

I. RESUMEN EJECUTIVO

El proyecto "Propagación de azafrán" tuvo como objetivos generales evaluar la multiplicación masiva de la especie a través de técnicas de cultivo *in vitro* y evaluar sistemas de engorde rápido de estas microestructuras. Dentro de la ejecución del mismo se incluyó la aclimatación de cormos a condiciones de cambio de hemisferio.

Como continuidad a las actividades ejecutadas, se realizó un estudio sobre la patogenicidad de *Burkholderia gladioli* sobre azafrán y gladiolo, basándose en que fue la principal causante de problemas fitopatológicos en el material estudiado.

II. TEXTO PRINCIPAL

1. Breve Resumen de la propuesta:

La susceptibilidad de la especie *Crocus sativus* a enfermedades bacterianas está poca descrita en la literatura científica. En los establecimientos en terreno realizados a partir de 1998 en la Estación Experimental La Palma y en el cultivo *in vitro* realizado en el Laboratorio de Micropropagación de esta Facultad fue la principal causante de pérdida de ejemplares y muertes de explantes, respectivamente.

Dentro de los resultados del proyecto de investigación " Propagación de Azafrán " código C-98-1-A-051, se logró determinar que la presencia de bacterias principalmente en los cormos estudiados corresponde a los géneros *Erwinia* y *Pseudomonas*. La presencia de éstas últimas podría ser un problema endógeno.

Con el objetivo de llegar a una determinación de la especie bacteriana, se enviaron muestras al Laboratorio CABI Bioscience en Inglaterra. Los resultados de los análisis fitopatológicos realizados identificaron la especie *Burkholderia gladioli* (syn. *Pseudomonas gladioli*).

Frente a lo anteriormente expuesto, el objetivo de la presente etapa de investigación fue la determinación de la patogenicidad de *Burkholderia gladioli* sobre el cultivo de azafrán y gladiolo.

2. Cumplimiento de los objetivos del proyecto:

Se cumplieron los objetivos propuestos para esta etapa, con un atraso en las actividades relacionadas a la inoculación con cuatro cepas de *Burkholderia* y sus respectivas evaluaciones, debido a los problemas técnicos derivados de la escasa emergencia de las plantas de gladiolo, que impidieron realizar las inoculaciones por falta de material para establecer los tratamientos y correspondientes repeticiones, debiéndose adquirir nuevo material que correspondió a plantas de gladiolo con 10 cm de crecimiento vegetativo.

3. Aspectos metodológicos del proyecto:

• Origen del material

El material utilizado para la presente etapa correspondió a cormos de gladiolo de la variedad Red Beauty de calibre 10-12 adquiridos en Quillota a un productor local de flores de corte. Los cormos de azafrán correspondieron a material cultivado en campo en las etapas anteriores de este proyecto.

Todo el material fue desinfectado con Thiuram molido durante su almacenaje, previo a ser entregado al Laboratorio de Fitopatología.

• Metodología de Cultivo Laboratorio de Fitopatología

Se utilizaron 50 cormos de gladiolo y 50 cormos de azafrán, los que se establecieron en macetas de 3 litros con sustrato vaporizado. Para la inoculación se utilizaron cuatro cepas de *Burkholderia gladioli*, las cuales se conservaron liofilizadas en el Banco de Germoplasma de este Laboratorio. Se realizaron cinco inoculaciones con heridas y cinco sin heridas a plantas ya desarrolladas en macetas, con las distintas cepas de esta bacteria y se mantuvieron plantas sin inocular como testigo (Para mayores detalles ver anexos).

4. Descripción de las actividades y tareas ejecutadas y comparación con las programadas:

✓ Diciembre

Se seleccionó el material de azafrán proveniente de macetas donde fueron establecidos durante el mes de marzo de 2001. Los cormos estaban en receso, se lavaron, desinfectaron,

seleccionaron por calibre y se almacenaron secos bajo condiciones ambientales. Durante el almacenaje se les aplicó Thiuram.

Se adquirió cormos de gladiolo donados por La Sociedad Agrícola Ahumada, los cuales se levantaron del suelo en receso, posteriormente se lavaron, desinfectaron, seleccionaron por calibre y se almacenaron de igual manera que los cormos de azafrán.

✓ Enero

El material fue entregado al Laboratorio de Fitopatología. El ensayo para azafrán fue establecido el 11 de enero y para gladiolo, el 18 de enero.

✓ Febrero

Se realizó inspecciones semanales para detectar la emergencia de las plantas de los ensayos. Los primeros ejemplares en emerger correspondieron a plantas de azafrán durante la semana 9.

