2018, Disponible en: <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/sanidad-vegetal/3-control-fitosanitario/04-gestion-de-manejo-y-control-de-plagas-especificas/b-prevencion-ingreso-moko-platano/4bi-ficha-tecnica-r.solanacearum-raza-2-min.pdf>
6. Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. (50a. ed). Elsevier Academic press, USA. P. 921. Disponible en: <https://www.elsevier.com/books/plant-pathology/agrios/978-0-08-047378-9>

7. Bentec, (2011). Semillas exóticas (*Eucalyptus urograndis*). *Características generales y usos*. Recuperado el 17 de febrero del 2018, Disponible en: <http://www.bentecsementes.com.br/eucalipto-urograndis/>
8. Cao, J. D. (1982). *Investigation of bacterial wilt in Eucalyptus saligna and E. grandis introduced from Brazil*. *Gruangxi Forestry Science Technology* 4:30-31. Recuperado el 05 de febrero del 2018, Disponible en: https://www.fabinet.up.ac.za/publication/pdfs/169-2011_zhou_et_al_austral_plant_pathol.pdf
9. Ciampi, L., Sequeira, L. & French, E. R. (1980). *Latent infection of potato tubers by Pseudomonas solanacearum*. *American Potato Journal* 57:377-386. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02854329>
10. Denny, T. P. (2000). *Ralstonia solanacearum – a plant pathogen in touch with its host*. *Trends in Microbiology* 11:486-489. Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20033098478>
11. Dianese, J. C. & Dristig, M. C. G (1993). *Screening Eucalyptus selections for resistance to bacterial wilt caused by Pseudomonas solanacearum*. In: Hartman, G.L., Hayward, A.C. (Eds.). *Bacterial Wilt Proceedings of an International Conference, Kaoshiung, Taiwan. 28-31 october 1992*. *ACIAR Proc.* 45:206-210.
12. Ecuadorforestal, (2012). Ficha técnica número #10 Eucalipto (*Eucalyptus urograndis*). *Características y propiedades*. Disponible en: <http://ecuadorforestal.org/fichas-tecnicas-de-especies-forestales/ficha-tecnica-no-10-eucalipto/>
13. Genin, S. & Boucher, C. (2002). *Ralstonia solanacearum: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome*. *Molecular Plant Pathology*. 3:111-118. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20569316>
14. Gong, M. Q., Chen, Y., Wang, F. Z. & Chen, Y. L. (1999). *Inhibitory effect of ectomycorrhizal fungi on bacterial wilt of Eucalyptus*. *Forest Research* 12:339-345. Disponible en: <file:///C:/Users/comer/Downloads/biolcontrl-ran-2005.pdf>

15. Goszczynska, T. Serfontein, J. J. Serfontein, S. (2000). *Introduction to Practical Phytobacteriology*. First edition. Safrinet. Pretoria ñ South Africa. 83p.
16. Graham, J., & Lloyd, A. B. (1978). *An improved indicator plant method for the detection of Pseudomonas solanacearum race 3 in soil*. Plant Disease Report 62:35-37. Recuperado el 17 de enero del 2018, Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2338.1988.tb00385.x>
17. Grey, B. E. & Steck, T. R. (2001). *The viable but nonculturable state of Ralstonia solanacearum may be involved in long-term survival and plant infection*. Applied Environmental Microbiology. 67:3866-3872. Recuperado el 15 de enero del 2018, Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11525979>
18. Gutarra, E. R. F. L., Aley, P. & Elphinstone, J. (1995). *Methods for the detection of Ralstonia solanacearum in potato crops*. In: Hardy, B., French, E.R. (Eds.). Integrated Management of Bacterial Wilt. Proceedings of an International Workshop held in New Delhi, India. 11-16, 195p. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.866.5972&rep=rep1&type=pdf>
19. Hayward, A. C. (1991) *Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by Pseudomonas solanacearum*. Annual Review Phytopathology 29:65-87. Recuperado el 20 de enero del 2018, Disponible en: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.py.29.090191.000433>
20. Hajek, A., (2004). *Natural Enemies. An Introduction to Biological Control*. Cambridge University Press. Cambridge: 394 pp.
21. Haack R. A.; E. Jendek; L. Houping; K. R. Marchant; T.R. Petrice; T.M. Poland y Y. Huie. (2002). *The emerald ash borer: a new exotic pest in North America*. Newsletter of the Michigan Entomological Society 47:1-5.
22. Javier, E. Q. (1994). *Foreword*. In: *Bacterial Wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. (Hayward, A.C., Hartman, G.L. Eds.). Wallingford, UK: CABI, p.xi-xii. 1994.

