

OFICINA DE PARTES 1 FIA  
RECEPCIONADO  
Fecha 22 DIC. 2014  
Hora 14:00  
Nº Ingreso 18149

# INFORME TÉCNICO FINAL Y DE DIFUSIÓN

SANTIAGO  
DICIEMBRE 2014

## ÍNDICE

	Pág.
<b>1. ANTECEDENTES GENERALES .....</b>	<b>8</b>
1.1 Antecedentes Generales.....	8
1.2 Costo general.....	8
1.3 Ejecución presupuestaria hasta la fecha .....	8
<b>2. RESUMEN EJECUTIVO.....</b>	<b>9</b>
<b>3. INFORME TÉCNICO .....</b>	<b>10</b>
3.1 Objetivo general .....	10
3.1.1 Obtener formulados de las cepas de rizobacterias nativas aisladas desde suelos agrícolas en Chile, efectivas para el control de nematodos fitoparásitos presentes en suelos cultivados con frutales, tomando los cerezos como modelo de uso.....	10
3.2 Objetivos específicos.....	10
3.2.1 Seleccionar las cepas de rizobacterias que sean más efectivas para la disminución de las poblaciones de nemátodos fitoparásitos (efecto nematocida). .....	10
3.2.2 Seleccionar las cepas de rizobacterias que aunque no elimine nemátodos, protejan el desarrollo radical de plantas de cerezos, por medio de la inhibición del ataque de los nemátodos (efecto nemostático). .....	10
3.2.4 Proteger los resultados de la investigación, mediante patente de invención. ....	10
3.2.5 Difundir al medio los resultados obtenidos.....	10
<b>4. METODOLOGÍA DEL PROYECTO .....</b>	<b>12</b>
4.1 Evaluación del efecto de cepas de rizobacterias nativas sobre la población de nematodos fitoparásitos y sobre el crecimiento de la planta, en condiciones de campo. ....	12
4.1.1 Evaluación de la actividad supresiva de las selecciones de rizobacterias sobre la población de nemátodos fitoparásitos, en raíces de plantas inoculadas, en condiciones de campo.....	12
4.1.1.1 Selección de los campos de ensayo.....	12
4.1.1.2 Preparación del material vegetal.....	12
4.1.1.3 Preparación del terreno.....	13
4.1.1.4 Preparación del inóculo bacteriano.....	13
4.1.1.5 Establecimiento de los ensayos.....	13
4.1.1.5.1 Muestreo de suelo.....	13
4.1.1.5.2 Extracción de formas móviles y análisis nematológico.....	13
4.1.1.5.3 Inoculación de plantas.....	14
4.1.1.5.4 Tratamientos.....	14

4.1.1.6	Evaluación del potencial supresivo en la población de nemátodos, en condiciones de campo <sup>14</sup>	
4.1.2	Evaluación de la actividad promotora de crecimiento de las selecciones de rizobacterias, en raíces de plantas de vid, en ensayos de campo. ....	15
4.1.2.1	Evaluación de vigor .....	15
4.1.2.2	Evaluación de síntomas de daño .....	15
4.1.3	Diseño experimental.....	15
4.1.4	Problemas metodológicos enfrentados .....	16
4.1.5	Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta. ....	16
4.2	Elaboración de un formulado en base a rizobacterias .....	16
4.2.1	Desarrollo de formulaciones bacterianas controladoras de nemátodos fitopatógenos.....	16
4.2.1.1	Protocolo utilizado para la Formulación Líquida .....	16
4.2.1.1.1	Preparación de matriz protectora.....	16
4.2.1.1.2	Procedimiento, producción del formulado líquido utilizado.....	16
4.2.1.2	Protocolo utilizado para la Formulación Sólida, en este caso polvo .....	17
4.2.1.2.1	Preparación de matriz osmoprotectora (protector de deshidratación celular).....	17
4.2.1.2.2	Procedimiento de mezclado Biomasa con Osmoprotector .....	17
4.2.1.2.3	Procedimiento de adsorción de células en soporte sólido (proceso con protección industrial) .....	17
4.2.2	Problemas metodológicos enfrentados .....	19
4.2.3	Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta .....	19
4.3.	Evaluación de los formulados en condiciones controladas .....	19
4.3.1	Evaluación de los formulados sobre la población de nemátodos fitoparásitos, en raíces de plantas inoculadas, en condiciones controladas.....	19
4.3.1.1	Lugar de estudio.....	19
4.3.1.2	Recolección del sustrato naturalmente infectado .....	19
4.3.1.3	Preparación del inóculo bacteriano .....	20
4.3.1.4	Establecimiento de los ensayos .....	20
4.3.1.4.1	Muestreo de suelo .....	20
4.3.1.4.2	Extracción de formas móviles y análisis nematológico .....	20
4.3.1.4.3	Inoculación y trasplante.....	20
4.3.1.4.4	Tratamientos.....	21
4.3.1.5	Evaluación de la formulación .....	21
4.3.2	Diseño experimental.....	21

4.3.3	Problemas metodológicos enfrentados.....	21
4.3.4	Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta .....	21
4.4	Caracterización fisiológica y genética de las cepas de rizobacterias con mayor efecto supresivo y/o con mayor efecto en la promoción del crecimiento. ....	22
4.4.1	Caracterización de la actividad fisiológica, metabolitos y enzimas asociados a la actividad nematocida de las rizobacterias.....	22
4.4.1.1	Identificación de Metabolitos y Enzimas de las Rizobacterias.....	22
4.4.1.1.1	Quitinasas y Colagenasas.....	22
4.4.1.1.2	Ácido Cianhídrico (HCN).....	23
4.4.1.1.3	Ácido Sulfhídrico (H <sub>2</sub> S).....	23
4.4.1.1.4	Proteasas .....	23
4.4.1.1.5	Catalasas.....	24
4.4.1.1.6	Lipasas .....	24
4.4.1.2	Caracterización fisiológica.....	24
4.4.2	Caracterización Molecular de las Cepas Rizobacterianas a través de marcadores moleculares. ....	24
4.4.2.1	Metodología para obtener el material genético de las rizobacterias.....	25
4.4.2.2	Secuenciación e identificación molecular.....	27
4.4.2.3	Pruebas adicionales para identificación de especies.....	27
4.5	Solicitud de Patente de Innovación .....	27
4.5.1	Preparación del Dossier .....	27
4.5.2	Registro de Cepas y Depósito en banco de microorganismos .....	28
4.5.3	Solicitud de patente de innovación.....	28
<b>5.</b>	<b>ACTIVIDADES.....</b>	<b>29</b>
5.1	Carta Gantt propuesta original .....	29
5.2	Carta Gantt real.....	31
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
6.1	Evaluación del efecto de cepas de rizobacterias nativas sobre la población de nematodos fitoparásitos y sobre el crecimiento de la planta, en condiciones de campo. ....	33
6.1.1	Evaluación de la actividad supresiva de las selecciones de rizobacterias sobre la población de nemátodos fitoparásitos, en raíces de plantas inoculadas, en condiciones de campo.....	33
6.1.1.1	Predio La Paloma.....	33
6.1.1.2	Predio Nancagua.....	34
6.1.1.3	Predio Tinguiririca.....	35
6.1.2	Evaluación de la actividad promotora de crecimiento de las selecciones de rizobacterias, en raíces de plantas de vid, en ensayos de campo. ....	36

6.1.3	Análisis de los datos.....	37
6.1.4	Selección final de las cepas.....	37
6.2	Caracterización fisiológica y genética de las cepas de rizobacterias con mayor efecto supresivo y/o con mayor efecto en la promoción del crecimiento.....	38
6.2.1	Metabolitos y Enzimas de las Rizobacterias.....	38
6.2.1.1	Quitinasas.....	38
6.2.1.2	Colagenasas.....	39
6.2.1.3	Ácido Cianhídrico.....	39
6.2.1.4	Ácido Sulfhídrico.....	39
6.2.1.5	Proteasas.....	40
6.2.1.6	Lipasas.....	40
6.2.1.7	Catalasas.....	41
6.2.2	Caracterización fisiológica de la cepa FIASp2130.....	41
6.2.3	Caracterización Molecular de las Cepas Rizobacterianas.....	43
6.2.3.1	Tinción Gram.....	48
6.3.	Evaluación de un formulado en base a rizobacterias.....	49
6.3.1	Activación de cepas transferidas.....	49
6.3.2	Generación de material de respaldo (cepario madre y trabajo).....	49
6.3.3	Producción de inóculos.....	49
6.3.4	Escalamiento de biomasa.....	49
6.3.5	Evaluación físico química de matrices para formulados en polvo y líquidas.....	49
6.3.6	Evaluación de formulaciones líquidas.....	49
6.3.7	Evaluación de formulaciones en polvo.....	50
6.3.8	Evaluación de la estabilidad de los formulados.....	50
<b>7.</b>	<b>FICHAS TÉCNICAS Y ANÁLISIS ECONÓMICO.....</b>	<b>53</b>
7.1	Fichas técnicas y de costos del o los cultivos, rubros, especies animales o tecnologías que se desarrolló en el proyecto (según corresponda a la naturaleza del proyecto).....	53
7.1.1	Predio La Paloma.....	53
7.1.1.1	Tratamientos.....	53
7.1.1.2	Fecha de muestreos, plantación, aplicación de tratamientos y medición de ASTT.....	54
7.1.2	Predio Nancagua.....	55
7.1.2.1	Tratamientos.....	55
7.1.2.2	Fecha de muestreos, plantación, aplicación de tratamientos y medición de ASTT.....	56
7.1.3	Predio Tinguiririca.....	57
7.1.3.1	Tratamientos.....	57

7.1.3.2	Fecha de muestreos, plantación, aplicación de tratamientos y medición de ASTT.....	58
7.1.4	Ensayo en condiciones controladas.....	59
7.1.4.1	Tratamientos para la evaluación de los formulados en condiciones controladas.....	59
7.2	Análisis económico actualizado, comparando con los análisis de la propuesta de proyecto.....	60
7.2.1	Aporte Ejecutor.....	60
7.2.2	Aporte Asociado.....	61
7.2.3	Aporte FIA.....	62
7.3	Análisis de las perspectivas del rubro, actividad o unidad productiva desarrollada, después de finalizado el proyecto.....	65
7.4	Descripción estrategias de marketing de productos, procesos o servicios (según corresponda a la naturaleza del proyecto).....	65
<b>8.</b>	<b>IMPACTOS Y LOGROS.....</b>	<b>66</b>
8.1	Impactos Productivos, Económicos y Comerciales.....	66
8.2	Impactos Sociales.....	66
8.3	Impactos Tecnológicos.....	67
8.4	Impactos Científicos.....	68
8.5	Impactos en Formación.....	68
8.6	Descripción y cuantificación de los impactos obtenidos, y estimación de lograr otros en el futuro, comparación con los esperados, y razones que explican las discrepancias.....	68
8.7	Indicadores de impactos y logros a detallar dependiendo de los objetivos y naturaleza del proyecto.....	69
<b>9.</b>	<b>PROBLEMAS ENFRENTADOS.....</b>	<b>70</b>
Legales.....		70
Técnicos.....		70
Administrativos.....		70
Gestión.....		70
<b>10.</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>71</b>
10.1	Técnicas.....	71
10.2	Económicas.....	71
10.3	Gestión.....	71
<b>11.</b>	<b>INFORME DE DIFUSIÓN.....</b>	<b>72</b>
11.1	Charlas de difusión.....	72
11.1.1	Programa charla de difusión.....	73
11.1.2	Tríptico charla de difusión.....	74
11.1.3	Pendón charla de difusión.....	76

11.1.4	Charla Revista Red Agrícola .....	77
11.1.5	Programa Charla Revista Red Agrícola .....	78
<b>12.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>79</b>
12.1	Fotografías ensayos de campo, predio La Paloma, Nancagua y Tinguiririca, formulados polvo y líquido.....	79
12.2.	Fichas Curriculares.....	83
12.2.1	Investigador principal.....	83
12.1.2	Equipo Técnico.....	84
<b>13.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>89</b>

## 1. ANTECEDENTES GENERALES

### 1.1 Antecedentes Generales

Código	PYT-2011-0052
Nombre del Proyecto	Uso de rizobacterias para mejorar el desarrollo y sanidad de raíces en cerezos
Región de ejecución:	del Libertador General Bernardo O` Higgins
Agente Ejecutor	Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas
Agente Asociado	Viveros El Tambo Ltda.
Coordinador del Proyecto	Erwin Aballay E.

### 1.2 Costo general

	Programado	Real
Costo total de la iniciativa		
Aporte FIA		
Porcentaje aporte FIA		
Periodo de Ejecución	01/06/2011 al 31/05/2014	01/06//2011 al 28/11/2014

### 1.3 Ejecución presupuestaria hasta la fecha

Acumulados a la Fecha		Monto
Aportes FIA	Suma cuotas programadas	
	Suma cuotas pagadas	
	Suma gasto programado	
	Suma gasto real	
Aportes Contraparte	Gasto programado	
	Gasto real	
	Gasto pecuniario programado	
	Gasto pecuniario real	

## 2. RESUMEN EJECUTIVO

El objetivo de este proyecto fue la formulación de un biopesticida para el control de nemátodos, en base a cepas de rizobacterias, seleccionadas previamente desde cultivos de vides en producción, las cuales en estudios previos en condiciones de invernadero, mostraron efectos antagonistas a nemátodos en términos de control (efecto nematicida) y positivos sobre el desarrollo radical (efectos nematicida y nemostático).

En una primera etapa de la investigación, se realizaron ensayos de campo, en la Región del Libertador General Bernardo O' Higgins, en huertos de cerezo, provenientes de replante, con poblaciones medias a altas de nemátodos fitoparásitos. Las plantas fueron inoculadas con las cepas de rizobacterias pre seleccionadas, antes de la plantación, y reinoculadas después de la plantación, para reforzar su colonización en la zona radical. Durante dos temporadas, se evaluó la presencia de daños en raíces, vigor y población de nemátodos. Posteriormente, una selección de las 3 cepas más efectivas fueron formuladas en base a diferentes acarreadores.

En ensayos de laboratorio, se evaluó la viabilidad de las cepas bajo diferentes formulaciones. Para ello se contó con la colaboración de la empresa Biogram S.A., la cual evaluó diferentes alternativas para el mantenimiento de las cepas. Se logró finalmente establecer dos formulaciones adecuadas para uso comercial. La primera es un polvo, el cual puede ser utilizado principalmente para inmersiones de plantas de antes de la plantación en el terreno y para aplicaciones al hoyo de plantación, una vez disuelto en agua. La segunda es un formulado líquido, el cual puede ser utilizado principalmente para inyecciones a los sistemas de riego. En ambos casos se pretende llegar al destino final de la aplicación con una concentración de inóculo de  $1 \times 10^6$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ .

En ensayos de invernadero, con plantas de cerezo in vitro, se evaluaron las cepas puras y formuladas, durante 5 meses.

Las cepas evaluadas en su etapa final presentan la capacidad de disminuir la población de nemátodos fitoparásitos en el suelo y algunos daños en raíces. Junto con ello, hay una tendencia importante en aumento de vigor en las plantas tratadas.

Dentro de las próximas semanas, y fuera del plazo del proyecto, se procederá al inicio de estudio de factibilidad de patentar, en favor de la Universidad de Chile. Este proceso, lo llevará a cabo una empresa especializada en la materia, la cual hará el depósito de las mismas en un banco de microorganismos.

El agente asociado, utilizará el producto para diferenciar su material en el mercado, vendiendo plantas inoculadas. A partir del patentamiento, si es que es factible, el Ejecutor licenciará la comercialización y distribución de este material entre empresas distribuidoras de agroquímicos a nivel nacional, estableciendo los privilegios que corresponda para el uso y explotación de la tecnología, por lo cual cobrará un porcentaje de las ventas netas.

Un producto de este tipo es de alta conveniencia, ya que evita la contaminación del suelo, riesgo para operarios y consumidores, la presencia de residuos en la fruta, y aumenta los efectos de mediano y largo plazo, ya que hay una colonización por el establecimiento en la rizósfera de las plantas.

### 3. INFORME TÉCNICO

#### 3.1 Objetivo general

3.1.1 Obtener formulados de las cepas de rizobacterias nativas aisladas desde suelos agrícolas en Chile, efectivas para el control de nemátodos fitoparásitos presentes en suelos cultivados con frutales, tomando los cerezos como modelo de uso

Logrado. Las 4 cepas de rizobacterias seleccionadas de los ensayos de campo, que mostraron mayores efectos en el control de nemátodos fitoparásitos, y estimulación en el crecimiento radical, fueron formuladas en estado polvo y líquido, por la empresa colaboradora BIOGRAM S.A.

#### 3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Seleccionar las cepas de rizobacterias que sean más efectivas para la disminución de las poblaciones de nemátodos fitoparásitos (efecto nematocida).

Logrado. De los ensayos establecidos en campo, se seleccionaron 4 cepas de rizobacterias nativas, que mostraron efectos en el control de nemátodos fitoparásitos, incluyendo los géneros más agresivos en cerezo, como son *Pratylenchus* y *Xiphinema*.

3.2.2 Seleccionar las cepas de rizobacterias que aunque no elimine nemátodos, protejan el desarrollo radical de plantas de cerezos, por medio de la inhibición del ataque de los nemátodos (efecto nemostático).

Logrado. Se seleccionaron 4 cepas de rizobacterias de acuerdo a su potencial biocontrolador de nemátodos, como también por su efecto positivo en el desarrollo y crecimiento radical.

3.2.3 Obtener un formulado desarrollado con las 3 cepas más eficaces para inmersiones de raíces y aplicaciones al suelo.

Logrado. Se obtuvieron formulados en estado líquido y polvo, con 4 cepas de rizobacterias seleccionadas en ensayos de campo previos.

3.2.4 Proteger los resultados de la investigación, mediante patente de invención.

La protección de los resultados obtenidos en la presente investigación, se realizará fuera de los plazos establecidos en el proyecto. En los próximos días, se dará curso al estudio de factibilidad de patentar y posteriormente al depósito de las cepas de rizobacterias en el banco de microorganismos del INIA. Esta labor se realiza a través de la Dirección de Innovación de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Chile, contando para ello con los servicios de la empresa especializada Jarry

3.2.5 Difundir al medio los resultados obtenidos.

Logrado. En septiembre de 2014, se realizó una charla de difusión de resultados, dirigida principalmente a viveristas y agricultores de cerezo, como también a asesores y representantes de

empresas químicas. Contó con la participación de Marcia Barraza, directora de la Asociación Gremial de Viveros Frutales (AGVF), y Erwin Aballay, Investigador principal.

## 4. METODOLOGÍA DEL PROYECTO

### 4.1 Evaluación del efecto de cepas de rizobacterias nativas sobre la población de nematodos fitoparásitos y sobre el crecimiento de la planta, en condiciones de campo.

#### 4.1.1 Evaluación de la actividad supresiva de las selecciones de rizobacterias sobre la población de nemátodos fitoparásitos, en raíces de plantas inoculadas, en condiciones de campo.

##### 4.1.1.1 Selección de los campos de ensayo

A partir de la base de datos del Laboratorio de Nematología de la Universidad de Chile, y de los antecedentes entregados por Viveros El Tambo, se estableció contacto con los productores de cerezo de la Región del Libertador General Bernardo O` Higgins y se realizó una prospección para determinar la población actual de nemátodos fitoparásitos en el suelo.

Se seleccionaron 3 predios para el establecimiento de los ensayos, ubicados en las comunas de La Paloma, Nancagua y Tinguiririca, provincia de San Fernando. La investigación se realizó durante la temporada 2011-2014.

Todos los predios contaban con un programa de replante de cerezo y el suelo presentaba poblaciones consideradas medias a altas (200 individuos / 250 cm<sup>3</sup> de suelo) de nemátodos fitoparásitos, principalmente de los géneros *Xiphinema* y *Pratylenchus*.

Predio La Paloma: Corresponde a un predio que presenta un suelo de características franco, con bajo nivel de pedregosidad, previamente cultivado con durazneros. La variedad establecida es Lapins, injertada sobre el patrón Colt, con una densidad de 1.250 plantas ha<sup>-1</sup>, con riego por goteo y un caudal de agua de 9 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> ha<sup>-1</sup>.

Precio Nancagua: Distante alrededor de 100 km hacia la costa del anterior, establecido en un suelo muy pedregoso, de textura franco a franco arcilloso. La variedad plantada es Lapins, injertada en el patrón Colt, regado por surcos. La plantación se encuentra a una densidad de 888 plantas ha<sup>-1</sup>.

Predio Tinguiririca: Ubicado a 50 km hacia el sur del primer estudio. Se establecieron plantas de la variedad Bing injertadas sobre el patrón Colt. El sustrato proveniente de vivero es a base de corteza de pino. La plantación se realizó en un sector del predio previamente cultivado con cerezos, que fue arrancado a los 5 años por problemas de variedad. La plantación se encuentra a una densidad de 888 plantas ha<sup>-1</sup>, regadas por surcos.

