

## Resultados y Lecciones en Bacterias Nativas para Control de Nemátodos Fitoparásitos

Proyecto de Innovación en  
**Regiones Metropolitana,  
de O'Higgins y del Maule**

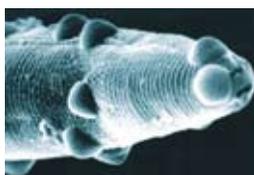




Fundación para la Innovación Agraria  
MINISTERIO DE AGRICULTURA



# Resultados y Lecciones en Bacterias Nativas para el Control de Nemátodos Fitoparásitos



Proyecto de Innovación en  
**Regiones Metropolitana,  
de O'Higgins y del Maule**

Valorización a agosto de 2010



## **Agradecimientos**

En la realización de este trabajo agradecemos sinceramente la colaboración de los productores, técnicos y profesionales vinculados al proyecto, y a los participantes en los talleres de validación, en especial a:

- Eduardo Donoso, ingeniero agrónomo, M. Sc., socio y gerente de desarrollo y producción de Bio Insumos Nativa Ltda., académico Universidad Católica del Maule
- Erwin Aballay, ingeniero agrónomo, M. Sc. Ph. D., profesor asociado Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile
- Juan Carlos Galaz, profesional FIA encargado del proyecto precursor

## **Resultados y Lecciones en**

### **Bacterias Nativas para el Control de Nemátodos Fitoparásitos**

Proyecto de Innovación en las regiones Metropolitana, de O'Higgins y del Maule

## **Serie Experiencias de Innovación para el Emprendimiento Agrario**

### **FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA**

Registro de Propiedad Intelectual N° 218.173

ISBN N° 978-956-328-134-7

#### **ELABORACIÓN TÉCNICA DEL DOCUMENTO**

Rodrigo Cruzat G., Esteban Barrios A. y Bernardita Mancilla V. - AQUAVITA Consultores

#### **REVISIÓN DEL DOCUMENTO Y APORTES TÉCNICOS**

M. Francisca Fresno R. y M. Margarita Casadio P. - Fundación para la Innovación Agraria (FIA)

#### **EDICIÓN DE TEXTOS**

Gisela González Enei

#### **DISEÑO GRÁFICO**

Guillermo Feuerhake

Se autoriza la reproducción parcial de la información aquí contenida, siempre y cuando se cite esta publicación como fuente.

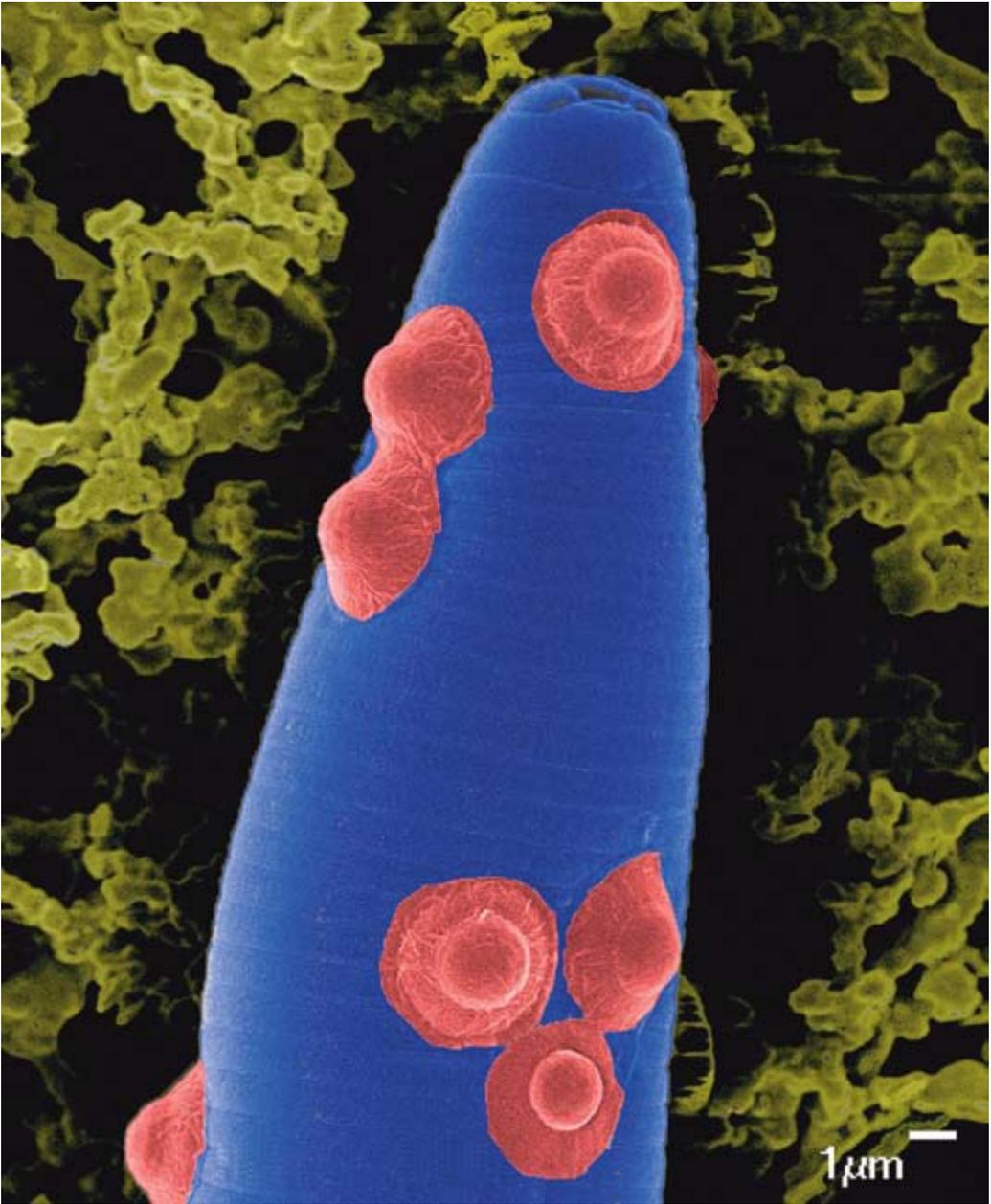
# Contenidos

---

---

<b>Sección 1. Resultados y lecciones aprendidas</b> .....	5
1. Antecedentes .....	5
2. Objetivo del documento.....	6
3. Base conceptual y tecnológica de la herramienta .....	6
3.1 Problemas ocasionados por nemátodos en tomates, vides y cítricos....	6
3.2 Técnicas de control de nemátodos en los cultivos .....	8
3.3 Características de las bacterias benéficas seleccionadas: <i>Pasteuria</i> y <i>Bacillus</i> .....	9
4. Situación nacional: cultivos de tomates, vides y cítricos; nematicidas.....	10
4.1 Cultivos .....	10
4.2 Nematicidas.....	13
4.3 El valor de la herramienta.....	14
5. Conveniencia económica para el productor.....	15
5.1 Análisis económico de los controles químico y biológico.....	15
5.2 Externalidades positivas de la herramienta tecnológica .....	18
6. Alcances de la herramienta .....	19
7. Asuntos por resolver .....	20
<b>Sección 2. El proyecto precursor</b> .....	21
1. El entorno económico .....	21
2. El Proyecto.....	22
2.1 Objetivos específicos.....	22
2.2 Metodología.....	23
3. Situación actual del desarrollo de la herramienta.....	29
<b>Sección 3. El valor del proyecto</b> .....	31
<b>ANEXOS</b>	
1. Resultados del análisis económico .....	34
2. Literatura consultada .....	35
3. Documentación disponible y contactos .....	36

---



DR. KEITH DAVIES

Endosporas de *Pasteuria penetrans* adheridas a la cutícula de un nemátodo

## SECCIÓN 1

# Resultados y lecciones aprendidas

El presente libro tiene el propósito de compartir con los actores del sector los resultados, experiencias y lecciones aprendidas sobre el control de la bacteria *Pasteuria penetrans* en el país, a partir de un proyecto financiado por la Fundación para la Innovación Agraria - FIA.

Se espera que esta información, que se ha sistematizado en este “documento de aprendizaje”,<sup>1</sup> aporte a los interesados elementos que le permitan adoptar decisiones productivas y, potencialmente, desarrollar nuevas iniciativas relacionadas con esta innovación, que ofrece una alternativa de control de nemátodos fitopatógenos como *Meloidogyne*, principalmente en cultivos de tomate y vid.

## ► 1. Antecedentes

Los análisis y resultados que se presentan en este documento han sido desarrollados a partir de las lecciones aprendidas en la ejecución del proyecto “Evaluación de Cepas Nativas de la Bacteria *Pasteuria penetrans* para el Biocontrol de Nemátodos Fitoparásitos Asociados a Cultivos de Vid, Tomate y Cítricos” (proyecto precursor<sup>2</sup>), realizado por la Universidad de Talca y el agente asociado Bio Insumos Nativa Ltda., en las regiones Metropolitana, de O’Higgins y del Maule. Este proyecto fue financiado por FIA y ejecutado entre diciembre de 2004 y noviembre de 2008, con una duración de 47 meses.

El objetivo principal fue “recolectar, aislar y evaluar la capacidad biocontroladora de cepas nativas de *Pasteuria penetrans* (Pp) recolectadas entre las regiones I y X, para nemátodos fitoparásitos causantes de enfermedades en cultivos de vid, cítricos y tomate”.<sup>3</sup>

Los objetivos específicos se detallan en la Sección 2: El proyecto precursor.

<sup>1</sup> “Documento de aprendizaje”: análisis de los resultados de iniciativas y proyectos con bajo potencial de aplicación inmediata por otros usuarios, pero con resultados valiosos y orientadores. Este documento consigna las oportunidades y los desafíos pendientes por abordar, y/o las limitantes que quedan por superar en las opciones analizadas.

<sup>2</sup> “Proyecto precursor”: proyecto de innovación a escala piloto financiado e impulsado por FIA, cuyos resultados fueron evaluados a través de la metodología de valorización de resultados desarrollada por la Fundación, análisis que se da a conocer en el presente documento. Los antecedentes del proyecto precursor se detallan en la Sección 2 de este documento.

<sup>3</sup> Denominaciones anteriores a la subdivisión efectuada en 2007: I Región de Tarapacá: en regiones de Arica y Parinacota, y de Tarapacá; X Región de Los Lagos: regiones de Los Ríos y de Los Lagos.