✓ Marzo

Durante la semana 12, se observó un 53% de emergencia de las plantas de azafrán establecidas en relación a un 4% de las de gladiolo. Frente a esto, se adquirió plantas de gladiolo con 10 cm de emergencia.

Se realizó la producción de cuatro cepas para realizar las inoculaciones respectivas. Para azafrán se realizaron el 22 de marzo.

En el caso de gladiolo se realizaron el 25 de marzo sobre nuevas plantas establecidas el 21 de este mismo mes.

✓ Abril

Se realizaron evaluaciones periódicas de las plantas inoculadas.

✓ Mayo

Se realizaron evaluaciones periódicas de las plantas inoculadas.

5. Resultados del proyecto:

- Desarrollo del ensayo de azafrán

Se observó emergencia de las plantas después de siete semanas de establecidos los cormos. Esta comenzó con la aparición de las primeras hojas, apreciándose la floración durante la

semana 13. Este patrón de crecimiento se debió al aporte continuo de agua a través de cintas de riego, que favorecieron el crecimiento vegetativo sobre el reproductivo.

En general, las plantas presentaron un crecimiento uniforme, ausente de problemas fitosanitarios hasta el momento de la inoculación.

- Desarrollo del ensayo de gladiolo

Se observó emergencia de las plantas después de ocho semanas de establecidos los cormos. Esta comenzó con la aparición de las primeras hojas, de manera muy heterogénea. Durante la semana 12, se extrajeron cormos para determinar si existía actividad de primordios radicales en la base de los cormos, la que indica comúnmente la ruptura del receso y en la mayoría de los cormos analizados existió nula actividad.

Frente a esto, se adquirió nuevas plantas de la misma variedad con un crecimiento de 10 cm.

En general, estas nuevas plantas presentaron un crecimiento uniforme, ausente de problemas fitosanitarios hasta el momento de la inoculación.

- Recopilación de antecedentes bibliográficos

En relación a las bacterias fitopatógenas, éstas se caracterizan por ingresar a la planta por heridas o aberturas naturales. Todas son parásitas o saprófitas facultativas, presentan respiración aerobia o anaerobia facultativa y pueden crecer artificialmente en los medios de cultivo (BESOAÍN, 1999).

Estos medios de cultivo permiten crecer selectivamente a las bacterias fitopatógenas de otras saprófitas comunes (AGRIOS, 1996).

Según BIGRE, MORAND y THARAUD (1990) y BESOAÍN (1999), todas las bacterias fitopatógenas poseen forma de bacilos (bastones), excepto las del grupo de los actinomicetos que desarrollan finos filamentos (como los hongos).

El citoplasma de algunas bacterias puede tener pigmentaciones, por ejemplo, algunas *Xanthomonas* poseen pigmentos amarillos y algunas *Pseudomonas*, fluorescentes (BIGRE, MORAND y THARAUD, 1990).

La pared bacteriana puede retener o no el colorante violeta genciana; de esta forma, se clasifican en Gram (+) o Gram (-), respectivamente. De las bacterias Gram (-) importantes patógenos de plantas son géneros como *Erwinia* y *Pseudomonas*. Los organismos del género *Erwinia* se caracterizan por ser anaerobios facultativos (fermentación ácido mixta o butilen-

glicólica) y, pertenecer a la familia de las Enterobacteriáceas. Las del género *Pseudomonas*, son organismos aerobios (oxidan compuestos orgánicos) y forman parte de la familia de las Pseudomonadáceas (BESOAIN, 1999).

Existen métodos de indexaje para la identificación de bacterias fitopatógenas como aislamiento de bacterias en medios nutritivos, serológicos (antígeno-anticuerpo), Método de Elisa (inmuno-enzimático) y la histoquímica (histofluorescencia) (BIGRE, MORAND y THARAUD, 1990). También, se cuenta con técnicas moleculares como el PCR (CHUN y JONES, 2001).

Dentro de las enfermedades del azafrán, según PÉREZ (1989), la principal enfermedad del cultivo de azafrán es el "mal vinoso" provocado por el hongo *Rhizoctonia violacea*. Esta aseveración fue reafirmada por ALONSO (2000)¹, quien señala, que es la que causa los mayores problemas en los cultivos realizados en España. La sintomatología, inicialmente, corresponde a manchas violáceas a negruzcas y finalmente, una pudrición blanda de todo el cormo.

Estos síntomas, también se pueden confundir con los que corresponden a la presencia de *Fusarium*, descrita en los análisis fitopatológicos realizados sobre cormos cultivados (CASTRO, 2001)².

De menor importancia es la enfermedad provocada por el hongo *Phoma crocophyla* y por nematodos (PEREZ, 1989).