##### 4.1.1.2 Preparación del material vegetal

Para las evaluaciones de campo, en el sector de replante, se utilizaron plantas de cerezo variedad Lapins (predio La Paloma y Nancagua) y Bing (predio Tinguiririca), todas sobre patrón Colt, de 1 año de edad, entregadas por Viveros El Tambo.

#### 4.1.1.3 Preparación del terreno

Una vez seleccionados los campos, el trabajo de suelo fue el habitual utilizado por el productor para la preparación del terreno, es decir, riego, aradura, rastraje y eliminación de restos de raíces del cultivo anterior. No se aplicaron productos con efectos nematocidas o enraizante. Todas las plantas tuvieron condiciones de manejo semejantes.

#### 4.1.1.4 Preparación del inóculo bacteriano

Los aislados bacterianos guardados en temperatura ultra baja ( $-70^{\circ}\text{C}$ ), fueron inoculados sobre medio TSBA 50% (agar-caldo de soya tripticasa) y cultivados por 48 horas a  $22^{\circ}\text{C}$ , para verificar su pureza. Las colonias puras fueron inoculadas en caldo TSB (caldo de soya tripticasa) al 100% de su concentración e incubadas por 24 horas en agitador orbital (160 rpm) para su multiplicación a temperatura ambiental. El inóculo es aplicado a una concentración de  $10^6$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  (unidades formadoras de colonias) por planta.

En laboratorio, se inicia con un volumen de 98 ml TSB 100%, al cual se le adiciona 2 ml de inóculo bacteriano previamente cuantificado a  $1 \times 10^{10}$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ . Después de 24 horas de agitación orbital, el volumen inicial de 100 ml llega a la concentración de  $1 \times 10^9$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ . En forma estéril, el inóculo de 100 ml se transfiere a un frasco tapa rosca estéril, y se diluye al volumen de 1.000 ml con una solución isotónica estéril de  $\text{MgSO}_4$  0,01 N, para cada cepa. El frasco tapa rosca constituye el inóculo concentrado  $10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ , que se transporta en condiciones seguras al sitio de trabajo, en una hielera que mantiene una baja temperatura.

#### 4.1.1.5 Establecimiento de los ensayos

##### 4.1.1.5.1 Muestreo de suelo

Para determinar la población inicial de nemátodos, se tomaron muestras de suelo con una pala, compuestas por 25 submuestras, para lograr una muestra de 1 kg de suelo, en cada parcela de ensayo, a una profundidad de 20-30 cm, donde se encuentra la mayor cantidad de raíces absorbentes. Las muestras, fueron colocadas en bolsas plásticas, para evitar su deshidratación, impidiendo que quedaran al sol directo, transportadas en una hielera y luego almacenadas en cámara de frío a  $9-11^{\circ}\text{C}$ , hasta su procesamiento.

##### 4.1.1.5.2 Extracción de formas móviles y análisis nematológico

La extracción de formas móviles de nemátodos y análisis nematológico, se realizaron en el Laboratorio de Nematología de la Universidad de Chile.

La extracción de formas móviles de nemátodos del suelo, se realizó a través del método de tamizado de suelos propuesto por Christie y Perry (1951), que utiliza tamices de 850, 180, 75 y 45  $\mu\text{m}$  de abertura de orificio de malla, más un periodo de filtrado en papel absorbente por 48 horas en embudo de Baermann (Hooper, 1986) de 15 cm de diámetro, en base a  $250 \text{ cm}^3$  de suelo. Para mejorar la eficiencia en la extracción de ejemplares de *Xiphinema index*, se utilizó el método de extracción de Brown y Boag (1988), donde las muestras de suelo son filtradas solo en tamices de 850 y 250  $\mu\text{m}$  de abertura de orificio de malla, y luego a través de una malla de nylon de 90  $\mu\text{m}$  por 24 horas.

Posteriormente, se procedió al conteo e identificación de los géneros de nemátodos colectados, bajo lupa estereoscópica de 90X de aumento, para determinar cualitativa y

cuantitativamente la población de nemátodos fitoparásitos y de vida libre presentes en las muestras.

#### 4.1.1.5.3 Inoculación de plantas

Para la inoculación, las raíces de la plantas de cerezo fueron inoculadas con la suspensión bacteriana a una dosis de 4 L por planta, con una concentración de  $10^6$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ , para todos los predios, cuando las plantas aún se encontraban en contenedores plásticos, macetas, en el Vivero.

La plantación se realizó en diciembre 2011, enero y agosto 2012, para los predios La Paloma, Nancagua y Tinguiririca, respectivamente. Una vez que las plantas fueron trasplantadas, se agregó una segunda dosis de 4 L por planta de la suspensión bacteriana, alrededor de cada planta, en orificios bien distribuidos en toda la zona radical.

En los 3 predios, una vez establecidas las plantas, se realizaron aplicaciones con las suspensiones bacterianas 2 veces por año, durante 2 temporadas, la primera a mediados de primavera y la segunda en otoño, aplicando una suspensión bacteriana en la misma concentración inicial, en una dosis de 4 L por planta mediante drenching, sobre suelo húmedo y removido para facilitar la penetración de la suspensión. Una vez aplicadas las suspensiones, se regó suavemente para permitir la movilidad de las suspensiones en profundidad.

En el campo se preparan baldes secos previamente desinfectados con etanol técnico. En cada uno, se diluye 200 ml de inóculo 100 veces con agua de riego, por cada tratamiento, hasta llegar a 20 L de inóculo con una concentración  $1 \times 10^6$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ . El protocolo de diluciones se realiza cuidadosamente, evitando cualquier factor contaminante, para cada cepa bacteriana, en cada ensayo de inoculación de raíces y suelos. Además se evita esparcir inóculo en forma accidental en el medio.

En los campos con riego por surco, el inóculo se distribuye en forma uniforme en todo el área radical, en tazas previamente hechas alrededor de los troncos. En el campo con riego tecnificado, la primera inoculación se realiza en tazas alrededor de los troncos, mientras para las reinoculaciones se realizan en tazas tanto alrededor del tronco, como en la zona de los goteros, y el inóculo se distribuye en todas las tazas para abarcar el nuevo crecimiento radical.

Antes y 60 días después de la aplicación de los tratamientos, se realizaron muestreos de suelo, con el propósito de verificar la efectividad de la aplicación en el manejo de las poblaciones de nemátodos fitoparásitos

#### 4.1.1.5.4 Tratamientos

Los tratamientos se pueden ver en las "Fichas Técnicas". Se establecieron 7 u 8 tratamientos con cepas de rizobacterias, además de un testigo químico (Cadusafos) y un testigo absoluto, correspondiente a plantas no bacterizadas. Las plantas se desarrollaron de acuerdo al programa de manejo general del predio, evitando el uso de activos con acción nematicida o bioestimulante del crecimiento de raíces.

#### 4.1.1.6 Evaluación del potencial supresivo en la población de nemátodos, en condiciones de campo

El comportamiento de las poblaciones de nemátodos durante la realización del ensayo, fue evaluado mediante el Índice Reproductivo (R), el cual indica la variación de la población final respecto a la población inicial ( $P_f/P_i$ ), así un valor menor a 1 indica una disminución del número de nemátodos:

$$\text{Índice Reproductivo (R)} = \frac{\text{Población final (Pf)}}{\text{Población inicial (Pi)}}$$

Los datos se expresaron como N° de nemátodos 250 cm<sup>-3</sup> de suelo.

Para determinar la efectividad de las cepas de rizobacterias con potencial supresivo, se evaluó el Porcentaje de control, según la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de control (\%)} = \left[ 1 - \frac{\text{Testigo}}{\text{Tratamiento}} \right] * 100$$

#### 4.1.2 Evaluación de la actividad promotora de crecimiento de las selecciones de rizobacterias, en raíces de plantas de vid, en ensayos de campo.

En forma simultánea a la evaluación de la población de nemátodos, se evaluó la presencia de síntomas particulares y significativos en las raíces y la parte aérea de la planta, con el propósito de verificar diferencias en el crecimiento vegetativo, atribuibles los tratamientos con rizobacterias.

##### 4.1.2.1 Evaluación de vigor

Se evaluó el Área de Sección Transversal de Tronco (ASTT) con un pie de metro, 10 cm sobre la unión patrón-injerto, una vez por temporada, para determinar el crecimiento acumulado año a año.

##### 4.1.2.2 Evaluación de síntomas de daño

Se evaluó la presencia de síntomas del daño causado por nemátodos en raíces, correspondientes a nódulos, para el caso de *Meloidogyne*, necrosis para *Pratylenchus* más el número de deformaciones apicales, para el caso de *Xiphinema americanum s.l.*. Se estableció una serie de 1 (daño severo) hasta 10 (sin daño) para evaluar el estado de las raíces.

##### 4.1.3 Diseño experimental

El diseño estadístico corresponde a bloques completamente aleatorizados. Según cada predio, se establecieron 9 o 10 tratamientos con 5 repeticiones. La unidad experimental correspondió a un grupo de 4 o 5 plantas (Ver Fichas Técnicas).

Para el análisis de los datos de las poblaciones de nemátodos, se utilizaron los Índices Reproductivos, previo a esto, fueron transformados a logaritmos según la fórmula LOG (x+1), para ajustar las poblaciones a una curva de distribución normal. Posteriormente, los datos obtenidos fueron analizados con un análisis de varianza ANDEVA, utilizando el programa Minitab 15, determinando la existencia de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. En caso de obtenerse diferencias, se realizó el Test de Dunnet ( $p \leq 0,05$ ), para separar las medias.

#### 4.1.4 Problemas metodológicos enfrentados

En esta actividad, no se presentaron problemas metodológicos.

#### 4.1.5 Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta.

En esta actividad, no se realizaron adaptaciones o modificaciones durante la ejecución del proyecto.

### 4.2 **Elaboración de un formulado en base a rizobacterias**

#### 4.2.1 Desarrollo de formulaciones bacterianas controladoras de nemátodos fitopatógenos

Su importancia está basada principalmente en la protección de las bacterias (células), con el objetivo de obtener un producto que dure por tiempos prolongados y resista una cadena de distribución comercial. Las matrices que confieren esta protección celular deben funcionar como capas protectoras, evitar la deshidratación acelerada de las células y disminuir el metabolismo llegando a un estado de dormancia para prolongar su actividad.

##### 4.2.1.1 Protocolo utilizado para la Formulación Líquida

###### 4.2.1.1.1 Preparación de matriz protectora: (secreto industrial)

Matriz compuesta por componentes orgánicos, polialcoholes y polisacáridos, que confieren protección a las células bajando el metabolismo de las mismas.

###### 4.2.1.1.2 Procedimiento, producción del formulado líquido utilizado

Terminada la fermentación, se realiza el control de pureza mediante tinción Gram y recuento viable de células para determinación de concentración.

Tomar muestras de control para trazabilidad (200 cc), en envase estéril.

Mezclar con matriz líquida en proporción de 1:1

Homogenizar la mezcla

Fraccionar en envases de 250cc

Tomar muestras para control; 3 muestras de 100 cc cada una. Las mediciones a realizar corresponden a pH, densidad y recuento viable.

Almacenar en cámara de refrigeración (4-6°C) y sala climatizada (23-25°C)

Realizar control de estabilidad luego de 7 días, 15 días y posteriormente de forma mensual.

Las mediciones a realizar corresponderán a pH, densidad y recuento viable.

#### 4.2.1.2 Protocolo utilizado para la Formulación Sólida, en este caso polvo

##### 4.2.1.2.1 Preparación de matriz osmoprotectora (protector de deshidratación celular)

Matriz compuesta por componentes orgánicos, polialcoholes, hidrato de carbono y polisacáridos, que confieren protección a las células disminuyendo la tasa de deshidratación de en el momento del procedimiento de secado.

##### 4.2.1.2.2 Procedimiento de mezclado Biomasa con Osmoprotector

Terminada la fermentación, realizar control de pureza mediante tinción Gram y recuento viable de células para determinación de concentración.

Tomar muestras de control para trazabilidad (200 cc), en envase estéril.

Mezclar con matriz líquida en proporción de 1:1

Homogenizar la mezcla

Tomar muestras para control; 3 muestras de 100 cc cada una. Las mediciones a realizar corresponden a pH, densidad y recuento viable.

Almacenar muestras en cámara de refrigeración (4-6°C) y sala climatizada (23-25°C)

##### 4.2.1.2.3 Procedimiento de adsorción de células en soporte sólido (proceso con protección industrial)

Las células ya mezcladas con el osmoprotector son adicionas al soporte sólido en el cual son adsorbidas.

La proporción de sólido-líquido debe ser tal que no se produzca escurrimiento en el momento de mezclado.

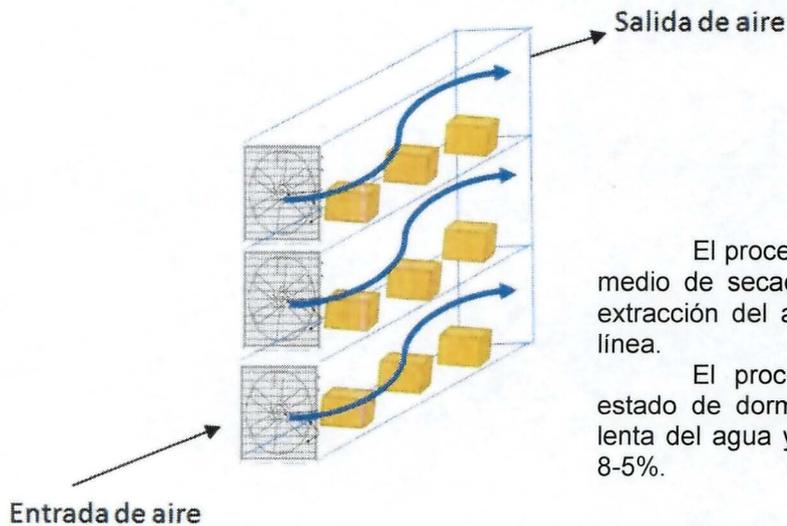
El mezclado con el soporte sólido debe ser cuidadoso para que la homogeneidad y cantidad de líquido sea adsorbida en su totalidad por el carrier.

Posteriormente la mezcla es pasada a un túnel de secado con aire forzado en el cual se controla temperatura, humedad y velocidad del aire.

Se debe mantener un control continuo con mediciones de humedad rápida para controlar la velocidad de secado y la humedad óptima para no provocar un shock osmótico en las células.

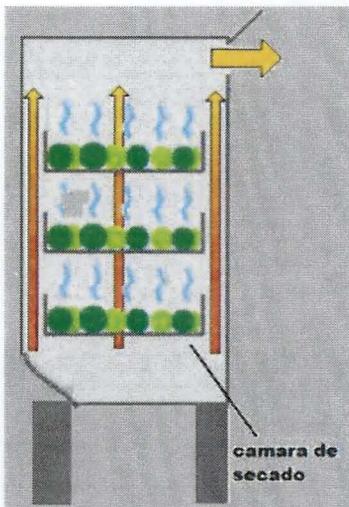
Los parámetros del túnel de secado se muestran en la siguiente tabla

Parámetro	Valor
Temperatura sala	23 – 25°C
Humedad sala	60 – 30%
Tiempo	3 a 7 días



El proceso de secado se lleva a cabo por medio de secado con aire forzado horizontal y extracción del aire húmedo en el final de cada línea.

El proceso debe dejar las células en estado de dormancia, mediante la evaporación lenta del agua y llegando a una Humedad entre 8-5%.



Se requiere que el proceso de secado sea lento e idealmente el material puesto en los túneles cargado como monocapa.

La temperatura no debe ser elevada para no aumentar la tasa de evaporación y el aire de ingreso no ser a una velocidad alta para no provocar polvo en suspensión y contaminación cruzada con otros procesos, además de esparcimiento de material particulado dentro de la sala de secado.

El tiempo de secado, para cada una de las células es variable, no es un proceso que pueda ser trabajado para todas por igual, lo que suma procesos en serie de producción, partiendo desde la programación de las fermentaciones hasta llegar a este punto. Esto se soluciona con el aumento de unidades de secado.

Un punto a considerar es la carga de producto en cada túnel, ya que el aumento de material en secado aumenta la humedad y debe optimizarse el proceso de extracción del aire húmedo dentro del túnel, sin aumentar la velocidad de evaporación de agua desde las células, ya que produce shock osmótico y muerte de las células por una disminución de su actividad de agua demasiado rápida.

La evaluación de los distintos carriers evaluados, mostro tener distintos efectos en el proceso de secado, por tratarse de un proceso aséptico y no estéril, se debió ajustar la carga por túnel, la humedad, la velocidad del aire cada túnel, sumar procesos de volteo y evaluar más carriers por condiciones de contaminación.

#### 4.2.2 Problemas metodológicos enfrentados

No se enfrentaron problemas metodológicos. La empresa encargada de realizar la actividad de formulación, Biogram S.A., posee amplia experiencia en el tema

#### 4.2.3 Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta

No se realizaron modificaciones durante la ejecución del proyecto.

### 4.3. **Evaluación de los formulados en condiciones controladas**

#### 4.3.1 Evaluación de los formulados sobre la población de nemátodos fitoparásitos, en raíces de plantas inoculadas, en condiciones controladas

##### 4.3.1.1 Lugar de estudio

La investigación se realizó en los invernaderos de la Fac. de Agronomía de la Universidad de Chile, ubicados en la comuna de la Pintana, Región Metropolitana, bajo condiciones controladas de temperatura, luz y humedad, durante la temporada 2014. Para los ensayos, se utilizaron plantas de cerezo *in vitro* variedad Colt, provenientes del Vivero Agromillora.

##### 4.3.1.2 Recolección del sustrato naturalmente infectado

Para el llenado de las macetas se procedió a coleccionar un volumen de 100 L de suelo naturalmente infectado con nemátodos, proveniente de la localidad de Casablanca. El suelo fue homogenizado y utilizado para llenar cada maceta de 500 cm<sup>3</sup>, las que posteriormente fueron inoculadas con los preparados bacterianos.

#### 4.3.1.3 Preparación del inóculo bacteriano

En el estudio se utilizaron 4 cepas que fueron seleccionadas en el 4.1, ya sea por su potencial biocontrolador de nemátodos fitoparásitos, o como cepas no supresivas que presentaron potencial bioestimulante del crecimiento de raíces.

La preparación de cepas puras, fue realizada bajo los mismos protocolos utilizados en 4.1.1.4, mientras que las rizobacterias formuladas, fueron preparadas por la empresa Biogram S.A., que colabora permanentemente con el Laboratorio de Nematología de la Universidad de Chile, como se indica en el 4.2.

#### 4.3.1.4 Establecimiento de los ensayos

##### 4.3.1.4.1 Muestreo de suelo

Se determinó la población inicial de nemátodos presentes, realizando un análisis nematológico del suelo obtenido, como muestra el 4.1.1.5.1.

##### 4.3.1.4.2 Extracción de formas móviles y análisis nematológico

La extracción de formas móviles del suelo, se realizó como se describe en 4.1.1.5.2.

Para la extracción de nemátodos endoparásitos de raíces, se usó el método de incubación de tejidos. Para el desarrollo de esta técnica, se usaron 10 gr de raíces con un diámetro de hasta 5 mm, las que fueron cuidadosamente lavadas para eliminar todos los restos de suelo. Mientras todavía estaban húmedas, se cortaron en pequeños trozos de 5-10 mm y se colocaron en frascos de vidrio de 500 ml de capacidad, agregando una fina lámina de agua en el fondo. Los frascos, semitapados para evitar la proliferación de hongos patógenos, se almacenaron a una temperatura de 20-25°C. Se extrajo una muestra diaria, agregando 100 ml de agua cada vez, agitando enérgicamente para dejar los nemátodos en suspensión. Posteriormente se recogió el agua para su análisis en lupa estereoscópica, dejando las raíces nuevamente inmersas en una fina lámina de agua. Este procedimiento se repitió durante 3 días.

##### 4.3.1.4.3 Inoculación y trasplante

Esta etapa se realiza en abril de 2014. Previo a la inoculación, las plantas fueron separadas del sustrato que las protegía, dejándolas a raíz desnuda, y sumergiéndolas en agua desmineralizada por un corto periodo de tiempo. Para la inoculación, las plantas de cerezo, fueron sumergidas durante 20 minutos en el inóculo bacteriano, según indica cada tratamiento. Luego del trasplante, cada planta es reinoculada con una solución de 75 ml de la suspensión bacteriana, a una concentración de  $10^6$  ufc  $ml^{-1}$ , logrando la saturación del sustrato, evitando el escurrimiento.

En el caso de los tratamientos con nematicidas, la aplicación de los productos se realiza posterior al trasplante.

Las plantas se mantienen en invernadero de vidrio, a temperatura controlada de 20-25°C, con 15 horas de luz, por un periodo de 5 meses.

Este ensayo es repetido en el mes de mayo, con un nuevo sustrato. Esta vez, el suelo naturalmente infectado con nemátodos fitoparásitos, es mezclado con arena, para mejorar la retención de humedad. Se utilizan plantas de igual variedad, obtenidas en el mismo vivero. Se mantienen bajo iguales condiciones de agua, luz y temperatura. Luego de 5 meses, se realiza la cosecha de las plantas, para posterior evaluación.