Los resultados del proyecto precursor permitieron establecer la potencialidad que tiene el uso de bacterias como *Pasteuria penetrans* y otros bacilos, para el control de nemátodos que atacan principalmente tomate y vid y, en menor proporción, cítricos. El comportamiento de estos microorganismos demostró ser satisfactorio, no sólo en cuanto a lograr el objetivo general planteado, sino también, dado el potencial desarrollo de una formulación comercial para la venta del biocontrolador.

En síntesis, los resultados generaron una experiencia valiosa en las líneas de investigación implementadas y respondieron a los objetivos propuestos, como se analiza en el presente documento; sin embargo, todavía existen asuntos pendientes que deben resolverse para convertir estas experiencias en una tecnología disponible para los usuarios.

En general, el proyecto precursor permite rescatar el conjunto de aprendizajes técnicos que dan lugar a una nueva herramienta para la industria hortícola, vitivinícola y frutícola, actualmente en desarrollo.

## ► 2. Objetivo del documento

---

Este documento se propone extraer y sistematizar, a partir de las experiencias y lecciones aprendidas en el proyecto precursor, los elementos que resultan claves para acondicionar la puesta en marcha y posterior validación de la aplicación de bacterias en el control de nemátodos fitoparásitos que afectan los cultivos de tomate, vid y cítricos.

## ► 3. Base conceptual y tecnológica de la herramienta

---

La herramienta tecnológica en aprendizaje se refiere al “uso de bacterias nativas para el control de nemátodos fitoparásitos que afectan al tomate, vid y cítricos”. El contexto y valor de esta innovación se señala a continuación.

### 3.1 Problemas ocasionados por nemátodos en tomates, vides y cítricos

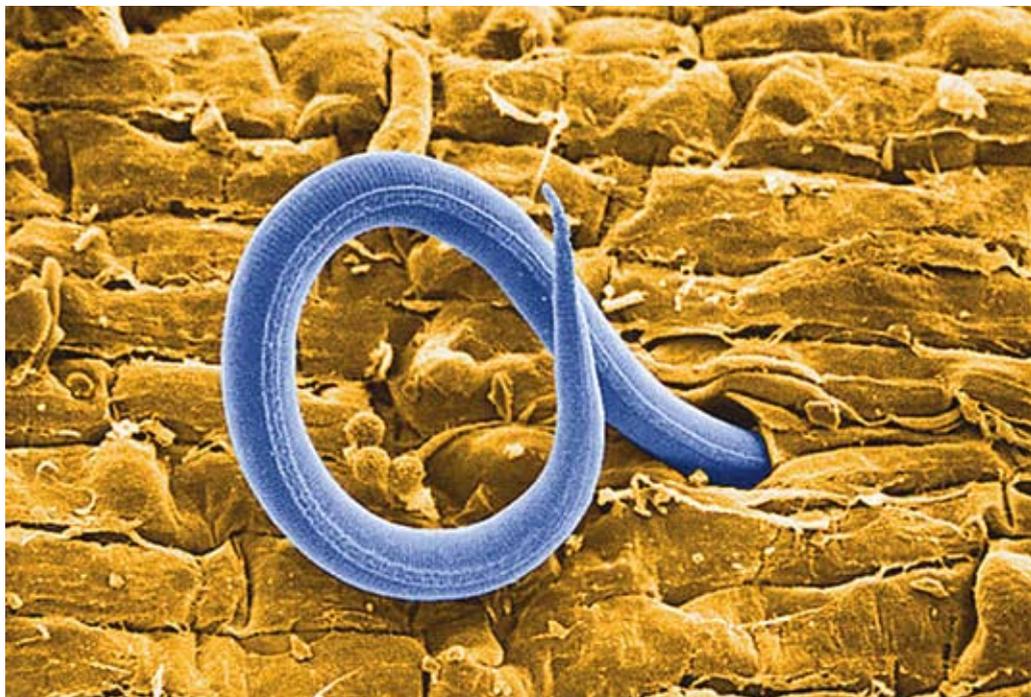
---

Los nemátodos fitoparásitos constituyen una de las plagas agrícolas más importantes para diversos cultivos; los más afectados son los tomates, vides y cítricos.

Estos microorganismos presentan dispersión agrupada, no azarosa, y son fácilmente transportables mediante cursos de agua, material vegetal y herramientas de trabajo, entre otros.

Los daños que pueden provocar son múltiples, dependiendo del género; algunos perforan las raíces con su aparato bucal (estilete) y otros las anidan provocando agallas o nódulos, lo cual produce un efecto desvigorizante en la planta, que puede presentar importantes repercusiones en el rendimiento productivo, ya sea por destrucción del sistema radicular, por la pérdida de nutrientes o porque las heridas permiten la entrada a otros agentes infecciosos, como hongos y virus.

Desde el punto de vista económico, las especies de nemátodos más importantes para los cultivos de tomates, vides y cítricos son, respectivamente: *Meloidogyne* spp., *Xiphinema* spp. y *Tylenchulus* spp., que se describen a continuación.



SCIENCE SOURCE/SCIENCE PHOTO LIBRARY

Nemátodo *Meloidogyne incognita* en hoja de tomate

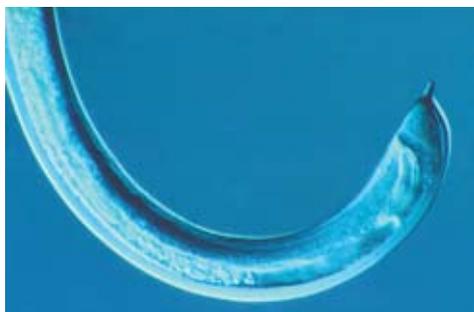
### ***Meloidogyne* spp.**

Se han descrito numerosas especies para este género. Son organismos endoparásitos sedentarios; las hembras penetran las raíces y se aposentan en el interior, lo que provoca que las células vegetales contiguas sufran hiperplasia e hipertrofia, lo cual genera agallas o nódulos. En este sector se forma una matriz gelatinosa, donde las hembras depositan los huevos.

Las especies presentan una amplia distribución nacional y atacan, entre otros cultivos, a vides y hortalizas (polífagos). Algunos de los síntomas que produce en su hospedador son: marchitez, enanismo y clorosis, como producto de la pérdida de productividad de las raíces infectadas, lo cual provoca una baja de los rendimientos del cultivo hasta valores de 24 y 38% en vides y cítricos, situación que no ocurre en tomate.

### ***Xiphinema* index**

Este nemátodo es ectoparásito y se le conoce también como nemátodo daga, precisamente porque utiliza su aparato bucal (estilete) para alimentarse de las raíces a través de pequeños orificios, sin llegar a la zona vascular y sin introducirse en el sistema radicular. Estas heridas producen deformidad de las raíces y la colonización de otros patógenos, como el virus del entrenudo.

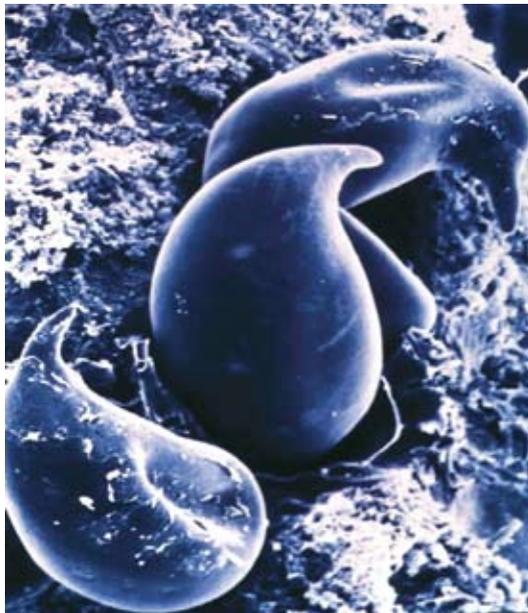


Esta plaga se alimenta casi en forma exclusiva de la vid; en la zona central de Chile, el 69% de la superficie plantada se encuentra con algún grado de infestación. En estos huertos el efecto desgastante se traduce en la pérdida de vigor y en la baja del rendimiento productivo hasta en un 20%.

### ***Tylenchulus semipenetrans***

Es un semiendoparásito, como su nombre lo indica, ya que las hembras introducen la porción anterior de su cuerpo en el hospedador para alimentarse, generalmente cerca unas de otras; posteriormente se vuelven sedentarias y secretan una masa gelatinosa donde depositan sus huevos. Este nemátodo también se conoce como “de los cítricos”, porque los ataca principalmente, aunque también se ha observado en olivos, en menor cantidad.

Los síntomas que provoca son poco específicos, por lo que cuesta determinar su presencia, incluso se le llama “decaimiento lento”, ya que las plantas no mueren, sólo disminuyen su vigor, la tasa de crecimiento y el rendimiento, el cual se ha estimado entre 10 y 34% menor al normal. En casos extremos las hojas se ponen cloróticas y las ramas pueden desfoliarse e incluso llegar a desprenderse.



### **3.2 Técnicas de control de nemátodos en los cultivos**

Una vez que el cultivo está asentado, se utilizan diversas técnicas o estrategias que incluyen desde la aplicación preventiva, hasta el control activo, por ejemplo:

- Rotación de cultivos.
- Uso de porta injertos tolerantes o resistentes.
- Esterilización del suelo o de las raíces a través de la solarización o el uso de calor.
- Fumigación con productos químicos.
- Enmiendas orgánicas.

La efectividad de estas medidas se asocia fuertemente con la presión de la plaga y la oportunidad del manejo, por lo tanto, cuanto más temprano se implemente, mejor será el resultado. Además, no todas las técnicas son efectivas para todos los géneros, ni posibles de aplicar en todos los cultivos, como los portainjertos de tomate o la fumigación con agroquímicos de huertos orgánicos.

Los agricultores, en general, privilegian el uso de compuestos químicos en el control activo, con el fin de mantener baja la población de la plaga, aún cuando esta práctica produce la destrucción de la flora antagonista que la controla; se suma el hecho que provoca inmunidad en los nemátodos haciéndolos cada vez más tóxicos y resistentes a los compuestos aplicados.

Otras alternativas que existen para el control activo son:

- Nematicidas orgánicos a base de microorganismos o de extractos vegetales tóxicos para los nemátodos.
- Cultivos trampa.
- Enmiendas orgánicas frescas.