23. Kelman, A. (1954). *The relationship of pathogenicity in Pseudomonas solanacearum to colony appearance on a tetrazolium medium*. *Phytopathology* 44:693-695. Recuperado el 18 de enero del 2018, Disponible en: <http://garfield.library.upenn.edu/classics1983/A1983QM45400001.pdf>
24. Loor, J. (2008). *Estudio de la Combinación de Fertilizantes Químicos en vivero de Palma Aceitera Híbrida (Elaeis Oleífera X Elaeis Guineensis) para Optimizar el Desarrollo en Palmeras del Ecuador-Cantón Shushufindi*.
25. Liang, Z. C. & Guo, Q. (1992) *Propagation and selection of casuarinas for resistance to bacterial wilt*. *Bacterial Wilt Newsletter* 8:4-5.
26. Liang, Z. C., Guo, Q. & Wu, Q. P. (1992). *Bacterial wilt of eucalyptus in South China*. *Bacterial Wilt Newsletter* 8:5. Recuperado el 06 de enero del 2018, Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582006000400005
27. Li, H. & Wu, X. Y. (1996). *The current status, causes and control of forest diseases in Haiman province*. *Tropical Forestry* 24:101-103. Recuperado el 10 de enero del 2018, Disponible en: [file:///C:/Users/comer/Downloads/biolcontrl-ran-2005%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/comer/Downloads/biolcontrl-ran-2005%20(1).pdf)
28. Lin, X. P., Lin, X. J., Wu, G. J., Li, X. X., Cai, J. S. & Su, S. C. (1996). *The epidemic law of bacterial wilt in Eucalyptus*. *Journal Central South Forestry University* 16:49-55.
29. Lopes, C. A. & Takatsu, A. (1997). *Controle da murcha bacteriana*. *Fitopatologia Brasileira*. 22:224-225 (Resumo). Recuperado el 10 de enero del 2018, Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162001000300010
30. Mafia, R. G. (2004) *Rizobactérias como promotoras do enraizamento, crescimento e como agentes de biocontrole de doenças na propagação clonal do eucalipto*. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG. 105p. Recuperado el 10 de enero del 2018, Disponible en:

<http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/1039/texto%20completo.pdf?sequence=1>

31. Mew, T. W. & Ho, W. C. (1977). *Effect of soil temperature on resistance of tomato cultivars to bacterial wilt*. *Phytopathology* 67:909-911. Recuperado el 19 de enero del 2018, Disponible en: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1977Abstracts/Phyto67_909.htm

32. Moura, A. G. & Romeiro, R. S. (1999). *Avaliação in vitro de actinomicetos como antagonistas a Ralstonia solanacearum* (Smith 1896). *Ciência e Agrotécnica*. 23:281-288. Recuperado el 09 de enero del 2018, Disponible en: file:///C:/Users/comer/Downloads/23-2-1999_05.pdf

33. Naidoo S, C Külheim, L Zwart, R Mangwanda, C. N Oates, EA Visser, FE Wilken, TB Mamni, AA Myburg. (2014). *Uncovering the defense responses of Eucalyptus to pests and pathogens in the genomics age*. *Tree Physiology* 34 (9):931-943. Recuperado el 06 de febrero del 2018, Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/10.1093/treephys/tpu075>