Se establecieron 6 tratamientos con rizobacterias, además de un testigo químico (Cadusafos), un testigo biológico, un testigo absoluto, todos correspondientes a plantas no bacterizadas.

Los productos se mantuvieron sin exposición a altas temperaturas ni radiación solar directa.

#### 4.3.1.4.4 Tratamientos

Los tratamientos aplicados se muestran en "Fichas Técnicas".

#### 4.3.1.5 Evaluación de la formulación

Cinco meses después de la inoculación con los formulados y bacterias puras, se realizó la cosecha de las plantas y la evaluación de los parámetros de vigor, la población de nemátodos y los síntomas de daño en raíces.

La evaluación de la población de nemátodos se realizó como se describe en 4.1.1.6, mientras que para verificar la respuesta de las plantas al tratamiento con los formulados y bacterias puras se realizó las evaluaciones descritas en 4.1.2.

#### 4.3.2 Diseño experimental

El diseño estadístico corresponde a bloques completamente aleatorizados, con 9 tratamientos de 10 repeticiones cada uno. Cada unidad experimental corresponde a un grupo de 10 plantas. Las diferencias entre los tratamientos fueron analizadas mediante ANDEVA, con un nivel de confianza de 5%. Se utilizó el test de Dunnet para la separación de las medias.

#### 4.3.3 Problemas metodológicos enfrentados

Originalmente, fue contemplado un ensayo en invernadero. Sin embargo, el suelo naturalmente infectado que se utilizó, era de textura gredosa, e impedía el buen crecimiento y desarrollo radical. El agua era retenida en superficie, y al cabo de unas horas, se encontraba absolutamente compactado.

#### 4.3.4 Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta

Se decide establecer un segundo ensayo, bajo las mismas condiciones de temperatura, agua y luz, con plantas provenientes del mismo vivero. Esta vez, se utilizó suelo naturalmente infectado mezclado con arena, para mejorar su capacidad de infiltración.

#### 4.4 Caracterización fisiológica y genética de las cepas de rizobacterias con mayor efecto supresivo y/o con mayor efecto en la promoción del crecimiento.

Las cepas rizobacterianas con mejores resultados en los parámetros valorados, fueron sometidas a análisis bioquímicos y fisiológicos, con el objetivo de identificar tanto los metabolitos y enzimas asociados al control de nemátodos y la promoción del crecimiento vegetal, como también, dilucidar los sustratos utilizados por la bacteria, los cuales directamente influyen su reproducción y por supuesto su establecimiento en condiciones de campo. Los resultados generarían información base para el desarrollo futuro de cepas idóneas en determinados cultivos y/o condiciones edáficas. Los medios de cultivo que se utilizaron para llevar a cabo dicho objetivo, se describen a continuación:

##### 4.4.1 Caracterización de la actividad fisiológica, metabolitos y enzimas asociados a la actividad nematocida de las rizobacterias

Medios de Cultivo: Para el desarrollo de la investigación se utilizaron cuatro medios microbiológicos de cultivo, con propósitos específicos.

Tryptic Soy Broth-Agar (TSBA): Reactivación y multiplicación de bacterias para evaluaciones sobre nemátodos y evaluaciones bioquímicas. Concentración 100% compuesta por: 30 g l<sup>-1</sup> de Tryptic Soy Broth (TSB; BectonDickinson y Co., USA); 15 g l<sup>-1</sup> de Bacto Agar (BectonDickinson & Co., USA).

Tryptic Soy Broth Liquido (TSBL): Multiplicación de las cepas para la extracción de filtrados. Concentración 100%, compuesta por 30 g l<sup>-1</sup> de TSB.

NutrientBroth (NB): Almacenamiento cepas. Medio compuesto, relación 1:1 v/v, NutrientBroth 0,8% (Difco, USA) y Glicerina (Aballay et al., 2011)

Agar Congo Red: medio selectivo para *Agrobacterium sp.*, concentración 100% compuesta por: 30 g l<sup>-1</sup> de Tryptic Soy Broth (TSB; BectonDickinson y Co., USA); 15 g l<sup>-1</sup> de Bacto Agar (BectonDickinson & Co., USA) y 0,08 g l<sup>-1</sup> Congo red colorante histológico.

##### 4.4.1.1 Identificación de Metabolitos y Enzimas de las Rizobacterias

Las 6 cepas mejor evaluadas en condiciones de terreno, fueron sometidas a una serie de pruebas bioquímicas para determinar la ausencia o presencia de algunos metabolitos y exoenzimas, posiblemente con efecto nematocida.

Todos los ensayos fueron repetidos cuatro veces, para verificar la consistencia de los resultados. La producción de algunos metabolitos y exoenzimas fue variable, por lo cual, en algunas ocasiones, fue necesario repetir más de cuatro veces el ensayo y generar escalas de calificación arbitrarias para expresar los resultados.

##### 4.4.1.1.1 Quitinasas y Colagenasas

La presencia o ausencia de quitinasas y colagenasas, fue determinada con el sistema de placas MT2 MicroPlate™ (Biolog Inc., CA, USA). Normalmente una placa de la tecnología MicroPlate, está compuesta por 96 pocillos, que contienen un colorante redox de tetrazolio, un medio de cultivo tamponado y una fuente de carbono. Las placas MicroPlate pueden entregar

información de la habilidad de un organismo para utilizar u oxidar diferentes compuestos, de un panel preseleccionado de fuentes de carbono, por lo tanto, nos puede mostrar un perfil metabólico de una población o comunidad de microorganismos. Los pocillos que componen las placas de la referencia MT2, solo tienen el colorante redox y el medio de cultivo tamponado, por lo tanto, ofrecen la flexibilidad al usuario de diseñar o seleccionar diferentes fuentes de carbono (sustratos) y evaluar la habilidad de la población bacteriana para utilizarla. En este caso se prepararon sustratos afines a las enzimas que se pretendían evaluar: quitina y colágeno.

Se utilizó una placa MT2 para cada enzima, repitiendo cada ensayo en cuatro ocasiones en periodos de tiempo diferentes, donde cada segmento correspondía a una repetición. Se prepararon tres sustratos, dos para quitinasas y uno para colagenasas. A continuación se describen los respectivos sustratos:

Quitinas: se utilizaron dos fuentes de quitina, quitina comercial (QC) derivada de caparazón de crustáceos (Sigma-Aldrich, MO, USA), y quitina sólida (QS) que se preparó a partir de exoesqueleto molido de centolla chilena (*Lithodessantolla molina*), un subproducto que se obtiene en la industria alimenticia. Se preparó una solución en agua destilada de QC ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ); De la misma forma se realizó una solución de QS, macerando 5 g con nitrógeno líquido y diluyéndolo en 50 ml de agua destilada. Ambas soluciones fueron autoclavadas a  $121^\circ\text{C}$  durante 20 minutos.

Colágeno: se utilizó como fuente un producto comercial a base de cartílago traqueal de bovino (Sigma-Aldrich, MO, USA). Se diluyó en agua destilada ( $6 \text{ g l}^{-1}$ ). La solución fue autoclavada a  $121^\circ\text{C}$  por 20 minutos.

Montaje y evaluación: Bajo condiciones estériles, fue realizada una suspensión bacteriana de la cepa, ajustándola a una concentración de  $10^6 \text{ ufc ml}^{-1}$ . En cada pocillo de las placas, en el siguiente orden, se inocularon 110  $\mu\text{l}$  de la suspensión bacteriana y 40  $\mu\text{l}$  del sustrato a evaluar. Se utilizaron otros pocillos de la misma placa como controles, donde se inoculó agua más sustrato y agua más suspensión bacteriana, conservando la misma proporción en el volumen del sustrato y las bacterias. Las placas fueron incubadas a  $24^\circ\text{C}$  durante 72 horas, efectuando evaluaciones visuales cada 12 horas. El color violeta del tetrazolio determinó la actividad de la cepa con el sustrato administrado.

#### 4.4.1.1.2 Ácido Cianhídrico (HCN)

En medios de cultivo sólido de TSBA 50% con glicina al 0,44% p/v, bajo condiciones estériles, fueron sembradas las cepas en placas Petri. Posteriormente, previo a la incubación, en la cara interior de la tapa, fue colocado un disco de papel filtro estéril, humedecidos anticipadamente en la solución de Acido Pírico/Carbonato de Sodio, de acuerdo a Kloepper *et al.* (1991). Se incubaron durante 96 horas a  $24^\circ\text{C}$ . El cambio de coloración del papel filtro, de amarillo al color anaranjado, determinó la presencia del metabolito.

#### 4.4.1.1.3 Ácido Sulfhídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ )

En medios de cultivo sólido de TSBA 50%, bajo condiciones estériles, fueron sembradas las cepas en placas Petri. Posteriormente en la cara interior de la tapa, fue colocada una tira de papel de acetato de plomo (Macherey-Nagel GmbH & Co. Düren, Alemania) de 3 cm de largo. Las placas se incubaron a  $22^\circ\text{C}$  durante cuatro días. El cambio de coloración del papel, de blanco a gris, indicó la producción del metabolito.

#### 4.4.1.1.4 Proteasas

En placas Petri con medio de cultivo sólido, compuesto por leche descremada (15 g l<sup>-1</sup>) (Merck, Alemania) y Bacto Agar (15g l<sup>-1</sup>), bajo condiciones estériles, se sembraron las bacterias y

posteriormente se incubaron durante cinco días a 22°C. Transcurrido este tiempo, se midió el radio del halo traslúcido generado en el agar, indicador de la actividad proteolítica de la enzima. La escala de calificación se determinó según: Radio del halo < 1 cm, producción baja; > 1 < 4 cm, producción media; > 4cm, producción alta; sin halo, actividad negativa.

#### 4.4.1.1.5 Catalasas

Las cepas fueron reactivadas, posteriormente se incubaron en TSBA durante 24 horas a 22°C. Bajo condiciones estériles, en portaobjetos se colocó una muestra de cada cepa, seguidamente fue agregada una alícuota de peróxido de hidrógeno. Se evaluó visualmente la producción de burbujas, como indicador de la presencia de la enzima.

#### 4.4.1.1.6 Lipasas

Se utilizaron dos pocillos de las placas EcoPlate™ (Biolog Inc., CA, USA), empleadas para el perfil fisiológico, los cuales contienen como fuente de carbono Tween 40 y Tween 80, dos ésteres con ácido palmítico y ácido oleico, respectivamente, más sorbitol. La actividad de esta enzima fue positiva cuando la coloración de los pocillos fue violeta.

Las condiciones de incubación y concentración de las bacterias, se describen en el párrafo caracterización fisiológica de las rizobacterias.

#### 4.4.1.2 Caracterización fisiológica

El perfil fisiológico fue elaborado en base al sistema de placas EcoPlate™ (Biolog Inc., CA, USA). Cada placa está compuesta por 96 pocillos, diseñadas con 31 fuentes de carbonos comúnmente utilizadas por microorganismos del suelo. Cada placa posee tres repeticiones de las fuentes y un control, que no posee carbono, por repetición. Los pocillos poseen un colorante redox que indica el uso del sustrato.

Bajo condiciones estériles, en tubos eppendorf de 2 ml y agua destilada estéril, se realizó y ajustó una suspensión bacteriana a  $10^6$  ufc ml<sup>-1</sup>. Seguidamente, en una placa Ecoplate, se inocularon 150 µl de dicha suspensión en cada uno de los 31 pocillos, según instrucciones del fabricante. La placa se incubó por cinco días a 22°C, realizando evaluaciones visuales a partir del día dos; una vez finalizado este periodo, se realizó una evaluación de la coloración de cada pocillo, a través de un espectrofotómetro para microplacas (Epoch™, Biotek ®) a 590 nm. El tipo y número de fuentes de carbono utilizado fue analizado de acuerdo a la metodología de Garland (1997).

#### 4.4.2 Caracterización Molecular de las Cepas Rizobacterianas a través de marcadores moleculares.

La caracterización molecular se realizó con el uso de primers universales en diferentes genes secuenciados. Debido a la cercanía de algunas especies, en donde la biología molecular no permitió separar las cepas a nivel de especie, se realizaron algunas pruebas complementarias bioquímicas, que a la vez generarían información descriptiva del comportamiento de las mismas. Debido al uso de primers universales y la duda en la pureza de algunas de las cepas, se efectuó la clonación de todos los fragmentos antes de enviar a secuenciarlos.

La identificación se realizó mediante la secuenciación parcial de genes ampliamente usados como el 16S ARNr, además de la región intergénica (ITS) de los genes 16 y 23S. Como

complemento, de acuerdo a las necesidades de identificación del grupo de cepas, se utilizaron los genes: *adk* que codifica para la enzima kinasa; *rpoB* que codifica para la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa bacteriana; *gyrB* que codifica para la ADN girasa subunidad B.

#### 4.4.2.1 Metodología para obtener el material genético de las rizobacterias

**Extracción de ADN:** Las cepas rizobacterias fueron reactivadas y luego sembradas en placas con TSBA 50%, a 30° C, para favorecer la lisis celular, por 24 horas. Para la extracción de ADN, bajo condiciones estériles, con una asa se extrajo una muestra de cada cepa y se suspendió en un buffer de lisis, de acuerdo al protocolo de Helgason *et al.* (2004). El ADN obtenido se almacenó a -20°C.

**Amplificación de fragmentos de interés:** En la Tabla 1, se describen los programas y partidores utilizados para los fragmentos amplificados. Los fragmentos del gen ribosomal 16S ARNr, fueron amplificados de acuerdo al protocolo de Lane (1991). Como genes complementarios, se usaron las regiones del gen *gyrB*, con los partidores UP1F y UP2R (Yamamoto y Harayama, 1995), y BCFW1, BCRW1 para algunas especies del género *Bacillus* que no amplificaron con el primer juego de partidores (Manzano *et al* 2003); *rpoB* con los partidores *rpoB*1206 y *rpoBR*3202 (Kí *et. al* 2009); *plcR* y los partidores BA-*plcRF* y BA-*plcRR* (Ko *et. al* 2004); *adk* (Helgason *et. al* 2004); y la región intergénica (ITS) con los partidores L516SF y L516SR (Xu y Coté, 2003).

**Electroforesis:** Los productos de PCR obtenidos, fueron visualizados en geles de agarosa al 1% (p/v), en un tampón TAE 1X (Tris-acetato 2M, EDTA 50mM pH 8,0). Se utilizó bromuro de etidio 1%, como agente de tinción del ADN. Los fragmentos fueron separados a 120V durante 40 minutos. El marcador molecular fue de 100 bp.

**Purificación Productos de PCR:** Los fragmentos de ADN amplificados y obtenidos de la electroforesis, fueron purificados con el Kit comercial E.Z.N.A® (Omega, Bio-Tek Inc. GA, USA), según las instrucciones del fabricante.

Tabla 1. Partidores y programas utilizados para la amplificación de los fragmentos genómicos

F <sup>1</sup>	Primer 5'-3'	T <sup>2</sup> (pb)	Condiciones PCR		
			D <sup>3</sup>	C <sup>4</sup>	E <sup>5</sup>
16S	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG (27f)	1500	94°C (10')	94°C (1')- 58°C (1')- 72°C (1'); 40x	72°C (5')
	AAGGAGGTGWTCCARCC (1525r)				
gyrB	GTTTCTGGTGGTTTACATGG (gyr-B-F)	400	95°C (5')	95°C (1') - 60 °C (1') - 72 °C (1') 35x	72°C (7')
	CAACGTATGATTTAATTCCACC (gyr-B-R)				
	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAY GCNGGNGGNAARTTYGA (UP1-F)	1200	94°C (2')	94°C (1') - 66 °C (1') - 72 °C (2') 30x	72°C (7')
	AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCC RTCNACRTCNGCRTCNGTCAT(UP2-R)				
rpoB	(ATCGAAACGCCTGAAGGTCCAAACAT (rpoB1-f)	1200	95°C (3')	95°C (20'') - 55 °C (30'') - 72 °C (1.5'') 35x	72°C (5')
	ACACCCTTGTTACCGTGACGACC (rpoB1-r)				
plcR	AAAAAGGAAGAATATCATC (BA-plcRF)	424	95°C (5')	95°C (30'') - 53 °C (30'') - 72 °C (1'') 30x	72°C (5')
	ATGCATCTTCAATCTCTG (BA-plcRR)				
adk	CAGCTATGAAGGCTGAAACTG	450	94°C (5')	94°C (1') - 57 °C (1') - 72 °C (1') 40x	72°C (7')
	CTAAGCCTCCGATGAGAACA				
ITS 16-23S	TCGCTAGTAATCGCGGATCAGC (L516SF)	500	95°C (45'')	94°C (15'') - 53 °C (30'') - 72 °C (90'') 30x	72°C (5')
	GCATATCGGTGTTAGTCCCGTCC (L523SR)				

<sup>1</sup>Fragmento a amplificar, <sup>2</sup>Tamaño en pares de bases, <sup>3</sup>Desnaturalización, <sup>4</sup>Ciclos, <sup>5</sup>Elongación

Clonación: Con los fragmentos purificados, se procedió a clonarlos para garantizar el envío de un fragmento "único", por colonia, a la secuenciación. Se utilizó la bacteria *Escherichiacoli* OneShot® TOP10 químicamente competente (Invitrogen®) como célula huésped.

La clonación fue realizada mediante el Kit pGEM (Promega, USA), según las instrucciones técnicas del fabricante. Las bacterias *E. coli* transformadas fueron visualizadas en medio Agar-TSB suplementado con Carbenicilina, Streptomycin, IPTG y X-Gal., donde además las colonias que incluyen el vector con el fragmento deseado se identifican con el color característico de las colonias de *E. coli*, mientras las que han incluido el vector plasmidial sin modificar adquieren el color azul que evidencia la actividad de la β-galactosidasa. Las colonias sin color se multiplicaron, posteriormente se extrajeron y se purificaron los plásmidos con el kit comercial E.Z.N.A® (Plasmid DNA Mini kit, Omega Bio-tek Inc., GA, USA) según instrucciones del fabricante.

#### 4.4.2.2 Secuenciación e identificación molecular

Los plásmidos fueron enviados a secuenciar al laboratorio MacroGen USA Corp. (Rockville, Maryland, USA). Para la secuenciación, se utilizaron los partidores universales T7 y SP6 (Schenborn y Mierendorf, 1985). Se enviaron cinco colonias, en promedio, por cada fragmento genómico a secuenciar, con el objetivo de verificar si existía algún tipo de contaminación en las cepas. Posteriormente, los resultados fueron alineados mediante el programa Geneious versión 7 (Biomatters Ltda.©), y analizados en la base de datos de NCBI, usando el algoritmo Blastn (Zhang *et. al.*, 2000; Morgulis *et. al.*, 2008). Los análisis filogenéticos fueron elaborados usando el programa MEGA versión 6 (Tamura *et. al* 2013).

#### 4.4.2.3 Pruebas adicionales para identificación de especies

Tinción Gram: Se efectuó bajo el método clásico de tinción, utilizando como reactivos safranina, alcohol acetona, violeta cristal y lugol. Se utilizaron colonias frescas (TSB 50% por 24h). Las muestras se fijaron en portaobjetos y se visualizaron a través de microscopio óptico (Axiolmager A2, Carl Zeiss, Alemania) a 1000x.

Tinción de cristales: Esta prueba fue realizada para la cepa FIAS2130, perteneciente al grupo *Bacillus cereus*. La tinción se efectuó sobre un frotis de la colonia en portaobjetos, utilizando una solución de azul coomassie de acuerdo a la metodología descrita por Niedmann-Lolas y Meza-Basso (2006). Las colonias provenían de placas de TSBA al 50%, que crecieron por 72 horas a 30°C. Las muestras se observaron mediante un microscopio de contraste (Axiolmager A2, Carl Zeiss, Alemania) a un aumento 1000x.

Uso de medios selectivos: medio Congo Red Agar específico para la identificación del género *Agrobacterium*.

### 4.5 Solicitud de Patente de Innovación

#### 4.5.1 Preparación del Dossier

De acuerdo a los requisitos contemplados en la legislación, se entregó a la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad, un dossier que contiene tanto la caracterización del microorganismo utilizado como ingrediente activo en la formulación, como del proceso tecnológico para la obtención del nuevo biopesticida. Dicha información fue revisada y objetada, solicitando mayor información sobre posibles daños al medio ambiente y seres vivos, que pudieran estar relacionados con las cepas de rizobacterias.

Luego de aclarar los orígenes del material bacteriano utilizado, se entregó a la empresa especializada para su revisión, en este caso la consultora Jarry. Dicha empresa entregará un informe, que indicará la factibilidad de patentamiento de la invención. Esta etapa será lograda posterior a la fecha de término del proyecto.

#### 4.5.2 Registro de Cepas y Depósito en banco de microorganismos

Se realizará el Registro de Cepas y correspondiente depósito en un banco de microorganismos reconocido, con el propósito de completar los requisitos que contempla al respecto la legislación vigente. Esta etapa será lograda posterior a la fecha de término del proyecto.

#### 4.5.3 Solicitud de patente de innovación

La solicitud de patente de innovación será entregada al organismo correspondiente, después de la fecha de término del proyecto.