### 3.3 Características de las bacterias benéficas seleccionadas: *Pasteuria* y *Bacillus*

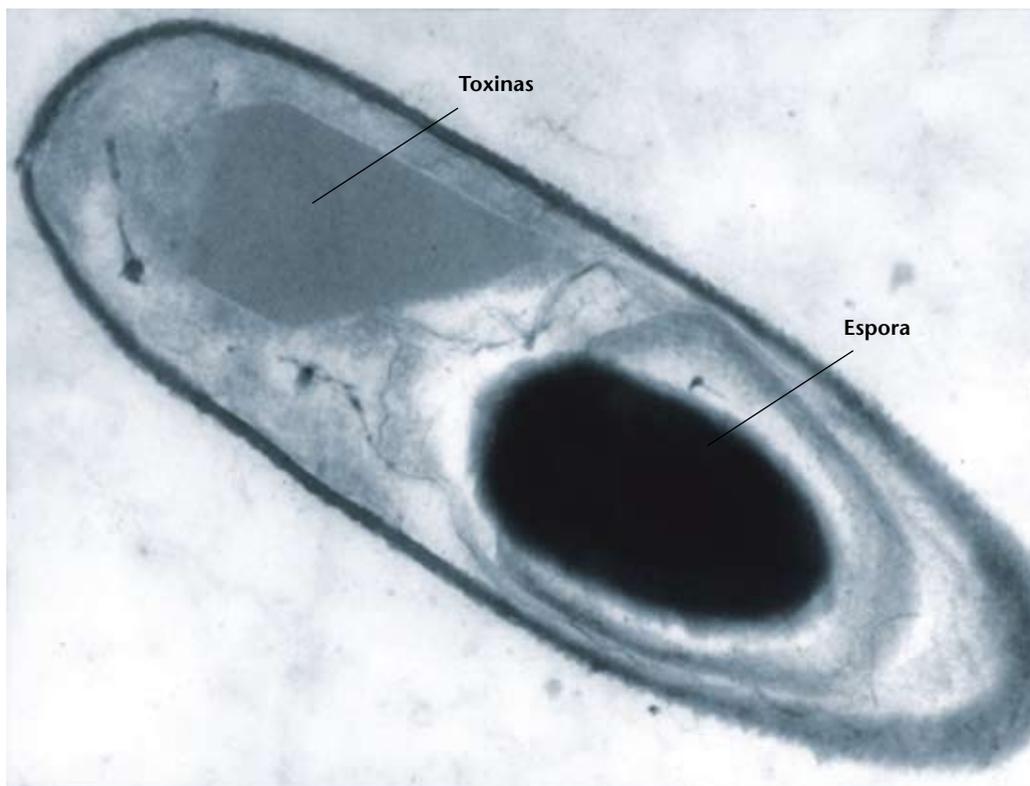
El proyecto se concentró en seleccionar organismos que viven asociados al hábitat natural de los nemátodos; destacan bacterias del género *Pasteuria* y *Bacillus*. Estos microorganismos producen esporas de resistencia que soportan más de 60 °C sin perder viabilidad. Además, son parásitos obligados, por lo que necesitan completar su ciclo de vida en asociación con el nemátodo huésped, característica que los hace altamente específicos y con un rango de asociación muy estrecho.

Específicamente, *P. penetrans* presenta un talo vegetativo dicotómico y sus endosporas se adhieren a la cutícula del nemátodo hospedador específico, para su posterior activación. Estas estructuras son las responsables de la diseminación de la bacteria, ya que son liberadas al medio desde el cuerpo del nemátodo infectado una vez que se produce su ruptura. Aunque se han realizado múltiples investigaciones en todo el mundo considerando su gran potencial como controlador biológico de nemátodos, aún no se ha determinado su papel en la regulación de la dinámica poblacional de nemátodos en campos agrícolas.

El género *Bacillus* presenta distintas formas de control: libera toxinas al ambiente que afectan la morfología de los huevos y de los juveniles (J2) de los nemátodos y, según la especie, puede colonizar ambos estados; también forma esporas que producen proteínas tóxicas para nemátodos y distintos tipos de insectos, como, por ejemplo, endotoxinas que corresponden a inclusiones cristalinas de naturaleza proteica con una subunidad tóxica.

Las toxinas de *Bacillus* spp. se consideran beneficiosas además porque son ambientalmente seguras, son parte natural del suelo e inocuas para otros seres vivos (mamíferos, incluido el hombre, plantas, aves y otros).

Sección longitudinal de *Bacillus thuringiensis*, bacteria nematocida



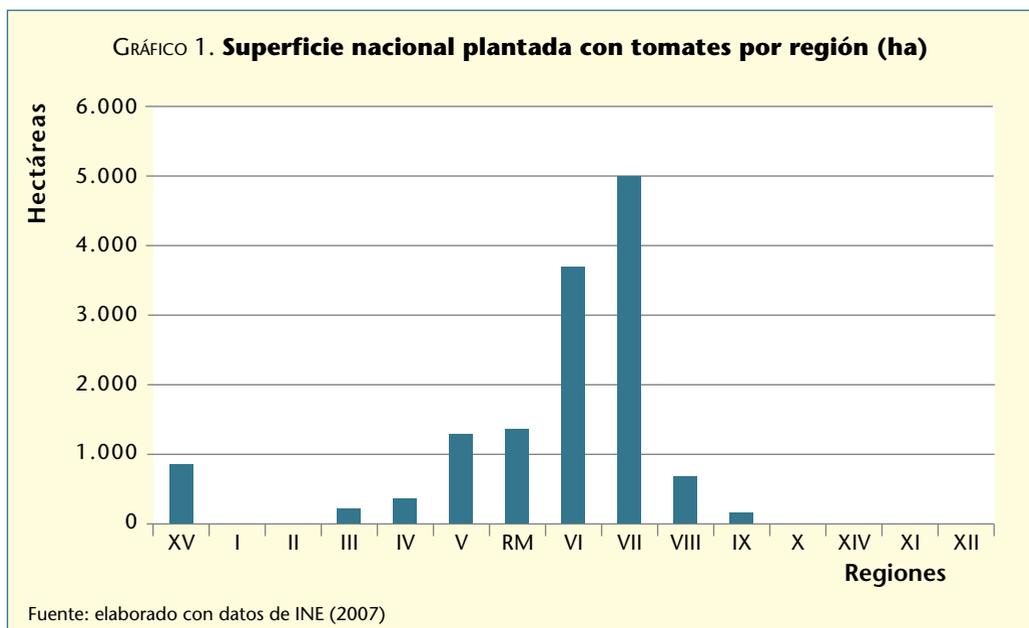
## ► 4. Situación nacional: cultivos de tomates, vides y cítricos; nematicidas

### 4.1 Cultivos

#### Tomate

En Chile el tomate es el tercer cultivo hortícola en importancia después del choclo y la lechuga. Entre 1998 y 2008 su producción promedio fue de 1,24 millones de toneladas y en general se ha mantenido estable (Faostat [en línea]).

Según el Censo Agropecuario y Forestal de 2007, la superficie plantada para consumo fresco y agroindustria fue de 13.626 ha ese año (cultivos al aire libre y forzados; gráfico 1). El 17% de la producción para cultivo fresco proviene de invernaderos y el 83% de superficies al aire libre (INE, 2007).



Se observa que la mayor superficie plantada se encuentra en la Región del Maule (36,6%; 4.992 ha), seguida por la de O'Higgins (cerca del 27%; 3.695 ha), la Metropolitana (cerca del 10%; 1.355 ha) y la de Valparaíso (9,4%; 1.285 ha). También es importante la producción de la Región de Arica y Parinacota, con cerca de 840 ha.



GUILLERMO FEUERHAKE

## Vides

El cultivo de la vid de mesa es el de mayor extensión en Chile en cuanto a frutales y en 2007 alcanzó las 62.411 ha (INE, 2007), superficie que representa el 19% del total de frutales mayores y menores.

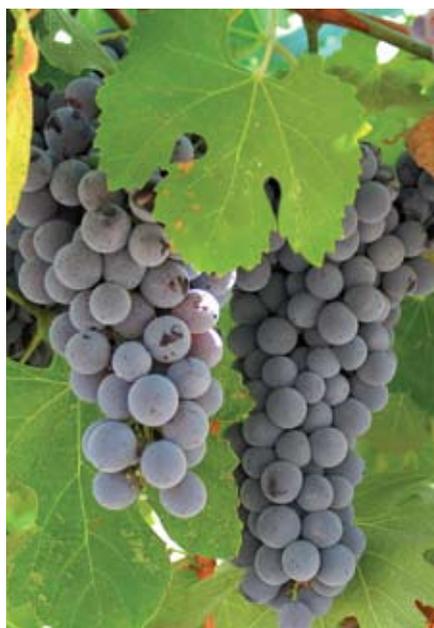
La distribución de este cultivo es amplia en el territorio; aunque se concentra entre las regiones de Atacama y del Maule, también existen algunas ha en zonas más extremas como la Región de Antofagasta y de La Araucanía. Respecto de las uvas viníferas, la mayor superficie se encuentra en la Región del Maule, seguida de la de O'Higgins (cuadro 1).

CUADRO 1. Superficie nacional plantada con viñas y parronales por región (ha)		
REGIÓN	SUPERFICIE	
	ha	%
Arica y Parinacota	45	0,03
Tarapacá	0	0,00
Antofagasta	6	0,00
Atacama	723	0,56
Coquimbo	12.227	9,48
Valparaíso	7.233	5,61
Metropolitana	12.064	9,35
O'Higgins	35.528	27,54
Maule	45.514	35,28
Biobío	15.613	12,10
La Araucanía	31	0,02
Los Lagos	8	0,01
Los Ríos	0	0,00
Aysén	0	0,00
Magallanes	0	0,00
<b>Total país</b>	<b>128.992</b>	<b>100</b>

Fuente: elaborado con datos de INE (2007).

Chile es un gran productor de uvas, tanto para vino como para consumo fresco; en el primer caso, en el período 1990 - 2007 la producción nacional de vinos aumentó de 2.822.390 hectolitros<sup>4</sup> a 8.682.970, lo cual representa un crecimiento de más de 200%; en la vendimia 2009, la cosecha produjo casi 10 millones de hl.

Con relación a la producción de vid de mesa, la variedad Thompson seedless ha sido la más desarrollada en Chile, tanto en volumen exportado como en hectáreas plantadas. Considerando todas las variedades que se exportan, Chile se ubica en el primer lugar de los países exportadores del hemisferio sur, con más de 900.000 t. Los principales destinos son: Estados Unidos (53%) y Asia, con 22,7% hasta 2006, ya que desde ese año Europa incrementó su consumo hasta un 25,3% (ODEPA [en línea]).



