



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

**“EVALUACIÓN DE AGENTES BIOLÓGICOS PARA EL CONTROL Y
MITIGACIÓN DEL DAÑO OCASIONADO POR *Ralstonia solanacearum*
EN EUCALIPTO TROPICAL A NIVEL DE VIVERO, EN LA HACIENDA
LOS ÁNGELES, CANTÓN BUENA FÉ, 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**

LLUMIGUANO GUAMÁN RAÚL ARMANDO.

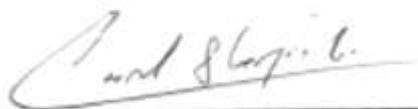
RIOBAMBA – ECUADOR

2018

HOJA DE CERTIFICACIÓN

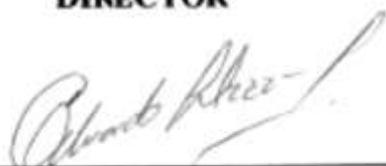
EL TRIBUNAL DEL TRABAJO DE TITULACIÓN CERTIFICA, que el proyecto de investigación titulado: "EVALUACIÓN DE AGENTES BIOLÓGICOS PARA EL CONTROL Y MITIGACIÓN DEL DAÑO OCASIONADO POR *Ralstonia solanacearum* EN EUCALIPTO TROPICAL A NIVEL DE VIVERO, EN LA HACIENDA LOS ANGELES, CANTÓN BUENA FÉ, PROVINCIA DE LOS RÍOS", de responsabilidad del señor Raúl Armando Llumiguano Guamán, ha sido prolijamente revisado quedando autorizada su presentación.

TRIBUNAL DE TRABAJO DE TITULACIÓN



Ing. Carlos Francisco Carpio Coba

DIRECTOR



Ing. Eduardo Patricio Salazar Castañeda

ASESOR

10-12-2018

Fecha

10-12-2018

Fecha

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Raúl Armando Llumiguano Guamán, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos contantes 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 30 de noviembre del 2018



Raúl Armando Llumiguano Guamán.

020238885-6

AUTORÍA

La autoría del presente trabajo investigativo es de propiedad intelectual del autor, NOVOPAN DEL ECUADOR S.A y de la Escuela de Ingeniería Forestal de la ESPOCH.



Raúl Amando Llumiguano Guamán.

020238885-6

DEDICATORIA

Con mucho amor y cariño quiero dedicar el presente trabajo investigativo, a los seres más maravillosos que Jehová me ha regalado en este mundo, a mis padres, que con su infinito amor, lucha constante y la bendición diaria de Jehová me han ayudado en el recorrido de mi vida profesional, infundiéndome valores, educación y lucha constante para lograr un sueño y a no rendirme si en el camino encuentro obstáculos, más bien con más energía y coraje luchar por alcanzar cada desafío que me plantee en la vida.

A mis hermanos: Rosa, Oswaldo, Martha, Anita, Alex y Danielita; quienes a pesar de los problemas y a la pérdida que tuvimos que enfrentar al quedarnos sin nuestro padre, me brindaron su confianza y el apoyo absoluto para poder cumplir este sueño tan anhelado.

A mis sobrinos: Shirley, Tamia, Samay, Danna, Bryan, Kleider, Derlis y Helian, espero ser un ejemplo a seguir y luchar por un sueño sin importar los obstáculos que la vida nos sitúe.

A mí querida y amada novia Katy Quinatoa, por su apoyo incondicional, por la confianza en que un día lograría culminar mis estudios a pesar de los obstáculos de mi vida y por todo el amor y cariño brindado desde el día en que apareció en mi vida.

A mis verdaderos amigos que estuvieron a mi lado durante mi vida universitaria, especialmente a Patricio, Laura, Jessica y Fabián, quienes me brindaron su ayuda total cuando más lo necesitaba.

***En cuanto a mí, a Dios clamaré;
y Jehová mismo me salvará.
Por la tarde y la mañana y el mediodía
no puedo menos que mostrar preocupación,
y lanzo quejidos, y él oye mi voz. (Salmo 55:16-17)***

Raúl Llumiguano Guamán

AGRADECIMIENTO

A Jehová Dios, por haberme regalado una lluvia de bendiciones durante toda mi vida, brindándome una familia sorprendente, de igual manera fortaleciéndome mediante su palabra en los momentos de angustia, recordándome que no estoy solo, que él siempre esta con migo, a pesar de mis errores e imperfecciones.

A mis padres: José Llumiguano, quien tristemente tuvo que partir de manera inesperada de entre nosotros y Rosa Guamán, por todo el sacrificio que realizaron para brindarme amor, ayuda económica y moral durante toda mi vida y así poder lograr este objetivo planteado en mi vida.

A mí cuñada y cuñado: Mercedes Pilco y Washington Caspi por ser una fuente de inspiración y ejemplo de profesionalismo, de igual manera por todo el apoyo brindado desde el día en que llegaron a formar parte de la familia.

A mis primos, Jaime Taris y Verónica Toalombo, por haberme ofrecido su sustento infinito durante los últimos años de mi carrera profesional, de igual manera a Merwin Becerra y Vanessa Verdezoto quienes me brindaron una fuente de trabajo en su empresa “ANBECA S.A.” durante el desarrollo de mi tesis.

A todos mis profesores de la Facultad de Recursos Naturales, quienes contribuyeron en mi formación académica, especialmente al Ing. Carlos Carpio y al Ing. Eduardo Salazar, por compartir todos sus conocimientos, apoyo, tiempo y la paciencia durante el desarrollo y culminación de la presente investigación y cumplir así el sueño tan anhelado.

A la célebre empresa NOVOPAN DEL ECUADOR S.A. y a los ingenieros: Ing. Adriana Mejía e Ing. Luis Pinto por haberme brindado la oportunidad de realizar mis prácticas pre profesionales y mi trabajo de titulación en las diferentes plantaciones y adquirir conocimientos y experiencias que serán cimientos para mi camino a recorrer de aquí en adelante.

Raúl Llumiguano Guamán

TABLA DE COTENIDO

LISTA DE GRÁFICOS.....	i
LISTA DE TABLAS	ii
LISTA DE ANEXOS.....	iii
I. EVALUACIÓN DE AGENTES BIOLÓGICOS PARA EL CONTROL Y MITIGACIÓN DEL DAÑO OCASIONADO POR <i>Ralstonia solanacearum</i> EN EUCALIPTO TROPICAL A NIVEL DE VIVERO, EN LA HACIENDA LOS ANGELES, CANTÓN BUENA FÉ, PROVINCIA DE LOS RIOS.	1
II. INTRODUCCIÓN.....	1
A. JUSTIFICACIÓN.....	2
B. OBJETIVOS.....	2
1. Objetivo General	2
2. Objetivos Específicos.....	2
C. HIPÓTESIS.....	3
1. Hipótesis nula.....	3
2. Hipótesis alternante.....	3
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
A. EL EUCALIPTO	4
1. Eucalipto tropical. (<i>Eucalyptus grandis</i>).....	4
B. MARCHITEZ BACTERIANA (<i>Ralstonia solanacearum</i>).....	6
1. <i>Ralstonia solanacearum</i>	6
2. Distribución geográfica.....	6
3. Historia de <i>Ralstonia solanacearum</i>	7
4. Como reconocer la enfermedad de <i>Ralstonia solanacearum</i>	7
5. Síntomas de <i>Ralstonia solanacearum</i> en eucalipto (<i>Eucalyptus urograndis</i>) ...	8
6. Marchitamiento vascular causado por bacterias.....	8
7. Ciclo de vida del patógeno y epifitiología de la enfermedad.....	9
8. Susceptibilidad de <i>Eucalyptus</i>	10
9. Factores de estrés asociados con la infección	10
10. Marchitez y muerte por <i>Ralstonia solanacearum</i>	12
C. AGENTE CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD	13
D. DONDE OCURRE, COMO SE DISEMINA Y PENETRA <i>Ralstonia solanacearum</i>	15
2. Formas de propagación.....	15

E.	PRODUCTOS COMERCIALES PARA EL CONTROL DE <i>R. solanacearum</i> .	15
1.	BIO-PROT.....	15
2.	BIO-FUNG.....	17
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
A.	CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR	19
1.	Localización de estudio.....	19
2.	Ubicación geográfica	19
3.	Condiciones climáticas.....	20
4.	Clasificación ecológica	20
B.	MATERIALES Y EQUIPOS	20
1.	Materiales de campo	20
2.	Equipos.....	21
3.	Componentes químicos y biológicos.	21
C.	DISEÑO EXPERIMENTAL	21
1.	Diseño experimental de la investigación.....	21
2.	Características del diseño experimental	21
D.	METODOLOGÍA.....	22
1.	Para el cumplimiento del primer objetivo: Valoración de la incidencia de plantas tratadas con agentes biológicos aislados en el laboratorio.	22
2.	Para el cumplimiento del segundo objetivo: Estimación de la severidad de plantas tratadas con agentes biológicos aislados por el laboratorio Biogreen.....	29
3.	Para el cumplimiento del tercer objetivo: Determinación de la mortalidad de plantas tratadas con agentes biológicos (Bioprot y Biofung).	29
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
A.	VALORACIÓN DE LA INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD EN LAS PLANTAS TRATADAS CON AGENTES BIOLÓGICOS (Bioprot y Biofung).....	31
1.	Análisis estadístico de la incidencia de la enfermedad en las plantas por tratamiento/ repetición (fase inicial-65 días de edad de las plantas) según Kruskal Wallis.....	31
2.	Análisis estadístico de la incidencia de la enfermedad en las plantas por tratamiento/ repetición (fase final-95 días de edad de las plantas) según Kruskal Wallis.....	34
B.	ESTIMACIÓN DE LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD EN LAS PLANTAS TRATADAS CON AGENTES BIOLÓGICOS (Bioprot y Biofung).....	37

1. Análisis estadístico para la severidad de la enfermedad por tratamiento/repetición de la (fase inicial a los 65 días de edad de las plantas) con estadística paramétrica.....	37
2. Análisis estadístico para la severidad de la enfermedad por tratamiento/repetición de la fase final – 95 días de edad de las plantas.....	37
C. DETERMINACION DE LA MORTALIDAD DE PLANTAS TRATADAS CON AGENTES BIOLÓGICOS (Bioprot y Biofung)	42
1. Análisis estadístico de la mortalidad a los 95 días de edad de las plantas por tratamiento/ repetición.....	42
VI. CONCLUSIONES	44
VII. RECOMENDACIONES	45
VIII. RESUMEN.....	46
IX. ABSTRACT.....	47
X. BIBLIOGRAFÍA	48
XI. ANEXOS	54

LISTA DE GRÁFICOS

		Pág.
Gráfico 1.	Hojas enfermas por tratamiento/repetición	33
Gráfico 2.	Hojas enfermas por tratamiento/repetición	36
Gráfico 3.	Severidad bacteriana por tratamiento/repetición.	39
Gráfico 4.	Severidad bacteriana por tratamiento/ repetición.	41

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla N°1.	Características del área experimental	22
Tabla N°2.	Control químico de nutrientes durante el tiempo de trabajo	26
Tabla N°3.	Control fitopatológico a nivel de sustrato en las plantas	27
Tabla N°4.	Control químico durante el crecimiento de las plantas	27
Tabla N°5.	Distribución de tratamientos según el diseño experimental	28
Tabla N°6.	Anova de incidencia de la enfermedad según Kruskal Wallis	31
Tabla N°7.	Ranking de los tratamientos aplicados según Kruskal Wallis	32
Tabla N°8.	Anova de incidencia de la enfermedad según Kruskal Wallis	34
Tabla N°9.	Separación de medias de los tratamientos aplicados según Kruskal Wallis.	35
Tabla N°10.	Análisis de la Varianza de la severidad por tratamiento/ repetición.	37
Tabla N°11.	Separación de medias de Tukey al 5% de la severidad por tratamiento/ repetición.	38
Tabla N°12.	Análisis de la Varianza de la severidad por tratamiento/ repetición.	39
Tabla N°13.	Separación de medias de Tukey al 5% de la severidad por tratamiento/ repetición.	40
Tabla N°14.	Anova de la mortalidad según Kruskal Wallis	42

LISTA DE ANEXOS

		Pág.
Anexo N°1.	Delimitación del área de estudio.	54
Anexo N°2.	Selección y ubicación del material experimental (Plantas de <i>Eucalyptus urograndis</i>)	54
Anexo N°3.	Establecimiento y etiquetado de los tratamientos y repeticiones del diseño experimental.	55
Anexo N°4.	Fertilización y aplicación de nutrientes a las unidades experimentales.(Macro y micro nutrientes)	55
Anexo N°5.	Selección e identificación de árboles con presencia de <i>Ralstonia solanacearum</i> previo inoculación de la bacteria.	56
Anexo N°6.	Recolección de muestras infectadas con <i>Ralstonia solanacearum</i> .	56
Anexo N°7.	Inoculación de la bacteria en un periodo de 24 horas.	57
Anexo N°8.	Aplicación de <i>Ralstonia solanacearum</i> en las unidades experimentales.	57
Anexo N° 9.	Sintomatología presente de la bacteria en las plantas.	58
Anexo N° 10.	Prueba de vaso para asegurar que la inoculación fue efectiva.	58
Anexo N°11.	Preparación y aplicación de los tratamientos en cada una de nuestras unidades experimentales.	59
Anexo N°12.	Evaluación de las unidades experimentales (DAC, altura, incidencia, severidad y mortalidad).	60
Anexo N°13.	Control químico de insectos y agentes patógenos mediante el sistema de riego.	60
Anexo N°14.	Visita del tribunal de tesis.	61

I. EVALUACIÓN DE AGENTES BIOLÓGICOS PARA EL CONTROL Y MITIGACIÓN DEL DAÑO OCASIONADO POR *Ralstonia solanacearum* EN EUCALIPTO TROPICAL A NIVEL DE VIVERO, EN LA HACIENDA LOS ANGELES, 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. Sin embargo, las plantaciones de eucalipto a nivel mundial se han perdido por agentes causales de enfermedades principalmente por hongos y bacterias, causando manchas foliares, chancro de fuste o ramas, muerte regresiva, marchitamiento vascular y roya (Pérez et al. 2010).