## 5. ACTIVIDADES

### 5.1 Carta Gantt propuesta original

N° OE	N° RE	Actividad / Hitos Críticos	2011			2012				2013			2014			
			2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	
1	1	<b>1. Selección de cepas de rizobacterias</b>														
		1.1 Selección de cepas	X	X												
		<b>2. Selección de plantas</b>														
		2.1 Selección de material, plantas en bolsas, en sustrato fumigado		X												
		2.2 Mantenición de plantas en bolsas			X											
		<b>3. Revisión y mantención del inóculo</b>														
		3.1 Reactivación de cepas guardadas a -70°C		X	X											
		3.2 Cultivo en TSBA y mantención en medio-glycerol -70 °C		X	X											
		<b>4. Selección de predios</b>														
		4.1 Revisión de antecedentes nematológicos		X												
		4.2 Visitas a predios, muestreos, análisis		X	X											
		<b>5. Preparación de terrenos</b>														
		5.1 Preparación de suelo, limpieza		X	X											
		<b>6. Inoculación y plantación</b>														
		6.1 Preparación del inóculo en base a TSBA		X	X	X										
		6.2 Inoculación y plantación plantas de cerezos/ HC		X	X	HC										
		<b>7. Cuidado de plantas I</b>														
		7.1 Cuidado de las plantas				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		<b>8. Análisis nematológicos de suelo y análisis de raíces</b>														
		8.1 Muestreos de suelos y raíces / HC		X	X		X		HC					HC	HC	X
8.2 Análisis nematológicos de suelos		X	X		X		X					X	X	X		
8.3 Análisis de raíces, daños, crecimiento					X		X	X				X	X	X		
<b>9. Aplicaciones post plantación</b>																
9.1 Preparación del inóculo en base a TSBA							X					X				
9.2 Aplicación							X					X				
2	2	<b>10. Evaluación parámetros vegetativos</b>														

		10.1 Medición de altura de brote principal y nº de hojas						X				x					X		
		10.2 Área sección transversal de tronco, cm2 (ASTT)						X				X					X		
		<b>11. Análisis de datos</b>																	
		11.1 Ordenamiento de los datos						X						X	X		X		
		11.2 Análisis estadísticos, elaboración de tablas / HC						X	X					X	X		HC		
3	3	<b>12.Preparación y evaluación de formulaciones</b>																	
		12.1 Preparación de TSB 1x1010 ufc/ml											X						
		12.2 Preparación formulado											X						
		12.2 Evaluación de eficacia en macetas / HC													X	X		HC	
		12.4 Mantenión de formulados por 3 meses											X	X	X				
		12.5 Evaluación de viabilidad de bacterias													X	X			
		<b>13. Análisis de datos. informe final</b>																	
		13.1 Ordenamiento de los datos																X	X
		13.2 Análisis estadísticos, elaboración de tablas																X	X
13.3 Elaboración de informe final																X	X		
4	4	<b>14. Solicitud de patentamiento</b>																	
		14.1 Inicio de formalización solicitud de patente de invención / HC																X	HC
		<b>15. Difusión de resultados</b>																	
5	5	15.1 Charla, SOCHIFIT															X		
		15.2 Publicación de resultados, Revista Frutícola																X	
		15.3 Publicar resultados página WEB Viveros El Tambo																X	

5.2 Carta Gantt real

Nº OE	Nº RE	Actividad / Hitos Críticos	2011				2012				2013				2014				
			2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
1	1	<b>1. Selección de cepas de rizobacterias</b>																	
		1.1 Selección de cepas			X														
		<b>2. Selección de plantas</b>																	
		2.1 Selección de material, plantas en bolsas, en sustrato fumigado			X														
		2.2 Mantención de plantas en bolsas			X	X			X										
		<b>3. Revisión y mantención del inóculo</b>																	
		3.1 Reactivación de cepas guardadas a-70°C			X				X										
		3.2 Cultivo en TSBA y mantención en medio-glycerol -70 °C			X				X										
		<b>4. Selección de predios</b>																	
		4.1 Revisión de antecedentes nematológicos			X	X			X										
		4.2 Visitas a predios, muestreos, análisis			X	X			X										
		<b>5. Preparación de terrenos</b>																	
		5.1 Preparación de suelo, limpieza			X	X			X										
		<b>6. Inoculación y plantación</b>																	
		6.1 Preparación del inóculo en base a TSBA			X	X			X										
		6.2 Inoculación y plantación plantas de cerezos/ HC			X	HC			X										
		<b>7. Cuidado de plantas I</b>																	
		7.1 Cuidado de las plantas			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		<b>8. Análisis nematológicos de suelo y análisis de raíces</b>																	
		8.1 Muestreos de suelos y raíces / HC			X	X	X		HC			X		HC	HC	X			
8.2 Análisis nematológicos de suelos			X	X			X		X			X	X	X					
8.3 Análisis de raíces, daños, crecimiento							X		X	X		X	X	X					
<b>9. Aplicaciones post plantación</b>																			
9.1 Preparación del inóculo en base a TSBA					X	X		X		X		X							
9.2 Aplicación					X	X		X		X		X							
2	2	<b>10. Evaluación parámetros vegetativos</b>																	
		10.1 Medición de altura de brote principal y nº de hojas																	
		10.2 Área sección transversal de tronco, cm2 (ASTT)									X		X	X	X				
		<b>11. Análisis de datos</b>																	
		11.1 Ordenamiento de los datos				X	X		X					X	X				

		11.2 Análisis estadísticos, elaboración de tablas / HC				X	X		X				X	X	HC				
3	3	<b>12.Preparación y evaluación de formulaciones</b>																	
		12.1 Preparación de TSB 1x10 <sup>10</sup> ufc/ml													X				
		12.2 Preparación formulado													X				
		12.2 Evaluación de eficacia en macetas / HC													HC	X	X		
		12.4 Mantención de formulados por 3 meses														X			
		12.5 Evaluación de viabilidad de bacterias														X			
		<b>13. Análisis de datos. informe final</b>																	
		13.1 Ordenamiento de los datos																X	X
		13.2 Análisis estadísticos, elaboración de tablas																	X
13.3 Elaboración de informe final																	X		
4	4	<b>14. Solicitud de patentamiento</b>																	
		14.1 Inicio de formalización solicitud de patente de invención / HC										X	X	X	X	HC	X	X	
5	5	<b>15. Difusión de resultados</b>																	
		15.1 Charla, SOCHIFIT												X					
		15.2 Publicación de resultados, Revista Fruticola																	
		15.3 Publicar resultados página WEB Viveros El Tambo																	

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Evaluación del efecto de cepas de rizobacterias nativas sobre la población de nematodos fitoparásitos y sobre el crecimiento de la planta, en condiciones de campo.

#### 6.1.1 Evaluación de la actividad supresiva de las selecciones de rizobacterias sobre la población de nemátodos fitoparásitos, en raíces de plantas inoculadas, en condiciones de campo

##### 6.1.1.1 Predio La Paloma

A continuación, se presentan las variaciones de poblaciones de nemátodos fitoparásitos en el suelo, donde la mayor presencia corresponde a nemátodos del género *Pratylenchus* y *Xiphinema*.

Tabla 2. Variación de las poblaciones de nematodos fitoparásitos en La Paloma

Tratamiento	N° nematodos/ 250 cm <sup>3</sup> de suelo		Tasa Reproductiva (R) <sup>Y</sup>	% de control
	Población inicial (P <sub>i</sub> )	Población Final (P <sub>f</sub> )	P <sub>f</sub> /P <sub>i</sub>	
FIAPF550	43,2	507,6	11,75	2,1
FIASP2130	51,6	381,0	7,38	20,3
FIABC1460	38,4	1.035,0	26,95	0,0
FIAPV10200	51,6	298,4	5,78 *	37,6
FIAPP8050	26,2	665,6	25,40	0,0
FIABM1850	38,8	353,6	9,11	1,7
FIACF11150	37,4	206,6	5,52 *	40,4
Testigo químico	71,4	224,2	3,14 *	66,1
Testigo	42,6	394,8	9,27	

P<sub>i</sub>: población inicial (22-12 2011); P<sub>f</sub>: población final (03-01 2014). Medias seguidas por asteriscos, indican diferencias significativas con el Testigo de acuerdo al Test de Dunnet (p ≤ 0,05)

### 6.1.1.2 Predio Nancagua

En este predio la mayor densidad de nemátodos fitoparásitos corresponde a la especie *Xiphinema americanum* s.l. seguido por representantes del género *Pratylenchus*, más otros género de menor importancia agrícola. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Variación de poblaciones de nemátodos fitoparásitos en el predio Nancagua.

Tratamiento	N° nematodos/ 250 cm <sup>3</sup> de suelo		Tasa Reproductiva (R) <sup>Y</sup>	% de control
	Población inicial (P <sub>i</sub> )	Población Final (P <sub>f</sub> )	P <sub>f</sub> /P <sub>i</sub>	
FIAPF550	9,4	38,4	4,09*	68.7
FIASP2130	9,4	36,6	3,89*	70.2
FIABC1460	9,4	195,0	20,74	0.0
FIAPV10200	7,6	226,2	29,76	0.0
FIAPP8050	9,4	127,8	13,60	1.5
FIABM1850	9,4	531,0	56,49	0.0
FIACF11150	9,4	116,4	12,38	5.2
Testigo químico	13,0	13,8	1,06*	91.9
Testigo	13,0	169,8	13,06	

P<sub>i</sub>: población inicial (27/01/2012); P<sub>f</sub>: población final (03-01 2014). Medias seguidas por asteriscos, indican diferencias significativas con el Testigo de acuerdo al Test de Dunnet ( $p \leq 0,05$ )

### 6.1.1.3 Predio Tinguiririca

En la Tabla 4 se presentan los datos de variaciones obtenidos una vez concluidos los programas de aplicaciones al suelo. Los datos se refieren al total de nemátodos fitoparásitos presentes, donde domina la presencia de *Xiphinema americanum s.l.*, *Pratylenchus thornei*. y *Helicotylenchus sp.*

Tabla 4. Variación de las poblaciones de nemátodos fitoparásitos, predio Tinguiririca

Tratamiento	N° nematodos/ 250 cm <sup>3</sup> de suelo		Tasa Reproductiva (R) <sup>Y</sup>	% de control
	Población inicial (P <sub>i</sub> )	Población Final (P <sub>f</sub> )	P <sub>f</sub> /P <sub>i</sub>	
FIAAR5130	28,0	88,4	3,16*	46,9
FIAAR9110	76,4	290,6	3,80	36,0
FIAAR8300	39,6	95,0	2,40*	59,6
FIABM7330	56,8	172,2	3,03*	49,0
FIABM8150	75,0	289,2	3,86	35,1
FIABP5020	64,2	367,8	5,73	3,6
FIABS6360	58,4	265,8	4,55	23,4
FIAPP13010	74,4	300,0	4,03	32,1
Testigo químico	63,6	93,0	1,46*	75,4
Testigo	33,4	198,4	5,94	

P<sub>i</sub>: población inicial (31/11/2012); P<sub>f</sub>: población final (02-01 2014). Letras iguales, no hay diferencias estadísticas de acuerdo al Test de Fisher (P<0.05). Medias seguidas por asteriscos, indican diferencias significativas con el Testigo de acuerdo al Test de Dunnet (p ≤ 0,05).

6.1.2 Evaluación de la actividad promotora de crecimiento de las selecciones de rizobacterias, en raíces de plantas de vid, en ensayos de campo.

En la tabla 5, se presentan los parámetros vegetativos evaluados los predios La Paloma y Nancagua, para determinar el efecto de los tratamientos en el vigor de las plantas.

Tabla 5. Evaluaciones de vigor en los predios La Paloma y Nancagua

Tratamientos	Evaluación raicillas		ASTT (cm <sup>2</sup> )	
	escala 1 – 10 (1= atrofiadas : 10= sanas)		La Paloma	Nancagua
	La Paloma	Nancagua		
FIAPF550	7,8	5,8	26,0	13,31
FIASP2130	7,6	7,2	25,1	15,46
FIABC1460	6,8	6,4	30,0	11,30
FIAPV10200	7,2	7,0	19,7	16,85
FIAPP8050	7,2	6,8	15,7	17,02
FIABM1850	7,3	7,2	21,1	12,58
FIACF11150	7,2	4,6	17,6	12,54
Testigo químico	8,2	6,2	18,4	19,66
Testigo	7,0	6,0	20,0	12,89

Letras iguales, no hay diferencias estadísticas de acuerdo al Test de Fisher ( $p \leq 0,05$ ). Medias seguidas por asteriscos, indican diferencias significativas con el Testigo de acuerdo al Test de Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

En la Tabla 6 se presentan los datos de vigor de las plantas, predio Tinguiririca.

Tabla 6. Área de sección transversal de tronco, Huerto santa Mónica, Tinguiririca.

Tratamiento	ASTT (cm <sup>2</sup> ) media
FIAAR5130	7,7
FIAAR9110	6,9
FIAAR8300	7,5
FIABM7330	5,9
FIABM8150	6,6
FIABP5020	6,6
FIABS6360	8,2
FIAPP13010	7,7
Testigo químico	6,6
Testigo	7,2

Medias seguidas por asteriscos, indican diferencias significativas con el Testigo de acuerdo al Test de Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

### 6.1.3 Análisis de los datos

Los datos obtenidos con los ensayos de campo, después de 2 temporadas de tratamientos, indican que las cepas evaluadas en su etapa final presentan la capacidad de disminuir la población de nemátodos fitoparásitos en el suelo y algunos daños en raíces. Junto con ello, hay una tendencia importante en aumento de vigor en las plantas tratadas.

No todos los datos son estadísticamente diferentes al Testigo, pero el hecho de que algunas cepas después de 2 temporadas, se muestran diferentes a las plantas no tratadas, debiéndose solo a una cuestión de tiempo y que aquellas con leves tendencias en el futuro, bajo un programa permanente de aplicaciones, también se manifiesten en la misma forma.

### 6.1.4 Selección final de las cepas

De acuerdo a los resultados obtenidos, las cepas seleccionadas para su inclusión en el desarrollo comercial de un bionemático, corresponden a las siguientes:

<b>Cepas originales</b>	<b>Especie(s)</b>
FIAPf550	Consorcio: <i>Oeskorvia turbata</i> <i>Pseudomonas fluorescens/aeruginosa</i>
FIASp2130	<i>Bacillus thuringiensis</i>
FIAAr5130	Consorcio <i>Bacillus</i> sp <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Agrobacterium radiobacter</i>
FIAAr8300	Consorcio: <i>Agrobacterium radiobacter</i> <i>Pseudomonas</i> sp.

La correcta identificación de las cepas se realizó de acuerdo al análisis de ácidos grasos, con lo cual se obtuvo una primera aproximación al género y especie. Posteriormente las cepas más promisorias fueron sometidas a análisis moleculares para su identificación (Ver 6.2).

Una de las situaciones que se repitieron en forma frecuente, fue la presencia de consorcios naturales, formados en la rizósfera de las plantas de donde vienen estos aislados y que son muy difíciles de separar. Hay una estrecha asociación entre algunas rizobacterias que las hace estar en forma muy unida y desarrollarse en forma muy ligada, por lo que finalmente se optó por trabajar algunas cepas como el consorcio natural que ocurre en la rizósfera. Ello considerando también que puede ser que su efecto en la disminución de las poblaciones de nemátodos o su efecto en las plantas se deba a una interacción entre estas diferentes rizobacterias.

## 6.2 Caracterización fisiológica y genética de las cepas de rizobacterias con mayor efecto supresivo y/o con mayor efecto en la promoción del crecimiento.

### 6.2.1 Metabolitos y Enzimas de las Rizobacterias

Todas las cepas rizobacterianas evaluadas presentan actividad en al menos tres de los metabolitos y enzimas evaluados (Tabla 7).

Tabla 7. Presencia de metabolitos y enzimas extracelulares de las cepas Rizobacterianas evaluadas.

Cepa	Metabolitos / Enzimas						
	HCN	H <sub>2</sub> S	Colagenasas	Quitinasas	Proteasas	Lipasas	Catalasas
FIAAr9110	+	--	--	neg	--	Debil+	+
FIASP2130	--	++	++	neg	+++	+++	+
FIAFp550	--	+++	+	+	--	++	+
FIA13010	+++	--	+	+	++	+	+
FIAAr5130	+	+++	+++	++	++	n/a	+
FIAAr8300	--	+++	++	+	--	n/a	+
Testigo	neg	neg	neg	neg	neg	neg	+

n/a = no analizada

#### 6.2.1.1 Quitinasas

Los resultados de la lectura visual de las placas MT2 de la actividad de la enzima quitinasa (Figura 1) indican una actividad mayor actividad en la cepa 5130, una muy leve actividad quitinasica en las cepas 1301, 550 y 8300 (Tabla 7). Las cepas 9110 y 2130 tuvieron muy baja o nula actividad que sale de los límites de sensibilidad del método.

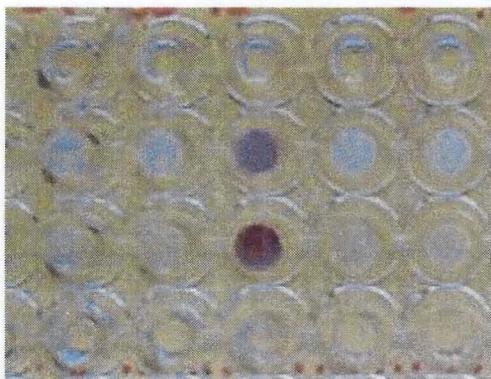


Figura 1. Actividad quitinolítica de la rizobacterias evaluadas después de 72 h de valuación. Controles negativos: primera y última fila de pocillos; actividad positiva en quitina comercial (pocillo morado claro) y quitina solida (pocillo morado oscuro).

En imagen se destaca la reacción positiva en la columna que corresponde a la cepa 5130, y leve actividad en las cepas 8300, 13010 y 550. La cepas 9110 y 2130 no manifiestan actividad chitinasica. La columna T corresponde al testigo.

### 6.2.1.2 Colagenasas

Los resultados de la lectura visual de las placas MT2-colagenasa (Figura 2), indican una actividad de la enzima colagenasa elevada en las cepas 513, 830 y 213 (Tabla 7), una baja actividad en las cepas 1301, 55. La actividad de la cepa 911 está bajo el nivel de detección del método.

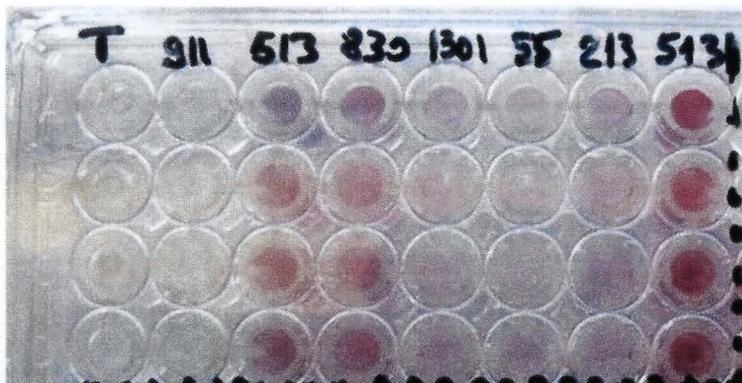


Figura 2. Placa MT2 colagenasa, después 72 h de incubación.

### 6.2.1.3 Ácido Cianhídrico

Los resultados de la lectura visual indican una intensa actividad de producción de HCN en la cepa 13010, una extremadamente leve actividad en las cepas 9110 y 8300. Todas las otras cepas se puede afirmar que tienen una liberación de HCN bajo (Figura 3).

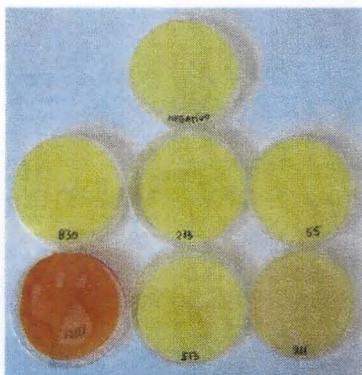


Figura 3. Liberación de ácido cianhídrico, 72 h después de la inoculación.

### 6.2.1.4 Ácido Sulfhídrico

El papel indicador de acetato de plomo (un pequeño fragmento de papel pegado en la tapa de la placa Petri) cambia su color desde blanco-papel hasta tonalidades de gris oscuro, color proporcional en intensidad con la cantidad de ácido sulfhídrico liberado dentro de la placa Petri sellada. Los resultados de la lectura visual indican alta actividad en las cepas 550, 8300 y 5130, además actividad media en la 2130. Las cepas 13010 y 9110 no indican liberación de ácido sulfhídrico.