34. Nikles, G. D. (1992). *Hybrids of forest trees: The bases of hybrids superiority and a discussion of breeding methods*. *IUFRO Conference: Resolving Tropical Forest Resource Concerns Through Tree Improvement, Gene Conservation and Domestication of New Species*. Cartagena and Cali - Colombia: 333-347. Disponible en: <http://fcf.unse.edu.ar/eventos/1-jornadas-forestales/pdfs/Eucaliptos%20colorados%20en%20combinaciones%20hibridas.pdf>

35. European and Mediterranean Plant Protection Organization. (2004). *Ralstonia solanacearum. Diagnostic protocols for regulated pests*. OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 34:173-178. Disponible en: <file:///C:/Users/comer/Downloads/pm7-021-1-en.pdf>

36. Pérez C. A, M. J Wingfield, B Slippers, N. A Altier, R. A Blanchette. (2010). *Endophytic and canker-associated Botryosphaeriaceae occurring on non-native Eucalyptus and native Myrtaceae trees in Uruguay*. *Fungal Diversity* 41

(1):53-69. Disponible en:
https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=1244927&pid=S0717-9200201600030000200028&lng=es

37. P&CMaderas, (2013). Ficha técnica Eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*). *Distribución y hábitat. Propiedades de la madera*. Disponible en: [file:///C:/Users/comer/Desktop/TODO%20TESIS/ARTÍCULOS%20Y%20DOCUM%20RS/IMPRESAS/EucaliptoUrograndis\(EucalyptusUrophyllaXEucaliptusGrandis\).pdf](file:///C:/Users/comer/Desktop/TODO%20TESIS/ARTÍCULOS%20Y%20DOCUM%20RS/IMPRESAS/EucaliptoUrograndis(EucalyptusUrophyllaXEucaliptusGrandis).pdf)
38. Prior, P. & Steva, H. (1990). *Characteristics of strains of Pseudomonas solanacearum from the French West Indies*. Plant Disease 74:13-17. Recuperado el 10 de febrero del 2018, Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS-91-2-0195>
39. Poussier, S. & Luiseti, J. (2000). *Specific detection of biovars of Ralstonia solanacearum in plant tissue by nested PCR*. European Journal of Plant Pathology 106:255-265.
40. Robbs, C. F., Cruz, A. P. & Neto, J. R. (1988). *Algumas estratégias de controle à murcha bacteriana (Pseudomonas solanacearum) em eucaliptos*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA. Jaguariúna, SP. Comunicado Técnico, nº 3. 4p.
41. Ran, L. S., Liu, C. Y., Wu, G. J., Van Loon, L. C. & Bakker, P.A.H.M. (2005). *Suppression of bacterial wilt in Eucalyptus urophylla by fluorescent Pseudomonas spp. in China*. Biological Control 32:111-120.
42. Smith, E. F. (1986). *A bacterial disease of tomato, eggplant and Irish potato (Bacillus solanacearum sp. nov.)* US Dep. Agric. Div. Veg. Physiol. Path. Bull. 12:1-28.
43. Sudo, S., Oliveira, G.H.N. & Pereira, A. C. (1983). Eucalipto (*Eucalyptus sp.*) e bracatinga (*Mimosa scabrella* Penth), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith. Fitopatologia Brasileira 8:631.(Resumo).