La enfermedad se presenta como marchitez repentina y flácida de las plantas, observándose necrosamiento en yemas, desintegración de los haces vasculares y frecuentemente en el tallo se aprecia hueco. Los frutos no llegan a desarrollarse o cuando están maduros se desprenden del pedúnculo con facilidad. La raíz se ve sana. Las siembras usualmente muestran color castaño a marrón cuando se observan desde una distancia mayor de 50 m (Delgado, 1999).

La marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*, es una devastadora enfermedad que afecta a varios cultivos de importancia económica a nivel mundial. La capacidad de supervivencia del patógeno y la ocurrencia de infecciones latentes hace que el diagnóstico tenga una importante función en la prevención de la enfermedad (Caruso, 2005).

Las afectaciones provocadas por este patógeno no solo radican en el hecho de que destruye los cultivos, también posee una excepcional habilidad para sobrevivir en el agua, el suelo y la rizosfera de plantas no hospedantes. Esto, sumado a la frecuente presencia de infecciones latentes, estableció la necesidad de conocer y contar con métodos sensibles y específicos para detectar la bacteria en dicho estado (Caruso, 2005).

La marchitez bacteriana constituye una seria amenaza para la agricultura por su extensa distribución en todas las islas del Caribe y el continente americano y la amplitud de hospedantes que posee. Adicionalmente, desde hace algunos años tiene lugar la

importación de semillas agrícolas y forestales procedentes de diferentes países. Esto conlleva un aumento del riesgo de introducción y establecimiento de la enfermedad, debido a que en el país existen las condiciones climáticas propicias para el desarrollo y supervivencia de *R. solanacearum*, resultando significativo que los servicios fitosanitarios conozcan y dispongan de las herramientas que permitan la detección de esta bacteria, con el fin de impedir la entrada de material infectado al país.

A. JUSTIFICACIÓN.

El presente trabajo se realizó con la finalidad de mitigar el daño ocasionado por: *Ralstonia solanacearum* y evitar la pérdida de plantaciones con alto valor económico, cubriendo así la demanda que existe en las empresas forestales del Ecuador y de otros países. Por lo tanto este ensayo se enfocó en uno de los graves problemas que asecha en grandes niveles a las plántulas producidas en el vivero de la empresa NOVOPAN DEL ECUADOR S.A. de la región Costa. Otorgando así la seguridad de producir plántulas sanas, ya sea mediante la clonación o semillas, con un excelente desarrollo y adaptación a las condiciones bioclimáticas del lugar para conseguir plantaciones de alta calidad dasométricas y fitosanitaria, y con esto evitar pérdidas económicas a la empresa.

B. OBJETIVOS.

1. Objetivo General

Evaluar los agentes biológicos para el control y mitigación del daño ocasionado por *Ralstonia solanacearum* en eucalipto tropical a nivel de vivero, en la hacienda Los Ángeles, Cantón Buena Fe, Provincia de Los Ríos.

2. Objetivos Específicos

- a. Valorar la incidencia de plantas tratadas con agentes biológicos aislados por el laboratorio Biogreen.
- b. Estimar la severidad de plantas tratadas con agentes biológicos aislados por el laboratorio Biogreen.
- c. Determinar la mortalidad de plantas tratadas con agentes biológicos aislados por el laboratorio Biogreen.

C. HIPOTESIS

1. Hipótesis nula

Ninguno de los agentes biológicos probados ayudará en el control de *Ralstonia solanacearum* en plantas de eucalipto tropical a nivel de vivero.

2. Hipótesis alternante

Al menos uno de los agentes biológicos ayudará en el control de *Ralstonia solanacearum* en plantas de eucalipto tropical a nivel de vivero.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A. EL EUCALIPTO

El género *Eucalyptus* Pertenece a la familia *Myrtaceae* y se compone de alrededor de 600 especies, sobre todo en las regiones tropicales y subtropicales. Esta especie es natural de Australia, Indonesia y las Islas cercanas, pero se ha introducido en diferentes regiones del mundo (CATIE, 1991).

Eucalyptus spp. Es el género de especies comerciales más ampliamente plantado en el mundo, con especies ampliamente conocidas como: *Eucalyptus grandis*, y sus híbridos, ampliamente plantado en América del Sur y África; *E. globulus*, plantado extensamente en Chile, Argentina y otros países, *E. deglupta* plantado en diferentes países, entre ellos Uruguay y Costa Rica. Todas las especies son plantadas tanto para la producción de madera para aserrío, tableros (compensados y aglomerados), astillas para la producción de pulpa para papel (CATIE, 1991).

1. Eucalipto tropical. (*Eucalyptus grandis*)

El *Eucalyptus grandis* se encuentra naturalmente entre 32 y 17° de Latitud Sur en la región costera de Queensland y en el Nuevo Gales del Sur (Australia), en un rango altitudinal desde 0 hasta 900 m, con precipitación media anual entre 1.000 y 1.780 mm, una estación seca de tres meses en promedio y temperatura máxima de 35°C y mínima de 5°C (Arango, 1999).

Se ha introducido en África, Asia, América del Sur y América Central. Gracias a su rápido crecimiento, productividad y adaptabilidad, ha permitido su introducción en sitios de una variada oferta ambiental como en el bosque seco tropical, bosque húmedo tropical, bosque húmedo pre-montano, bosque muy húmedo pre montano y bosque muy húmedo montano bajo (Arango, 1999).

En Colombia crece bien entre 1000 y 2000 m.s.n.m., y es una de las especies forestales más cultivadas en los departamentos del Cauca, Valle del Cauca, Caldas, Risaralda y Antioquia. Por su alta productividad es la especie preferida para la producción de pulpa de fibra corta. En el país se tienen plantaciones con fines comerciales en un área de 15984 hectáreas (Alves, 2002).

a. Morfología

Es un árbol que alcanza hasta 60 m de altura y 1,50 m de diámetro. La corteza es áspera y persistente desde la base hasta uno o dos metros de altura; es delgada, fibrosa o escamosa, tiene una tonalidad gris clara a marrón y se puede desprender en bandas alargadas. Inicialmente la corteza interna posee una tonalidad rosácea brillante y después es blanca o grisácea blanquecina (Alves, 2002).

Los árboles son de copa poco densa y amplia, y tienen porte columnar en plantaciones densas. El árbol como particularidad, produce un número indefinido de brotes y yemas desnudas (Alves, 2002).

b. Las hojas

Son alternas y horizontales o colgantes. En estado juvenil son opuestas por algunos pares, luego alternas, ovadas, de hasta 16 cm de largo y 8,5 cm de ancho, verdes a verdes oscuras. Las hojas adultas son alternas, lanceoladas a ampliamente lanceoladas, de hasta 15 cm de largo y 3 cm de ancho, verdes por el haz y verdes pálidas por el envés, penninervadas, densamente reticuladas (Alves, 2002).

c. Las flores

Son blancas y crecen en umbelas. Estas inflorescencias son axilares y simples, con siete flores; pedúnculos aplanados, de hasta 2,0 cm de longitud, yemas sésiles o cortamente pediceladas; los pedicelos con frecuencia son robustos y atenuados, de 0,8 a 0,5 cm y presentan una cicatriz (Farfán, 2005).

Las flores tienen cinco estambres flexados irregularmente, y fértiles; anteras versátiles, oblongas, que se abren por ranuras longitudinales. La mayoría de las umbelas originan de cinco a siete frutos hasta la madurez (Farfán, 2005).

Dos a tres semanas después de la floración los estambres y el estilo se marchita, se desprenden y dejan descubierto el fruto, que es una cápsula leñosa, cerrada, de forma cónica a ligeramente piriforme, con gran cantidad de semillas muy pequeñas, pedicelos cortos, en ocasiones sésiles, frecuentemente glaucos, de hasta 0,8 cm de largo por 0,6 cm de ancho, con frecuencia contraídos hacia el ápice, reborde delgado, disco no visible, dehiscente, con 4 a 5 valvas, anchas y curvadas hacia adentro. Cada cápsula contiene

entre 3 y 25 semillas sanas, con un promedio de 8 y una cantidad mucho mayor de óvulos no fértiles (Hodgson, 1976).

d. La madera

Es de color rojo claro, suave, liviana y moderadamente durable en contacto con el suelo. La densidad de la madera proveniente de plantaciones varía en promedio entre 0,4 y 0,59 g/cm³, pero este valor está influenciado por la edad y el sitio de la plantación. Así por ejemplo, a los tres años la densidad varía entre 0,32 y 0,44 g/cm³, a los cuatro años entre 0,44 y 0,47 g/cm³, a los seis años entre 0,46 y 0,54 g/cm³ (Lema, 1995).

Cuando la plantación supera los ocho años de edad, la densidad alcanza valores de 0,55 a 0,59 g/cm³. Esta madera es fácil de impregnar y trabajar, pero resulta difícil secarla. El crecimiento rápido y la capacidad de rebrote de esta especie le confieren gran potencial para la producción de madera para leña. El poder calorífico es de 18199 KJ/kg (Lema, 1995).

B. MARCHITEZ BACTERIANA (*Ralstonia solanacearum*)

1. Ralstonia solanacearum

La Marchitez bacteriana es una enfermedad mortal para muchas especies de plantas, más notoriamente de miembros de la familia de las Solanáceas a la cual pertenecen cultivos importantes en Honduras como el tomate, chiles, berenjena, papa y eucalipto. En la última década se ha incrementado alarmantemente la ocurrencia de Marchitez bacteriana en berenjena y tomate, y con menos frecuencia en Chile, provocando pérdidas cuantiosas en particular en el valle de Comayagua y en la zona occidental. La enfermedad es causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum* (antes *Pseudomonas solanacearum*) (Melgar 2012).

2. Distribución geográfica

Su distribución geográfica es mundial (CABI/EPPO, 1999) habiéndose obtenido registros de su presencia en: Europa Bélgica, Alemania, Hungría, Países Bajos, España, Islas Canarias, Reino Unido, Inglaterra, Líbano. Asia: Bangladesh, China, India, Indonesia, Irán, Japón, Nepal, Pakistán, Filipinas, Sri Lanka. África: Burundi, Egipto, Kenya, Libia, Reunión, África del Sur, Zambia, América del Sur: Argentina, Bolivia,

Brasil, Chile, Colombia, Perú, Uruguay. América Central y Caribe: Costa Rica, México. Oceanía: Australia, Nueva Guinea. América del Norte: México, USA (Obregón, 2009).

3. Historia de *Ralstonia solanacearum*

R. solanacearum a partir de 1972, se reconoció como un organismo cuarentenario para la Unión Europea, donde la incidencia de la pudrición castaña en papa produjo pérdidas importantes (Elphinstone, 1996; Janse, 1996). A partir de su detección, las medidas de manejo son muy severas prohibiéndose durante 4 años el cultivo de plantas hospederas, recomendándose la eliminación de malezas hospedantes y plantas voluntarias (Anonymous, 1998; 2006). Entre los más importantes se citan bananero (*Musa paradisiaca*); berenjena (*Solanum melongena*); papa (*Solanum tuberosum*); pimiento (*Capsicum annuum*); tabaco (*Nicotiana tabacum*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) (Gotuzzo, 1975), también plátano, jengibre, y algunas especies de árboles y arbustos de importancia económica (Hayward, 1991).

4. Como reconocer la enfermedad de *Ralstonia solanacearum*

La palabra “Marchitez” se utiliza para indicar que en la parte aérea de una planta ocurren síntomas de falta de agua, sin aclarar cuál es la causa. Además de Marchitez causada por *R. solanacearum*, en las Solanáceas ocurren otras tres enfermedades que provocan síntomas de Marchitez: la Marchitez por Fusarium causada por el hongo *Fusarium oxysporum*, la Marchitez sureña o Mal del esclerocio causada por el hongo *Sclerotium rolfsii*, y la Marchitez por pudrición de raíz y tallo causadas por especies del *Estramenópilo Phytophthora*. También el daño a las raíces por especies del nematodo agallador (*Meloidogyne spp.*) induce síntomas de Marchitez, aunque muy raramente provocando muerte de las plantas (Alfenas, 2006).

El combate de todas las enfermedades arriba mencionadas requiere de medidas específicas a la naturaleza del organismo que las causa; en consecuencia, sólo pueden combatirse efectivamente si se conoce la causa real de la Marchitez. Para una correcta identificación de cualquier enfermedad es importante conocer el tipo de síntomas y signos que presentan las plantas, cuando y como aparecen, y las circunstancias de su ocurrencia. Si fuese necesario, para la confirmación definitiva también se puede recurrir a clínicas especializadas en diagnóstico fitosanitario, el Departamento de Protección Vegetal de la FHIA. A continuación se describen aquellos síntomas, signos y

circunstancias de ocurrencia característicos de Marchitez bacteriana y que facilitan su reconocimiento en el campo (Alfenas, 20016).