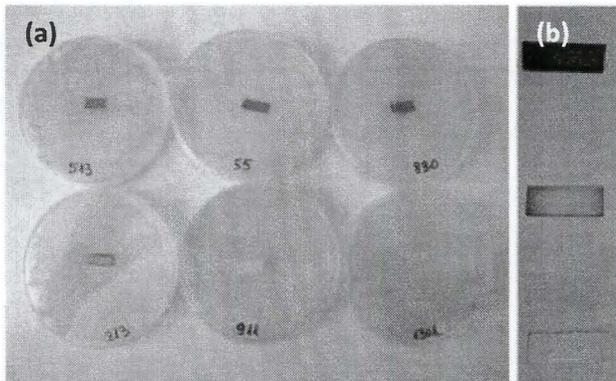


Figura 4. Actividad del Ácido Sulfhídrico (a), se indica a través de la coloración del Papel acetato de plomo (b)

#### 6.2.1.5 Proteasas

El medio opaco de leche descremada ofrece la proteína de la leche llamada caseína. Si el metabolismo de la bacteria esta capaz de utilizarla, la caseína esta consumida dejando en su lugar una playa de lisis transparente (halo). El diámetro de la playa de lisis es directamente proporcional con la actividad proteolítica total de la cepa analizada. La imagen a las 72 h de incubación (Figura 5a) muestra cepas con importante actividad proteolítica (cepa FIASp2130), cepas con mediana actividad (513 y 1301) y cepas con muy baja actividad (550, 9110 y 8300) que se escapa de los límites de detección del método.

Es importante mencionar que la cepa FIAPf550 sin actividad de la enzima en el periodo evaluado, tiene una actividad muy baja que se evidencia lentamente, ya que después de 20 días manifestó un halo de lisis de 1-2 mm (Figura 5b) que aumenta lentamente en tiempo.

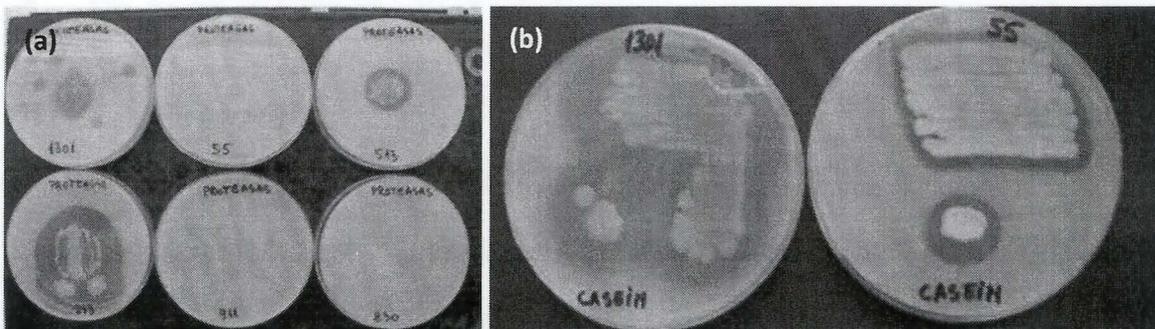


Figura 5. Actividad de la enzima proteasa de las cepas valoradas, después de 72 h (a). Actividad de las cepas FIAPp13010 y FIAPf550 (b) con diferentes cantidades de producción de la enzima.

#### 6.2.1.6 Lipasas

Para investigar la actividad lipasica se utilizaron dos pocillos de las placas EcoPlate™ (Biolog Inc., CA, USA), empleadas para el perfil fisiológico, los cuales contienen como fuente de carbono Tween 40 y Tween 80. Los Tween son dos ésteres con ácido palmítico y ácido oleico, respectivamente, más sorbitol. La actividad de esta enzima fue positiva cuando la coloración de los pocillos correspondientes a esta fuente de carbón fue violeta. En la figura 6 se observa que todas las cepas tienen un nivel de actividad de la enzima, las cepas 550 y 13010 con mayor actividad mientras 911 tiene solo actividad lipasica que corresponde al ácido palmítico.

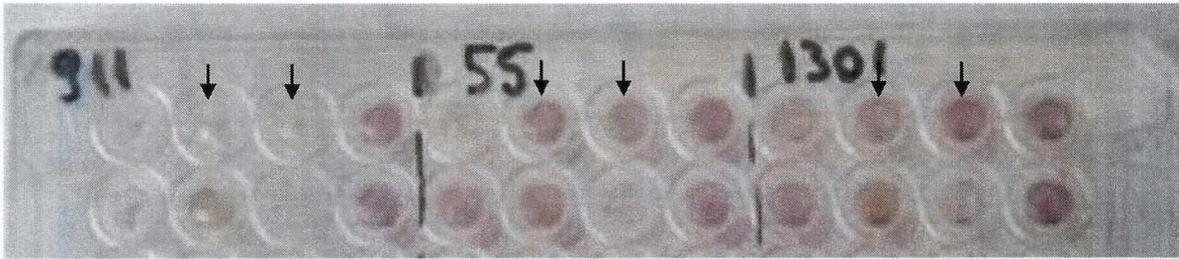


Figura 6. Actividad lipásica de las cepas 55, 1301 y 911. En los pocillos señalados en la figura, se puede observar la coloración purpura, característico de la actividad enzimática.

#### 6.2.1.7 Catalasas

La enzima catalasa, está presente en varios organismos vivos, su importancia radica en catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno, un compuesto tóxico que se usa como defensa al ataque de otros patógenos (Henkle-Dührsen y Kampkötter, 2001). En el presente trabajo, todas las cepas fueron positivas en esta enzima, sin embargo, esta enzima, dada su naturaleza, no ha sido reportada con efectos nematocidas. A pesar de ello, es una enzima importante en la defensa de los microorganismos contra otras especies patógenas, que pueden jugar un rol importante en el establecimiento de las cepas en condiciones de campo.

Las cepas 8300, 5130 y 9110, identificadas inicialmente como *Agrobacterium radiobacter*, presentan diferencias evidentes en la producción de enzimas y metabolitos (Figura 7), razón por la cual surgió la hipótesis de que las cepas 5130 y 83000 son un consorcio de dos o más bacterias, concepto que se desarrollará más adelante en el análisis molecular de las cepas rizobacterianas.

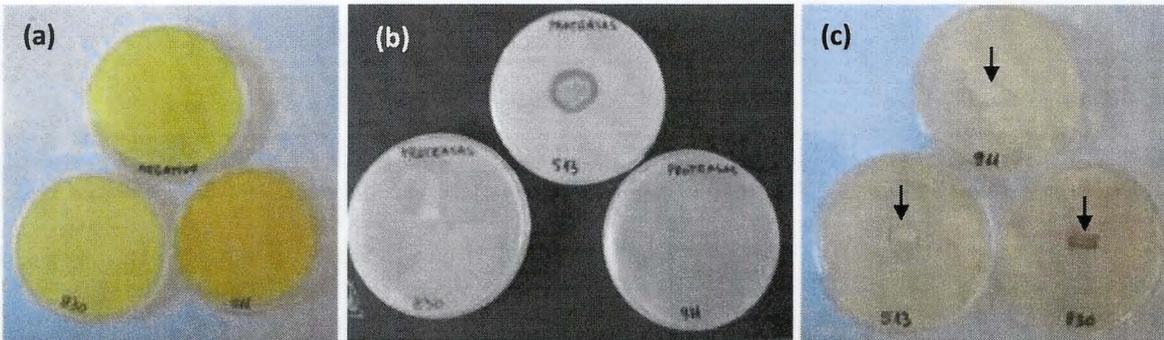


Figura 7. Actividad de los metabolitos y enzimas de las cepas FIA8300, FIA5130 y FIA9110. Ácido Cianhídrico (a), Proteasas (b) y Ácido Sulfhídrico (c).

#### 6.2.2 Caracterización fisiológica de la cepa FIASp2130

En términos generales, la cepa FIASp2130, tuvo una baja afinidad con las fuentes de carbono presentes en las placas Ecoplate (Tabla 8). La coloración violeta, característica de la actividad, no se identificaba visualmente en los pocillos donde había una baja actividad de la cepa.

Las fuentes de carbono utilizadas por la cepa FIASp2130, son principalmente ácidos carboxílicos y carbohidratos, dos compuestos normalmente existentes en los exudados de las plantas. A pesar de que se requieren hacer pruebas en un futuro específicas de los exudados

presentes en la rizósfera de cultivos puntuales, donde se quiere establecer la bacteria, la cepa evaluada tendría la facilidad de establecerse en cultivos tradicionalmente sembrado en el país.

Tabla 8. Perfil fisiológico de la rizobacteria FIASp2130 evaluada en base a las fuentes de carbono utilizadas en la placa Ecoplate.

FUENTE DE CARBONO <sup>1</sup>	FIASp2130
Ácido pirúvico metiléster <sup>a</sup>	+++
D- ácido galacturónico <sup>a</sup>	++
Ácido $\gamma$ - hidroxibutírico	+
Ácido D- glucosamínico <sup>a</sup>	-
Ácido itacónico <sup>a</sup>	-
Ácido $\alpha$ -cetobutírico <sup>a</sup>	-
Ácido D-málico	-
Feniletíl- amina <sup>b</sup>	-
Putrescina <sup>b</sup>	-
L-Arginina <sup>c</sup>	-
L-Asparagina <sup>c</sup>	-
L-Fenilalanina <sup>c</sup>	-
L-Serina <sup>c</sup>	+
L-Treonina <sup>c</sup>	-
Ácido Glicil-L-Glutámico <sup>c</sup>	-
$\beta$ -Metil-D-glucósido <sup>d</sup>	-
Ácido D-galactónico $\gamma$ -lactona <sup>d</sup>	-
D-Xilosa <sup>d</sup>	+++
i-Eritritol <sup>d</sup>	-
D-Manitol <sup>d</sup>	-
N-Acetil-D-Glucosamina <sup>d</sup>	-
D-Celobiosa <sup>d</sup>	+
Glucose-1-fosfato <sup>d</sup>	-
$\alpha$ -D-Lactosa <sup>d</sup>	+
D,L- $\alpha$ -Glicerolfosphate <sup>d</sup>	+
Ácido 2-Hidroxibenzoico <sup>e</sup>	-
Ácido 4-Hidroxibenzoico <sup>e</sup>	-
Tween 40 <sup>f</sup>	+++
Tween 80 <sup>f</sup>	+
$\alpha$ -Ciclodextrina <sup>f</sup>	+
Glicogeno <sup>f</sup>	-

<sup>1</sup>Tipo de sustrato: (a) Acido Carboxílico, (b) Aminas, (c) Aminoácidos, (d) Carbohidratos, (e) Compuestos fenólicos, (f) Polímeros; <sup>2</sup>(-) Negativo, (+) Afinidad baja, (++) Afinidad media, (+++) Afinidad Alta.

### 6.2.3 Caracterización Molecular de las Cepas Rizobacterianas

La identificación de las cepas rizobacterianas en base al gen 16S ARNr (Figura 8), definió el género al que pertenecen cada una de las cepas. La cepa FIASp2130, pertenece a la familia Bacillaceae, la cepa FIAPp13010 pertenece a la familia Pseudomonaceae, la cepa FIAAr9110 pertenece a la familia Rhizobiaceae, la cepa FIAPf550 pertenece a la familia Cellulomonadaceae.

De las seis cepas tomadas en investigación, dos fueron consideradas cepas puras: 9110 *Agrobacterium tumefaciens* y 2130 *Bacillus thuringiensis*.

Las cepas iniciales 550 y 13010 se postularon como candidatas para ser declaradas consorcios, debido a que el desarrollo morfológico en colonias con más de 72 h de edad, fueron notorios dos tipos de colonias con mínimas diferencias morfológicas.

En el caso de la cepa 13010, las dos componentes se lograron separar en el último mes, pero el trabajo de identificación molecular se ha podido completar solo para una cepa, identificada como *Pseudomonas alkalyfenolia* (Figura 10). La otra variante se identificó parcialmente como *Pseudomonas putida*, sin embargo son necesarios análisis complementarios para definir la especie con certeza.

El caso de la cepa 550 inicialmente identificada como *Pseudomonas fluorescens*, después del análisis de proteasas, se puso en duda la correcta identificación. Después de minuciosos análisis morfológicos de las colonias de diferentes edades, se planteó la hipótesis de la presencia de dos componentes bacterianos, por lo tanto se hablaría de un **consorcio FIAPf550**. Una de las componentes del consorcio fue identificada molecularmente como una variante de la especie *Oerskovia turbata* (Figura 12), según la cercanía genética. El segundo componente bacteriano fue imposible de aislar en forma pura hasta el momento de finalización del proyecto, sin embargo, según las características morfológicas, posiblemente pertenece al género *Pseudomonas*, específicamente, *Pseudomonas fluorescens* o *Pseudomonas aeruginosa*.

Las cepas inicialmente nombradas 8300 y 530 e identificadas ambas como *Agrobacterium radiobacter*, demostraron respuestas diferentes en varios los análisis de metabolitos y enzimas presentados anteriormente. Además estudiando las morfologías en diferentes estados y edades, se propusieron como consorcio incluyendo por lo menos tres cepas distintas. La separación en cepas fue posible realizarla hasta el cierre del proyecto, pero se propone la siguiente esquema de identificación en base a su morfología y ciertas características fisiológicas: consorcio 830 incluye las cepas *Agrobacterium sp.* mas dos tipos de *Pseudomonas sp.*, distintas; el consorcio 513 incluye un *Bacillus sp.*, dos tipos de *Pseudomonas* y *Agrobacterium sp.* No se realizó el trabajo de identificación molecular hasta el cierre del proyecto. Las cepas quedan bajo estudio.

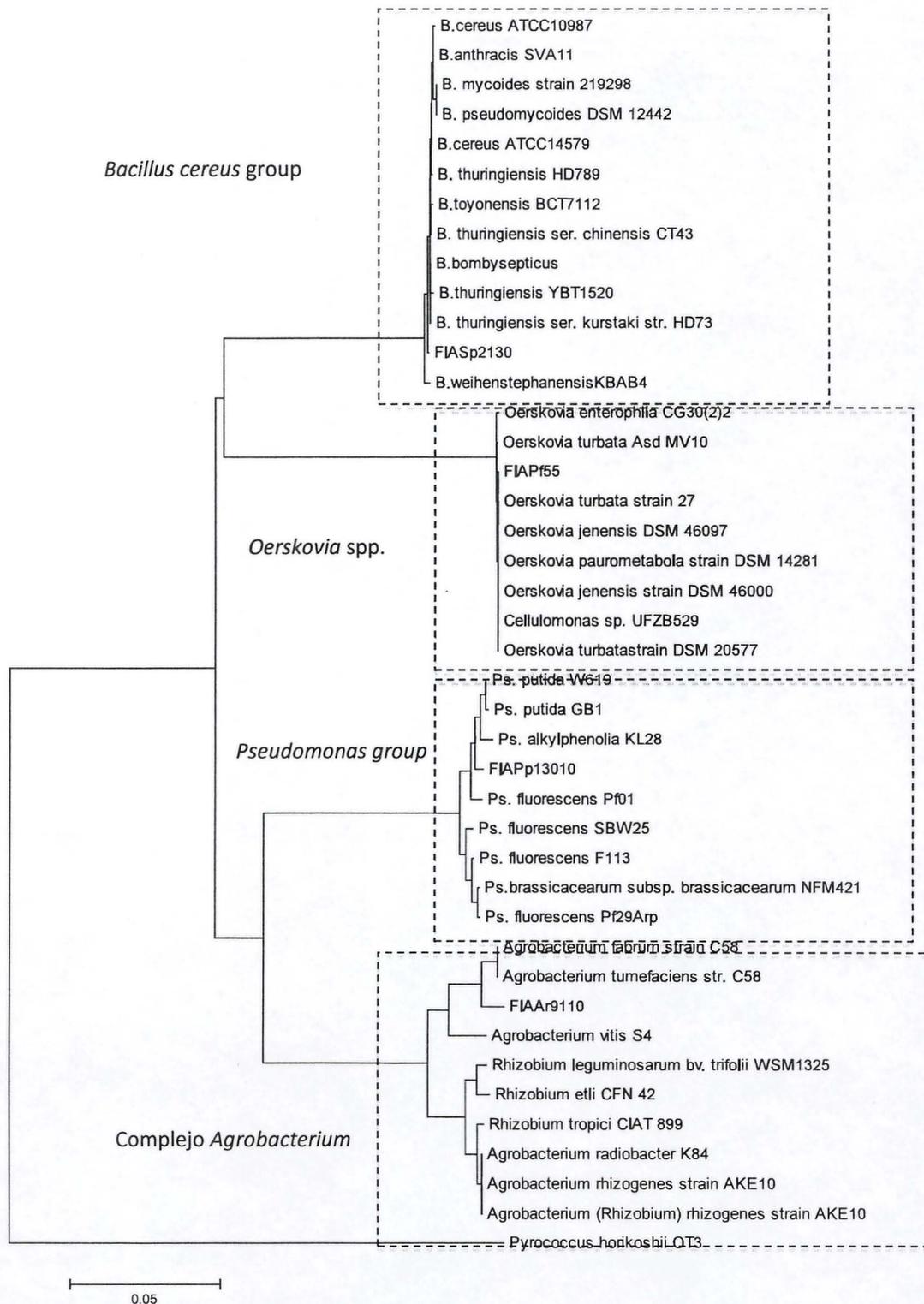


Figura 8. Clasificación de las Rizobacterias evaluadas en base al gen 16S. La historia evolutiva fue inferida por el método de agrupamiento de vecinos (Neighbor-Joining) (Saitou y Nei, 1987). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de probabilidad compuesta máxima (Tamura *et. al.*, 2004).

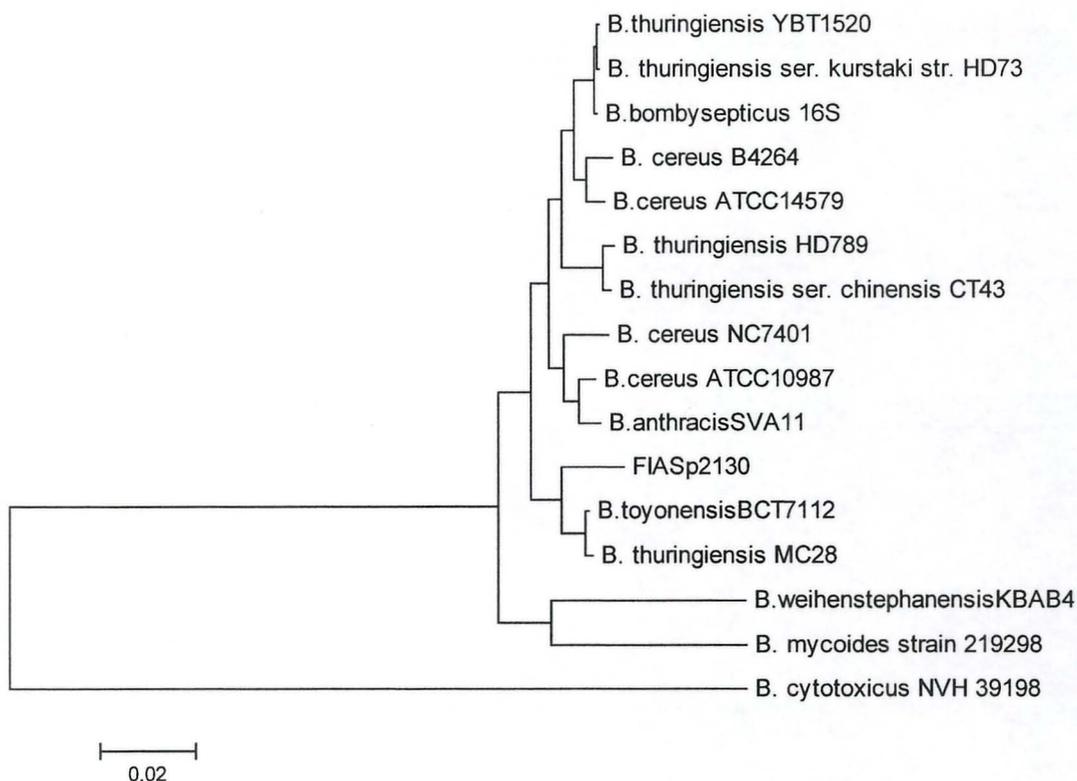


Figura 9. Clasificación de la rizobacterias perteneciente al grupo *B. cereus* (FIASp2130). El árbol contiene seis secuencias concatenadas de los genes 16S, *gyrB*, *rpoB*, *plcR*, *adk* y la región intergénica 16-23S. La historia evolutiva fue inferida por el método de agrupamiento de vecinos (Neighbor-Joining) (Saitou y Nei, 1987). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de probabilidad compuesta máxima (Tamura *et al.*, 2004).

La región ITS en la cepa FIAPp13010, separó la cepa en dos especies distintas: una cepa se acerca genéticamente de *Ps. putida* y otra de *Ps. alkylphenolia*. Esta especie requiere un trabajo adicional que no finalizó en este proyecto.