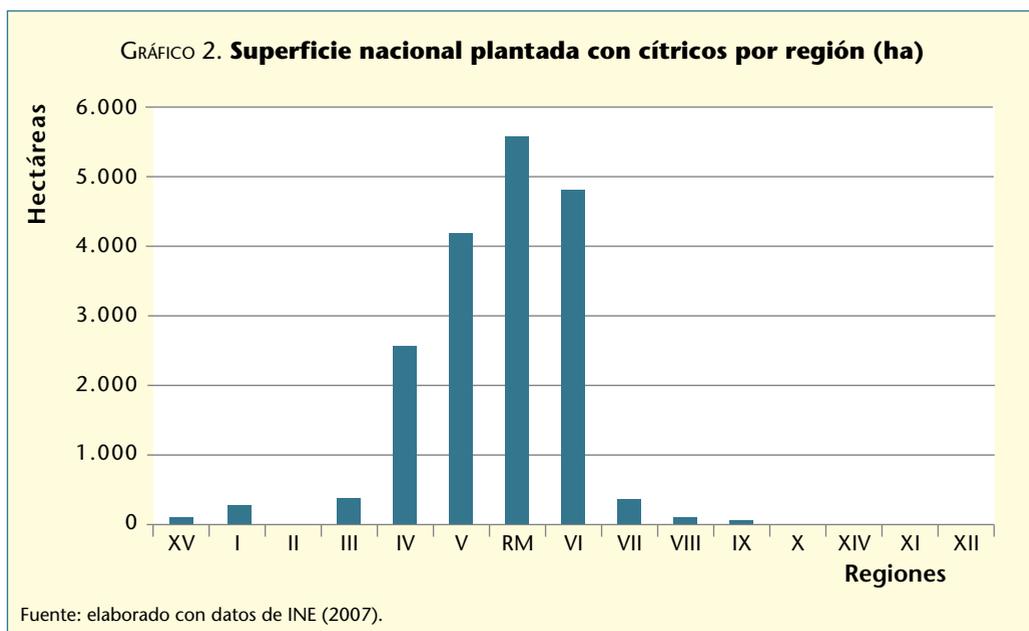
<sup>4</sup> 1 hl = 100 litros.



GUILLERMO FEUERHAKE

### Cítricos

Con casi 18.000 ha en 2007, la superficie nacional de cítricos<sup>5</sup> representa cerca del 5,7% del total de frutales del país (INE, 2007). Predomina la Región Metropolitana (cerca del 30%; 5.549 ha), seguida de O’Higgins (25%; 4.792 ha) y Valparaíso (22%; 4.166 ha) (gráfico 2).



La producción nacional conjunta de limones, limas y naranjas se ha incrementado en 69% entre 1999 y 2008, desde 198.000 a 335.000 t (Faostat [en línea]).

<sup>5</sup> Lima, limón de Pica, limonero, mandarina, naranjo, pomelo y tangelo.

## 4.2 Nematicidas

En general los nematicidas son productos químicos de amplio espectro, provocan una disminución de la población de nemátodos y de su capacidad de infestación, pero ninguno es capaz de eliminarlos del suelo completamente.

Los primeros nematicidas descubiertos a principios de los años 40, como el D-D y el EDB, eran fumigantes. Treinta años más tarde aparecieron los productos no fumigantes, formulados principalmente como gránulos o líquidos, como los grupos carbamatos y organofosforados, que presentan menos espectro biocida que los primeros, así como menor toxicidad para los cultivos. La efectividad de este tipo de productos depende de factores como su degradación en el suelo y movimiento, dispersión, temperatura, pH y de su capacidad de movilización dentro de la planta.

En Chile el producto clásico utilizado por años ha sido el bromuro de metilo (BrM), un fumigante que requiere de la cobertura con plástico en el sector que se aplica. Este producto es fitotóxico, por lo que se aplica antes del establecimiento del cultivo y previa subsolación. También se utilizan productos químicos no fumigantes, como Nematicur, que tiene menor toxicidad y mayor acción nematicida en el tiempo; lleva 30 años en el mercado chileno y es uno de los nematicidas de mayor uso, al haber demostrado gran efectividad.

Considerando que en el año 2015<sup>6</sup> quedará prohibido el uso de este nematicida, actualmente existen alternativas como el 1-3 dicloropropeno, que se comercializa como Triform, y que tiene menor presión de gas que el BrM, pero requiere de las mismas medidas de aplicación. Además, nuevos productos naturales se han incorporado al mercado, como diversos controladores biológicos y extractos de plantas con efecto tóxico, por ejemplo, el QL Agri 35 (saponinas del extracto de quillay), que presenta un menor impacto ambiental y características nematicidas similares al Nematicur y Mocap, que se comercializan en Chile desde el año 2002.

El Servicio Agrícola y Ganadero, SAG, es el organismo encargado de llevar el registro nacional oficial de plaguicidas, y clasifica los nematicidas en la serie 1000, que incluye los insecticidas, rodenticidas y acaricidas.

El cuadro 2 muestra los productos contra nemátodos registrados como plaguicidas autorizados por el SAG, a agosto de 2010.<sup>7</sup>



<sup>6</sup> En 1990 Chile ratificó el Protocolo de Montreal para reducir gradualmente hasta eliminar por completo, en el año 2015, el uso de bromuro de metilo, debido a su comprobada acción adelgazante de la capa de ozono.

<sup>7</sup> <[www.sag.gob.cl](http://www.sag.gob.cl)>.

CUADRO 2. **Nematicidas con autorización vigente del SAG, a agosto de 2010**

Nombre comercial	Ingrediente activo	Grupo químico	Toxicidad	Modo de acción
FURADAN 4 F	Carbofurano	Carbamato	Rojo	Contacto e ingestión
FURADAN 10 G	Carbofurano	Carbamato	Amarillo	Sistémico, contacto e ingestión
DUPONT VYDATE G	Oxamyl	Carbamatos	Rojo	Contacto y traslocación
ANACELHONE NE	1,3 dicloropropeno/ cloropicrina	Organoclorado	Rojo	Contacto, ingestión y fumigante
TRI-FORM	1,3 - dicloropropeno	Organoclorado	Rojo	Fumigante
NEMACUR	Fenamifos	Organofosforado	Amarillo	Sistémico, contacto e ingestión
RUGBY 200 CS	Cadusafos	Organofosforado	Amarillo	Contacto e ingestión
RUGBY 10 G	Cadusafos	Organofosforado	Amarillo	Contacto
METABROMO 1000	Bromuro de metilo	Órganobromado	Rojo	Fumigante
ENZONE	Tetratiocarbonato de sodio	Tiocarbonatos	Amarillo	Contacto
MICOSPLAG WP	Mezcla de hongos	Biológico	Verde	Biocontrol de nemátodos en el suelo
DITERA WG	<i>Myrothecium verrucaria</i>	Biológico	Verde	Contacto
BIOSTAT WP	<i>Paecilomyces lilacinus</i> cepa atcc 38740	Biológico	Verde	Parasita y produce toxinas
QL AGRI 350	Extracto de quillay	Biológico	Verde	Contacto
BIOREND-R	Quitosano	Polisacáridos, enraizantes	Verde	Biológico

Fuente: elaborado con información del registro oficial de plaguicidas del SAG, a agosto de 2010.

Este registro incluye también cinco nematicidas de tipo biológico, que son los únicos inocuos para el ambiente, plantas y animales, incluidas otras especies de insectos; ello se debe a que los controladores naturales en general son altamente específicos, además de biodegradables. Cabe destacar que de los cinco productos autorizados, tres corresponden a hongos nematicidas, uno es a base de extracto de quillay y el otro es un enraizante natural (quitosano) que mejora la condición de las raíces de las plantas y que puede ser utilizado en conjunto con alguna otra aplicación.

Otros productos a base de compuestos de plantas como *Calendula officinalis*, *Tagetes patula* o *Thymus vulgaris* están actualmente (agosto de 2010) en evaluación, lo mismo que la herramienta innovadora originada en el proyecto precursor, que utiliza bacterias para el control de nemátodos.

### 4.3 El valor de la herramienta

La herramienta tecnológica que se presenta en este documento es, fundamentalmente, una alternativa para el control de los nemátodos más importantes que afectan los cultivos nacionales, como *Meloidogyne* y *Xiphinema*, principalmente en tomate y vid.

Su desarrollo surge básicamente por la motivación de encontrar nuevas soluciones para controlar esta plaga, que reemplacen al bromuro de metilo, acorde a las demandas actuales de conservación ambiental; en este contexto, el requerimiento bacteriano de parasitar los nemátodos señalados, para continuar su ciclo, las convierte en agentes controladores biológicos efectivos. Si se suma su capacidad de formar endosporas para su preservación, entonces estos microorganismos constituyen un producto comercial potencial para ser utilizado contra los nemátodos fitopatógenos

## ► 5. Conveniencia económica para el productor

### 5.1 Análisis económico de los controles químico y biológico

Para ilustrar el valor de esta nueva tecnología, a continuación se señalan algunos datos relevantes del cultivo del tomate, necesarios de considerar en la evaluación de la conveniencia económica de utilizar este producto en plantaciones comerciales (en el anexo 1 se detallan los costos de inversión y el flujo de fondos del modelo productivo).

#### Consideraciones generales:

- Cultivo: tomate nacional de dos temporadas/año.
- Superficie: 1 ha para la comparación.
- Producción: 140 t/ha/año en un cultivo sano.
- Precio promedio pagado a productor: \$ 200/kg.<sup>8</sup>
- Pérdidas promedio de producción por ataque de nemátodos: 30%.
- Control de nemátodos durante cinco años o 10 temporadas: para visualizar el impacto del daño de la plaga y de los costos asociados en el tiempo de vida útil de las instalaciones.
- Dos opciones de control: fumigación química cada dos temporadas con aplicación de nematicida químico intercalado y nematicida biológico de aplicación en cada temporada.

#### Consideraciones para la alternativa de control químico:

- Aplicación de bromuro de metilo: pre plantación para fumigar y repetición del procedimiento cada dos temporadas.
  - Dosis: 52 bombonas/ha; la aplicación tiene un costo aproximado de \$ 516.000/ha.
- Aplicación de un nematicida químico (Rugby 10G) durante las temporadas siguientes a las fumigaciones.
  - Dosis: 15 l/ha.
  - Valor aplicación: \$ 255.000/ha, aproximadamente.

#### Consideraciones para la alternativa de control biológico:

- Producto: herramienta señalada en el proyecto precursor, a base de bacterias formadoras de esporas de los géneros *Bacillus* y *Brevibacillus* (BFE<sup>9</sup>).
- Aplicación: dos veces/temporada (en almácigo y trasplante).
  - Dosis: 4 kg/ha.
  - Precio estimado puesto en el mercado: \$ 35.000/kg.
  - Valor aplicación: \$ 280.000/temporada en total.