44. Supriadi, Karden, M. & Sitepu, D. (2001) *Bacterial wilt disease of woody trees caused by Pseudomonas solanacearum: a review*. Jurnal Litbang Pertanian. 20(3): 106112. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/262762990_Characterization_of_isolates_of_Ralstonia_solanacearum_biovar_2_pathogenic_to_Eucalyptus_urograndis_hybrids
45. Takatsu, A. & Lopes, C.A. (1997). *Murcha-bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle*. Horticultura Brasileira 15:170-177.
46. Vasse, J., Frey, P. & Trigalet, A. (1995). *Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 8:241-251. Recuperado el 10 de enero del 2018, Disponible en: <https://www.apsnet.org/publications/mpmi/BackIssues/Documents/1995Articles/Microbe08-241.pdf>
47. Volcy, C. (2008) “*Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología*”. Una revisión. Universidad Nacional de Colombia. Medellín.
48. Wu, Q. P. & Liang, Z. C. (1988b). *Selection of species and provenance of Eucalyptus for resistance to bacterial wilt*. Journal South China Agriculture University. 9:41-45.
49. Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H. & Nishiuchi, Y. (1995). *Transfer of two Burkholderia and an Alcaligenes species to Ralstonia gen. nov.: proposal of Ralstonia pickettii (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., Ralstonia solanacearum (Smith 1896) comb. nov. & Ralstonia eutropha (Davis 1969) comb. nov.* Microbiology and Immunology 39:897-904. Recuperado el 10 de enero del 2018, Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8657018>

XI. ANEXOS

Anexo 1. Ubicación y Variables dasométricas de la toma de muestras

Punto	X	Y	Altura (msnm)	DAP	ALTURA
165	00 38 645	79 30 515	144	4,76	6,56
166	00 38 636	79 30 519	143	3,76	5,34
167	00 38 650	79 30 507	148	3,97	5,23
168	00 38 649	79 30 491	143	3,07	5,78
170	00 38 666	79 30 477	144	2,65	4,59

Elaborado por: (Remache. F, 2018)

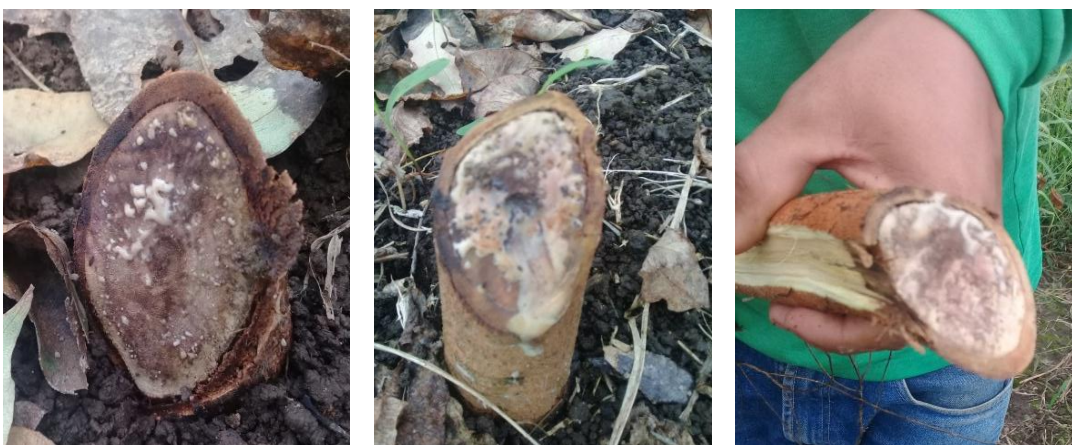
Anexo 2. Producción de plantas de *Eucalyptus urograndis* en el vivero “Los Ángeles”



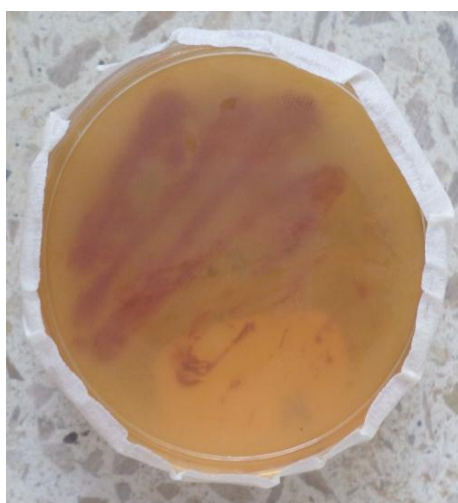
Anexo 3. Plantas y árboles de *Eucalyptus urograndis* con síntomas de *R. solanacearum*