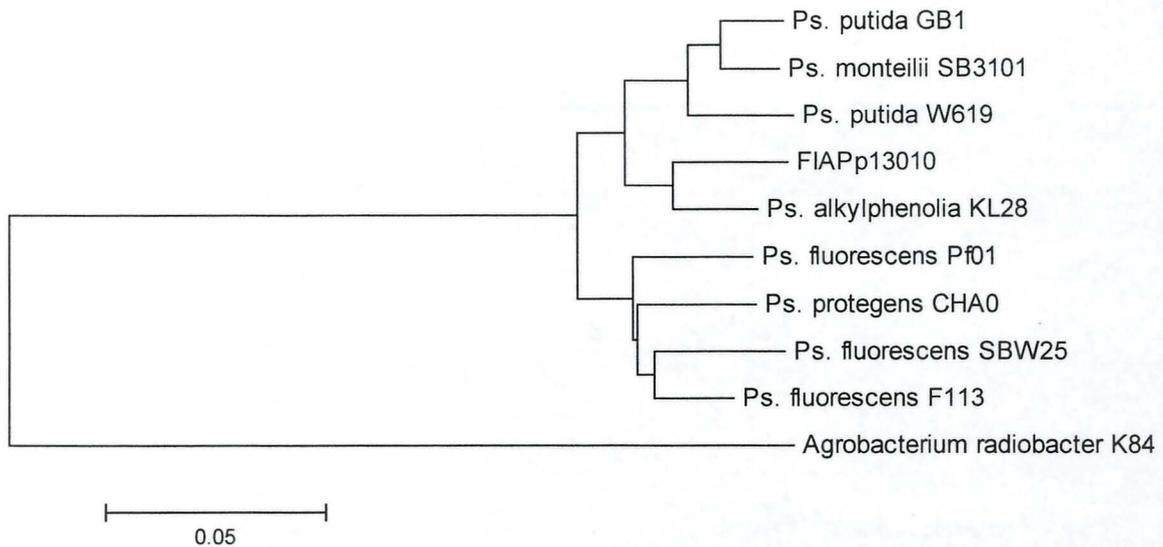


Figura 10. Clasificación de la cepa FIAPp13010, perteneciente al grupo *Pseudomonas*. El árbol contiene tres secuencias concatenadas de los genes 16S, gyrB, y rpoB. La historia evolutiva fue inferida por el método de agrupamiento de vecinos (Neighbor-Joining) (Saitou y Nei, 1987). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de probabilidad compuesta máxima (Tamura *et al.*, 2004).

En el caso del género *Agrobacterium*, en los últimos años ha surgido una reclasificación, transformándolo en el género *Rhizobium*, pero no existe un consenso en el mundo científico con respecto a esta reclasificación. Por lo tanto coexisten en este momento una doble o incluso triple nomenclatura, por ejemplo la cepa C58, considerada ampliamente en control biológico mundial, está clasificada como *A. tumefaciens*, a *A. radiobacter* y también como *Rhizobium radiobacter*, según diferentes autores. Sin duda, la diferencia entre estas cepas no está tanto en el cromosoma bacteriano, sino en la presencia o ausencia del plasmidio Ti que induce el tumor, y se puede transferir horizontalmente entre especies del género.

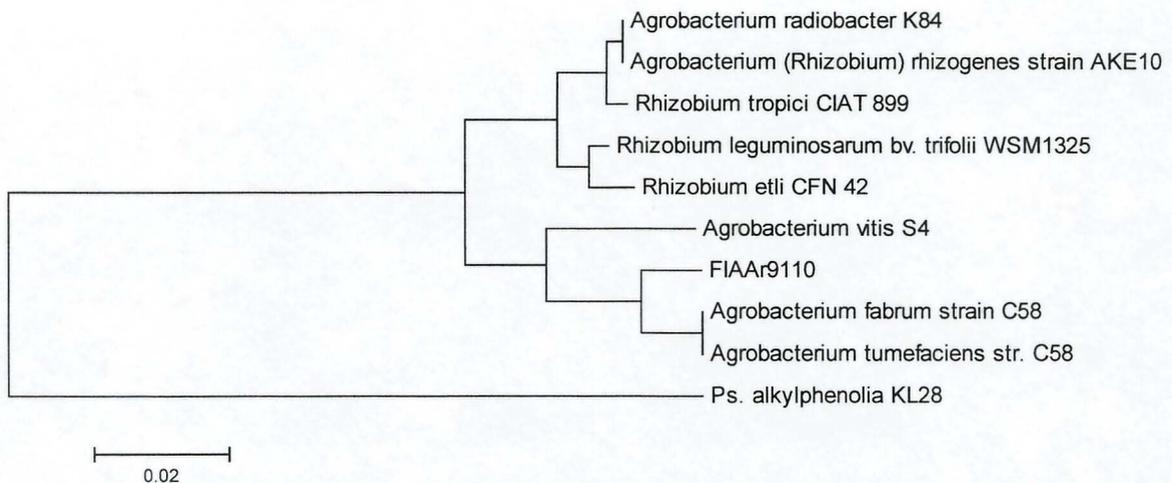


Figura 11. Clasificación de la cepa FIAAr9110, perteneciente al grupo *Agrobacterium*. El árbol contiene dos secuencias concatenadas de los genes 16S y gyrB. La historia evolutiva fue inferida por el método de agrupamiento de vecinos (Neighbor-Joining) (Saitou y Nei, 1987). Las distancias

evolutivas se calcularon utilizando el método de probabilidad compuesta máxima (Tamura *et al.*, 2004).

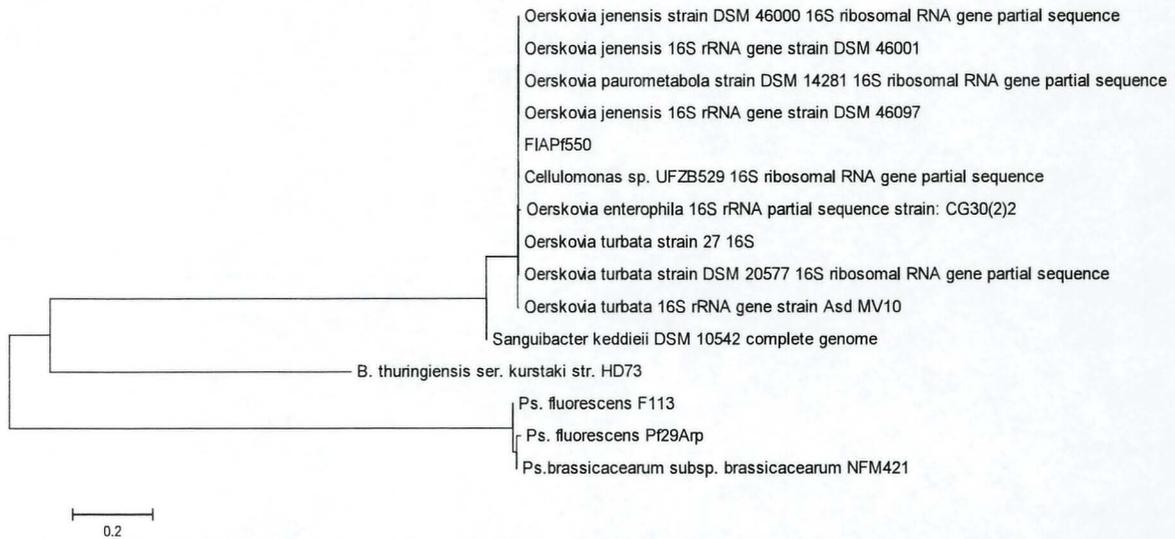


Figura 12. Clasificación de la cepa FIAPf550, perteneciente al grupo *Oerskovia* vs. el género *Pseudomonas*. El árbol la secuencia del gen 16S. La historia evolutiva fue inferida por el método de agrupamiento de vecinos (Neighbor-Joining) (Saitou y Nei, 1987). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de probabilidad compuesta máxima (Tamura *et al.*, 2004).

La cepa FiaS2130 fue identificada como *Bacillus thuringiensis*. Todos los genes utilizados y la región ITS no permitieron diferenciar la especie de estas dos cepas, a pesar de que la especie más repetitiva en los alineamientos era *B. thuringiensis*. Se concluyó que la cepa pertenecía a la especie *Bacillus thuringiensis*, al realizar tinciones con azul coomassie y determinar la presencia de cristales en ambas cepas (Figura 13), característica que diferencia *B. cereus* de *Bacillus thuringiensis* (Helgason *et al.*, 2000). Los cristales observados, presentaban formas circulares en su mayoría, y en algunas ocasiones se observaron cristales en forma bipiramidal (datos no presentados).

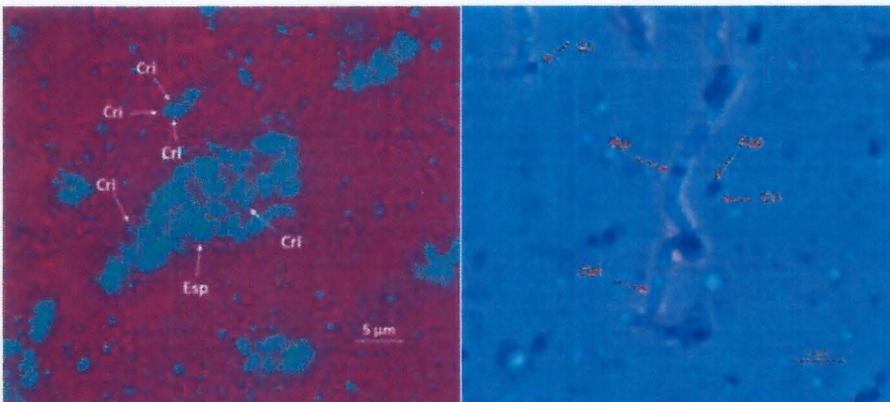


Figura 13. Presencia de cristales en la cepa *B. thuringiensis*.FIASp2130. Cri: Cristales; Esp: Espora; Par: Endospora o esporangio; Cel: Célula vegetativa.

### 6.2.3.1 Tinción Gram

Un primer criterio en la caracterización de las bacterias es la presencia o ausencia de la pared celular, y se puede investigar a través de la tinción Gram, dividiendo las bacterias en tres categorías: Gram positivas, Gram negativas y Gram variables. Para clasificar las cepas valoradas, se ha realizado la tinción Gram de algunos de las cepas donde existían dudas sobre su pureza. Dos cepas identificadas inicialmente como *Agrobacterium radiobacter*, bajo el microscopio ofrecen imágenes totalmente diferentes (Figura 14). En la cepa 513 es evidente la presencia de un *Bacillus* mucho más largo y grueso que es el *Bacillus* fino y pequeño que corresponde a *Agrobacterium sp*, a pesar que ambos son Gram negativos. En la cepa 830, igual gram negativa, además de células que se podríamos asemejar a *Agrobacterium sp*, se presentan unas formaciones que se asemejan más a las células de *Pseudomonas*.

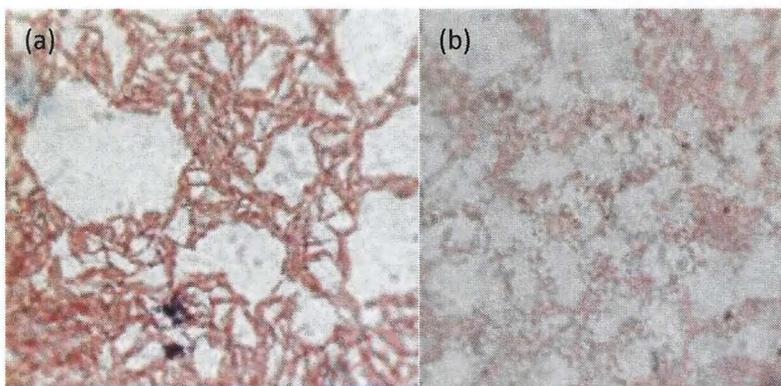


Figura 14. Tinción gram de la cepa 513 (a) y 830 (b)

Las imágenes microscópicas interpretadas con atención revelan en 4 de las 6 cepas, la presencia de una diversidad de formas celulares, con diferentes grados de absorción de los colorantes: 5130, 8300, 13010 y 550. Eso significa que estas muestras no son en realidad cepas puras, sino consorcios de rizobacterias, conclusión respaldada de los resultados moleculares, en los casos que se pudieron completar.

Juntando las diferencias morfológicas, microscópicas y bioquímicas (fisiológicas), surgió la hipótesis que estamos frente a varios consorcios de rizobacterias, Se inició un estudio con el fin de separar bajo la lupa (máximo aumento 100x) los componentes de los consorcios, usando principalmente criterios morfológicos y medios selectivos, sin embargo como se resaltó anteriormente algunos de estos trabajos no se concretaron en el presente proyecto.

### **6.3. Evaluación de un formulado en base a rizobacterias**

#### **6.3.1 Activación de cepas transferidas**

Material fue transferido, recepcionando cepas congeladas (viales) y activas sobre medio de cultivo. El material recepcionado mostro estar contaminado, por lo que se inicia un proceso largo de limpieza e identificación mediante test bioquímicos. Se obtienen cultivos puros, pero con la presunción de la existencia de un consorcio bacteriano en una de las cepas. Esta última se cultiva en ese estado y genera material madre y respaldo. Proceso que toma más tiempo de lo inicialmente proyectado y programado.

#### **6.3.2 Generación de material de respaldo (cepario madre y trabajo)**

Se genera el material madre necesario, siendo congelado en conjunto con un crioprotector. El material de trabajo se mantiene en medios de cultivo agarizados en placas y tubos de agar tendido.

#### **6.3.3 Producción de inóculos**

Obtención estandarizada de inóculos para producción de biomasa mediante uso de medios de cultivo complejo (TSB).

#### **6.3.4 Escalamiento de biomasa**

Cepas fermentadas con medio de cultivo complejo (TSB), muestran distintas velocidades de crecimiento los cuales quedan determinados mediante la obtención de su máxima concentración.

#### **6.3.5 Evaluación físico química de matrices para formulados en polvo y líquidas**

Se obtienen las materias primas adecuadas para cada tipo de formulación, sin incompatibilidad con las bacterias, aceptadas por las normativas orgánicas, de buen suministro en el mercado y de costos adecuados.

#### **6.3.6 Evaluación de formulaciones líquidas**

Los procesos de mezclados de las matrices de protección y las células son procesos complicados por su alta viscosidad. El producto obtenido se asemeja más a un gel ya que existe un cambio en la reología de biomasa, existe una expansión de volumen por micro burbujas que entregan una buena difusión de O<sub>2</sub> dentro del envase, permitiendo un suministro mejor a la células, además de conferir un descenso en su metabolismo.

### 6.3.7 Evaluación de formulaciones en polvo

Se obtiene una buena matriz de osmoprotección celular, resultado demostrado en los análisis post-secado en muestras con y sin protector, aquellas sin protección descendieron hasta 4 potencias en algunas bacterias y con osmoprotección mantuvieron su concentración inicial. El proceso de secado debe ser muy controlado, pero la metodología utilizada por la empresa dio buenos resultados y a bajos costos comparados con un secado spray. En la línea de producción se debe sumar un equipo mezclador para obtención de mezcla completa.

### 6.3.8 Evaluación de la estabilidad de los formulados

El bioformulado líquido presenta una vida más corta que los formulados en polvo. El formulado en polvo por presentar células en estado de dormancia con una actividad de agua (aw) adecuada y sin presencia de O<sub>2</sub> por su forma de envasado en vacío permite que se mantengan más estables las bacterias en el tiempo.

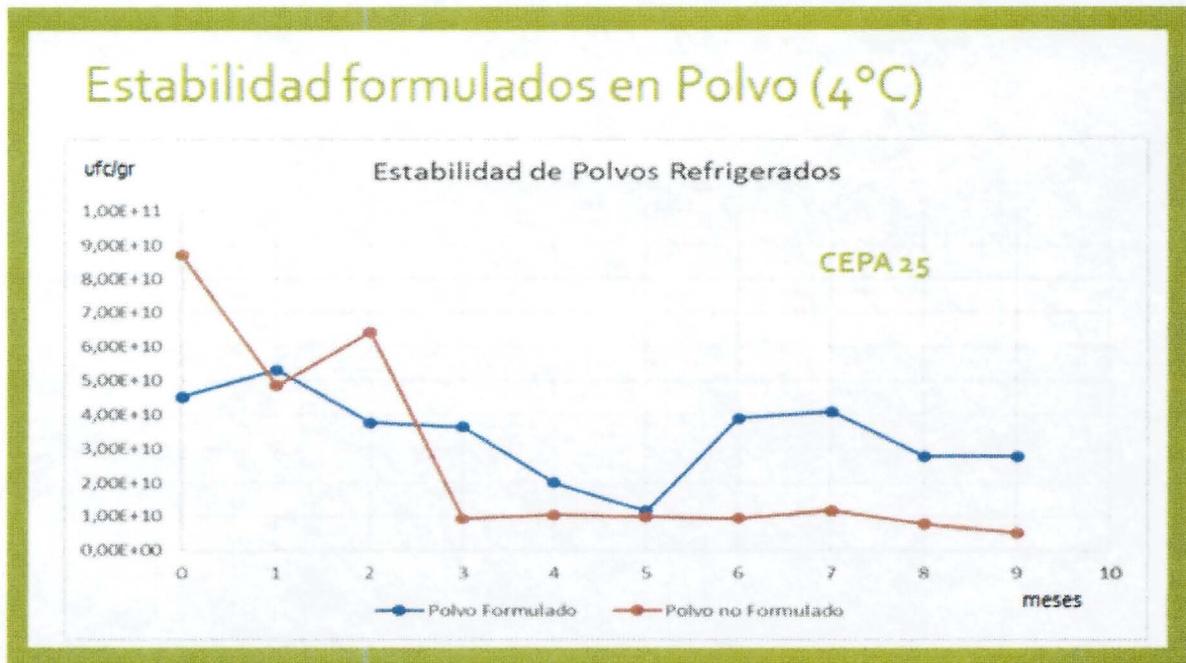


Figura 15. Estabilidad de los formulados en polvo

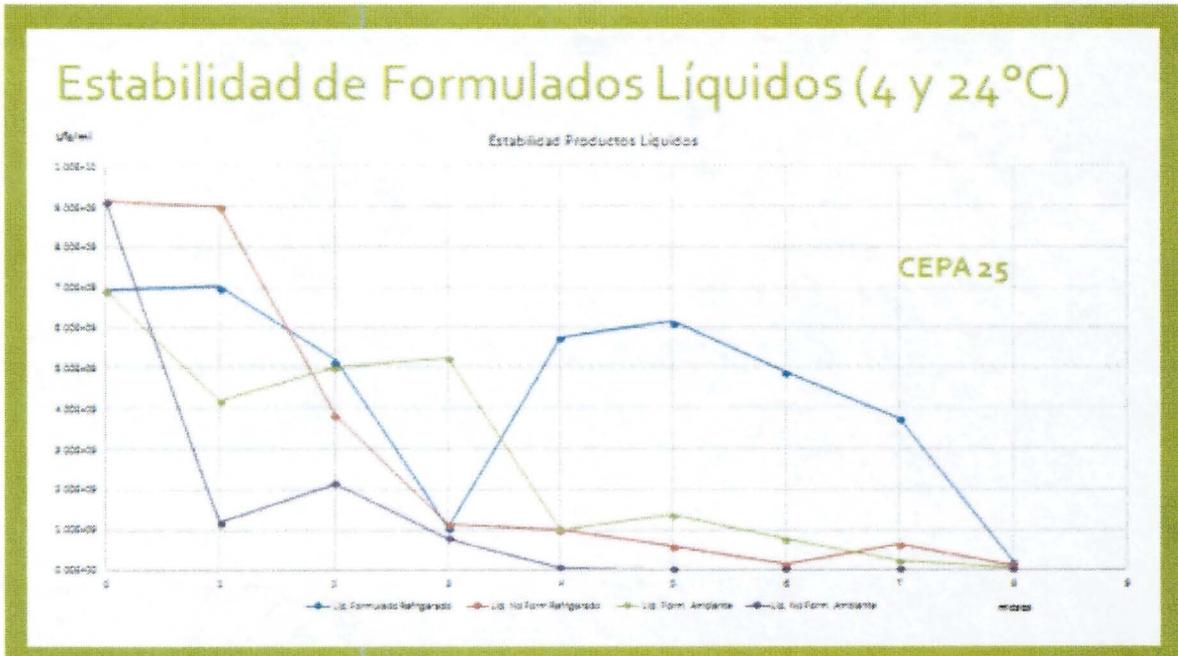


Figura 16. Estabilidad de los formulados líquidos

**6.4 Cuadro comparativo de los resultados esperados en la propuesta de proyecto y los alcanzados finalmente.**

<b>Resultado esperado</b>	<b>Resultado obtenido</b>
Lograr porcentajes de control al menos similares a nematicidas convencionales 50% de control.	Dependiendo del predio, se han logrado porcentajes de control que superan este mínimo, 2 temporadas después de iniciados los estudios de terreno.
Lograr plantas con bajo nivel de daños en raíces, independiente del control de nematodos (efecto nematóxico), ya que el efecto inhibitorio (efecto nemostático) que pueden inducir es una manera de proteger las raíces.	No se pudo observar un efecto nemostático directo al analizar raíces, ya que si bien hay raíces más sanas, los datos no son significativos. Indirectamente podría asociarse al aumento de vigor que se observa con algunas cepas.
Seleccionar 3 cepas para ser formuladas.	Se seleccionaron 4 cepas, para ser formuladas.
Patentar el uso de lo obtenido.	Se han iniciado los estudios de factibilidad de patentamiento, cuyos resultados se verán posterior a la fecha de término del proyecto. Proceso en revisión, bajo la asesoría de la Dirección de Innovación de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Chile (Fernando Venegas, Jefe Unidad Legal y Propiedad Intelectual).
Difusión al ámbito Científico/Técnico.	<p>1. Se realizó charla de difusión técnica de resultados, para viveristas, agricultores, y asesores y representante de empresas químicas.</p> <p>2. Conferencia Red Agrícola, 2-3 de julio, 2014, Espacio Riesco "Desarrollo de nuevos bionematicidas en Chile".</p>