5. Síntomas 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 (Alfenas, 2003).

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, 2003).

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 2003).

6. Marchitamiento vascular causado por bacterias

Etiología y sintomatología. El marchitamiento vascular bacteriano fue reportado por primera vez en Brasil en 1983, asociado a *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi (Sudo et al.1983). Esta especie es considerada una de las bacterias fitopatógenas más importantes del mundo debido a los grandes perjuicios económicos que causa, la dificultad de control, su amplia distribución geográfica, y al amplio rango de hospederos que posee (Palladino et al., 2013).

Este patógeno provoca síntomas muy similares a *R. solanacearum*, lo que resulta imposible diferenciar a campo (Arriel et al.2014). El síntoma típico de la enfermedad es un marchitamiento generalizado de la planta, que comienza desde arriba hacia abajo. Las hojas presentan lesiones medianas a grandes, irregulares, oscuras, pudiéndose tornar a marrón claras en los bordes de las hojas. Esta enfermedad puede provocar coloración oscura en la madera. Las plantas más propensas a la enfermedad son aquellas con sistema radicular malformado, con heridas en el tronco o base del tallo. La enfermedad ha sido observada tanto en vivero como en el campo (Palladino et al., 2013).

7. Ciclo de vida del patógeno y epifitología de la enfermedad

Cuando esta bacteria se instala en una región, las posibilidades de diseminación son múltiples (a través de suelo infectado, aguas, labores culturales, restos vegetales, plantas reservorio, etc.). En el suelo, *R. solanacearum* es capaz de soportar un período de cuatro años con la capacidad de producir marchitez bacteriana en hospedantes susceptibles y sobrevivir el mismo tiempo bajo condiciones de oligotrofia (escasez de nutrientes) y en presencia de bajas temperaturas en microcosmos acuáticos (Fegan, 2009).

Está descrito que la bacteria es atraída quimio-tácticamente (movimiento estimulado por sustancias químicas) hacia sus hospedantes por diversos aminoácidos, ácidos orgánicos y especialmente por exudados de la raíz y que la concentración de oxígeno dentro de las células del hospedante también cumple importante función en la localización de la planta por parte del patógeno. Posteriormente, la penetración a la planta ocurre, generalmente, por la raíz, a través de heridas o en puntos de emergencia de pelos radicales o raíces laterales (se ha comprobado que también puede penetrar por las hojas a través de los estomas) (Fegan, 2009).

Una vez en el interior de su hospedante, la bacteria pasa una primera fase en el córtex y posteriormente invade los haces conductores del xilema, donde se multiplica hasta causar el marchitamiento y/o la muerte de la planta. Posteriormente, la bacteria se libera de su hospedante hacia el suelo, el agua o restos vegetales donde puede sobrevivir hasta encontrar una nueva planta susceptible o reservorio (Fegan, 2009).

Las infecciones latentes son de gran importancia para la diseminación del patógeno, por lo que también fueron muy bien documentadas. La capacidad de la bacteria de

permanecer en material vegetal sin la manifestación de síntomas ha sido la principal vía de diseminación a largas distancias y la causa de brotes acontecidos en la Unión Europea a través de tubérculos de papa contaminados y en plantas ornamentales en Estados Unidos. Otros estudios sugirieron que *R. solanacearum* puede prevalecer en la región del Caribe en forma latente en plantas del género *Musa* spp. De aquí la importancia de contar con métodos lo suficientemente sensibles para detectar la bacteria en dicho estado y limitar la diseminación de tan devastadora enfermedad (Fegan, 2009).

8. Susceptibilidad de *Eucalyptus*

Las especies de eucalipto difieren en su susceptibilidad a la infección por especies de *Ralstonia* sp. Por ejemplo, Old et al. (2003) consideraron a *Eucalyptus pellita* y *E. urophylla* como una de las especies más susceptibles. Sin embargo, esto probablemente esté relacionado con el hecho de que estas dos especies se siembran más comúnmente en los trópicos y subtrópicos, donde las especies de *Ralstonia* sp están mejor adaptadas para infectar a estas plantas. La variación en la susceptibilidad en clones propagados vegetativamente de híbridos interespecíficos es bien conocida. En los últimos 50 años, la mayor parte de la investigación sobre esta enfermedad en *Eucalyptus* se ha centrado en la detección de material resistente / tolerante (Gan et al., 2004; Li et al., 2007; Wang et al., 2011; Marques et al., 2013; Fonseca et al., 2016). Identificar este material y desplegarlo en plantaciones es una solución obvia para controlar la marchitez bacteriana. Sin embargo, el proceso de selección está plagado de dificultades (Coutinho & Wingfield, 2002).

9. Factores de estrés asociados con la infección

A diferencia de la situación en la planta herbácea, los factores de estrés parecen ser importantes en la predisposición de árboles de eucalipto a la infección por *R. solanacearum* y *R. pseudosolanacearum*. Estos factores incluyen sistemas de raíz malformados (j-rooting) como resultado de malas prácticas de siembra, despliegue de plantas de vivero demasiado grandes, problemas fisiológicos, por ejemplo, deficiencia de boro (Bernard y Xu, 2006), lesiones en el cuello de la raíz causada por temperaturas excesivas (Mariano et al., 2013) y daños por tifones (Rodas, 2003).

No está claro si estos factores de estrés simplemente permiten la entrada de bacterias a las plantas a través de la creación de heridas, o si debilitan los sistemas de defensa del huésped

permitiendo que estos patógenos ya presentes en los tejidos de las plantas colonicen el tejido interno del huésped (Rodas, 2003).

Las observaciones durante muchos años han demostrado que uno de los factores más comunes asociados con la marchitez bacteriana en *Eucalyptus* es el anudado de la raíz. Este es un personaje que puede asociarse con clones particulares que no desarrollan sistemas de raíz efectivos, que está determinado genéticamente. Sin embargo, también puede manifestarse cuando los clones se plantan en suelos muy compactos o densos. El resultado en ambos casos es que los árboles están bajo estrés extremo. Tienden a crecer activamente durante aproximadamente 6 meses después de los cuales mueren. Brotes epicórmicos también se desarrollarán en la base de los árboles infectados. Por lo tanto, es común ver un gran número de árboles que parecen morir muy rápidamente (Rodas, 2003).

En este caso, han llegado claramente a un punto donde los sistemas de raíces anudadas no pueden sostener las partes superiores de los árboles; una condición en la que las especies de *Ralstonia* sp pueden multiplicar rápidamente los sistemas de xilema. En este sentido, se sabe que el estrés hídrico, debido a un sistema vascular bloqueado, conduce a la producción excesiva de compuestos de defensa (pectinas y tilos) que reduce la resistencia del huésped a la infección (Rodas, 2003).

La presencia de otros patógenos también puede provocar estrés en la planta. Por ejemplo, un patógeno importante de las especies de eucalipto en el sudeste asiático es *Ganoderma philippii* (Coetzee et al., 2011). Las raíces con infecciones avanzadas causadas por este hongo patógeno suelen ser coinfectadas con *R. pseudosolanacearum*, que ilustra la naturaleza oportunista de las especies de *Ralstonia*. El estrés puesto en el árbol por el patógeno primario (*G. philippii*) podría resultar en la invasión oportunista de esta especie bacteriana. Curiosamente, cuando los aislamientos se realizan a partir del exudado producido en árboles infectados con especies de *Ralstonia*, otras especies bacterianas son comúnmente aisladas (Coutinho, 2011).

Los hongos rara vez se aíslan, incluso si se utilizan medios de aislamiento generales. Los géneros bacterianos comúnmente aislados incluyen *Ralstonia* (bacteria más abundante), *Clostridium*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Pseudomonas* (Carstensen, inédito) Con la excepción de *Bacillus* (Paz et al., 2012), no se ha informado de ninguno de los otros géneros ocurrir en especies de eucalipto sanas como endófitos. Sin embargo, los cinco géneros se han aislado por separado y juntos de numerosas especies arbóreas con síntomas

de mojado o de flujo de baba (Sinclair y Lyon, 2005). No ha habido informes de esta "enfermedad" en *Eucalyptus*. Sin embargo, en etapas avanzadas de infección por especies de *Ralstonia*, la madera está decolorada y tiene una apariencia "húmeda" (Coutinho, 2011).

10. Marchitez y muerte por *Ralstonia solanacearum*

La Marchitez es el primer síntoma externo visible, expresado en el follaje y tallos jóvenes, que inicialmente da la alarma del problema. Se manifiesta repentinamente, en hortalizas tan breve como 2-3 días después de la infección si la planta es altamente susceptible y las condiciones ambientales son favorables; puede observarse en toda la planta o en solamente pocas ramas de un lado de la planta, más notoriamente en las horas más calientes del día. Típicamente las hojas cuelgan flácidas, se enrollan hacia la cara superior en los márgenes y carecen de brillo y turgencia; sin embargo, característicamente conservan su color verde y permanecen temporalmente adheridas a la planta, aunque eventualmente se desprenderán (Melgar 2012).

Puede ocurrir recuperación transitoria aparente de la planta durante la noche y las horas tempranas del día siguiente, pero al transcurrir el nuevo día aparece nuevamente la Marchitez. Lo que ocurre es que la bacteria se multiplica en el sistema de conductos internos de la planta por el cual fluye hacia arriba el agua extraída del suelo por la raíces, provocando la obstrucción a dicho flujo y matando la planta por falta de agua (Melgar 2012).

10.1. Decoloración vascular

Una vez se presentan síntomas externos claros de Marchitez frecuentemente también ocurre internamente decoloración color café claro a oscuro del sistema de vasos conductores de agua ubicados en la periferia del tallo y de las raíces de la planta en la proximidad de la línea del suelo. Este síntoma es más evidente en la base del tallo, en el tejido ubicado entre la corteza y la madera; ocasionalmente también puede ocurrir ablandamiento de dicho tejido. Una decoloración parecida del sistema vascular también puede ocurrir en plantas afectadas por Marchitez por *Fusarium* o Marchitez por *Phytophthora*, por lo cual hay que tomar en cuenta otros elementos para un diagnóstico seguro (Melgar 2012).

10.2. Flujo bacteriano de *R. solanacearum*

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 utilizada como un método simple de diagnóstico confirmativo de ocurrencia de Marchitez bacteriana mediante la “prueba del vaso”. Para ello se sumerge ligeramente el extremo inferior de la sección de tallo en agua limpia dentro de un vaso u otro recipiente transparente. Si transcurridos unos pocos minutos se observa en el agua que del corte en el tallo fluyen hilos o bien nubes lechosas, ello es otra prueba de ocurrencia de Marchitez bacteriana (Melgar, 2012).

10.3. Raíces aéreas

En plantas afectadas puede ocurrir la presencia anormal en la base del tallo de raíces aéreas visibles, llamadas raíces adventicias (Melgar, 2012).

10.4. Circunstancias y distribución de plantas enfermas

Plantas de cualquier edad pueden ser infectadas y manifestar la enfermedad, aunque aquellas de edad mediana a adulta muestran la mayor incidencia y severidad, en particular cuando ocurren temperaturas moderadas a altas y alta humedad del suelo. Es frecuente que las plantas enfermas inicialmente ocurran en pequeños focos (pocas plantas) ubicados en las áreas más bajas del terreno (donde se acumula agua) y los cuales rápidamente aumentan de tamaño, aunque también pueden ocurrir plantas individuales enfermas dispersas en el campo. Cuando el riego es por gravedad no es raro encontrar varias plantas atacadas a lo largo de un mismo surco o en surcos contiguos como resultado de la dispersión de inóculo bacteriano en el agua a partir de un punto o foco de infección surco arriba (Melgar, 2012).

C. AGENTE CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD

El patógeno causante de la enfermedad, la bacteria *R. solanacearum*, es realmente un conjunto de razas o cepas que comparten suficientes características morfológicas, genéticas, bioquímicas y patogénicas para considerarlas una misma especie. No obstante, dichas cepas poseen algunas características distintivas que las diferencian entre sí, de las

cuales en la práctica la más importante es la habilidad para infectar distintas especies de plantas. Basado en lo anterior históricamente se ha reconocido la existencia de por lo menos tres razas, a saber:

Raza 1. Esta raza tiene un amplio rango de plantas hospederas y es usualmente conocida como la raza de las Solanáceas puesto que este es el grupo más importante de plantas cultivadas que ataca (exceptuando a la papa); también ataca jengibre, cacahuate, etc.

Raza 2. Ocurre en plantas de la familia de las Musáceas, a la cual pertenecen el banano, plátano y moroca, causándoles la enfermedad llamada “Moko”.

Raza 3. Es la raza que preferencialmente ataca a la papa y al geranio.

Recientemente se han identificado dos razas adicionales, denominadas.

Raza 4 que se reportó en Asia y Hawai atacando también a jengibre.

Raza 5 reportada solamente en China atacando una especie de mora. Este sistema de razas se ha vuelto menos práctico a medida que se descubren nuevas especies de plantas que la bacteria es capaz de infectar y nuevas cepas de la bacteria, lo cual ha dado lugar a una nueva clasificación en cinco distintos biovares o cepas basados en la habilidad de los aislados bacterianos de utilizar ciertos alcoholes y azúcares complejos (Melgar, 2012)

Estos biovares también muestran variación en la agresividad a una misma especie de plantas, algunas de ellas siendo altamente agresivas bajo ciertas condiciones aún en plantas que supuestamente tienen resistencia. Uno de estos biovares en particular, identificado como Raza 3/Biovar 2, parece ser extremadamente agresivo y ha sido declarado de importancia cuarentenaria en Norte América y Europa (Melgar, 2012)

Actualmente en países desarrollados se acostumbra realizar la identificación de aislados de la bacteria hasta raza y biovar. Desafortunadamente, en la actualidad en la FHIA no se cuenta con los recursos logísticos para dicho detalle y la identificación se hace solamente hasta género y especie (Melgar, 2012).