Anexo 4. Pus bacteriano síntoma característico de *Ralstonia solanacearum*



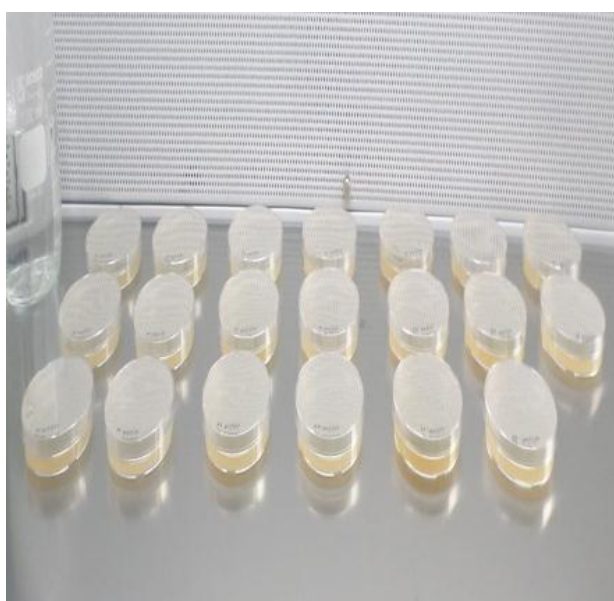
Anexo 5. Cepa pura de *Ralstonia solanacearum* en medio de cultivo Kelman



Anexo 6. Productos comerciales bio-fung y bio-prot



Anexo 7. Réplica de la bacteria *R. solanacearum* en medio Agar nutritivo



Anexo 8. Crecimiento de la bacteria *R. solanacearum* en Incubadora a 28 C°.



Anexo 9. Caldo nutritivo con la bacteria *R. solanacearum* para prueba de patogenicidad.



Anexo 10. Inoculación del caldo bacteriano en plantas de *Eucalyptus urograndis*



Anexo 11. Distribución del diseño experimental



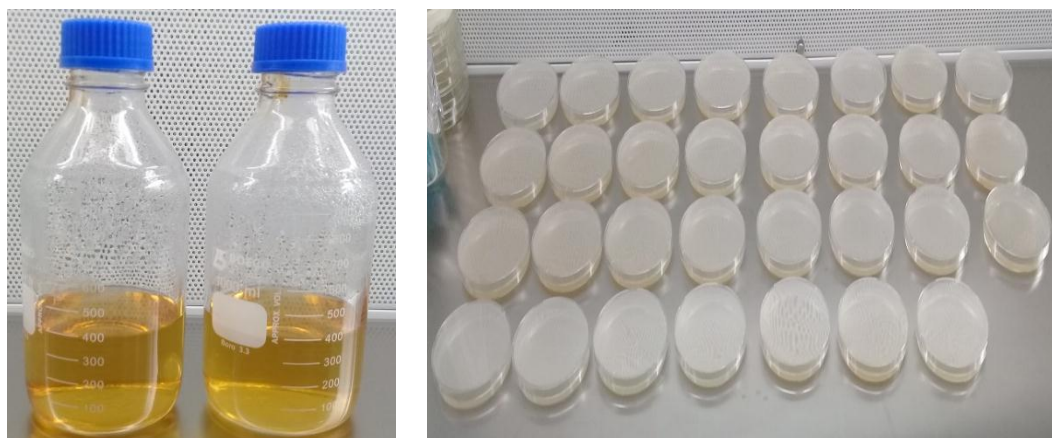
Anexo 12. Peso de 18,4g de Agar Nutritivo para medio de cultivo