El hongo *Penicillium corymbiferum* es capaz de causar enfermedad en el azafrán y afecta tanto el cormo como la parte aérea (CAPELLI, BUONAURO y POLVERARI, 1991).

DI PRIMO (2000) realiza una caracterización preliminar de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* que causa pudrición de cormos y brotes.

Según POWELL (1985), PIRONE (1978), MOORE *et al.* (1979) y FORSBERG (1976), citados por DE HERTOUGH y LE NARD (1993), el género *Crocus* es hospedero de bacterias como *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* y *Pseudomonas marginata*, las que provocan enfermedad con síntomas de pudrición de cormos y de raíces y aparición de costras en los cormos, respectivamente.

¹ Gonzalo Alonso Díaz-Marta. Especialista español. Comunicación Personal

² Mónica Castro Valdebenito. Ingeniero Agrónomo (M.Sc). Comunicación Personal

Existen algunas sinonimias descritas para *Burkholderia gladioli*. SCHAAD, JONES y CHUN, indican su sinonimia con *Pseudomonas marginata*, causante de manchas y pudriciones a nivel de hojas en gladiolo.

De acuerdo con LESZCZYŃSKA, H y BORY, M (1994) la infección causada por *Pseudomonas marginata* en gladiolos proviene de cormos infectados o del suelo. Suelos pesados, húmedos y alcalinos favorecen el desarrollo de la enfermedad. Los síntomas aparecen como manchas acuosas en la base de cormos, de donde sale un líquido pegajoso, posteriormente, se secan y hunden. Durante el cultivo, primero se pudren las hojas internas y después el resto. Si la infección es severa, la planta se dobla en su base.

6. Problemas enfrentados durante la ejecución del proyecto:

- Técnicos

Los bulbos de gladiolo adquiridos presentaron problemas en la ruptura del receso, traduciéndose en una emergencia lenta y heterogénea de las plantas cultivadas, frente a esto, se adquirió nuevo material (plantas con 10 cm. de emergencia) para contar con plantas en un estado de desarrollo similar al alcanzado en los azafranes. Este fue desinfectado previo a su establecimiento.

- Gestión

Dado al problema suscitado con los cormos de gladiolo, las inoculaciones programadas para febrero se debieron realizar durante el mes de marzo, retrasando las posteriores evaluaciones hasta el mes de mayo.

Durante los días 3 y 4 de junio, la Estación Experimental La Palma sufrió una grave inundación, producto del frente de mal tiempo que azotó la V Región, esto provocó la pérdida total del invernadero de propagación de plantas Medicinales, donde se mantenía parte importante del material proveniente de Argentina y España y daños parciales en el invernadero de propagación del Departamento de Micropropagación, donde existía otra parte del material. Esto se tradujo en el retraso de la entrega del Informe Final del Laboratorio de Fitopatología y el consecuente Informe Técnico Final.

7. Calendario de Ejecución (programado/real):

Nombre de la tarea	Ejecutada	Programada	Realizada
Adquisición de cormos de gladiolo y azafrán	SI	Dic 01	Dic 01
Selección de cormos	SI	Dic 01	Dic 01
Desinfección de cormos	SI	Dic 01	Dic 01
Entrega de material al Laboratorio	SI	Dic 01	Ene 02
Establecimiento de cormos de gladiolo	SI	Ene 02	Ene 02
Establecimiento de cormos de azafrán	SI	Ene 02	Ene 02
Producción de cuatro cepas de <i>Burkholderia</i>	SI	Dic 01 Mar 02	Mar 02
Inoculaciones de <i>Burkholderia</i> en gladiolo	SI	Feb 02	Mar 02
Inoculaciones de <i>Burkholderia</i> en azafrán	SI	Feb 02	Mar 02
Evaluaciones en gladiolo	SI	Dic 01 Mar 02	Mar 02 May 02
Evaluaciones en azafrán	SI	Dic 01 Mar 02	Mar 02 May 02
Análisis estadísticos de los datos obtenidos	SI	Mar 02	May 02
Elaboración de Informe	SI	Mar 02 Abr 02	Abr 02 May 02
Recopilación de antecedentes bibliográficos	SI	Dic 01 Mar 02	Dic 01 Mar 02
Elaboración Informe Final	SI	Abr 02	May 02

Ver Carta Gantt de Actividades programadas

8. Difusión de los resultados obtenidos:

No se consideró actividades de difusión en las actividades programadas, sin embargo, periódicamente, se estuvieron atendiendo telefónicamente interesados en el cultivo de azafrán, a los que se les envió por correo electrónico el apunte confeccionado para el seminario realizado durante el año 2000.