D. DONDE OCURRE, COMO SE DISEMINA Y PENETRA *Ralstonia solanacearum*

1. Hábitat en la que se encuentra la bacteria

R. solanacearum es un habitante natural del suelo, donde en ausencia de cultivos susceptibles puede sobrevivir por períodos prolongados (meses o inclusive años) en los residuos de cultivos previos infectados, o bien sobre o dentro de las raíces de malezas u otras plantas cultivadas en las cuales no provoca daño aparente (Rivera, 2012).

2. Formas de propagación

La diseminación de la bacteria hacia y dentro de los campos de cultivo puede ocurrir por una variedad de medios. El suelo infestado es usualmente la principal fuente de inóculo primario de la bacteria, la cual puede ocurrir naturalmente aún en terrenos nunca antes utilizados para cultivo alguno (de Solanáceas o de otras especies de importancia económica). Además, también ocurre liberación masiva de bacterias al suelo desde las raíces de plantas infectadas en el semillero o bien infectadas en el campo definitivo (Rivera, 2012).

A partir de las fuentes originales de inóculo, la bacteria se disemina; a) en el agua de riego o drenaje, b) en partículas o masas íntegras de suelo contaminadas adheridas a herramientas, o equipos de cultivo (azadones, podadoras, cuchillas, arados, etc.) y al calzado, c) en plántulas para trasplante infectadas en el semillero, etc. Se considera que dentro de un campo donde ocurren los primeros casos el medio más importante de diseminación secundaria es el agua de riego contaminada que fluye de las plantas infectadas a plantas sanas. La transmisión por semilla verdadera no es usualmente considerada de importancia en hortalizas. La excepción a lo anterior la constituye el cultivo de la papa, en el cual los tubérculos-semilla pueden ser el principal medio de diseminación de la bacteria si provienen de plantas atacadas o llevan suelo infestado (Rivera, 2012).

E. PRODUCTOS COMERCIALES PARA EL CONTROL DE *R. solanacearum*

1. BIO-PROT.

Composición: Mezcla de soluciones muy concentradas de varias cepas vivas de Bacilos sp. La solución contiene estabilizadores y micro partículas de almidones con nutrientes para que nuevas colonias se formen rápidamente y hagan su efecto cortamente luego de su aplicación.

Beneficios del producto: El producto es de acción rápida por su formulación, a pesar de ser orgánico, imprimiendo beneficios en las plantas muy rápidamente. Por consistir de cepas vivas permite una protección de largo plazo (Biogreen, 2010).

Su aspersión no necesita llegar a todos los lugares de las plantas, lo cual presenta una gran ventaja, ya que poco a poco puebla un sector. El producto actúa por exclusión ya que 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. Al ser compuesto por bacterias es resistente a la gran mayoría de fungicidas utilizados. Esto es muy ventajoso ya que permite la aplicación conjunta con estos productos (Biogreen, 2010).

Es un excelente Bioremediador, siendo capaz de metabolizar y cortar moléculas grandes y complejas. Descompone muy eficientemente material orgánico crudo, resultando en materia descompuesta muy rápidamente colonizada por benéficos. Esta mezcla es absorbida plenamente por las plantas en un periodo mucho menor al que tomaría una descomposición sin este producto. Su composición líquida ayuda substancialmente en su manejo potenciando su aplicación, evitando el taponamiento de boquillas y facilitando su mezcla homogénea y rápida (Biogreen, 2010).

Indicado para: Descomposición acelerada de la materia orgánica cruda. Infestaciones bacterianas de erwinia spp. Previene y protege de Rhizoctonia, Phytophthora, Pythium entre otras enfermedades del suelo. Para otras como la sigatoka es excluyentes. (Biogreen, 2010).

Modo de empleo: El producto disuelto puede aplicarse directamente al follaje por aspersión, además en viveros y campo 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).

Compatibilidad: Con la mayoría de los insecticidas, fungicidas, herbicidas, foliares que se recomiendan en los cultivos. No compatible con bactericidas, bacteriostáticos 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 acida, neutra o ligeramente básica. Además es compatible con aceite agrícola (Biogreen, 2010).

2. **BIO-FUNG**

El producto es de acción rápida por su formulación, a pesar de ser orgánico, imprimiendo beneficios en las plantas muy rápidamente. Por consistir de cepas vivas y esporas encapsuladas permite una protección de largo plazo, teniendo que aplicar nuevamente cuando la población de hongos y bacterias patógenas vuelva a amenazar el cultivo. Su composición permite una translocación a distintos sitios próximos de las plantas, protegiendo sectores enteros. Su aspersion no necesita llegar a todos los lugares de las plantas, lo cual presenta una gran ventaja, ya que poco a poco puebla un sector. (Biogreen, 2010).

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. Por ende la protección es de largo plazo. El producto a nivel radicular produce un efecto muy similar al de las micorrizas, potencializando ampliamente la absorción de elementos esenciales, formando virtualmente una red amplia postiza de raíces. (Biogreen, 2010).

Indicado para: Diversos patógenos como Sigatoka en banano y plátano, monilla en cacao, actúa en patógenos del suelo, en cultivos, semilleros. Fusarium, Rhizoctonia, Pythium, Phytophthora. Protectante y erradicante de hongos y bacterias de amplio espectro. Bioremediador de solución muy concentrada de esporas y células vivas de varias cepas de Trichoderma. (Biogreen, 2010).

Composición: Mezcla de soluciones muy concentradas de varias cepas vivas y esporas de Trichoderma sp. La solución contiene estabilizadores y micro partículas de almidones con nutrientes para que nuevas colonias se formen rápidamente y hagan su efecto cortamente luego de su aplicación (Biogreen, 2010).

Modo de empleo: El producto disuelto puede aplicarse directamente al follaje por aspersion, además en viveros y campo puede ser utilizado en drench. Puede ser aplicado por avioneta, bomba de motor, bomba de mochila, aspersion. Importante es agitar antes de mezclar para aplicar (Biogreen, 2010).

Compatibilidad: Con la mayoría de los insecticidas que se recomiendan en los cultivos. No compatible con fungicidas o bactericidas 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 acida, neutra o ligeramente básica. Además es compatible con aceite agrícola (Biogreen, 2010).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

A. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR

1. Localización de estudio

La investigación se ejecutó en la parroquia La Invasión, en las instalaciones de la hacienda “Los Ángeles” perteneciente a la empresa NOVOPAN DEL ECUADOR S.A, en la provincia de Los Ríos con una extensión de 300ha.



Fuente (Novopan S.A. 2017)

Figura 1. Mapa de ubicación de la hacienda y vivero “Los Ángeles” parroquia La Inmaculada.

2. Ubicación geográfica

Lugar: Parroquia La Invasión.

Zona: 17 sur

Datum: WGS84

Latitud (X): 665637

Longitud (Y): 9928202

Altitud: 146 m.s.n.m.

Fuente: (Estación meteorológica NOVOPAN S.A.)

3. Condiciones climáticas.

Temperatura media anual: 23 - 35°C

Precipitación media anual: 2265 mm

Humedad relativa anual: 76%

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

4. 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

- 1 par de botas de caucho.
- 1 par de guantes de caucho.
- 4 mascarillas.
- 2 botellas plásticas de 6 litros.
- 1 litro de desinfectante.
- 4 atomizadores.
- 1 libreta de campo.
- 1 par de esfero.
- 1 lápiz.
- 1 escalimetro.
- 1 calibrador pie de rey.
- 1 tablero plástico.
- 39 etiquetas plásticas.
- 20 bandejas.
- 6 bancales.

2. Equipos

- Computadora.
- Paquete office (Word, Excel, Power point).
- Cámara fotográfica.
- Programas (Infostat y Minitab).
- Calculadora.
- GPS.

3. Componentes químicos y biológicos.

- Bioprot.
- Biofung.
- Solución de nutrientes (Nitrógeno, Fosforo, Potasio, Boro)
- Evergreen.
- Tachigaren
- Vitavax.
- Alcohol industrial.

4. Material vegetativo.

180 plántulas de *Eucalyptus urograndis*

C. DISEÑO EXPERIMENTAL

1. Diseño experimental de la investigación

Se utilizó el Diseño Completo al Azar (DCA), aplicando 12 tratamientos y 3 repeticiones dándonos un total de 36 casos.

2. Características del diseño experimental

Las características del diseño experimental se detallan en la siguiente tabla 1.

Tabla N° 1. Características del diseño experimental

Número de especies	1
Número de tratamientos	12
Número de repeticiones	3
Número de unidades experimentales	36
Número de plantas/ unidad experimental	5
Número de plantas por tratamiento:	15
Total de plantas :	180
Área del campo de estudio:	307 ha
Área total en estudio	50 m ²

Elaborado por: (Llumiguano, R. 2018)

D. METODOLOGÍA.

1. Para el cumplimiento del primer objetivo: Valoración de la incidencia de plantas tratadas con agentes biológicos aislados en el laboratorio.

- a) Se georreferenció el área de estudio mediante la ayuda de un GPS (Garmin GPSMAP64S), en donde se delimito el área del vivero y las parcelas de recolección de muestras.
- b) Para la adecuación del área de estudio donde se ubicaron las unidades experimentales, se desinfectó el lugar para conseguir un sitio totalmente libre de patógenos. Para este proceso se utilizó vitavax y alcohol industrial a 20 ml por bomba.
- c) Los bancales fueron ubicadas a 1 metro de distancia entre estos, para un mejor manejo del ensayo, principalmente para las aplicaciones de fertilización y los productos de los respectivos tratamientos.
- d) Las bandejas se ubicaron a 50 cm de separación entre cada una, y a 20 cm por planta para evitar la incidencia entre productos y no haya alteración en la reacción de las plántulas en relación a cada producto.



Fotografía 1. Establecimiento de las unidades experimentales. (Bancal).

- e) Una vez establecido el ensayo, se procedió a comprobar si las unidades experimentales estaban contaminadas de *Ralstonia solanacearum*. Para lo cual se aplicó la prueba del vaso, se tomó una planta al azar, este proceso permitió asegurar si la población estaba libre de esta bacteria y poder realizar la inoculación con un grado de confianza al 100%.
- f) Para la prueba del vaso se realizó un corte en la zona inferior del tallo de las plantas, las mismas que tenían una edad de 45 día de germinación, fueron colocadas la misma en un vaso con agua destilada; al sumergir la plántula se observó si existía una sustancia de color rosado a blanquecino, que permitiría determinar si la bacteria se hallaba en la planta.
- g) Durante la primera evaluación cada una de las unidades experimentales tenían una edad de 65 días de germinación en la cual se evaluó también las variables de DAC y altura respectivamente.
- h) Una vez comprobado la prevalencia de la enfermedad en las unidades detalladas anteriormente se procedió a la extracción de la enfermedad para la inoculación de la bacteria en todo el ensayo.
- i) Para la extracción de la bacteria se realizó un recorrido por todas las plantaciones de la hacienda San Fernando ubicado en la provincia de los Ríos, para analizar individuos que presentaran los efectos y síntomas de la bacteria para proceder a la recolección de las diferentes muestras.



Fotografía 2. Recolección de muestras infectadas con *Ralstonia solanacearum*

- j) Una vez identificados los síntomas en diversos individuos, se procedió a extraer el fluido bacteriano de cada una de las muestras de los individuos identificados. Luego se colocó las muestras en agua destilada para el aislamiento de la bacteria, este método se lo realizó según lo aplicado por Rivera en 2012 en la especie de tomate riñón; continuamente se realizó la alteración del metabolismo de disacáridos y alcoholes hexosa de la bacteria mediante la elaboración del jugo fitopatológico con el agua contaminada y muestras foliares infectadas, esta técnica es una excelente estrategia para asegurar la obtención de la enfermedad según (Hayward, 1964) realizado en los estudios de detección de *Ralstonia solanacearum* en tubérculos en México.
- k) La destilación del jugo bacteriano fue un proceso fundamental para aislar y extraer la bacteria en dosis más concentradas y asegurar la inoculación en todas las unidades experimentales.



Fotografía 3. Extracción del jugo bacteriano de *Ralstonia solanacearum*

- l) Con un dosímetro de 20 ml se aplicó 15 ml de jugo bacteriano a cada unidad experimental. La inoculación fue a nivel de sustrato, puesto que este patógeno se desarrolla de mejor manera en condiciones edafológicas y su infestación inicia principalmente en el sistema radicular.
- m) Mientras se esperaba la manifestación de la sintomatología de la enfermedad (15 días) se realizó las respectivas fertilizaciones (cada 4 días), riegos (cada día) y control fitopatológico (1 día/semana), con el objetivo de evitar desfases en el desarrollo de las plántulas y continuar con la recolección de información para las variables planteadas en los otros objetivos. Las fertilizaciones se detallan en las tablas N° 2 y 3.

a. Para crecimiento de las plantas mediante fertilización.