Anexo 13. Esterilización del medio Agar Nutritivo en el Autoclave



Anexo 14. Obtención y solidificación del Medio Agar Nutritivo



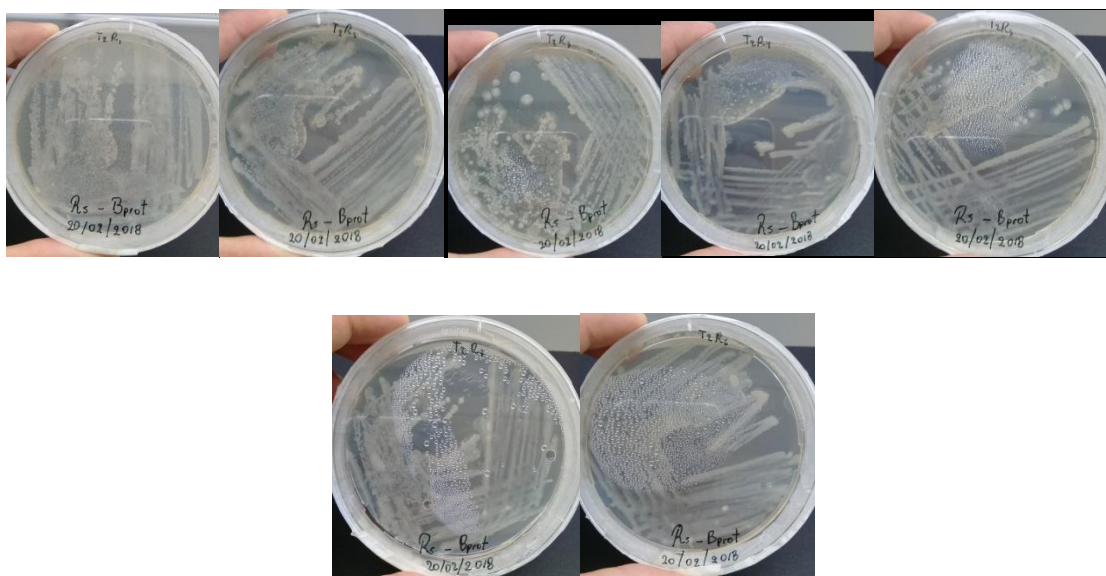
Anexo 15. Pruebas de Antagonismo *Ralstonia solanacearum* - Bioprot



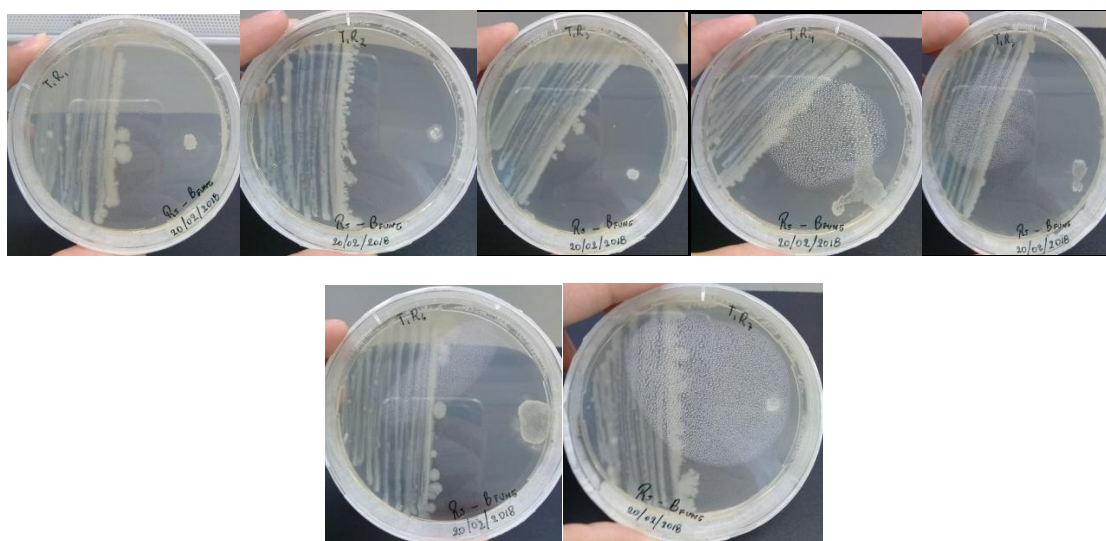
Anexo 16. Pruebas de Antagonismo *Ralstonia solanacearum* – Biofung