Con estos datos se simuló el ataque de nemátodos a una producción de tomates bajo invernadero y su recuperación/temporada, con un 30% de pérdida y un 60% de eficacia de cada control (cuadro 3).

<sup>8</sup> Valor según fuentes informadas de la industria.

<sup>9</sup> Bacterias formadoras de esporas

Cuadro 3. **Pérdida y recuperación de la producción de tomate bajo invernadero (t/ha)**

Producción (t/ha)	AÑO									
	1		2		3		4		5	
	Temporada									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Potencial</b>	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
<b>Con ataque de nemátodos</b>										
Sin control	70	49	34	24	17	12	8	6	4	3
Con control químico	70	62	70	62	70	62	70	62	70	62
Con control biológico	67	67	67	67	67	67	67	67	67	67

Fuente: elaborado con datos de agentes de la industria.

En el caso del control químico se observa la fluctuación esperada de la población de nemátodos, producto de la aplicación del fumigante (BrM) que reduce casi en un 100% la plaga y que se utiliza cada dos temporadas para evitar la recuperación de los parásitos. Con este fin se aplica también el nematicida químico (Rugby 10G) intercaladamente con el fumigante, con el objeto de mantener una población de nemátodos que no cause un gran daño a la producción.

Por otra parte, el proyecto precursor demostró que el producto a base de BFE tiene una eficacia cercana a la del BrM y provoca un efecto similar; respecto la tasa de reproducción de los nemáto-

Raíces de vid infectadas por nemátodos



USDA

dos, su eficacia puede llegar a ser superior a la de un producto químico. Como consecuencia, al aplicar dos veces durante la temporada, en almácigo y trasplante, el producto genera una efectiva protección del cultivo. Por ello se observa un efecto eficaz, que permanece en el tiempo, sumatorio además en cada temporada debido al equilibrio que se alcanza entre la plaga y el controlador, lo que conduce finalmente a prescindir de las aplicaciones consecutivas de BrM.

Los cuadros 4 y 5 muestran el efecto económico total que produce la aplicación de ambos tipos de control: costos de los tratamientos y pérdida de ingresos como consecuencia de la merma productiva.

**CUADRO 4. Costos de aplicación y merma de control químico en cultivo de tomate bajo invernadero (t/ha)**

Efectos/costos del control químico	AÑO				
	1	2	3	4	5
Recuperación (60%) post aplicación del control (t/ha)	132	132	132	132	132
<b>Costos (\$/ha)</b>					
Tratamiento	771.000	771.000	771.000	771.000	771.000
Merma de la producción	1.680.000	1.680.000	1.680.000	1.680.000	1.680.000
Total costo anual	2.451.000	2.451.000	2.451.000	2.451.000	2.451.000
Total costo (acumulado)	2.451.000	4.902.000	7.353.000	9.804.000	12.255.000

Fuente: elaborado con datos de agentes de la industria.

**CUADRO 5. Costos de aplicación y merma de control biológico en cultivo de tomate bajo invernadero (t/ha)**

Efectos/costos del control biológico	AÑO				
	1	2	3	4	5
Recuperación (60%) post aplicación de control (t/ha)	133	133	133	133	133
<b>Costos (\$/ha)</b>					
Tratamiento	560.000	560.000	560.000	560.000	560.000
Merma de la producción	1.344.000	1.344.000	1.344.000	1.344.000	1.344.000
Total costo anual	1.904.000	1.904.000	1.904.000	1.904.000	1.904.000
Total costo acumulado	1.904.000	3.808.000	5.712.000	7.616.000	9.520.000

Fuente: elaborado con datos de agentes de la industria.

A la luz de estos resultados económicos, la alternativa de control biológico surge como una opción más rentable que la química, no sólo por el costo total anual que se aprecia en cada uno de los controles y que es menor para el tratamiento con BFE, sino además, porque el control constante de la población de nemátodos, provoca una notoria disminución de la merma de producción. Cabe recordar que estas bacterias son capaces de formar esporas, por lo que pueden estar latentes durante los períodos en que los nemátodos no están activos; este es un factor que puede resultar importante al considerarse otras especies, y que en los tomates, por ser de doble temporada, los nemátodos disponen casi continuamente de la alimentación necesaria para su desarrollo.

Al término del período de cinco años de producción se observa que el control químico tiene un costo total acumulado de \$ 2,73 millones más que el biológico.

## 5.2 Externalidades positivas de la herramienta tecnológica

En el análisis anterior se aprecia la conveniencia económica para el productor de tomates que utilice esta herramienta tecnológica. Aunque también existen otros beneficios a considerar, algunos aún no han sido completamente evaluados, por lo que son de difícil estimación, mientras que otros son comunes a todos los productos de control biológico y sus beneficios son conocidos.

- En la etiqueta de los productos químicos se advierte del desarrollo de resistencia de los individuos remanentes de la plaga que combaten, por lo que se recomienda alternar con otros productos de mayor toxicidad, de otro compuesto activo o aumentar la dosis en algunos casos. Esto a la larga produce un mayor costo para lograr el mismo efecto de control, lo que no sucede al utilizar un producto de origen natural que se basa en el equilibrio natural plaga-controlador, mediante el control de la población patogénica por debajo de los límites del umbral de daño económico.

Nemátodos *Xiphinema index* aislados de tierra de un viñedo



- Durante el desarrollo del proyecto precursor se observaron aumentos de hasta un 10% en el crecimiento de las plantas de tomate y de su producción, en comparación con el uso de productos tradicionales. Aunque ello no fue evaluado directamente, se espera que sea un efecto permanente en todas las aplicaciones de las BFE, producto de la protección que genera en las raíces y que permite un mejor desarrollo de la planta.
- El producto, con su alta tasa de eficiencia contra nemátodos, se presenta como una posible alternativa para ser usada en conjunto con diversos controladores (de hongos, virus y otros) y prescindir de la utilización del fumigante bromuro de metilo, frente a su inminente prohibición.
- El producto natural no es tóxico para el ambiente, las plantas del cultivo y el ser humano, por lo que no requiere un período de carencia y de reingreso al cultivo, lo cual facilita la aplicación vía riego y la obtención de los permisos ambientales

## ► 6. Alcances de la herramienta

---

### **Presencia de *Pasteuria penetrans***

Por primera vez en Chile se determinó la presencia de esta bacteria en los suelos. El proyecto contó además con la visita del especialista extranjero Keith Davies, quien confirmó este hallazgo y capacitó al personal del proyecto en la aislación, identificación y reproducción de las cepas.

### **Metodología de detección de BFE**

Se aisló e identificó un grupo de bacterias con capacidad nematicida y formadoras de endosporas, pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Brevibacillus*, las que demostraron ser importantes controladoras de nemátodos, con efecto similar al BrM, además de ser compatibles con el cultivo *in vitro*, lo que facilita su producción comercial.

### **Base científica y tecnológica**

Se generaron las capacidades científicas y técnicas necesarias para continuar con la exploración, detección y aislamiento de diferentes bacterias y otros organismos. Ello permitiría controlar biológicamente nemátodos y potencialmente aumentar el pool de organismos para este tipo de control de distintas plagas y enfermedades.

### **Desarrollo de un producto comercial**

Los resultados de los ensayos con BFE permiten desarrollar un producto biocontrolador de nemátodos fitoparásitos con niveles de control similares a los producidos por plaguicidas químicos. En este sentido, se realizaron avances importantes en la definición y desarrollo de una ficha técnica del producto, con el fin de ser usado especialmente en cultivos de tomate y vid, y en menor grado en cítricos, contra los géneros *Meloidogyne* y *Tylenchulus*.

## ► 7. Asuntos por resolver

---

Aunque el proyecto precursor resolvió los objetivos propuestos y produjo logros adicionales, quedaron desafíos pendientes por resolver antes que la herramienta esté lista y que sea aplicable, como los siguientes.

### **Producción de *Pasteuria penetrans***

Tanto el proyecto, como otras investigaciones internacionales, aún no definen un método para reproducir las cepas de *P. penetrans* a escala industrial, aunque existen métodos para producción a escala local. Por esto es necesario continuar el estudio, a fin de desarrollar el método, ya que esta bacteria presenta diversas ventajas como una mayor especificidad y menor dependencia de las condiciones ambientales, para su efectividad de control.

### **Sistema de producción comercial**

En cuanto a las BFE, para las que se obtuvieron las bases tecnológicas para el desarrollo de un producto comercial, se recomienda seguir evaluando nuevas cepas y los procesos de secado, ya que, si bien se determinó una temperatura a la que aumenta el número de esporas, la población final obtenida es menor a la esperada, en comparación con la cantidad de UFC<sup>10</sup> iniciales. Por otra parte, se determinó que estas cepas son capaces de crecer a 37 °C, lo que incrementa el riesgo de restricciones para su registro.

### **Selección de cepas**

Una vez terminado el proyecto, se han recolectado y seleccionado nuevas cepas que han demostrado buenos niveles de control, escalabilidad comercial y ausencia de riesgos para la salud humana; por ello está en proceso de evaluación la formulación definitiva, con el fin de iniciar el registro oficial.

### **Proceso de registro del producto**

Actualmente la formulación definitiva de las cepas está en proceso de evaluación de toxicidad y de ensayos de eficacia, antes de iniciar el proceso de registro SAG; se estima una salida al mercado a fines de 2013.

---

<sup>10</sup> Unidad formadora de colonia.

## SECCIÓN 2

# El proyecto precursor

## ► 1. El entorno económico

Los nemátodos fitoparásitos son uno de los más importantes agentes causales de enfermedades y pérdidas económicas en la agricultura mundial. Esto se debe principalmente a su forma de dispersión y a que no existe una solución completamente eficaz para detener la plaga.

Dentro de los cultivos vegetales comerciales más afectados por nemátodos se encuentran los cítricos, tomates y vides, los cuales pueden ser colonizados por diferentes especies; las más importantes desde el punto de vista económico son las pertenecientes a los géneros *Tylenchulus*, *Meloidogyne* y *Xiphinema*, respectivamente. Sólo en la zona central de Chile, casi el 70% de los predios cultivados con vid se encuentran con algún tipo de infestación por estos parásitos.