Durante el ensayo se empleó macro y micro nutrientes para el crecimiento y desarrollo de las plantas evitando así el debilitamiento y muerte de las plantas por estrés hídrico o a causa de *Ralstonia solanacearum*.

Tabla N° 2. Control químico de nutrientes durante el tiempo de trabajo.

Aditivo químico	Dosis Químico (soluto)	Dosis- agua (Solvente)	Capacidad de bomba de riego	Dosis soluto-solvente	Control
Macro y Micronutrientes	2,5 cc	2000 MI	2000 mL	5 cc/2000 mL	Potencialización histológica de las plantas durante el crecimiento

Elaborado por: (Llumiguano, R. 2018)

b. Para el control fitopatológico.

El apareamiento de patógenos en el sustrato fue controlado mediante la aplicación de Tachigaren 36% LS una vez por semana durante un mes.

Tabla N° 3. Control fitopatológico a nivel de sustrato en las plantas.

Aditivo químico	Dosis Químico (soluto)	Dosis- agua (Solvente)	Capacidad de bomba de riego	Dosis soluto-solvente	Control
Tachigaren 36% LS	2,5 cc	2000 MI	2000 mL	5 cc/2000 mL	Protección de hongos que se presentaron en el sustrato.

Elaborado por: (Llumiguano, R. 2018)

c. Para el fortalecimiento de las plantas.

Durante el tiempo del presente trabajo, cada una de las unidades experimentales se empleó nitrato de calcio y evergren en una concentración de 2,5 cc con el objetivo de brindar fortalecimiento y vigorosidad durante el crecimiento de cada una de las plántulas, otorgando así las mismas condiciones manejadas a nivel del vivero.

Tabla N°4. Control químico durante el crecimiento de las plantas.

Aditivo químico	Dosis Químico (soluto)	Dosis- agua (Solvente)	Capacidad de bomba de riego	Dosis soluto-solvente	Control
Nitrato de calcio	2,5 cc				Fortalecimiento durante el crecimiento de las plantas.
Evergreen	2,5 cc				Vigorosidad y brillo de las hojas.

Elaborado por: (Llumiguano, R. 2018)

- n) Transcurrido los 15 días de tiempo promedio para la manifestación de la bacteria en las plántulas se procedió a un nuevo análisis de fitosanidad mediante la prueba del vaso, mismo que consistió en realizar el mismo proceso para comprobar la existencia de la bacteria en el material del ensayo al iniciarse la investigación. Para este proceso se tomó un individuo al azar de cada repetición y realizando el correspondiente corte

en el tallo se introdujo cada muestra en el vaso con agua destilada, donde se obtuvo como resultado final que la bacteria si se propago en las plántulas inoculadas (resultado positivo).

- o) Luego de las pruebas realizadas, se evaluaron Bioprot y Biofung, productos biológicos producidos por “Biogreen, Laboratorio Meristemático, Ecuador” con los respectivos tratamientos establecidos en el diseño experimental, para lo cual se hizo referencia en la siguiente plantilla que se detalla a continuación.

Tabla N° 5. Distribución de tratamientos según el diseño experimental.

N° de Repetición	Producto	Dosis	Frecuencia de aplicación
T1	Bioprot	15cc/L	1/día
T2	Bioprot	15cc/L	1/semana
T3	Bioprot	15cc/L	1/15 días
T4	Bioprot	15cc/L	1/mes
T5	Biofung	15cc/L	1/día
T6	Biofung	15cc/L	1/semana
T7	Biofung	15cc/L	1/15 días
T8	Biofung	15cc/L	1/mes
T9	Biofung+Bioprot	7,5cc+7,5cc =15cc/L	1/día
T10	Biofung+Bioprot	7,5cc+7,5cc =15cc/L	1/semana
T11	Biofung+Bioprot	7,5cc+7,5cc =15cc/L	1/15 días
T12	Biofung+Bioprot	7,5cc+7,5cc =15cc/L	1/mes

Elaborado por: (Llumiguano, R. 2018)

- p) El levantamiento de datos de la incidencia se lo realizo cada 8 días, luego de la aplicación de los respectivos tratamientos. Para la evaluación de la variable “incidencia” se tomó en cuenta el número de hojas enfermas, ya que este es uno de los síntomas principales de *Ralstonia solanacearum*. Tomando en cuenta el avance de la enfermedad por cada unidad experimental.
- q) Al finalizar la evaluación de cada una de nuestras variables nuestras unidades experimentales tenían una edad de 95 días.
- r) Una vez terminadas las evaluaciones se elaboró la plantilla final de datos obtenidos en la evaluación, para su respectiva tabulación y análisis estadístico, para lo cual se

ejecutó pruebas de normalidad según Shapiro Wilks en Infostat y homogeneidad en el programa Minitab. En el caso de la incidencia se aplicó estadística no paramétrica según Kruskal-Wallis, tanto de la primera y última evaluación para determinar el grado de incidencia inicial y final.

2. Para el cumplimiento del segundo objetivo: Estimación de la severidad de plantas tratadas con agentes biológicos aislados por el laboratorio Biogreen.

- a) La evaluación de la severidad de esta bacteria se basó principalmente en el área necrosada o enferma de la planta.
- b) El levantamiento de datos que se hizo bajo estimación visual del marchitamiento gradual de las plantas, para esto se tomó en cuenta el nivel de necrosamiento en las plantas, como el tallo y hojas de cada una de las diferentes unidades experimentales evaluándolo en porcentaje de 1 a 100% dependiendo el grado de afectación.
- c) La información levantada fue ajustada con el factor de Bilz para poder aplicar una estadística paramétrica y poder normalizar el coeficiente de variación, con esta transformación ya no fue necesario realizar pruebas de normalidad y homogeneidad, puesto que al aplicar estas operaciones los datos quedan totalmente normalizados y aptos para el respectivo análisis estadístico.
- d) Se realizó el respectivo ANOVA para esta variable y dependiendo del resultado que este arrojaría se procedería a la separación de medias de Tukey al 5% en caso de ser necesario al igual que el análisis gráfico utilizando cajas estadísticas con su respectiva discusión.

3. Para el cumplimiento del tercer objetivo: Determinación de la mortalidad de plantas tratadas con agentes biológicos (Bioprot y Biofung).

- a) Para la evaluación de la variable de la mortalidad se tuvo que esperar el final de la aplicación de los todos tratamientos empleados en la presente investigación, para lo cual se evaluó cada uno de los individuos y así observar las respuestas positivas o negativas de los tratamientos.
- b) Para afianzar la mortalidad de los individuos se evaluó básicamente el grado de hidratación y marchitez de la masa foliar por planta, pues una baja cantidad de hojas conduce a la mortalidad. El número de yemas y rebrotes secos y marchitos fue otro

factor que se tomó en cuenta pues el no generar nuevas hojas y ramificaciones afecta al proceso fotosintético lo cual genera el descenso de la planta. Además fue indispensable analizar el estado fisiológico de los tallos, el avance de la bacteria es notable en estas estructuras por su amarillamiento y deshidratación impidiendo el transporte de la sabia bruta y circulación de la sabia elaborada.

- c) Una vez finalizada la evaluación de esta variable se procedió a realizar las respectivas pruebas de normalidad y homogeneidad, para la normalidad se aplicó Shapiro Wilks y la homogeneidad utilizando minitab con la finalidad de determinar la estadística a utilizarse. En este caso se aplicó estadística no paramétrica, pues el resultado de estas pruebas para esta variable fueron de no ser normal ni homogéneo.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. VALORACIÓN DE LA INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD EN LAS PLANTAS TRATADAS CON AGENTES BIOLÓGICOS (Bioprot y Biofung)

1. Análisis estadístico de la incidencia de la enfermedad en las plantas por tratamiento/ repetición (fase inicial – 65 días de edad de las plantas) según Kruskal Wallis

Tabla N° 6. Anova de incidencia de la enfermedad según Kruskal Wallis

Tratamiento	N	D.E	Medianas	H	p
Bioprot/1/día	12	2,43	5,00	22,38	0,0184
Bioprot/1/semana	12	2,08	4,50		
Bioprot/1/15 días	12	1,83	5,00		
Bioprot/1/mes	12	1,56	5,00		
Biofung/1/día	12	1,99	4,50		
Biofung/1/semana	12	1,54	4,50		
Biofung/1/15 días	12	1,40	5,00		
Biofung/1/mes	12	1,61	6,00		
Biofung+Bioprot1/día	12	2,04	5,00		
Biofung+Bioprot1/semana	12	1,97	7,00		
Biofung+Bioprot1/ 15 días	12	1,59	6,00		
Biofung+Bioprot1/mes	12	1,76	2,50		

Elaborado por: (Llumiguano, R. 2018)

Según el análisis estadístico de la tabla N° 6, para el número de hojas enfermas en base a los 12 tratamientos aplicados a los 65 días de edad de las plántulas, se obtuvo un p-valor de 0,0184, determinando una diferencia significativa entre tratamientos, por ende se realizó el respectivo análisis de las medias aritméticas de cada tratamiento.

1.1. Separación de medias de la incidencia de la enfermedad en la fase inicial.

Tabla N° 7. Ranking de los tratamientos aplicados según Kruskal Wallis

Tratamientos.	Medias		
Biofung+Bioprot1/mes	34,42	A	
Biofung/1/semana	56,67	A	B
Biofung/1/día	57,63	A	B
Bioprot/1/día	64,21	A	B
Biofung+Bioprot1/día	73,54		B C
Bioprot/1/mes	73,79	B	C
Biofung/1/15días	75,96	B	C
Biofung+Bioprote1/15días	77,50	B	C
Bioprot/1/semana	78,59	B	C
Bioprot/1/15 días	82,79	B	C
Biofung/1/mes	88,58	B	C
Biofung+Bioprot1/semana	90,88		C

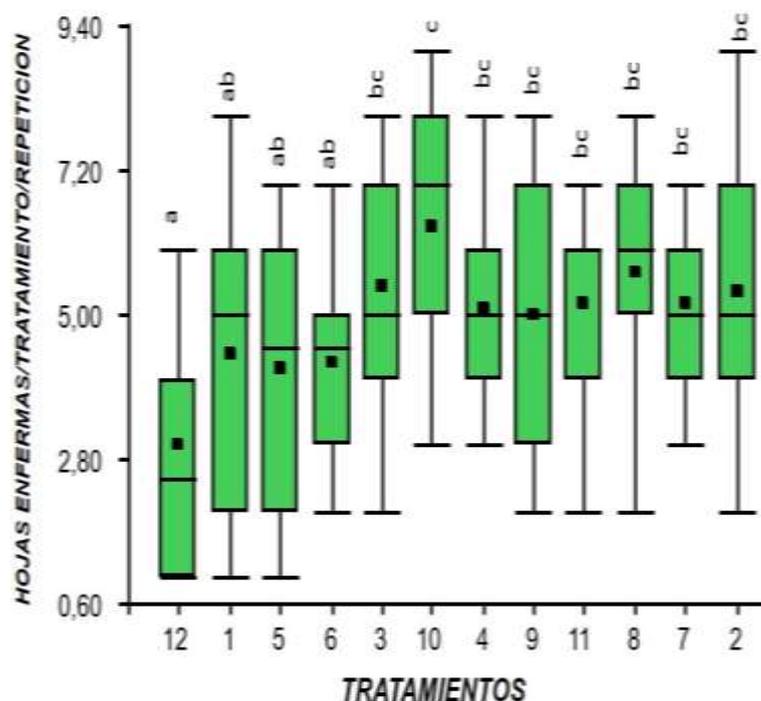
Elaborado por: (Llumiguano, R. 2018)

De acuerdo al análisis estadístico según Kruskal Wallis se determinó que el tratamiento 12 (Biofung+Bioprote1/mes) obtuvo el valor más bajo de incidencia de la bacteria con un porcentaje de 34,42%, seguido del tratamiento 6 (Biofung/1/semana) con un porcentaje de 56,67%; mientras que los valores más altos se obtuvieron en el tratamiento 8 (Biofung/1/mes) y 10 (Biofung+Bioprot/1/semana) con un porcentaje de 88,58 % y 90,88 % respectivamente.

Además se visualizó la formación de tres grupos estadísticos diferentes (A, B y C) pero con baja significancia entre los mismos. Los tratamientos 12 y 6 son estadísticamente diferentes frente al tratamiento 8 y 10. En base a lo analizado se apreció que los productos empleados en esta investigación no surtieron efecto positivo para el control de la bacteria. Grabowski, C. et, al. 2015, menciona que al aplicar, UFV-56 (*Trichoderma thuringiensis*) y UFV-62 (*Bacillus cereus*) para el control de *R. solanacearum* en *Eucaliptus robusta*, en la primera fase del ensayo, estos fueron más efectivos para controlar el marchitamiento bacteriano y redujeron de manera altamente significativa la incidencia de la enfermedad ($P < 0.001$ en los dos microorganismos), frente a los

tratamientos utilizados en la presente investigación con un p-valor de 0,0184 lo que nos presentó un resultado ligeramente positivo.