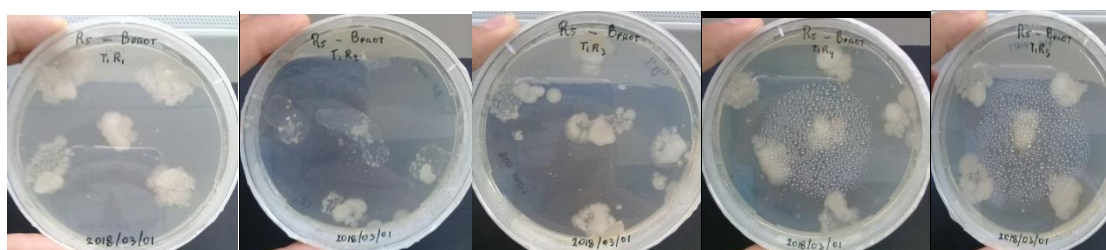
Anexo 17. Método de Cultivo Dual entre *R. solanaceum* y Bio-prot (7 repeticiones)

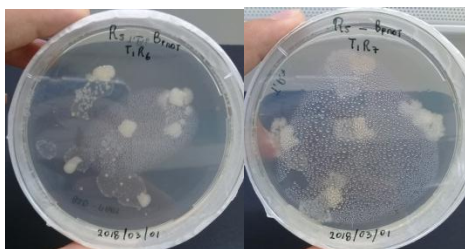


Anexo 18. Método de Cultivo Dual entre *R. solanaceum* y Bio-fung (7 Repeticiones)

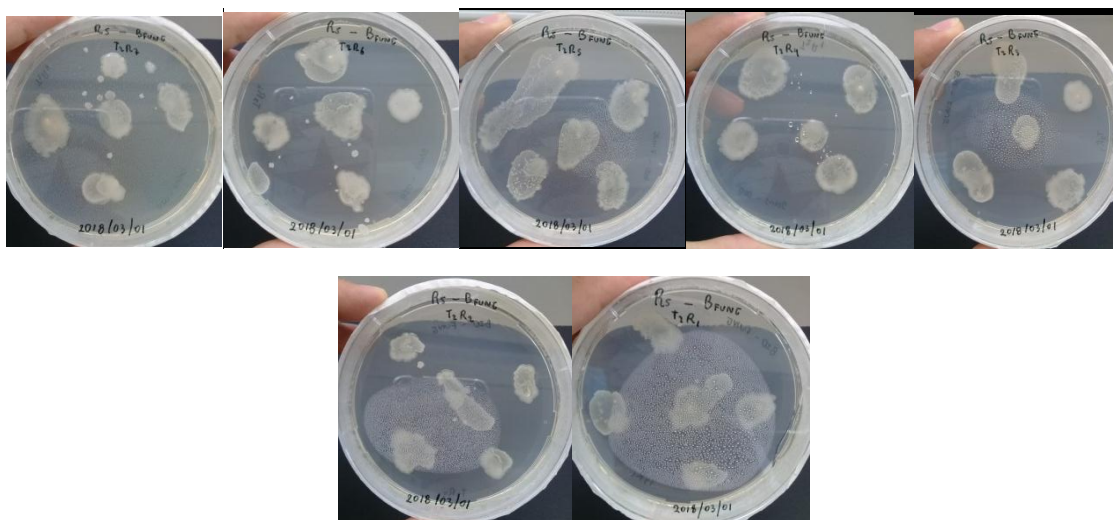


Anexo 19. Método de Inhibición Simultánea entre *R. solanaceum* y Bio-prot (7 Repeticiones)





Anexo 20. Método de Inhibición Simultánea entre *R. solanacearum* y Bio-fung (7 Repeticiones)



Anexo 21. Observación del crecimiento radial de *Raltonia solanacearum* con los antagonistas en el microscopio.