## 7. FICHAS TÉCNICAS Y ANÁLISIS ECONÓMICO

7.1 Fichas técnicas y de costos del o los cultivos, rubros, especies animales o tecnologías que se desarrolló en el proyecto (según corresponda a la naturaleza del proyecto)

### 7.1.1 Predio La Paloma

INFORMACIÓN DE CONTACTO	
Nombre del ensayo	Predio La Paloma
Comuna	
Localidad	San Fernando
Región	del Libertador General Bernardo O` Higgins
Predio	Agrícola El Tranque
Encargado	Francisco Moraga
Teléfono	

DATOS PREDIO	
Cultivo	Cerezo
Variedad	Lapins
Portainjerto	Colt
Año de plantación	2011
Densidad de plantación (plantas/ha)	1.250
Sistema de riego	Goteo
Distancia entre goteros (m)	1

#### 7.1.1.1 Tratamientos

Tratamiento	Aislado	Especie	Dosis
1	FIAPF550	<i>Pseudomonas sp.</i>	10 <sup>6</sup> ufc ml <sup>-1</sup>
2	FIASP2130	<i>Serratia sp.</i>	10 <sup>6</sup> ufc ml <sup>-1</sup>
3	FIABC1460	<i>Bacillus sp.</i>	10 <sup>6</sup> ufc ml <sup>-1</sup>
4	FIAPV10200	<i>Pseudomonas sp.</i>	10 <sup>6</sup> ufc ml <sup>-1</sup>
5	FIAPP8050	<i>Pseudomonas sp.</i>	10 <sup>6</sup> ufc ml <sup>-1</sup>
6	FIABM1850	<i>Bacillus sp.</i>	10 <sup>6</sup> ufc ml <sup>-1</sup>
7	FIACF11150	<i>Curtobacterium sp.</i>	10 <sup>6</sup> ufc ml <sup>-1</sup>
8	Testigo químico	Cadusafos	2 K i.a. ha <sup>-1</sup>
9	Testigo	Testigo sin bacterias	-

7.1.1.2 Fecha de muestreos, plantación, aplicación de tratamientos y medición de ASTT

	2011		2012				2013				2014			
	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<b>Muestreo</b>		X		X		X		X			X			
<b>Plantación</b>		X												
<b>Inoculación</b>		X		X		X		X		X				
<b>ASTT</b>							X		X	X	X			

### 7.1.2 Predio Nancagua

INFORMACIÓN DE CONTACTO	
Nombre del ensayo	Predio Nancagua
Comuna	
Localidad	San Fernando
Región	del Libertador General Bernardo O` Higgins
Predio	César Cáceres Silva
Encargado	César Cáceres Silva
Teléfono	

DATOS PREDIO	
Cultivo	Cerezo
Variedad	Lapins
Portainjerto	Colt
Año de plantación	2012
Densidad de plantación (plantas/ha)	888
Sistema de riego	Tendido

#### 7.1.2.1 Tratamientos

Tratamiento	Aislado	Especie	Dosis
1	FIAPF550	<i>Pseudomonas sp.</i>	10 <sup>6</sup>
2	FIASP2130	<i>Serratia sp.</i>	10 <sup>6</sup>
3	FIABC1460	<i>Bacillus sp.</i>	10 <sup>6</sup>
4	FIAPV10200	<i>Pseudomonas sp.</i>	10 <sup>6</sup>
5	FIAPP8050	<i>Pseudomonas sp.</i>	10 <sup>6</sup>
6	FIABM1850	<i>Bacillus sp.</i>	10 <sup>6</sup>
7	FIACF11150	<i>Curtobacterium sp.</i>	10 <sup>6</sup>
8	Testigo químico	Cadusafos	2 K i.a. ha <sup>-1</sup>
9	Testigo	Testigo sin bacterias	-

7.1.2.2 Fecha de muestreos, plantación, aplicación de tratamientos y medición de ASTT

	2011		2012				2013				2014			
	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<b>Muestreo</b>			X	X		X				X				
<b>Plantación</b>			X											
<b>Aplicación</b>			X			X		X		X				
<b>ASTT</b>							X		X	X	X			

7.1.3 Predio Tinguiririca

INFORMACIÓN DE CONTACTO	
Nombre del ensayo	Predio Tinguiririca
Comuna	
Localidad	San Fernando
Región	del Libertador General Bernardo O` Higgins
Predio	Huerto Santa Mónica
Encargado	Christian Dussailante
Teléfono	

DATOS PREDIO	
Cultivo	Cerezo
Variedad	Bing
Portainjerto	Colt
Año de plantación	2012
Densidad de plantación (plantas/ha)	888
Sistema de riego	Tendido

7.1.3.1 Tratamientos

Tratamiento	Isolate	Especie	Dosis
1	FIAAR5130	<i>Agrobacterium sp.</i>	10 <sup>6</sup>
2	FIAAR9110	<i>Agrobacterium sp.</i>	10 <sup>6</sup>
3	FIAAR8300	<i>Agrobacterium sp.</i>	10 <sup>6</sup>
4	FIABM7330	<i>Bacillus sp.</i>	10 <sup>6</sup>
5	FIABM8150	<i>Bacillus sp.</i>	10 <sup>6</sup>
6	FIABP5020	<i>Bacillus sp.</i>	10 <sup>6</sup>
7	FIABS6360	<i>Bacillus sp.</i>	10 <sup>6</sup>
8	FIAPP13010	<i>Pseudomona sp.</i>	10 <sup>6</sup>
9	Testigo químico	Cadusafos	2 K i.a. ha <sup>-1</sup>
10	Testigo	Testigo sin bacterias	-

7.1.3.2 Fecha de muestreos, plantación, aplicación de tratamientos y medición de ASTT

	2011		2012				2013				2014			
	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<b>Muestreo</b>					X	X		X						
<b>Plantación</b>					X									
<b>Aplicación</b>				X		X		X		X				
<b>ASTT</b>						X								

7.1.4 Ensayo en condiciones controladas

INFORMACIÓN DE CONTACTO	
Nombre del ensayo	<i>In vitro</i> con formulados
Comuna	
Localidad	Santiago
Región	Metropolitana
Predio	Sector invernaderos
Encargado	Erwin Aballay

DATOS PREDIO	
Cultivo	Cerezo
Variedad	Colt
Inicio de ensayo	2014
Contenedores	500 cm <sup>3</sup>
Sistema de riego	Manual, agua desmineralizada

7.1.4.1 Tratamientos para la evaluación de los formulados en condiciones controladas

Tratamiento	Inóculo	Tipo de Inóculo	Dosis
1	FIAPF550+FIAPF2130+FIAPF13010	Formulado líquido	75 ml 10 <sup>6</sup>
2	FIAPF9110	Formulado líquido	75 ml 10 <sup>6</sup>
3	FIAPF550+FIAPF2130+FIAPF13010	Cepa pura	75 ml 10 <sup>6</sup>
4	FIAPF9110	Cepa pura	75 ml 10 <sup>6</sup>
5	FIAPF550+FIAPF2130+FIAPF13010	Formulado polvo	75 ml 10 <sup>6</sup>
6	FIAPF9110	Formulado polvo	75 ml 10 <sup>6</sup>
7	Nematicida	Cadusafos líquido	100 ppm
8	Nematicida	Bafex-N	5 k ha <sup>-1</sup>
9	Testigo absoluto	Agua	-

**7.2 Análisis económico actualizado, comparando con los análisis de la propuesta de proyecto**

7.2.1 Aporte Ejecutor

Ítem	Sub Ítem		Programado	Real	Saldo
Recursos humanos	Erwin Aballay	No pecuniario			
	Marta Sepúlveda	No pecuniario			
Infraestructura	Laboratorios invernaderos oficinas	No pecuniario			
Viáticos y Movilización	Camioneta	No pecuniario			
<b>Total</b>		<b>No pecuniario</b>			

7.2.2 Aporte Asociado

Ítem	Sub Ítem		Programado	Real	Saldo
Recursos humanos	Marcia Barraza	No pecuniario			
	Trabajador	No pecuniario			
Infraestructura	Laboratorios, Invernaderos, oficinas	No pecuniario			
Viáticos y movilización	Combustibles	Pecuniario			
	Camioneta	No pecuniario			
	Peajes	Pecuniario			
Materiales e insumos	Sustratos plantas	No pecuniario			
Servicios de terceros	Formulados	Pecuniario			
Gastos generales	Mantenimiento equipos	Pecuniario			
<b>Total</b>		<b>No pecuniario</b>			
		<b>Pecuniario</b>			

7.2.3 Aporte FIA

Ítem	Sub Ítem	Programado	Real	Saldo
Recursos Humanos	Simona Prodan			
	Silvia Gutiérrez			
	<b>Total RR. HH.</b>			
Equipamiento	2 Incubadoras			
	1 Refrigerador			
	1 Termociclador			
	1 Centrífuga			
	1 Baño termo regulado			
	1 Vortex			
	1 Cámara electroforesis			
	1 Transiluminador UV			
	1 Agitador orbital			
	1 Fotodocumentación			
	1 Balanza analítica			
	1 pH metro			
	1 Aire acondicionado			
	<b>Total Equipamiento</b>			
Viáticos y movilización	Viático Nacional			
	Viatico Internacional			

	Combustibles			
	Peajes			
	Pasaje bus Nacional			
	Pasaje aéreo Internac.			
	<b>Total V. y movilizac.</b>			
Materiales e insumos	Insumos lab. y campo			
	<b>Total M. e insumos</b>			
Servicios de terceros	Análisis de suelos			
	Identificación de cepas			
	<b>Total S. a terceros</b>			
Difusión	Charla			
	<b>Total Difusión</b>			
Capacitación	Congreso o Curso Int.			
	<b>Total Capacitación</b>			
Gastos generales	Oficina-fotocopias			
	Correspondencia			
	Inicio patentamiento			
	<b>Total G. generales</b>			
Gastos administración	Overhead			
	<b>Total G. admin.</b>			
Imprevistos	Imprevistos			

	<b>Total Imprevistos</b>			
<b>Total</b>		<b>Total</b>		

### **7.3 Análisis de las perspectivas del rubro, actividad o unidad productiva desarrollada, después de finalizado el proyecto**

La gestión realizada en los 3 años de investigación ha logrado demostrar en terreno la eficacia de las cepas seleccionadas, las cuales son la base para un futuro bionemática.

El desarrollo de 2 formulaciones que han permitido mantener viables las cepas utilizadas por un período de más de 3 meses, permite contar con el material necesario para ser comercializado. Este trabajo aún no termina, ya que se busca hacer un seguimiento del comportamiento de los formulados durante 1 año, bajo condiciones de almacenamiento a diferentes temperaturas.

Para darle la continuidad práctica, está en desarrollo un acuerdo comercial con la empresa BIOGRAM S.A, de forma de poder licenciarle su formulación y comercialización a nivel nacional. BIOGRAM S.A. se hará cargo del registro ante el Servicio Agrícola y Ganadero, formulación y distribución del producto, cancelando a la Universidad de Chile un royalty aún no definido, pero que se estima entre 10 y 15% de las ventas.

### **7.4 Descripción estrategias de marketing de productos, procesos o servicios (según corresponda a la naturaleza del proyecto).**

Toda esta labor corresponderá ser desarrollada por la empresa a la cual se le licenciará el set de bacterias seleccionadas.

## 8. IMPACTOS Y LOGROS

### 8.1 Impactos Productivos, Económicos y Comerciales

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del Proyecto	Diferencial
Formación de empresa o unidades de negocio	No aplica	No aplica	No aplica
Producción ( <i>por producto</i> )	No aplica	No aplica	No aplica
Costos de producción	No aplica	No aplica	No aplica
Ventas y/o Ingresos	No aplica	No aplica	No aplica
<i>Nacional</i>	No aplica	No aplica	No aplica
<i>Internacional</i>	No aplica	No aplica	No aplica
Convenios comerciales	No aplica	No aplica	No aplica

### 8.2 Impactos Sociales

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del Proyecto	Diferencial
Nivel de empleo anual	No aplica	No aplica	No aplica
Nuevos empleos generados	No aplica	No aplica	No aplica
Productores o unidades de negocio replicadas	No aplica	No aplica	No aplica

### 8.3 Impactos Tecnológicos

Logro	Número			Detalle
	Nuevo en el mercado	Nuevo en la empresa	Mejorado	
Producto	Si	No aplica	No	Obtención de formulados de cepas de rizobacterias efectivas en el control de nematodos y estimulación del crecimiento radical.
Proceso	No	No aplica	No	Su importancia está basada principalmente en la protección de las bacterias (células), con el objetivo de obtener un producto que dure por tiempos prolongados y resista una cadena de distribución comercial.
Servicio	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica

Propiedad Intelectual	Número	Detalle
Patentes	0	Sin patentes
Solicitudes de patente	0	Sin solicitudes
Intención de patentar	1	En trámite. Estudio de factibilidad de patentar.
Secreto industrial	0	No aplica
Resultado no patentable	0	En estudio.
Resultado interés público	0	No aplica

Logro	Número	Detalle
Convenio o alianza tecnológica	1	Licenciamiento Biogram S.A.
Generación nuevos proyectos	0	En estudio.

#### 8.4 Impactos Científicos

Logro	Número	Detalle ( <i>Citas, título, descripción</i> )
Publicaciones	0	Sin publicaciones
<i>Por Ranking</i>		
Eventos de divulgación científica	1	Castañeda, C. and Aballay, E. 2013. Evaluación <i>in vitro</i> de filtrados de cepas rizobacterianas sobre los nemátodos <i>fitoparásitos Xiphinema index</i> y <i>Meloidogyne ethiopica</i> . XLV Annual Meeting, Organization of Nematologists of Tropical America, ONTA, La Serena, Chile. October 20-25, 2013.
Integración a redes de investigación	No aplica	No aplica

#### 8.5 Impactos en Formación

Logro	Número	Detalle ( <i>Título, grado, lugar, institución</i> )
Tesis pregrado	No aplica	No aplica
Tesis postgrado	No aplica	No aplica
Pasantías	No aplica	No aplica
Cursos de capacitación	0	Sin cursos de capacitación

#### 8.6 Descripción y cuantificación de los impactos obtenidos, y estimación de lograr otros en el futuro, comparación con los esperados, y razones que explican las discrepancias.

Se estima que el proceso de desarrollo del proyecto se dio de acuerdo a lo estimado, tal vez lo más complejo ha sido la correcta identificación de las bacterias, dado principalmente porque algunas cepas han sido básicamente consorcios naturales, de muy compleja separación, lo que lleva a una casi imposible caracterización molecular. De todas maneras es probable que de alguna manera estas especies individuales se asocien por razones simbióticas y que esto también esté teniendo algún grado de significación en su eficacia.

Los impactos aún no se ven, esto se proyecta para el futuro, en la medida que registre en el Servicio Agrícola y Ganadero y comience su comercialización, proyectada para el año 2015. Se espera sea un producto de uso frecuente en carozos en general, partiendo su uso desde viveros,

continuando con plantaciones nuevas, entre ellas replantes y huertos adultos en general, donde la destrucción de las raíces aun no sea extrema.

### **8.7 Indicadores de impactos y logros a detallar dependiendo de los objetivos y naturaleza del proyecto**

Selección de rizobacterias efectivas para el control de nematodos fitoparásitos en cerezo.

Caracterización fisiológica y molecular de las cepas de rizobacterias seleccionadas para formular. Descripción de consorcios e identificación de nuevas especies.

Desarrollo de 2 formulaciones, una en polvo y otra líquida. La formulación polvo para el uso de inmersión de raíces y sistemas de riego mecanizados. La formulación líquida, para sistemas de riego mecanizado.

Avances en el establecimiento de acuerdo comercial con una empresa formuladora del producto y distribuidora (BIOGRAM S.A.).

## 9. PROBLEMAS ENFRENTADOS

### **Legales**

No se enfrentaron problemas legales durante la ejecución del proyecto.

### **Técnicos**

No se enfrentaron problemas técnicos durante la ejecución del proyecto

### **Administrativos**

No se enfrentaron problemas administrativos durante la ejecución del proyecto

### **Gestión**

No se enfrentaron problemas de gestión durante la ejecución del proyecto

## 10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 10.1 Técnicas

1. La identificación bacteriana molecular, según los resultados de la presente investigación, complementada con la elaboración de árboles filogenéticos, puede entregar una amplia información para la caracterización de individuos a nivel de especie. Sin embargo, son necesarios métodos adicionales, como los bioquímicos, para obtener resultados confiables en grupos estrechamente relacionados desde el punto de vista genético.

2. Rizobacterias aisladas de suelos agrícola en Chile, son capaces de ejercer algún grado importante de disminución de la presencia de nematodos fitoparásitos afectando a cultivos, en este caso cerezos, hecho que puede ser extrapolable a otros frutales y cultivos.

3. Para lograr un producto que sea utilizable bajo diferentes condiciones de suelo, manejo y tipos de nemátodos, es recomendable la mezcla de cepas, ya sea como especies individuales o de consorcios naturales y así ampliar el espectro de acción.

### 10.2 Económicas

Una recomendación para la etapa posterior al término del proyecto, es poder lograr un producto comercial que sea de un costo competitivo en el mercado, en términos de una buena relación costo/beneficio.

### 10.3 Gestión

Es recomendable contar desde el inicio de un proyecto de este tipo, con empresas biotecnológicas o unidades que posean las capacidades técnicas de apoyo en el trabajo con microorganismos, ya sean formulaciones, conservación, trabajo en terreno y otros.

## 11. INFORME DE DIFUSIÓN

### 11.1 Charlas de difusión

1. Se realizó una charla de difusión, en la cual se expusieron los principales resultados obtenidos durante la ejecución del proyecto. Esta actividad, se desarrolló en la comuna de Chimbarongo, Región del Libertador General Bernardo O` Higgins, el día 04 de septiembre, y participaron tanto viveristas y productores de cerezas, como también asesores y representantes de importantes empresas químicas.

Marcia Barraza, Directora de la Asociación Gremial de Viveros Frutales, realiza una interesante introducción acerca de la importancia del control de nematodos fitoparásitos en viveros, promoviendo entre los asistentes el interés en la investigación realizada, e invitándolos a seguir informándose sobre estos avances.

Erwin Aballay, Director del Proyecto, expone los principales y más importantes resultados obtenidos en los 3 años y medio de investigación.

2. Se realizó una Charla en el evento organizado por la Revista Red Agrícola, los días 2 y 3 de Julio de 2014, en Espacio Riesco, Santiago.

Dentro de este evento hubo diferentes Seminarios, uno de los cuales se refirió al control biológico de plagas y enfermedades. Para este ítem se presentó la charla "Desarrollo de nuevos bionemáticas en Chile". Se adjunta el programa desarrollado en el evento.

A continuación, se adjunta material de difusión.

11.1.1 Programa charla de difusión



**PROYECTO FIA**

PYT-2011-0052

**“Uso de rizobacterias para mejorar el desarrollo y sanidad en raíces de cerezos”**

**PROGRAMA**

09:30 – 10:00	Coffee Break	
10:00 – 10:05	Bienvenida	Erwin Aballay
10:05 – 10:20	Participación y experiencia de Viveros El Tambo en el proyecto	Marcia Barraza
10:20 – 11:20	Presentación de principales resultados	Erwin Aballay
11:20 – 11:40	Ronda de preguntas	
11:40 – 12:30	Cóctel	

Santiago, Jueves 04 de Septiembre de 2014

**LABONEMA**  
Laboratorio de Nematología Agrícola  
Universidad de Chile



**LABORATORIO DE NEMATOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DE CHILE**

*Proyecto financiado por  
Fundación para la Innovación Agraria  
Código PYT-2011-0052*

  
**LABORATORIO DE NEMATOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DE CHILE**  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

*Uso de rizobacterias  
para mejorar el  
desarrollo y sanidad  
en raíces de cerezos.*



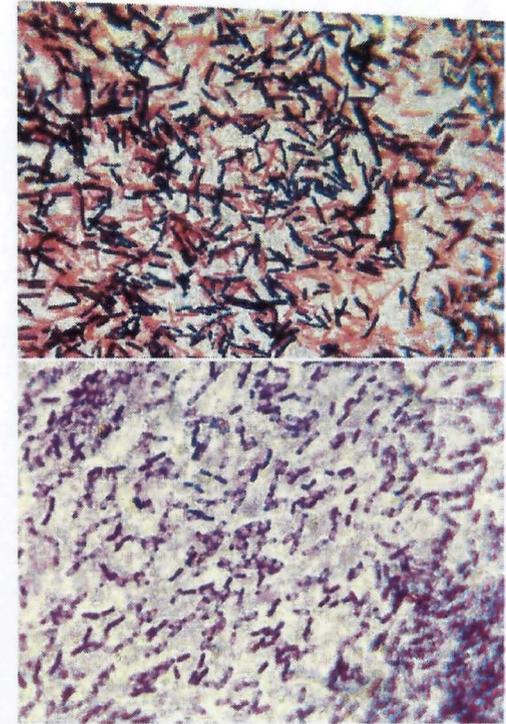
[www.nematologia.uchile.cl](http://www.nematologia.uchile.cl)





El objetivo de este proyecto es la formulación de un biopesticida para el control de nemátodos, en base a cepas de rizobacterias seleccionadas previamente desde cultivos de vides en producción, las cuales en estudios previos en condiciones de invernadero mostraron efectos antagonistas a nemátodos en términos de control (efecto nematicida) y positivos sobre el desarrollo radical (efectos nematicida y nemostático). El producto será utilizado en Cerezos, frutal que se ve afectado por varias especies de nematodos, sobre las cuales los portainjertos solo muestran alguna tolerancia en contra de *Meloidogyne* spp.