No obstante con los resultados obtenidos en esta investigación y según lo mencionado por Según (Ureta, 2016) que el índice aceptable de afectación e incidencia de una enfermedad es el 5 % se comprobó que estos tratamientos aplicados no controlaron la incidencia de la bacteria puesto que se determinó un promedio de incidencia 60 % lo cual equivalió a 6 hojas enfermas de 10 hojas por planta evaluada. Además al realizar el análisis por tratamiento, se apreció un promedio de 2,50 – 5,00 y 4,50 hojas enfermas en el tratamiento 12 (Bioprot + Biofung/1/mes), 1 (Bioprot/1/día) y 5 (Biofung/1/día) respectivamente, siendo estos los que más controlaron la incidencia de la bacteria; pero en cuanto a los promedios más bajos se determinaron los valores de 6,00 – 5,00 y 5,00 de los tratamientos 8 (Biofug/1/mes), 7 (Biofung/1/15días) y 2 (Bioprot/1/semana) respectivamente, esto permitió determinar que los tratamientos aplicados **no controlaron la incidencia de la bacteria** por el considerable número de hojas enfermas por repetición (Ver gráfico 1)



Elaborado por: (Llumiguano, R. 2018)

Gráfico 1. Hojas enfermas por tratamiento/ repetición.

2. **Análisis estadístico de la incidencia de la enfermedad en las plantas por tratamiento/ repetición (fase final - 95 días de edad de planta) según Kruskal Wallis**

Tabla N° 8. Anova de incidencia de la enfermedad según Kruskal Wallis

Tratamiento	N	D.E.	Medianas	H	p
Bioprot/1/día	12	2,57	11,50	25,52	0,0066
Bioprot/1/semana	12	2,68	10,00		
Bioprot/1/15 días	12	1,66	10,50		
Bioprot/1/mes	12	2,26	10,50		
Biofung/1/día	12	2,53	9,50		
Biofung/1/semana	12	1,78	9,50		
Biofung/1/15días	12	1,91	11,00		
Biofung/1/mes	12	2,67	11,00		
Biofung+Bioprot1/día	12	2,71	10,00		
Biofung+Bioprot1/semana	12	3,01	12,00		
Biofung+Bioprot1/ 15 días	12	2,77	10,00		
Biofung+Bioprot1/día	12	2,27	8,00		

Elaborado por: (Llumiguano, R. 2018)

De acuerdo al análisis estadístico de la incidencia bacteriana en referencia al número de hojas enfermas en base a los 12 tratamientos aplicados a los 95 días de edad de las plántulas, se obtuvo un p-valor de 0,0066, determinando una diferencia significativa entre tratamientos, por ende se realizó el respectivo análisis de la separación de medias de los tratamientos aplicados (Ver tabla N° 8).

2.2. Separación de medias de la incidencia de la enfermedad en la fase final.

Tabla N° 9. Separación de medias de los tratamientos aplicados según Kruskal Wallis.

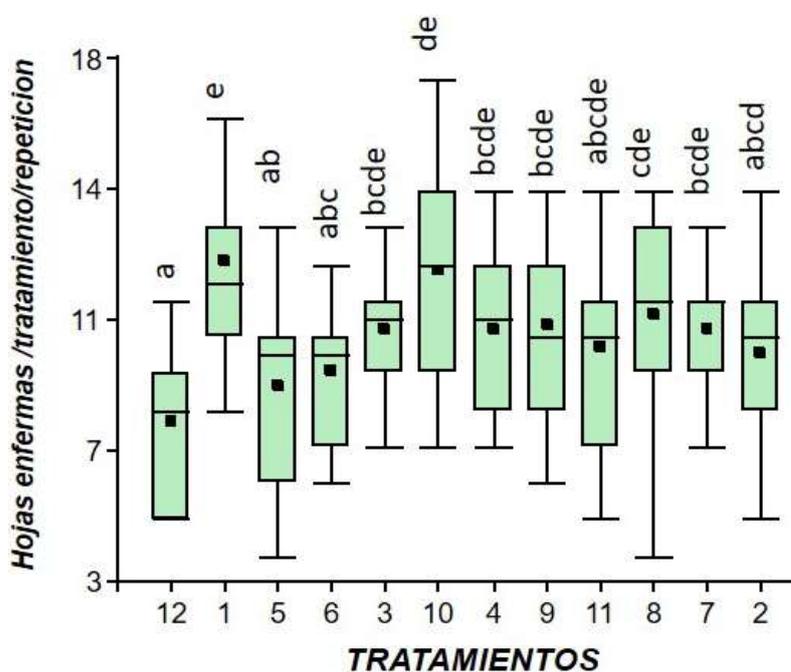
Tratamientos	Medias				
Biofung+Bioprot1/mes	37,08	A			
Biofung/1/día	51,46	A B			
Biofung/1/semana	55,17	A B C			
Bioprot/1/semana	66,42	A B C D			
Biofung+Bioprot1/ 15 días	69,67	A B C D E			
Biofung+Bioprot1/día	75,79	B C D E			
Bioprot/1/mes	76,00	B C D E			
Bioprot/1/15 días	76,92	B C D E			
Biofung/1/15días	77,92	B C D E			
Biofung/1/mes	85,54	C D E			
Biofung+Bioprot1/semana	96,88	D E			
Bioprot/1/día	99,17	E			

Elaborado por: (Llumiguano, R. 2018)

En la tabla N°9 se aprecia el análisis estadístico según Kruskal Wallis donde se determinó que el tratamiento 12 (Biofung+Bioprot 1/mes) obtuvo el valor más bajo de incidencia de la bacteria, con un porcentaje de 37,08%, seguido del tratamiento 5 (Biofung/1/día) con un porcentaje de 51,46 %, mientras que el valor más alto se obtuvo en el tratamiento 10 (Biofung+Bioprot/1/semana) y el tratamiento 1 (Bioprot/1/día) con un porcentaje de 96,88 % y 99,17 % respectivamente. Además se pudo apreciar la formación de 4 grupos diferentes (A, B, C y E), pero con baja diferencia significativa entre tratamientos. En los tratamientos 12 y 5 son estadísticamente diferentes al tratamiento 10 y 1.

Tal como menciona (Grabowski, C. et, al. 2015), en su segundo experimento, que al utilizar UFV-56 (*Bacillus thuringiensis*) y UFV-62 (*Bacillus cereus*) en *Eucalyptus robusta*, la incidencia de *R solanacearum* se redujo significativamente por UFV-56 (P <0.001), 62 (P = 0.029). Según (Ureta, 2016) un índice aceptable de afectación e incidencia de una enfermedad es el 5 %. Por lo tanto en base a lo mencionado anteriormente se comprobó que la incidencia de esta bacteria al aplicar estos tratamientos no se logró

controlar la bacteria en un rango aceptable , ya que según el análisis realizado se apreció un porcentaje de incidencia bacteriana de 71,42 % lo cual equivale 10 hojas enfermas por cada 14 hojas sanas promedio por planta, esto se afianzo al determinar un promedio de 8,00 – 12,00 y 10,00 hojas enfermas en el tratamiento 12 (Bioprot + Biofung/1/mes), 1 (Bioprot/1/día) y 5 (Biofung/1/día) respectivamente, siendo estos los que más controlaron la bacteria, no obstante los promedios de 11,00 – 11,00 y 10,00 de los tratamientos 8 (Biofung/1/mes), 7 (Biofung/1/15 días) y 2 (Bioprot/1/semana) respectivamente, permitió afirmar que **ningún tratamiento garantizo** el control de la enfermedad, por el alto promedio de hojas enfermas (Ver gráfico 2).



Elaborado por: (Llumiguano, R. 2018)

Gráfico 2. Hojas enfermas por tratamiento/repetición.

B. ESTIMACIÓN DE LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD EN LAS PLANTAS TRATADAS CON AGENTES BIOLÓGICOS (Bioprot y Biofung)

1. Análisis estadístico para la severidad de la enfermedad por tratamiento/repetición (fase inicial a los 65 días de edad de las plantas) con estadística paramétrica

Tabla N° 10. Análisis de la Varianza de la severidad por tratamiento/ repetición.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3387,54	11	307,96	2,44	0,0083
Tratamiento	3387,54	11	307,96	2,44	0,0083
Error	16632,17	132	126,00		
Total	20019,72	143			
Cv	43,40 %				

Elaborado por: (Llumiguano, R. 2018)

De acuerdo al análisis estadístico obtenido en la tabla N° 10, para la severidad causada por la bacteria a los 65 días de edad de las plantas, en referencia al porcentaje por cada repetición, luego de haber aplicado los 12 tratamientos, se obtuvo un p-valor de 0,0083, con lo cual se determinó una diferencia significativa entre tratamientos, por ende se procedió a la respectiva separación de medias, según Tukey al 5 %.

1.1 Separación de medias según Tukey al 5 % para la severidad de la enfermedad

Tabla N° 11. Separación de medias de Tukey al 5% de la severidad por tratamiento/ repetición.

Tratamiento	Medias	n	E.E.		
Bioprot + Biofung/1/mes	20,92	12	3,24	A	
Bioprot/1/día	27,22	12	3,24	A	B
Biofung/1/día	29,78	12	3,24	A	B
Biofung/1/semana	30,05	12	3,24	A	B
Bioprot + Biofung/1/día	31,73	12	3,24	A	B
Bioprot/1/mes	33,63	12	3,24	A	B
Biofung/1/15días	34,16	12	3,24	A	B
Bioprot/1/semana	34,85	12	3,24	A	B
Bioprot + Biofung/1/15 días	35,69	12	3,24	A	B
Bioprot/1/15 días	37,09	12	3,24		B
Bioprot + Biofung/1/semana	38,22	12	3,24		B
Biofung/1/mes	38,24	12	3,24		B

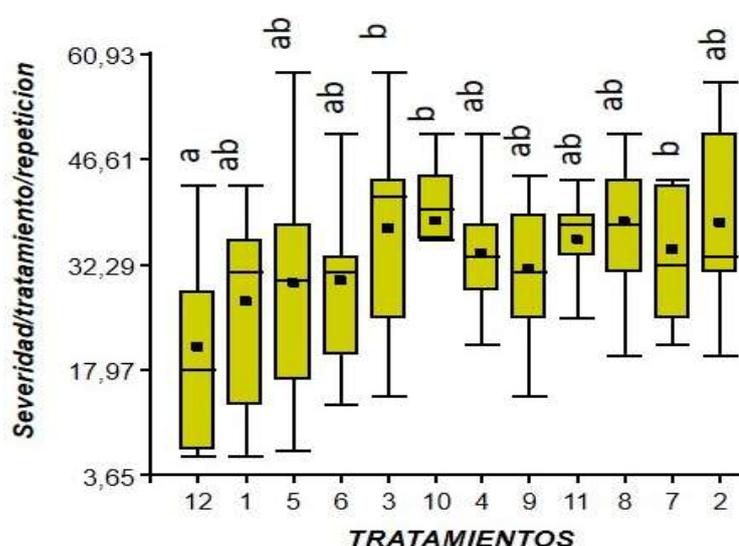
Elaborado por: (Llumiguano, R. 2018)

De acuerdo a la separación de medias de Tukey al 5% para la severidad por tratamiento/repetición, se determinó que en el tratamiento 12 (Bioprot + Biofung/1/mes) se obtuvo el valor más bajo con un promedio de 20,92 %, seguido del tratamiento 1 (Bioprot/1/día) con un promedio de 27,22 %, mientras que el valor más alto se obtuvo en el tratamiento 10 (Bioprot + Biofung /1/ semana) y tratamiento 8 (Bioprot/1/mes) con un promedio de 38,22 % y 38,24 % respectivamente. Los tratamientos 12 y 1 son estadísticamente diferentes al tratamiento 10 y 8. Ver tabla 11.

1.2 Análisis gráfico de la severidad bacteriana por tratamiento/repetición.

Según la afirmación de (López, et, al. 2016), al aplicar *Trichoderma spp*, *Bacilos spp* y *Agri-gent*, se determinó que la severidad de la bacteria en *Eucaliptus robusta* se controló en un índice promedio por tratamiento de 1,6% mientras que en comparación con *Agri-gent* un 0,8%. Entonces según estos resultados se comprobó que al aplicar Bioprot y Biofung no se pudo controlar al 100% la severidad de esta bacteria, pues según Bock et al. (2010) afirma que el rango aceptable de severidad es de (<10 %) y para Saucedo et al.

(2009), los niveles de severidad aceptable son ($< 8\%$), entonces según lo mencionado anteriormente y lo obtenido en esta investigación en la fase inicial que fue de $17,68\%$ – $31,30,0\%$ y $29,91\%$ en el tratamiento 12 (Bioprot + Biofung /1/mes), 1 (Bioprot/1/día) y 5 (Biofung/1/día) respectivamente, siendo estos los que más apaciguaron la severidad de la enfermedad, no obstante los promedios más altos se obtuvieron en los tratamientos 8 (Biofung/1/mes), 7 (Biofung/1/15días) y 2 (Bioprot/1/semana) con $37,50\%$ – $32,29\%$ y $33,33\%$ respectivamente. Esto permitió corroborar que estos productos **no controlaron la severidad bacteriana** por el alto promedio porcentual de severidad ($32,63\%$) alcanzado en el material vegetativo. (Véase gráfico 3)



Elaborado por: (Llumiguano, R. 2018)

Gráfico 3. Severidad bacteriana por tratamiento/ repetición.

2. Análisis estadístico para la severidad de la enfermedad por tratamiento/repetición de la fase final – 95 días de edad de las plantas.

2.1 Severidad de la enfermedad en la fase final con estadística paramétrica

Tabla N° 12. Análisis de la Varianza de la severidad por tratamiento/ repetición.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3567,19	11	324,29	2,53	0,0063
Tratamiento	3567,19	11	324,29	2,53	0,0063
Error	16932,05	132	128,27		
Total	20499,24	143			
CV	14,30%				

Elaborado por: (Llumiguano, R. 2018)

Según el análisis estadístico obtenido en la tabla N° 12, para la severidad en la fase final a los 95 días de edad de las plantas, en referencia al porcentaje de afectación de las plantas por cada repetición, luego de haber aplicado los 12 tratamientos, se obtuvo un p-valor de 0,0063; con lo cual se determinó una diferencia significativa entre tratamientos, por ende se procedió a la respectiva separación de medias, según Tukey al 5 %.