Para el control de nemátodos se utilizan diversas técnicas o estrategias que incluyen desde la rotación de cultivos hasta el uso de fumigantes del suelo, con resultados erráticos y/o a largo plazo. Por ello los agricultores privilegian el uso de compuestos químicos de alta toxicidad que resuelven



el problema a nivel de suelo en forma inmediata. Sin embargo, las poblaciones no son totalmente destruidas y con el paso del tiempo comienzan a aumentar, apareciendo en forma más severa con nuevos individuos resistentes a los productos químicos anteriormente utilizados, lo cual se facilita, además, por la eliminación de los organismos antagonistas producto del uso de los químicos.

Por otro lado, la gran toxicidad de los químicos empleados, sumada a su larga permanencia en el suelo, hacen que su uso esté siendo cada vez más limitado por consideraciones medioambientales, lo cual está favoreciendo, internacionalmente, el uso de alternativas de control biológico.

Lo anteriormente descrito corresponde al escenario presente al momento del desarrollo del proyecto precursor. Así, para su implementación y con el fin de proporcionar una nueva alternativa de control de nemátodos, acorde con las exigencias ambientales actuales, se seleccionaron microorganismos que viven asociados al hábitat natural de los nemátodos, entre los cuales destacan bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pasteuria*. Estas especies son biocontroladores naturales y parásitos obligados, ya que necesitan del nemátodo para continuar con su ciclo de vida, lo cual produce que cada cepa bacteriana presente un alto grado de especificidad, con lo cual se obtienen niveles de eficacia similares a los productos químicos.

## ► 2. El Proyecto

---

Los análisis y resultados que se presentan en este documento se desprenden de las experiencias y resultados de un proyecto realizado por la Universidad de Talca y el agente asociado Bio Insumos Nativa Ltda., en las regiones Metropolitana, de O'Higgins y del Maule, denominado "Evaluación de Cepas Nativas de la Bacteria *Pasteuria penetrans* para el Biocontrol de Nemátodos Fitoparásitos Asociados a Cultivos de Vid, Tomate y Cítricos", ejecutado entre diciembre de 2004 y noviembre de 2008, con una duración de 47 meses.

El objetivo principal del proyecto fue "recolectar, aislar y evaluar la capacidad biocontroladora de cepas nativas de *Pasteuria penetrans* (*Pp*) recolectadas entre las regiones I y X, para nemátodos fitoparásitos causantes de enfermedades en cultivos de vid, cítricos y tomate".

### 2.1 Objetivos específicos

---

- Recolección y reproducción de cepas nativas de *Pp*.
- Evaluación de la capacidad controladora in vitro de cepas nativas de *Pp* para los nemátodos fitoparásitos *Xiphinema*, *Meloidogyne* y *Tylenchulus*.
- Evaluación in vivo de la capacidad biocontroladora de las cepas de *Pp* efectivas en cultivos de tomate, vid y cítricos, inoculados con *Xiphinema*, *Meloidogyne* y *Tylenchulus*.
- Evaluación en campo de la capacidad biocontroladora de las cepas de *Pp* efectivas en cultivos establecidos por agricultores de la zona y con historial de ataques por nemátodos.
- Desarrollar un sistema de producción masivo y de almacenaje de las cepas de *Pp* biocontroladoras efectivas, que genere una formulación comercial.
- Difundir ampliamente los resultados alcanzados en el proyecto entre grupos de agricultores con potencialidad de adoptar esta tecnología.

## 2.2 Metodología

El proyecto se dividió en cinco etapas, las cuales se sintetizan a continuación:

- I. Prospección y aislamiento de cepas de *Pasteuria* spp.
- II. Evaluación *in vitro*
- III. Evaluación *in vivo*
- IV. Evaluación en campo
- V. Desarrollo y transferencia de un sistema de producción

### Etapa I. Prospección y aislamiento de cepas de *Pasteuria* spp.

Las muestras de suelo fueron recolectadas en huertos de cítricos, viñas, hortalizas, frutales y zonas silvestres comprendidos entre las regiones del extremo norte de Chile y la de Los Lagos.

La extracción de nemátodos se realizó con el método del embudo de Baermann para cada una de las muestras, con el fin de encontrar y aislar los individuos de *Pp* en las diferentes especies de nemátodos. Luego se procedió a la observación individual de cada población de nemátodos y de los nódulos de hembras de *Meloidogyne*, para detectar la presencia de endosporas adheridas. Los restantes nemátodos aislados fueron almacenados a 4 °C, para posteriormente reproducirlos en suelo estéril y utilizarlos en los ensayos de inoculación de plantas de limón, tomate y vid.

Finalmente se aislaron 21 cepas de *Pp*, aunque sólo se logró reproducir tres de ellas en forma controlada: las cepas 97, 220 y 329. Posteriormente se reprodujeron cepas de *Pasteuria in vitro*, a fin de obtener endosporas. En este ensayo se observó el crecimiento de una bacteria de aspecto bacilar, formadora de endosporas (BFE), determinada mediante secuenciación como parte de la clase Firmicutes, perteneciente a los géneros *Bacillus* y *Brevibacillus*.

### Etapa II. Evaluación *in vitro*

**Capacidad de adherencia de cepas de *Pasteuria* sobre nemátodos fitoparásitos.** En una placa de Petri se colocaron 5 ml de una suspensión con 50 nemátodos fitoparásitos y 1 ml de suspensión de un cultivo de *Pp*; se realizaron cinco repeticiones de cada combinación de cepa bacteriana/nemátodo.

En el caso de *Meloidogyne*, las cepas bacterianas con mayor amplitud de rango de adherencia fueron las 213 y 97 (8 de 10 poblaciones); la primera fue más eficiente en *M. arenaria* y *M. javanica*, mientras que la segunda lo fue en *M. incognita*. Se observó la especificidad que existe entre las cepas, ya que todas demostraron tener incapacidad de adhesión en, por lo menos, una población de *Meloidogyne*.

Además se realizaron ensayos en *Pratylenchus*, donde las cinco cepas bacterianas presentaron capacidad de adhesión en, al menos, una de las poblaciones del nemátodo; las cepas 213, 329 y 97 mostraron la mayor capacidad de infección. En



*Tylenchulus* sólo la cepa 220 presentó cierto grado de adhesión e infección, aunque no en todas las poblaciones del nemátodo. Por otra parte, ninguna cepa de *Pp* logró demostrar capacidad nematicida hacia *Xiphinema*.

**Bacterias formadoras de esporas (BFE) con actividad nematicida.** En placas de Petri se depositaron 10 ml de agua estéril, 80 J2 de *Meloidogyne incognita* y 1 ml de suspensión de esporas a una concentración de  $10^{-8}$  UFC/g de cada una de las distintas cepas encontradas de BFE y a distintas dosis. El ejercicio se replicó con *Tylenchulus semipenetrans* y con *Pratylenchus*. Luego de 72 horas en agitación se observó la población de los nemátodos J2 sobrevivientes, con endosporas adheridas.

Se obtuvieron siete aislados de BFE desde nemátodos infectados (cada uno se identificó como BSP), de los cuales: BSP1 provocó una mortalidad de 100% en *Meloidogyne* y, aunque BSP2 y BSP4 lograron mortalidades estadísticamente similares, fue con dosis de 1,5 y 3 g/litro. En *Tylenchulus*, la única cepa bacteriana con actividad fue BSP2, lo cual demuestra nuevamente un grado de especificidad.

**Determinación de la compatibilidad de BFE con agroquímicos utilizados para el control de nemátodos.** Se suspendieron en matraces de 100 ml con agua destilada estéril 1,5 gr ( $1 \times 10^{-8}$  UFC/g) de cada una de las cepas de BFE y se añadieron las dosis recomendadas por litro de agroquímicos nematicidas (Rugby, Nemacur, Biorend, Mocap y Furadan). Luego se realizó un cultivo para contabilizar la cantidad de colonias vivas, comparadas con un tratamiento control sin los químicos.

En este ensayo, las BFE mostraron una alta compatibilidad con los nematicidas, sin embargo, los productos dirigidos al control de bacterias como óxido cuproso y antibióticos, provocaron un grado de inhibición superior al 70%. Por lo que no deben realizarse aplicaciones conjuntas.

### Etapa III. Evaluación *in vivo*

**Capacidad de supresión de nemátodos fitoparásitos por suelos naturalmente infectados por *Pasteuria*.** Se tomaron muestras de suelos naturalmente infectados con *Pasteuria* y se les aplicó 5 ml de suspensión con 50 nemátodos/ml y sobre esto una planta de 2 hojas verdaderas de tomate. Esto se realizó con 15 tipos diferentes de suelo y 15 poblaciones de *Meloidogyne*, con tres repeticiones por combinación. Estos tratamientos fueron cultivados en cámara de crianza durante 12 semanas, y luego fueron evaluados en cuanto a número de nódulos en las raíces, poblaciones de nemátodos en el suelo, nivel de infección y población final de nemátodos. En *Tylenchulus* se realizó de la misma manera, pero con plantas de naranjo.

De las 15 poblaciones de *Pp*, sólo nueve se adhirieron a juveniles, que correspondieron a ocho poblaciones de *Meloidogyne*. Sin embargo, en ningún caso se observó la presencia de hembras infectadas, por lo que probablemente la espora no tiene la capacidad infectiva o no estuvo presente en las concentraciones necesarias para generar la infección en las hembras. En *Tylenchulus* se observó adhesión en todas las poblaciones.



**Capacidad nematocida de cepas de *Pasteuria* sobre poblaciones de *Meloidogyne* y *Tylenchulus semipenetrans*, en plantas de tomate, vid y limón en condiciones controladas.** Con el fin de realizar las comparaciones pertinentes, los tres ensayos que se presentan a continuación tuvieron un tratamiento negativo (sólo suelo estéril) y uno positivo (inoculado con nemátodos)

- **Ensayo en tomate.** Se trasplantaron plantas de tomate cv. Maria Italia a macetas de 4 litros de capacidad, con sustrato estéril compuesto por arena, compost, perlita y turba (1:2:2:2), además de 3.000 J2 de *Meloidogyne incognita*. Se aplicaron seis tratamientos con bacterias de las cepas 97 y 213 de *Pp*, en dosis de  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  esporas/ml en 500 ml por planta; además de un séptimo con nematocida Furadan en dosis comercial. A las 12 semanas de comenzado el ensayo, se evaluaron las variables: población final, índice de nodulación,<sup>11</sup> altura y peso seco de las plantas, porcentaje de J2 y hembras infectadas.
- **Ensayo en vid.** En macetas de 20 litros de capacidad con un sustrato estéril compuesto por arena, compost, perlita y turba (1:2:2:2), se trasplantaron plantas de vid cv. Merlot y 3.000 J2 de *Meloidogyne arenaria*. Los tratamientos aplicados fueron con las mismas dosis por planta del ensayo en tomate, pero sólo con la cepa *Pp* 213; además, se utilizó el nematocida Nematicur, en lugar de Furadan.
- **Ensayo en limón.** Las plantas de limón cv. Eureka se instalaron con las mismas condiciones del ensayo en vid, pero con 5.000 J2 de *Tylenchulus semipenetrans*. Los tratamientos fueron aplicados con las mismas dosis de esporas por planta, pero con la cepa 329 de *Pp*, además de un tratamiento con Nematicur en dosis comercial.