Se evaluó durante dos temporadas la presencia de daños en raíces, vigor y población de nematodos. Posteriormente, una selección de las 3 cepas más efectivas fueron formuladas en base a acarreadores, los cuales son elementos que permiten que el producto final tenga volumen, provee de propiedades antiaglomerantes, dispersantes y entregan nutrientes para la mantención de los microorganismos. Entre ellos están las arcillas, glucosa, carbonatos, maltodextrina y otros, que fueron determinados de acuerdo a las necesidades, como parte del desarrollo del proyecto. Un producto de este tipo es de alta conveniencia, ya que evita la contaminación del suelo, riesgo para operarios y consumidores, la presencia de residuos en la fruta, y aumenta los efectos de mediano y largo plazo, ya que hay una colonización por el establecimiento en la rizósfera de las plantas.



El nuevo biopesticida será protegido con patente de invención, en favor de la Universidad de Chile. El agente asociado, Viveros El Tambo, utilizará el producto para diferenciar su material en el mercado, vendiendo plantas inoculadas.

11.1.3 Pendón charla de difusión





2014

# Conferencia Red Agrícola

Conferencia & Exposición 2 y 3 de Julio  
Espacio Riesco - Santiago

## Guía Conferencia

Programa pag. 48

Plano Exhibición pag. 50

Guía de expositores pag. 52

## 11.1.5 Programa Charla Revista Red Agrícola

3  
Julio

JUEVES

» SALÓN A

**MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS & NOVEDADES EN BIOCONTROL, BIO-FITOSANITARIOS**

8:00-9:00 Registro

09:00-09:30 "La obligatoriedad del Manejo Integrado de Plagas en Europa", Gonçal Barrios, Biólogo, Sección de Agricultura y Sanidad Vegetal de Tarragona, Departamento de Agricultura, Generalitat de Catalunya.

09:30- 10:00 "Manejo Integrado de Plagas en Chile", Dr. Renato Ripa, BIOCEA.

10:00-10:30 "Relación entre nutrición mineral y las enfermedades de las plantas", Dr. Lawrence Datnoff, Louisiana State University (EE.UU.)

10:30- 11:15 **COFFEE BREAK**

11:15- 11:45 "Lobesia botrana: hospederos, dispersión y manejo", Luis Sazo, Universidad de Chile, Chile.

11:45- 12:10 "Estrategia de Manejo de *Lobesia botrana* en Chile", Grisel Monje, Ingeniero Agrónomo, Directora Ejecutiva del Programa Oficial de Control de Lobesia botrana, SAG, Chile.

12:10- 12:40 "Experiencias de Manejo y Control de Lobesia botrana en España", Gonçal Barrios, Biólogo, Sección de Agricultura y Sanidad Vegetal de Tarragona, Departamento de Agricultura, Generalitat de Catalunya.

12:40 -13:00 Mesa Redonda: Gonzal Barrios, Grisel Monje, Luis Sazo

13:00- 14:30 **ALMUERZO AUSPICIADO POR NUTRAFEED**

14:30- 15:00 "Perspectivas para el desarrollo de una industria chilena de bioinsumos", Dr. Eduardo Donoso, Director, Bioinsumos Nativa, Chile.

15:00 -15:30 "Nuevas herramientas para el Manejo Integrado de Plagas: nuevo cebo para el control de hormiga argentina y nueva barrera para burritos y capachitos", Pilar Larral, Ingeniero Agrónomo, BIOCEA, Chile.

15:30- 16:00 "Desarrollo de nuevos bionematicidas en Chile", Dr. Erwin Aballay, Universidad de Chile.

16:00 -16:30 **COFFEE BREAK**

16:30-16:55 "Biológicos: Complementan la oferta Integrada de Bayer CropScience", Rubén Santamaría, Crop Manager Vides, Bayer CropScience, Chile.

16:55-17:20 "Desarrollo de tecnologías orgánicas a base de microorganismos nativos para potenciar el sector hortícola en zonas áridas de Chile", Dra. Alexandra Stoll (Alemania), CEAZA, Chile.

17:20- 17:45 "Timorex Gold, la nueva solución orgánica para enfermedades fungosas", Pablo González, Asesor AgroAMIGO, Syngenta, Chile.

17:45-18:10 "Experiencias de campo en Manejo Integrado de Plagas y uso de bioinsumos para reducir residuos de fitosanitarios en uva de exportación", Carolina Cruz, Ingeniero Agrónomo, consultora, Chile.

18:10-20:00 **COCKTAIL AUSPICIADO POR ADAMA**

» SALÓN B

**2ª CONFERENCIA NACIONAL DE RIEGO Y DRENAJE AGRYD-REDAGRICOLA**

09:00 Palabras de Bienvenida. Presidente de la AGRYD y editor de Redagrícola.

09:00-09:30 "El agua como insumo clave para la agricultura", Patricio Crespo, Presidente, Sociedad Nacional de Agricultura, Chile.

09:30- 10:00 "Plan de gestión de los recursos hídricos de Chile", Reinaldo Ruiz Valdés, Delegado Presidencial para los recursos hídricos de Chile.

10:00-10:30 "Políticas y Programas de la Comisión Nacional de Riego: cómo enfrentar el escenario de escasez hídrica", Patricio Grez, Secretario Ejecutivo, Comisión Nacional de Riego, Chile.

10:30-11:15 **COFFEE BREAK**

11:15-11:45 "Estrategias de Manejo del Riego en escenarios de escasez hídrica, un exitoso estudio de caso en palto", Raúl Ferreyra, INIA, Chile.

11:45-12:15 "Riego utilizando energía solar, experiencias en Chile", Erik Cartes, I Energía, Chile.

12:15 -12:45 "Escenarios futuros de oferta de energía en Chile", Rodrigo Castillo, Director Ejecutivo, Empresas Eléctricas AG, Chile.

13:00 -14:30 **ALMUERZO AUSPICIADO POR NUTRAFEED**

14:30- 15:00 "Optimización del recurso hídrico: la regulación de canales mediante automatización y telecontrol", Irene Bernaus, Riegosalz, Chile.

15:00 -15:30 "La productividad del agua: un marco conceptual para adaptar la agricultura a la aridización", Dr. Nicolás Franck, Centro de Estudios de Zonas Áridas, Universidad de Chile.

15:30- 16:00 "Distribución del agua y gestión del riego a través de un smartphone", Guillermo Valenzuela, WiseConn, Chile.

16:00- 16:30 **COFFEE BREAK**

16:30-17:00 "El monitoreo de la humedad del suelo incrementa la productividad en nogales y uva de mesa", Alejandro Diestre, CD Tec, Chile.

17:00- 17:30 "Determinando estado hídrico de frutales en tiempo real utilizando la sonda magnética ZIM-Probe", Wilson Gato, Fertigation Specialist, Yara, Noruega.

17:30 -18:00 "Uso de la percepción remota y drones para estimar el consumo de agua en olivos y viñas", Dr. Samuel Ortega, CITRA, Universidad de Talca, Chile.

18:10-20:00 **COCKTAIL AUSPICIADO POR ADAMA**

2014  
**Conferencia  
Redagrícola**  
Conferencia & Exhibición: 2 y 3 de Julio  
Español/Riesca - Santiago

## 12. ANEXOS

### 12.1 Fotografías ensayos de campo, predio La Paloma, Nancagua y Tinguiririca, formulados polvo y líquido.



Figura 17. Predio La Paloma. A: Plantas de cerezo año 1. B: Aplicación de tratamiento nematocida. C: Inoculación tratamientos cepas de rizobacterias. D: Plantas de cerezo año 3 (verano). E: Plantas de cerezo año 3 (invierno). F: Recarga de baldes con agua de riego para inoculación. G: Muestreo de suelo.



Figura 18. Predio Nancagua. A: Raíz desnuda. B: Recarga de baldes con agua de riego para inoculación. C: Plantas de cerezo año 3 (invierno). D: Preparación de tratamientos bacterianos en campo.



Figura 19. Predio Tinguiririca. A: Plantación de cerezos año 1. B: Muestreo de suelo. C: Medición ASTT. D: Sistema de riego por tendido. E: Plantas de cerezo año 3 (verano).

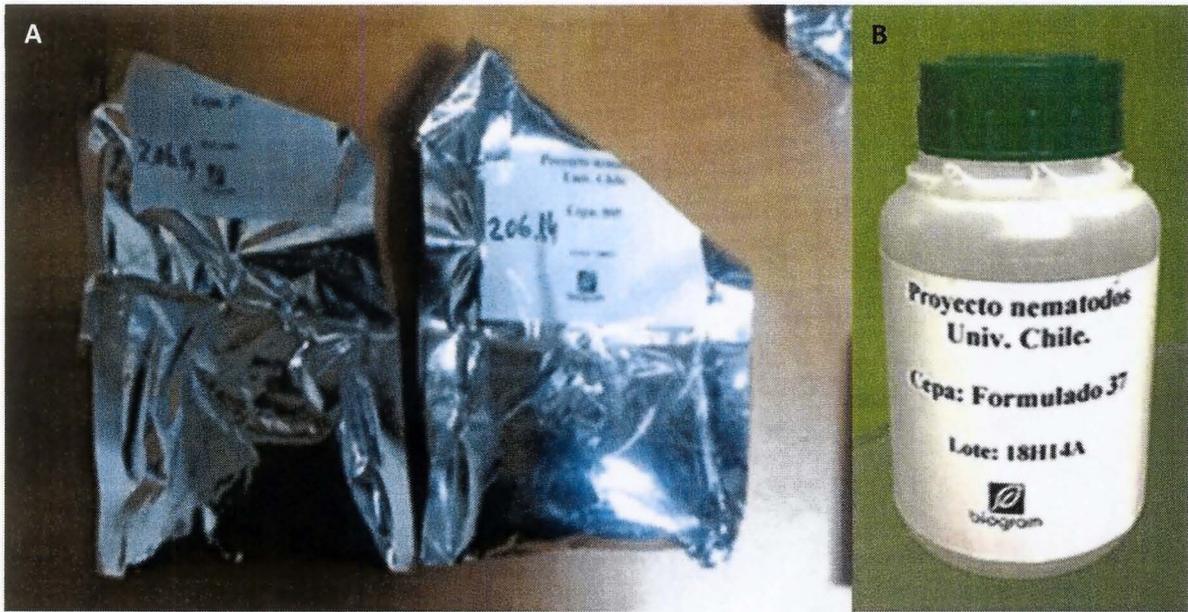


Figura 20. Formulados. A: Polvo. B: Líquido.

## 12.2. Fichas Curriculares

### 12.2.1 Investigador principal

<b>Nombres</b>	Erwin	
<b>Apellido paterno</b>	Aballay	
<b>Apellido materno</b>	Espinoza	
<b>RUT</b>		
<b>Profesión</b>	Ingeniero Agrónomo	
<b>Empresa/organización donde trabaja</b>	Universidad de Chile	
<b>RUT</b>		
<b>Cargo o actividad que desarrolla en ella</b>	Académico	
<b>Si es investigador responde</b>	<b>Horas totales dedicadas al proyecto</b>	<b>Valor total de las horas dedicadas al proyecto (\$)</b>
<b>Dirección laboral (calle y número)</b>		
<b>Ciudad o Comuna</b>		
<b>Región</b>	Metropolitana	
<b>País</b>	Chile	
<b>Teléfono fijo</b>		
<b>Fax</b>		
<b>Teléfono celular</b>		
<b>Email</b>		
<b>Género</b>	Masculino	
<b>Etnia (2) (clasificación al final del documento)</b>		
<b>Tipo (3) (clasificación al final del documento)</b>	Sin Clasificar	
<b>Firma</b>		

12.1.2 Equipo Técnico

<b>Nombres</b>	Karla	
<b>Apellido paterno</b>	Córdova	
<b>Apellido materno</b>	Zúñiga	
<b>RUT</b>		
<b>Profesión</b>	Ingeniero Agrónomo	
<b>Empresa/organización donde trabaja</b>	Universidad de Chile	
<b>RUT</b>		
<b>Cargo o actividad que desarrolla en ella</b>	Administración proyectos de investigación	
<b>Si es investigador responda</b>	Horas totales dedicadas al proyecto	Valor total de las horas dedicadas al proyecto (\$)
<b>Dirección laboral (calle y número)</b>		
<b>Ciudad o Comuna</b>		
<b>Región</b>	Metropolitana	
<b>País</b>	Chile	
<b>Teléfono fijo</b>		
<b>Fax</b>		
<b>Teléfono celular</b>		
<b>Email</b>		
<b>Género</b>	Femenino	
<b>Etnia (2) (clasificación al final del documento)</b>		
<b>Tipo (3) (clasificación al final del documento)</b>	Profesional	
<b>Firma</b>		

<b>Nombres</b>	Simona	
<b>Apellido paterno</b>	Prodan	
<b>Apellido materno</b>		
<b>RUT</b>		
<b>Profesión</b>	Bioquímico	
<b>Empresa/organización donde trabaja</b>	Universidad de Chile	
<b>RUT</b>		
<b>Cargo o actividad que desarrolla en ella</b>	Laboratorista	
<b>Si es investigador responda</b>	Horas totales dedicadas al proyecto	Valor total de las horas dedicadas al proyecto (\$)
<b>Dirección laboral (calle y número)</b>		
<b>Ciudad o Comuna</b>		
<b>Región</b>	Metropolitana	
<b>País</b>	Chile	
<b>Teléfono fijo</b>		
<b>Fax</b>		
<b>Teléfono celular</b>		
<b>Email</b>		
<b>Género</b>	Femenino	
<b>Etnia (2) (clasificación al final del documento)</b>		
<b>Tipo (3) (clasificación al final del documento)</b>	Profesional	
<b>Firma</b>		

<b>Nombres</b>	Verónica	
<b>Apellido paterno</b>	Escobar	
<b>Apellido materno</b>	Tolosa	
<b>RUT</b>		
<b>Profesión</b>	Asistente de laboratorio	
<b>Empresa/organización donde trabaja</b>	Universidad de Chile	
<b>RUT de la empresa/organización</b>		
<b>Cargo o actividad que desarrolla en ella</b>	Procesos de muestras de suelo para análisis, mantención de ensayos, montajes de estudios de campo y evaluaciones.	
<b>Si es investigador responda</b>	<b>Horas totales dedicadas al proyecto</b>	<b>Valor total de las horas dedicadas al proyecto (\$)</b>
<b>Dirección laboral (calle y número)</b>		
<b>Ciudad o Comuna</b>		
<b>Región</b>	Metropolitana	
<b>País</b>	Chile	
<b>Teléfono fijo</b>		
<b>Fax</b>		
<b>Teléfono celular</b>		
<b>Email</b>		
<b>Género</b>	Femenino	
<b>Etnia (2) (clasificación al final del documento)</b>		
<b>Tipo (3) (clasificación al final del documento)</b>	Profesional	
<b>Firma</b>		

<b>Nombres</b>	Silvia	
<b>Apellido paterno</b>	Gutiérrez	
<b>Apellido materno</b>	Gutiérrez	
<b>RUT</b>		
<b>Profesión</b>	Asistente de laboratorio	
<b>Empresa/organización donde trabaja</b>	Universidad de Chile	
<b>RUT de la empresa/organización</b>		
<b>Cargo o actividad que desarrolla en ella</b>	Procesos de muestras de suelo para análisis, mantención de ensayos, montajes de estudios de campo y evaluaciones.	
<b>Si es investigador responde</b>	Horas totales dedicadas al proyecto	Valor total de las horas dedicadas al proyecto (\$)
<b>Dirección laboral (calle y número)</b>		
<b>Ciudad o Comuna</b>		
<b>Región</b>	Metropolitana	
<b>País</b>	Chile	
<b>Teléfono fijo</b>		
<b>Fax</b>		
<b>Teléfono celular</b>		
<b>Email</b>		
<b>Género</b>	Femenino	
<b>Etnia (2) (clasificación al final del documento)</b>		
<b>Tipo (3) (clasificación al final del documento)</b>	Profesional	
<b>Firma</b>		

<b>Nombres</b>	Marcia	
<b>Apellido paterno</b>	Barraza	
<b>Apellido materno</b>	Montes	
<b>RUT</b>		
<b>Profesión</b>	Ingeniero Agrónomo	
<b>Empresa/organización donde trabaja</b>	Viveros El Tambo	
<b>RUT de la empresa/organización</b>		
<b>Cargo o actividad que desarrolla en ella</b>	Gerente de producción	
<b>Si es investigador responda</b>	Horas totales dedicadas al proyecto	Valor total de las horas dedicadas al proyecto (\$)
<b>Dirección laboral (calle y número)</b>		
<b>Ciudad o Comuna</b>		
<b>Región</b>	Libertador Bernardo O'Higgins	
<b>País</b>	Chile	
<b>Teléfono fijo</b>		
<b>Fax</b>		
<b>Teléfono celular</b>		
<b>Email</b>		
<b>Género</b>	Femenino	
<b>Etnia (2) (clasificación al final del documento)</b>		
<b>Tipo (3) (clasificación al final del documento)</b>	Profesional	
<b>Firma</b>		

### 13. BIBLIOGRAFÍA

- Brown, D.J.F. and Boag, B. (1988). An examination of methods used to extract virus-vector nematodes (Nematoda: Longidoridae and Trichodoridae) from soil samples. *Nematologia Mediterránea* 16: 93-99.
- Christie, J. R. and Perry, V. G. 1951. Removing Nematodes from Soil. *Proc. Helm. Soc. Wash.* 18(2):106-108.
- Hooper, D. J. 1986. Extraction of free-living stages from soil. In: *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. J.F. Southey, ed., London: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food 5–30.
- Garland JL (1997) Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 24:289–300. doi: 10.1111/j.1574-6941.1997.tb00446.x
- Helgason E, Tourasse NJ, Meisal R, et al (2004) Multilocus Sequence Typing Scheme for Bacteria of the *Bacillus cereus* Group. *Appl Environ Microbiol* 70:191–201. doi: 10.1128/AEM.70.1.191-201.2004
- Ki J-S, Zhang W, Qian P-Y (2009) Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and *rpoB* comparisons and their usefulness for species identification. *J Microbiol Methods* 77:48–57.
- Klopper JW, Rodríguez-Kábana R, McInroy JA, Collins DJ (1991) Analysis of populations and physiological characterization of microorganisms in rhizospheres of plants with antagonistic properties to phytopathogenic nematodes. *Plant Soil* 136:95–102. doi: 10.1007/BF02465224
- Ko KS, Kim J, Kim J, et al (2004) Population Structure of the *Bacillus cereus* Group as Determined by Sequence Analysis of Six Housekeeping Genes and the *plcR* Gene. *Infect Immun* 72:5253–5261. doi: 10.1128/IAI.72.9.5253
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: *Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) Nucleic acid Tech. Bact. Syst.*, 1st edn. John Wiley and Sons, New York, EEUU., pp 115–175
- Manzano M, Cocolin L, Cantoni C, Comi G (2003) *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* differentiation using a PCR-RE technique. *Int J Food Microbiol* 81:249–54.
- Morgulis A, Coulouris G, Raytselis Y, et al (2008) Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics* 24:1757–64. doi: 10.1093/bioinformatics/btn322
- Niedmann-Lolas L, Meza-Basso L (2006) Evaluación de Cepas Nativas de *Bacillus thuringiensis* Como una Alternativa de Manejo Integrado de la Polilla del Tomate (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) en Chile. *Agric Técnica* 66:235–246. doi: 10.4067/S0365-28072006000300002
- Schenborn ET, Mierendorf RC (1985) A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure. *Nucleic Acids Res* 13:6223–6236.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729.
- Xu D, Coté J-C (2003) Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:695–704. doi: 10.1099/ijs.0.02346-0

Yamamoto S, Harayama S (1995) PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl Environ Microbiol* 61:1104–1109.

Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol a J Comput Mol cell Biol* 7:203–14. doi: 10.1089/10665270050081478