2.2 Separación de medias para la severidad según Tukey al 5 %

Tabla N° 13. Separación de medias de Tukey al 5% de la severidad por tratamiento/ repetición.

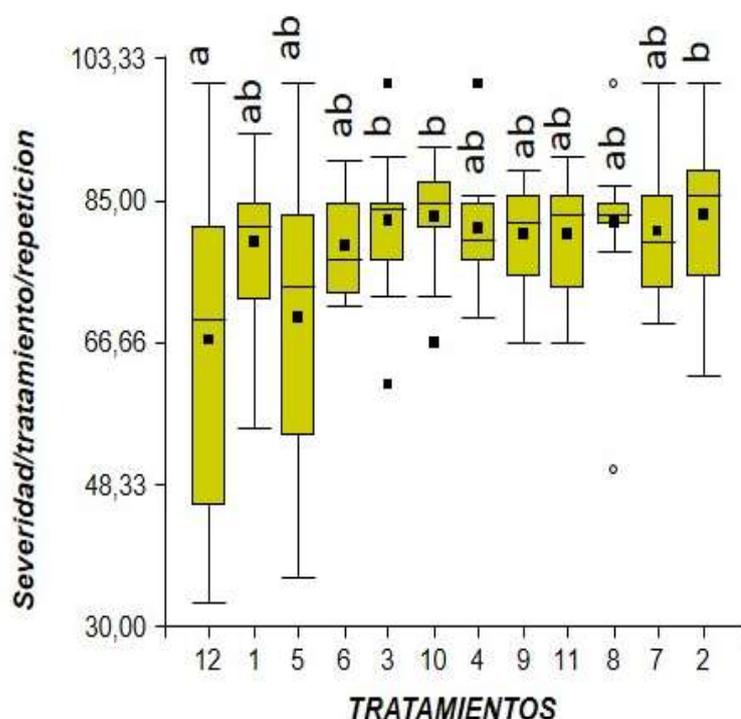
Tratamiento	Medias	n	E.E.		
Bioprot +Biofung/1/mes	66,93	12	3,27	A	
Biofung/1/día	69,99	12	3,27	A	B
Biofung/1semana	79,32	12	3,27	A	B
Bioprot/1/día	79,75	12	3,27	A	B
Bioprot+Biofung/1/15 días	80,52	12	3,27	A	B
Bioprot +Biofung/1/día	80,73	12	3,27	A	B
Biofung/1/15 días	80,94	12	3,27	A	B
Bioprot/1/mes	81,51	12	3,27	A	B
Biofung/1/mes	81,98	12	3,27	A	B
Bioprot/1/15días	82,30	12	3,27		B
Bioprot+Biofung/1/semana	83,00	12	3,27		B
Bioprot/1/semana	83,38	12	3,27		B

Elaborado por: (Llumiguano, R. 2018)

De acuerdo a la separación de medias de Tukey al 5% para la severidad de la fase final, por tratamiento/repetición a los 95 días de edad de las plantas, se determinó que el tratamiento 12 (Bioprot +Biofung/1/mes) obtuvo el valor más bajo, con un promedio de 66,93 %, seguido del tratamiento 5 (Biofung/1/día) con un promedio de 69,99 %, mientras que los valores más altos se obtuvieron en el tratamiento 10 (Bioprot +Biofung/1/semana) y tratamiento 2 (Bioprot/1/semana) con un promedio de 83,00 % y 83,38 % respectivamente. Los tratamientos 12 y 5 son estadísticamente diferentes a los tratamientos 10 y 2. Ver tabla 13.

2.3 Análisis gráfico de la severidad bacteriana por tratamiento / repetición.

Según, (López, et, al. 2016), al aplicar *Trichoderma spp*, *Bacilos spp* y *Agri-gent*, se determinó que la severidad de la bacteria en *Eucaliptus robusta* se controló en un promedio por tratamiento de 86 % al aplicar *Trichoderma spp* y *Bacilos spp* mientras que al aplicar *Agri-gent* fue de 89 %. Según estos resultados y lo que menciona Bock et al. (2010) que el rango aceptable de severidad es de (<10 %) y para Saucedo et al. (2009), los niveles de severidad aceptable son (< 8 %), se pudo comprobar que al aplicar Bioprot y Biofung para el control de la severidad de esta bacteria no se consiguió controlar la enfermedad, pues el promedio de severidad en la fase final fue de 69,70 % – 73,90 % y 81,66 % en el tratamiento 12 (Bioprot + Biofung/1/mes), 5 (Biofung/1/día) y 1 (Biofung/1/semana) respectivamente, siendo estos los que más controlaron la severidad de la enfermedad, no obstante los promedios obtenidos en los tratamientos 8 (Biofung/1/mes), 7 (Biofung/1/15 días) y 2 (Bioprot/1/semana) con 83,33 % – 79,52 % y 85,65 % respectivamente, entonces según estos resultados y los rangos permisibles para este factor se determinó que **Bioprot y Biofung no afianza el control de la enfermedad**, por el alto promedio de severidad bacteriana (79,20 %) en el material vegetativo (Véase gráfico 4).



Elaborado por: (Llumiguano, R. 2018)

Gráfico 4. Severidad bacteriana por tratamiento/ repetición.

C. DETERMINACION DE LA MORTALIDAD DE PLANTAS TRATADAS CON AGENTES BIOLÓGICOS (Bioprot y Biofung)

1. Análisis estadístico de la mortalidad a los 95 días de edad de las plantas por tratamiento/ repetición según Kruskal Wallis

Tabla N° 14. Anova de la mortalidad según Kruskal Wallis

Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Bioprot/1/día	12	1,00	0,00	1,00	0,72	0,9201
Bioprot +Biofung/1/semana	12	1,00	0,00	1,00		
Bioprot +Biofung/1/15dias	12	1,00	0,00	1,00		
Bioprot +Biofung/1/mes	12	0,92	0,29	1,00		
Bioprot/1/semana	12	0,92	0,29	1,00		
Bioprot/1/15 días	12	0,92	0,29	1,00		
Bioprot/1/mes	12	0,92	0,29	1,00		
Biofung/1/día	12	0,92	0,29	1,00		
Biofung/1/semana	12	1,00	0,00	1,00		
Biofung/1/15 días	12	0,92	0,29	1,00		
Biofung/1/mes	12	0,92	0,29	1,00		
Bioprot +Biofung/1/día	12	1,00	0,00	1,00		

Elaborado por: (Llumiguano, R. 2018)

Según el análisis estadístico detallado en la tabla N° 14, luego de 95 días de edad de las plántulas, en base a los 12 tratamientos aplicados, se obtuvo un p-valor de 0, 9201, con lo cual se determinó que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, por ende no se realizó la respectiva separación de medias según cada tratamiento.

Moncada, R. 2014, menciona que al aplicar diferentes tratamientos con *Trichoderma spp* y *Bacillus spp* se determinó que la mortalidad en plántulas de eucalipto mediante un análisis edafológico para la inhibición de *Ralstonia solanacearum* y controlar la mortalidad de las plántulas, se obtuvo una concentración inicial de 1×10^5 UFC/g y una concentración promedio final de 3.2×10^9 UFC/g, observando ningún efecto en la inhibición por parte de los tratamientos en base a estos microorganismos. Por lo tanto, según estos resultados obtenidos se pudo corroborar que en esta investigación los tratamientos aplicados no garantizaron evitar la mortalidad del material vegetativo, ya

que estadísticamente no existió significancia entre los tratamientos aplicados al material vegetativo y la alta cifra de mortalidad (100%) observada en el área de estudio.

VI. CONCLUSIONES

1. Se comprobó que los 12 tratamientos aplicados con Bioprot y Biofung, no controlaron la incidencia causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum*. Ya que el promedio de hojas muertas por cada repetición en la fase inicial fue 6 de 10 hojas evaluadas, lo cual equivale al 60 %, mientras que en la fase final se obtuvo un promedio de 10 hojas enfermas de 14 hojas evaluadas, esto equivale a un 71,42 %. Según los rangos permisibles este índice no debe sobrepasar el 5% de afectación, por lo tanto se determinó que la incidencia de la bacteria alcanzó niveles altos de afectación y que estos agentes biológicos no fueron eficientes para inhibir la bacteria.
2. Se determinó que ninguno de los 12 tratamientos aplicados con Bioprot y Biofung controlaron la severidad de la enfermedad causada por *Ralstonia solanacearum*, pues el porcentaje evaluado por cada unidad experimental en la fase inicial fue de 32,63 % y en la fase final de 79,20 %, según los rangos permisibles que es del 8-10% se determinó que los tratamientos aplicados no alcanzaron resultados positivos para el control de esta bacteria. Permitiendo comprobar que estos productos no tuvieron eficacia en el control de la enfermedad para esta especie forestal.
3. El alto índice de mortalidad por cada unidad experimental, permitió comprobar con mayor certeza que estos tratamientos no tuvieron efecto positivo, puesto que el alto porcentaje de individuos muertos que fue del 100% permitió apreciar resultados desalentadores para el control de la bacteria. Por lo tanto el uso de Bioprot y Biofung para el control de *Ralstonia solanacearum* no es recomendable en esta especie.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda no utilizar Bioprot y Biofung para el control de *Ralstonia solanacearum* e integrar otros microorganismos antagonistas a esta bacteria como el cultivo de cepas específicas de *Pseudomonas* fluorescentes (rizobacterias) para el control del marchitamiento en eucalipto como lo menciona Ran *et al.* (2005).
2. En el vivero, se recomienda el control integrado, basado en varias medidas preventivas, como ser el uso de plántulas sanas, desinfección de agua de riego, desinfección de herramientas, etc.
3. Impulsar la utilización de nuevas tecnologías, como cámaras térmicas, para la evaluación de la eficacia de productos que ayuden a combatir y controlar *Ralstonia solanacearum* que afectan a las plantaciones de *Eucalyptus urograndis*.

VIII. RESUMEN

El presente trabajo investigativo plantea: evaluar agentes biológicos para el control y mitigación del daño ocasionado por *Ralstonia solanacearum* en eucalipto tropical a nivel de vivero, en la hacienda los Ángeles, cantón Buena Fe, provincia de los Ríos; cuyo ensayo estuvo estructurado de 12 tratamientos, mismos que se detallan: (T1: Bioprot + 15cc/L + 1/día); (T2: Bioprot + 15cc/L + 1/semana); (T3: Bioprot + 15cc/L + 1/15 días); (T4: Bioprot + 15cc/L + 1/ 1 mes); (T5: Biofung + 15cc/L + 1/día); (T6: Biofung + 15cc/L + 1/semana); (T7: Biofung + 15cc/L + 1/ 15 días); (T8: Biofung + 15cc/L + 1/mes); (T9: Biofung+Bioprot + 15cc/L + 1/día); (T10: Biofung+Bioprot + 15cc/L + 1/semana); (T11: Biofung+Bioprot + 15cc/L + 1/ 15 días); (T12: Biofun+Bioprot + 15cc/L + 1/mes). Cada tratamiento fue aplicado en tres repeticiones (5 plantas /repetición). Se utilizó un diseño completo al azar (DCA), y se evaluó las variables planteadas en los objetivos específicos: la incidencia (número de hojas muertas); la severidad (porcentaje de afectación) y la mortalidad (número de plantas muertas). Durante la evaluación se realizó riegos y fertilizaciones para mantener la vigorosidad de las plantas. Como resultado final se obtuvo que la incidencia de la bacteria en la fase inicial fue de 60 % y en la fase final de 71,42 %, y según Ureta (2016), el rango aceptable debe ser menor al 5%. En cuanto a la severidad se determinó que en la fase inicial alcanzo un 32,63% y en la fase final 79,20 %; y según Bock et al. (2010) el rango aceptable es de (<10 %) y para Saucedo et al. (2009), (< 8 %), finalmente con la mortalidad del 100 % se comprobó que los tratamientos no controlaron la bacteria y que estos productos no generaron resultados positivos.

Palabras clave: AGENTES BIOLÓGICOS - CONTROL BIOLÓGICO - EUCALIPTO TROPICAL – VIVERO FORESTAL.

Por: Raúl Llumiguano



IX. ABSTRACT

The following investigation proposed to evaluate biological agents to control and mitigate the damage caused by *Ralstonia solanacearum* to tropical eucalyptus at a nursery level. This research work took place in Los Angeles farm, Buena Fe canton in Los Rios province. The trial of this investigation was structured in 12 treatments as it follows: (T1: Bioprot+ 15cc/L+ 1/day); (T2: Bioprot+ 15cc/L+ 1/ week); (T3: Bioprot+ 15cc/L+ 1/ 15 days); (T4: Bioprot+ 15cc/L+ 1/ 1 month); (T5: Biofung+ 15cc/L+ 1/day); (T6: Biofung + 15cc/L+ 1/ week); (T7: Biofung + 15cc/L+ 1/ 15 days); (T8: Biofung + 15cc/L+ 1/ 1 month); (T9: Biofung +Bioprot + 15cc/L+ 1/day); (T10: Biofung +Bioprot + 15cc/L+ 1/ week); (T11: Biofung +Bioprot + 15cc/L+ 1/ 15 days); (T12: Biofung +Bioprot + 15cc/L+ 1/ 1 month). Each treatment was applied in three repetitions (5 plants/ repetition). A complete randomized design (CRD) was used and the variables stated in the specific objectives were evaluated: the effect (number of dead leaves), the severity (affectation percent), the mortality (number dead plants). During the assessment process, the plants were watered and fertilized to maintain their strength. As a final result, it was determined that the bacteria impact at the initial stage was 60 % and at the final stage was 71, 42 %. According to Ureta (2016), the acceptable range has to be less than 5 %. The severity reached a 32,63 % at the initial stage and a 79,20 % at the final stage. According to Bock et.al (2010) the acceptable range is (< 10 %) and for Saucedo et.al (2009), (< 8 %). Finally, after checking that the mortality was 100%, it was concluded that these treatments don't control the bacteria and these products don't generate positive results.