Los resultados permiten concluir que, para las poblaciones de *Meloidogyne*, ambas cepas de *Pp* (97 y 213) lograron una disminución significativa de la población de nemátodos a la concentración de  $10^6$  UFC/ml, en cultivos de tomate; se obtuvo un resultado similar en el ensayo sobre el mismo nemátodo en plantas de vid, con la cepa 213. Por su parte, la cepa 329 mostró sólo una disminución significativa en la población de *Tylenchulus* en la concentración de  $10^8$  UFC/ml. En general, los niveles de control obtenidos fueron inferiores al provocado por el nematocida químico, pero superiores al control positivo.

Entre los distintos tratamientos con *Pasteuria*, en general no se encontraron hembras de *Meloidogyne* infectadas, aunque sí se observaron diferencias con respecto a J2 infectados: los tratamientos con mayores concentraciones tienden a presentar un mayor porcentaje de J2 infectados; en el ensayo en vid, se observó el mismo patrón que en tomates.

En el ensayo de *Tylenchulus*, todas las concentraciones lograron una disminución significativa respecto al control positivo, pero menos efectivas que el control químico.

- **Ensayos *in vivo* de control de *Meloidogyne* spp. por bacterias con actividad nematocida, bajo condiciones controladas en tomate.** En un predio se establecieron plantas de tomate, cv. Maria Italia de 4 semanas, en macetas de 10 litros, con sustrato estéril de arena, compost, perlita y turba (1:2:2:2) y se inocularon con 3.000 J2 de *Meloidogyne incognita*. Los tratamientos evaluados fueron los siguientes:

Controlador	Dosis	Concentración
<i>Pasteuria</i> cepa 213	50 ml/planta	$1 \times 10^6$ esporas/ml
<i>Pasteuria</i> cepa 97	50 ml/planta	$1 \times 10^6$ esporas/ml
Mezcla de cepas 97 y 213 (1:1)	$1 \times 10^6$ esporas/ml	500 ml por planta
BFE	50 ml/planta	1,5 gr/litro ( $1 \times 10^8$ esporas/g)

<sup>11</sup> Índice de nodulación: 0 = sin nodulos; 1 = 10%; 2 = 25%; 3 = 50%; 4 = 75%; 5 = 100%.

Ocho semanas después de la aplicación de los tratamientos se hicieron las mediciones de la población de la plaga y de su tasa de crecimiento poblacional, además de la determinación del nivel de nodulación y del peso aéreo y radicular de las plantas.

Los resultados indican que todos los tratamientos en forma significativa el tamaño de la población y la tasa de crecimiento de *Meloidogyne*, excepto por el de la cepa Pp 213, que parece ser ineficiente en el control de esta especie de nemátodo.

- **Ensayos *in vivo* de control de *Meloidogyne* spp. por bacterias con actividad nematocida, con formulación y dosis final en tomate.** Este ensayo se estableció con las mismas variables del anteriormente señalado, pero se utilizó una formulación sólida de la mezcla entre las bacterias con propiedades nematocidas (Pp y BFE). Los tratamientos fueron los siguientes
  - BFE en dosis de 50 ml/planta a una concentración de 2 g/litro ( $1 \times 10^8$  esporas/g)
  - BFE (2g/l) + Pp 97 ( $1 \times 10^9$  esporas/litro)
  - Control químico: Furadan.

Las mediciones fueron las mismas que en otros ensayos y se realizaron 12 semanas después de la aplicación de los tratamientos.

Los resultados de este ensayo mostraron que tanto las BFE solas como en mezcla con *Pasteuria*, redujeron significativamente la población de *Meloidogyne* y su tasa de crecimiento; incluso fueron más eficaces que el nematocida químico Furadan. La falta de actividad de este nematocida puede deberse al contenido de materia orgánica en el suelo, la cual presenta la capacidad de inmovilizar los ingredientes activos de este plaguicida.



#### **Etapa IV. Evaluación en campo**

Los ensayos se establecieron en predios comerciales, donde sólo se modificó el manejo de nemátodos.

**Evaluación de bacterias con capacidad nematocida en cultivos de tomate.** Este ensayo se estableció en dos naves con riego tecnificado y previamente fumigadas con Metham sodio. En estas condiciones la presencia de *Meloidogyne* era de 5 J2/250 gr de suelo cuando se trasplantaron plantas de tomate cv. Maria Italia de tercera hoja. Cada seis semanas se extrajeron muestras de suelo de los mismos lugares para determinar la dinámica poblacional del nemátodo y después de la cosecha se determinó la población final del nemátodo y la biomasa aérea y radicular de las plantas, así como su índice de nodulación.

Se aplicaron cuatro tratamientos, cada uno con seis repeticiones de 12 plantas:

- T0: Control (manejo del predio con bromuro de metilo)
- T1: BFE
- T2: *Pasteuria* cepa 97 + BFE
- T3: *Pasteuria* cepa 97

Las dosis de aplicación fueron de 50 ml/planta de una suspensión de 10 g/l con una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/ml, aplicados al cuello de la planta.

Los resultados fueron concluyentes en varios aspectos:

- Todos los tratamientos (T1, T2 y T3) mejoran la eficacia del control del producto químico de fumigación.
- Todos redujeron la población final de *Meloidogyne*; los tratamientos que incluían BFE mostraron las menores poblaciones.
- El tratamiento *Pp* + BFE tuvo menor formación de nódulos.

**Evaluación de bacterias con capacidad nematicida en cultivos de vid.** En un predio en Villa Alegre con vid cv. Merlot se extrajeron muestras de suelo de plantas donde se realizarían las repeticiones y los tratamientos, con el fin de determinar las poblaciones iniciales de *Meloidogyne* y *Xiphinema*. La aplicación de las bacterias cepa *Pp* 213 se realizó a través de collarín ( $1 \times 10^6$ /ml) en un volumen de 500 ml/planta. Luego, la evaluación consistió en el muestreo de la población de nemátodos, además del desarrollo vegetativo y el rendimiento, tanto en cierre de racimo como en cosecha.

Tratamientos:

- T0: Control (manejo del predio)
- T1: *Pasteuria* cepa 213 + BFE
- T2: BFE
- T3: *Pasteuria* cepa 213

Resultados del ensayo:

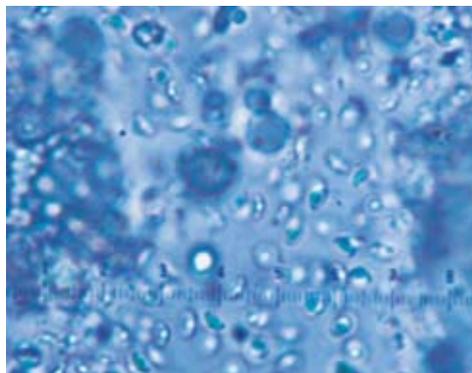
- Efecto significativo de todos los tratamientos sobre la población final de *Meloidogyne*.
- El tratamiento de la cepa 213 de *Pasteuria* + BFE, logró una disminución significativa de la tasa de crecimiento poblacional del nemátodo.
- En el caso de *Xiphinema* no existieron diferencias significativas y los resultados no fueron concluyentes.

## **Etapas V. Desarrollo y transferencia de un sistema de producción**

Para el desarrollo del sistema de producción se implementaron cuatro ensayos.

- **Ensayo I: Sistema de producción de cepas nativas de *Pasteuria*.** Se realizó en una cámara de crianza con control de temperatura, humedad y luz, con el fin de estandarizar las condiciones del ensayo. Los métodos evaluados inicialmente para la reproducción fueron:
  - Inoculación con suelo original: cultivo de plantas sobre suelo con presencia natural de nemátodos y esporas.
  - En suelo estéril: cultivo de plantas en suelo estéril con nemátodos infectados artificialmente con *Pp*.
  - Suelo original: cultivo de plantas sobre suelo, con presencia natural de *Pp*, libre de nemátodos e inoculados con poblaciones puras de nemátodos.

En *Meloidogyne* se midieron poblaciones finales de nemátodos, número de hembras por peso de raíz, porcentaje de hembras infectadas y número de esporas/hembra. Para *Tylenchulus*, sólo se determinó número de nemátodos infectados.



De los tres sistemas de producción, el más efectivo y fácil de aplicar fue el tercero (suelo original), mientras que las especies vegetales mejor evaluadas para la producción de esporas fueron tomate y albahaca (se probó también zanahoria y berenjena). Las cepas que se lograron reproducir en condiciones artificiales fueron la 97, 213, 220 y 329, todas en *Meloidogyne*.

- **Ensayo II: Producción en sustrato.** Se evaluaron varios sustratos para producir las plantas de tomate inoculadas con *Meloidogyne* spp., en un sistema con fertirrigación.

Tratamientos:

- T0: Suelo del lugar
- T1: Mezcla de perlita, turba y arena (1:1:1)
- T2: Mezcla de vermiculita, arena y turba (1:1:1)
- T3: Mezcla de compost, arena y perlita (1:1:1)
- T4: Mezcla de arena, compost, perlita y turba (2:1:1:1)

El tratamiento T4 resultó ser el mejor sustrato, seguido por el T3. De todas maneras, se recomienda realizar varios ciclos de cultivo, para determinar no sólo la producción, sino la confiabilidad del sistema, a fin de aplicar eventualmente en un futuro sistema comercial de producción.

- **Ensayo III: Sistema de producción de cepas de BFE, cultivadas *in vitro*.** Se realizaron tres ensayos diferentes, cada uno para probar el comportamiento de la producción de cepas de BFE en distintas variables: medios (caldo nutritivo, glucose yeast salt [GYS] y Lb), temperatura de cultivo y pH de cultivo.