Key words: <BIOLOGICAL AGENTS >, < BIOLOGICAL CONTROL >, <TROPICAL EUCALYPTUS >, <FOREST NURSERY>.



X. BIBLIOGRAFÍA

1. Alfenas, A., Mafia, R., Sartório, R., Binoti, D., Silva, R., Lau, D. & Vanetti, C. (2006). *Ralstonia solanacearum em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. Fitopatologia Brasileira*. Brasil. Recuperado el 5 de octubre del 2018, de <http://www.scielo.br/pdf/fb/v31n4/05.pdf>
2. Alfenas, A., & Mafia, R. (2003) *Controle integrado de doenças em viveiros clonais e aspectos relativos à ferrugem (Puccinia psidii) do eucalipto*. *Fitopatologia Brasileira* 28: pp. 156-163. Recuperado el 10 de octubre del 2018, de: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582005000400003
3. Alfenas, A. C., Zauza, E. V., Mafia, R. G. & Assis, T. F. (2004). *Clonagem e doenças do eucalipto*. Imprensa Universitária. p. 442. Recuperado el 15 de agosto del 2018 de: <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp082045.pdf>
4. Alves, F., & Milani, D. (2002). *Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil. Mogi Guaçu, SP. International Paper* . p. 98. Recuperado el 15 de agosto del 2018 de: <https://www.cenicafe.org/es/publications/eucalipto.pdf>
5. Janse, J., Van den Beld, H., Elphinstone, J., Simpkins, S., Tjou-Tam-Sin, N. & Van Vaerenbergh, J. (1998). *Interim testing scheme for the diagnosis, detection and identification of Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi et al. in potatoes*. Annex II to the Council Directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Publication 97/647/EC, Official Journal European Communities No. L 235: 8-39. Recuperado el 15 de agosto del 2018 de: <http://www.sipav.org/main/jpp/volumes/0204/020407.pdf>
6. Arango, A. (1999). *Variación de la densidad de la madera de Eucalyptus grandis en árboles de siete años de edad*. Medellín, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Recuperado el 5 de mayo del 2018, de <https://es.slideshare.net/AdierVelasquez/eucalipto-66355891>

7. Arriel, A., Fonseca, N. R., Guimarães. L. M. S., Hermenegildo, P. S., Mafía, R., & De Souza, A. C. (2014). *Wilt and die-back of Eucalyptus spp. caused by Erwinia psidii in Brazil. Forest Pathology* 44 (4^a): pp. 255-265. DOI: 10.1111/efp.12087. Recuperado el 15 de agosto del 2018 de: <http://www.redalyc.org/pdf/1731/173149194002.pdf>
8. Caruso P. (2005). *Detección y caracterización serológica y molecular de Ralstonia solanacearum biovar 2, causante de la marchitez y podredumbre parda en patata*. (Tesis de Doctorado). Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. IVIA. Valencia - España. Recuperado el 15 de agosto del 2018 de: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n3/rpv01313.pdf>
9. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. CATIE. (1991). *Deglupta (Eucalyptus deglupta) especie de árbol de uso múltiple en América Central. Turrialba, Costa Rica*. CATIE, Serie Técnica, Informe Técnico No 240. p. 45. Recuperado el 10 de octubre del 2018 de: <https://www.onfcr.org/media/uploads/documents/genero-eucalipto.pdf>
10. Coetzee, M. P. A., Golani, G., Tjahjono, B., Gafur, A., & Wingfield, M. J. (2011). *Single dominant Ganoderma species is responsible for root rot of Acacia mangium and Eucalyptus in Sumatra. South. For.* pp. 175–180. 10.2989/20702620.2011.639488. Recueprado el 10 de octubre del 2018 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5425484/>
11. Coutinho, C. (2010). *La marchitez bacteriana de la papa*. Chile. Recuperado el 15 de agosto del 2018 de: <https://www.papachile.cl/la-marchitez-bacteriana-de-la-papa-2/>
12. Coutinho, T., Brady, C., Van Der Vaart, M., Venter, S., Tele-chea, N., Rolfo, M., Pérez, C., & Wingfield, M. (2011). *A new shoot and stem disease of Eucalyptus species caused by Erwinia psidii. Australasian Plant Pathology* Recuperado el 15 de Agosto del 2018 de: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/bosque/v37n3/art02.pdf>

13. Delgado, L., García, A., & García, R. (1999). *Marchitez bacteriana del tomate causado por el Biovar 2^a de Ralstonia solanacearum* en algunas localidades del estado MERIDA, Venezuela. *Forest.* 43 (2^a): pp.183-189, Recuperado el 15 de agosto del 2018 de: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_1792.pdf
14. Elphinstone, J., Hennessy, J., Wilson, J., & Stead. D. (1996). *Sensitivity of different methods for the detection of Pseudomonas solanacearum (Smith) in potato tuber extracts.* EPPO/OEPP Bulletin 26: pp. 663-678. Recuperado el 15 de agosto del 2018 de: <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/tesis/bitstream/handle/11185/285/tesis.pdf?sequence=1>
15. Farfán, V. (2005). *Informe anual de investigaciones de café. cenicafé. chinchiná.* Colombia. Chinchiná, Cenicafé. p. 48-49. Recuperado el 7 de mayo del 2018, de: <https://es.slideshare.net/AdierVelasquez/eucalipto-66355891>
16. Fegan, M., & Prior, P. (2005). *How complex is the R. solanacearum species complex.* The American Phytopathological Society, Bacterial Wilt: The Disease and the *R. solanacearum* Species Complex: pp. 449-461. Recuperado el 22 de octubre del 2018 de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000300001
17. Gan, S., Li, M., Li, F., Wu, K., Wu, J., & Bai, J. (2004). *Genetic analysis of growth and susceptibility to bacterial wilt (Ralstonia solanacearum) in Eucalyptus by interspecific factorial crossing.* *Silvae Genet.* 53. pp. 254 - 258. Recuperado el 10 de noviembre del 2018 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5425484/>
18. Gotuzzo, E. (1975). *Introducción a la Fitopatología.* Bacterias. In Fernandez Valiela (Eds). Vol II. Colección Científica del INTA. Buenos Aires - Argentina. p 3-360. Recuperado el 15 de agosto del 2018 de: <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/tesis/bitstream/handle/11185/285/tesis.pdf?sequence=1>

19. Hodgson, L. (1976). *Some aspects of flowering and reproductive behavior in Eucalyptus grandis* (Hill). Maiden at J.D.M. Keet Forest Research Station. Relative yield, breeding systems, barriers to selfing and general conclusions. South African Forestry Journal 99: pp. 53-58. Recuperado el 22 de octubre del 2018 de: <https://www.cenicafe.org/es/publications/eucalipto.pdf>
20. Hayward, A. (1991). *Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by Pseudomonas solanacaerum*. Annu. Rev. Phytopathol. 29. pp. 65-87. Recuperado el 15 de agosto del 2018 de: <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/tesis/bitstream/handle/11185/285/tesis.pdf?sequence=1>
21. Lema, T. (1995). *Algunas aproximaciones estadísticas a la medición forestal*. Medellín. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Recuperado el 7 de mayo del 2018, de: <https://es.slideshare.net/AdierVelasquez/eucalipto-66355891>
22. Melgar, J. (2012). *Marchitez bacteriana en solanáceas: su reconocimiento y manejo integrado*. Honduras. Recuperado el 7 de mayo del 2018 de: http://www.fhia.org.hn/downloads/proteccion_veg_pdfs/manual_marchitez.pdf
23. Osorio, L. (2004). *Interceptación de la radiación, acumulación y distribución de biomasa y contenido de carbono en las especies Eucalyptus grandis Hill exmaiden y Alnus acuminata*. Medellín, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Recuperado el 7 de mayo del 2018, de: <https://es.slideshare.net/AdierVelasquez/eucalipto-66355891>
24. Palladino, M., Pérez, G., Alonso, R., & Pérez, C. (2013). *Enfermedades bacterianas en Eucalipto: estado del conocimiento a nivel nacional*. In Balmelli G, Simeto S, Martínez G, Gómez D eds. VI Jornada técnica de protección forestal. Montevideo - Uruguay. INIA. Serie Técnica 213. pp. 53-63. Recuperado el 15 de agosto del 2018 de: <http://mingaonline.uach.cl/pdf/bosque/v37n3/art02.pdf>

25. Pérez, A., Wingfield, M., Slippers, B., Altier, N., & Blanchette, R. (2010). *Endophytic and canker-associated Botryosphaeriaceae occurring on non-native Eucalyptus and native Myrtaceae trees in Uruguay*. *Fungal Diversity* 41 (1^a): pp. 53-69. Recuperado el 22 de octubre del 2018 de: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/bosque/v37n3/art02.pdf>
26. Paz, I. C. P., Santin, R., Guimarães, C. M., Rosa, O. P. P., Dias A. C. F., & Quecine J. L. (2012). *Eucalyptus growth promotion by endophytic Bacillus spp.* *Genet. Mol. Res.* 11. pp. 3711–3720. 10.4238/2012.August.17.9. Recuperado el 10 de noviembre del 2018 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5425484/>
27. Rodas, C. (1996). *Chrysomima semilutearia (Felder & Rohenhofer) nuevo defoliador de plantaciones forestales en Colombia*. Cali – Colombia. Recuperado el 7 de mayo del 2018, de: <https://es.slideshare.net/AdierVelasquez/eucalipto-66355891>
28. Rodas, C. (2003.) *First report of Ceratocystis fimbriata on E. grandis in Colombia*. In *Diseases of Eucalyptus*. Colombia. Department of Plant Pathology and Microbiology, Forestry and Agricultural Biotechnology Institute. Recuperado el 7 de mayo del 2018, de: <https://es.slideshare.net/AdierVelasquez/eucalipto-66355891>
29. Rivera, C. (2012). *Marchitez bacteriana en solanáceas: su reconocimiento y manejo integrado*. Honduras. Recuperado el 7 de mayo de: http://www.fhia.org.hn/downloads/proteccion_veg_pdfs/manual_marchitez.pdf
30. Sanfuentes, J. (2012). *Enfermedades que afectan a eucaliptos y acacias*. Brasil. Recuperado el 7 de mayo del 2018, de: https://issuu.com/andres_bc/docs/publicaci_n_orinoquia
31. Semprún, J. (2009). *Caracterización e incidencia de Ralstonia solanacearum Smith en plantas de Musa en el Sector “El Roble”*. Venezuela. Recuperado el 7 de mayo del 2018, de:

<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiOgKmGoMHeAhXjYt8KHRiUCoUQFjAAegQICRAC&url=https%3A%2F%2F dialnet.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F3308482.pdf&usg=AOvVaw3ipaQoaQsqIy31ElH0pOqT>

32. Sinclair, W., & Lyon, H. (2005). *Diseases of Trees and Shrubs*. Ithaca: Cornell University Press. Recuperado el 15 de agosto del 2018 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5425484/>

33. Sudo, S., Oliveira, G. H. N., & Pereira, A.C. (1983). *Eucalipto (Eucalyptus sp.) e bracatinga (Mimosa scabrella Benth), novos hospedeiros de Pseudomonas solanacearum E.F. Smith. Fitopatologia Brasileira* 8:631 (Abstract). Recuperado el 15 de agosto del 2018 en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-92002016000300002

XI. ANEXOS

Anexo N°1. Delimitación del área de estudio.



Anexo N°2. Selección y ubicación del material experimental (Plantas de *Eucalyptus urograndis*)



Anexo N°3. Establecimiento y etiquetado de los tratamientos y repeticiones del diseño experimental.



Anexo N°4. Fertilización y aplicación de nutrientes a las unidades experimentales.(Macro y micro nutrientes)



Anexo N°5. Selección e identificación de árboles con presencia de *Ralstonia solanacearum* previo inoculación de la bacteria.



Anexo N°6. Recolección de muestras infectadas con *Ralstonia solanacearum*.



Anexo N°7. Inoculación de la bacteria en un periodo de 24 horas.



Anexo N°8. Aplicación de *Ralstonia solanacearum* en las unidades experimentales.



Anexo N° 9. Sintomatología presente de la bacteria en las plantas.



Anexo N° 10. Prueba de vaso para asegurar que la inoculación fue efectiva.



Anexo N°11. Preparación y aplicación de los tratamientos en cada una de nuestras unidades experimentales.



Anexo N°12. Evaluación de las unidades experimentales (DAC, altura, incidencia, severidad y mortalidad).



Anexo N°13. Control químico de insectos y agentes patógenos mediante el sistema de riego.



Anexo N°14. Visita del tribunal de tesis.