Los resultados demostraron que:

- En el primer ensayo no hubo diferencias significativas, por lo que se optó por el medio GYS, que es el de menor costo.
- Los tratamientos a 25 y a 30 °C propiciaron una producción significativamente mayor que a menores temperaturas.
- El pH del cultivo, medido en GYS, mostró que los índices más neutros redujeron los días de esporulación: 6,5 y 7, versus 6 y 7,5 que también se midieron.
- **Ensayo IV: Evaluación de sustratos inertes y forma de secado para almacenaje y formulación.** Se determinó que la dilución es el método que genera la mayor cantidad de esporas viables. Aunque la forma del secado no fue significativa, se observó una fuerte tendencia a que el secado a 45 °C combinado con dilución, arrojaría la mayor población de bacterias. Sin embargo, se recomienda seguir evaluando los procesos de secado, ya que la población final es bastante baja en comparación con la cantidad de UFC iniciales. Por otra parte, se identificó que la presencia de luz genera una disminución en la cantidad de esporas, que a pesar de no ser significativa, hace recomendar el almacenaje en oscuridad.

- **Transferencia del sistema de producción**

Se realizó mediante tres etapas. En la primera se firmó un convenio entre la Universidad de Talca y la empresa Bio Insumos Nativa Ltda., mediante el cual se establecieron las condiciones para que la empresa pueda producir y comercializar las cepas de *Pasteuria* y BFE, además de recibir la tecnología de producción y establecer los mecanismos de control de calidad, tanto del producto como de las recomendaciones de uso.

Durante la segunda etapa la Universidad entregó copias de las cepas estudiadas a Bio Insumos Nativa Ltda., con el fin de duplicar el material almacenado y entrenar al personal de la empresa en la reproducción de las cepas y en su identificación.

En la tercera etapa en la empresa se instalaron producciones a escala de laboratorio, utilizando las metodologías desarrolladas por el proyecto, tanto para la producción como para la formulación y evaluación de las poblaciones y de la actividad de las cepas.

### ► **3. Situación actual del desarrollo de la herramienta**

---

Luego del término del proyecto precursor, la Universidad de Talca y la empresa Bio Insumos Nativa Ltda. continuaron analizando las cepas de BFE, con el fin de avanzar en la determinación de las mejores cepas controladoras, tanto para *Meloidogyne* como *Pratylenchus* y se estableció que el producto será una combinación de cepas.

Una vez que estas evaluaciones finalicen, la empresa hará la definición de los análisis toxicológicos a realizar, con el fin de obtener el registro SAG que puede demorar hasta seis meses más.

Al término de esta etapa sólo faltaría el proceso de escalamiento del producto, con el fin de realizar la producción masiva y posterior comercialización en el mercado. La empresa también ha contemplado continuar con la búsqueda de nuevas cepas de este tipo de bacterias, y de otros microorganismos, a fin de encontrar otras herramientas de biocontrol para las plagas que afectan a la agricultura.



## SECCIÓN 3

# El valor del proyecto

A la luz de los resultados del proyecto, se establece la gran potencialidad que tiene el uso de microorganismos para controlar las plagas de la agricultura, especialmente cuando se enmarcan en productos enfocados a reemplazar el bromuro de metilo. En particular, las bacterias BFE demostraron tener una eficiencia muy similar a los productos químicos actualmente disponibles en el mercado, en cuanto al control de nemátodos fitoparásitos, produciendo un efecto continuo y de mayor permanencia en el tiempo, pero sin provocar los conflictos ambientales y de salud que se atribuye a los convencionales.

Aunque todavía no está desarrollado todo el paquete tecnológico concerniente a este nuevo sistema de control, que permita hacer un uso comercial, sus perspectivas están centradas en el control de nemátodos fitoparásitos en tomate y vid, y en menor medida en cítricos. Esto se debe a

Nemátodo fitoparásito y su huevo



que su mayor nivel de control se produce en los nemátodos *Meloidogyne* y *Xiphinema*, y es menor en *Tylenchulus*. Estos resultados generaron un gran interés por parte de las empresas agrícolas y forestales, y por los agricultores de hortalizas de la zona donde se desarrolló el proyecto, así como una manifiesta recepción positiva de este tipo de herramientas biológicas, dado que facilita la obtención de certificaciones y no produce limitaciones de manipulación.

Al margen de la potencialidad del producto desarrollado, el proyecto logró determinar por primera vez en Chile, la detección reportada de la bacteria *Pasteuria penetrans* en el territorio nacional. Esto se realizó con la ayuda del especialista extranjero Keith Davies, quien confirmó el hallazgo y capacitó al personal del proyecto a fin de sentar las bases científicas y tecnológicas para el proceso de prospección de cepas bacterianas y su reproducción.

# Anexos

---

Anexo 1. Resultados del análisis económico

---

Anexo 2. Literatura consultada

---

Anexo 3. Documentación disponible y contactos

---

## ANEXO 1. Resultados del análisis económico

CUADRO 1. Costos de inversión de un cultivo de tomate en invernadero (\$)

Inversiones	\$/10 naves	\$/ha
Invernadero	7.000.000	33.333.333
Sistema de riego	2.048.600	9.755.238
Equipos y herramientas	250.000	1.190.476
<b>Total inversiones</b>	<b>9.298.600</b>	<b>44.279.048</b>

Fuente: elaborado con datos de agentes de la industria.

CUADRO 2. Flujo de fondos de un cultivo de tomate en invernadero (\$/ha)

Ítem (\$/ha)	AÑO	
	0	1 a 5
<b>Inversiones</b>		
Invernadero	33.333.333	
Sistema de riego	9.755.238	
Equipos y herramientas	1.190.476	
<b>Total inversiones</b>	<b>44.279.048</b>	
<b>Labores</b>		
Almácigo		133.412
Preparación de suelo		168.000
Labores de cultivo		2.258.890
Cosecha		2.100.000
<b>Subtotal labores</b>		<b>4.660.302</b>
<b>Insumos</b>		
Semilla		2.100.000
Fertilizantes		648.450
Insecticidas, Herbicidas, Fungicidas		398.319
Nematicidas Químicos		255.000
Bromuro de Metilo		516.000
Cajones madera		1.875.000
<b>Subtotal insumos</b>		<b>5.792.769</b>
Total costos	44.279.048	10.453.071
Margen bruto	-44.279.048	15.866.929
Ingresos	0	26.320.000

VAN 12%: \$ 12.917.682

TIR: 23%

Fuente: elaborado con datos de agentes de la industria.

## ANEXO 2. **Literatura consultada**

---

- Aballay, E. 1992. Nemátodos en frutales y vides: Control con Nema-cur 400EC. *Sembrando Futuro* 9(79): 2-4.
- Aballay, E. 1995. Características generales de los nemátodos: Morfología y fisiología, pp. 1-7. En: Aballay, E. y Magunacelaya, J.C. *Nematología. Agrícola Básica*. Universidad de Chile, Fac. de Cs. Agrarias y Forestales, Depto. de Sanidad Vegetal. Santiago, Chile. 75 pp.
- Álvarez, P. 2006. Evaluación de algunas alternativas de control sobre el nemátodo del nódulo de la raíz (*Meloidogyne* spp.), como opciones de preplantación en condiciones de replante en vid (*Vitis vinifera* L.). Tesis (ingeniero agrónomo). Universidad de Chile.
- FAOSTAT. [En línea]. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). <<http://faostat.fao.org/>> [Consulta: agosto, 2010]
- FIA. 2007. Resultados y Lecciones en Reemplazo de Bromuro de Metilo. Serie Experiencias de Innovación para el Emprendimiento Agrario. N° 5. Fundación para la Innovación Agraria, FIA. Ministerio de Agricultura, Chile.
- INE. 2007. VII Censo Agropecuario y Forestal 2007. Instituto Nacional de Estadísticas (INE). [En línea] <[http://www.ine.cl/canales/chile\\_estadistico/censos\\_agropecuarios/censo\\_agropecuario\\_07\\_comunas.php](http://www.ine.cl/canales/chile_estadistico/censos_agropecuarios/censo_agropecuario_07_comunas.php)> [Consulta: agosto, 2010].
- Magunacelaya, J.C. y Dagnino, E. 1999. *Nematología Agrícola en Chile*. Universidad de Chile. Serie Ciencias Agronómicas N°2. 282 pp.
- Matamala, S. 2006. Determinación del efecto de los elicitores quitosano y la proteína harpin en limoneros afectados por *Tylenchulus semipenetrans*, en la localidad de Panquehue. Tesis (ingeniero agrónomo). Universidad de Chile.
- McSorley, R. 2003. Soil-inhabiting nematodes: Phylum Nematoda. 4p. [En línea] <[http://creatures.ifas.ufl.edu/nematode/soil\\_nematode.htm](http://creatures.ifas.ufl.edu/nematode/soil_nematode.htm)> [Consulta: agosto, 2010]
- ODEPA. [En línea]. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). <<http://www.odepa.gob.cl>> [Consulta: agosto, 2010]
- Sánchez, I. 2006. Determinación de la época óptima de aplicación de nemacur y extracto de quillay, para el control de *Meloidogyne* spp. en cinco estados fenológicos de vid cv. Chardonnay. Tesis (ingeniero agrónomo). Universidad de Chile.
- Sepúlveda, R. 2004. Efecto de la incorporación de material vegetal sobre la población de *Xiphinema index* en estacas enraizadas de vid (*Vitis vinifera* var. Thompson Seedless) en bolsas. Tesis (ingeniero agrónomo). Universidad de Chile.
- Razeto, M. 1999. Para entender la Fruticultura. 3ª ed. Universitaria S.A. Santiago, Chile. 373 pp.
- Rodríguez, K. R. 1991. Control biológico de nemátodos parásitos de plantas. *Nematological review*. Department of Plant Pathology, Auburn University, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn, Estados Unidos. [En línea] <[http://brokert10.fcla.edu/DLData/NM/NM00000001/NM00995444/21\\_1/00P0084A.pdf](http://brokert10.fcla.edu/DLData/NM/NM00000001/NM00995444/21_1/00P0084A.pdf)> [Consulta: agosto, 2010]

Además se utilizó información de los siguientes sitios Web [consulta: agosto, 2010]:

- <[www.aduana.cl](http://www.aduana.cl)>
- <[www.indap.cl](http://www.indap.cl)>
- <[www.inia.cl](http://www.inia.cl)>
- <[www.sag.gob.cl](http://www.sag.gob.cl)>
- <[www.nemachile.cl](http://www.nemachile.cl)>

## ANEXO 3. **Documentación disponible y contactos**

---

El presente libro y su ficha correspondiente se encuentran disponibles como PDF, a texto completo, en el sitio Web de FIA ([www.fia.gob.cl](http://www.fia.gob.cl)), accediendo a “Información para la innovación” y luego a “Experiencias de Innovación” o a “Biblioteca Digital”, donde existe un buscador de publicaciones.

Contacto: [fia@fia.cl](mailto:fia@fia.cl)