9. Impactos del proyecto:

Dada la importancia cuarentenera de esta bacteria, impediría el ingreso de cormos de azafrán a Chile, salvo que en el país de origen del material se certificara oficialmente que se encuentra libre de este patógeno.

Otra manera de ingresar este tipo de material sería a través de cultivo *in vitro*.

El material que se encuentra en manos del proyecto podría ser saneado a través del cultivo de meristemas para así ser mantenido en nuestro país. Cabe señalar que al inicio de este proyecto se realizaron ensayos utilizando yema meristemática como explante, sin embargo, los resultados preliminares no fueron satisfactorios debido a la oxidación observada.

10. Conclusiones y Recomendaciones:

Las cepas de *Burkholderia gladioli* aisladas desde cultivo *in vitro* de azafrán fueron patogénicas tanto para gladiolo como para azafrán.

El grado de incidencia (medido como % de incidencia de la enfermedad) fue diferente en las dos especies estudiadas, siendo más agresiva en plantas de azafrán.

La sintomatología difirió en los dos cultivados estudiados, afectando principalmente al follaje de gladiolos y a cormos en azafrán.

La baja incidencia de la enfermedad a nivel de cormos de gladiolo, se puede deber al patrón de desarrollo de esta especie, la que produce tempranamente un nuevo cormo y cormillos.

La presencia y la importancia de esta enfermedad en azafrán, limitaría el cultivo de esta especie en Chile.

11. Otros aspectos de interés

El desarrollo de esta investigación sigue suscitando interés a nivel nacional, por lo que sería interesante que los resultados estuvieran disponibles a potenciales productores de esta especie dentro del material de divulgación de la Fundación para la Innovación Agraria.

12. Anexos

Se incluye Informe de Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía.

13. Bibliografía Consultada

Leszczyńska, H y Bory, M. 1994. *Gladiola*. Edomex, Méjico. 166 p.

SCHAAD, NN; JONES, J.B y CHUN, N. *Plant Pathogenic Bacteria*. 3 Edition. APS Press, Minesota. 373 p.

ANEXO

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
FUNDACIÓN ISABEL CACES DE BROWN
Calle San Francisco SN°, La Palma, Quillota - Chile
Teléfono (56-32) 274501. Fax (56-32) 274570
Casilla 4-D. <http://www.ucv.cl>



FACULTAD DE AGRONOMÍA

INFORME FINAL

PRUEBAS DE PATOGENICIDAD DE *Burkholderia gladioli* EN PLANTAS DE AZAFRÁN Y GLADIOLOS BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE INVERNADERO

Proyecto FIA C98-1-A-051 “Propagación del azafrán (*Crocus sativus*)”

Ing. Agr. **ERIKA BRICEÑO P.**
Ing. Agr. M. Sc. **XIMENA BESOAIN C.**
Laboratorio de Fitopatología

JUNIO 2002

INTRODUCCIÓN

En nuestro país el cultivo del azafrán es bastante nuevo, y por esta causa se desconocen los síntomas y características de las enfermedades que lo afectan. En cuanto a patógenos que causan pudrición al bulbo en otros países tenemos *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Penicillium* (De Hertogh y Le Nard, 1993).

El cultivo del gladiolo, sin embargo, se realiza ya desde hace varios años. Como a todos los cultivos, el cultivo del gladiolo no está ajeno al ataque de patógenos del tipo hongos, virus y bacterias. Dentro de este último grupo, las principales bacterias que afectan al cultivo del gladiolo son *Pseudomonas gladioli* pv. *gladioli* (sin. *Burkholderia gladioli*), *Pseudomonas marginata*, *Xanthomonas campestris* pv. *gummisudans* y *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*.

En el marco del proyecto FIA C98-1-A-051, Propagación del azafrán (*Crocus sativus*), desde cultivos *in vitro* provenientes del extranjero, y que durante su propagación desarrollaron en los explantes y plantas síntomas de pardeamiento y pudrición blanda de brotes y tallos de color café oscuro, acompañado de exudados bacterianos desarrollados en la base del explante. A partir de estas lesiones presentes en las plantas y desde crecimiento bacteriano presente en el medio de cultivo empleado en su propagación, se aisló en forma consistente más de 10 aislados, los que presentaron características bioquímicas similares correspondiendo al género *Burkholderia*. Todas las plantas y explantes provenientes de esta partida fueron debidamente eliminados, conservándose las cepas bacterianas debidamente liofilizadas.

Debido a que esta especie además de afectar al cultivo de azafrán también afecta al gladiolo, y debido a que no se encuentra descrita en nuestro país para ninguno de los dos cultivos, se decidió realizar estos ensayos cuyo objetivo es probar la patogenicidad de las cepas aisladas sobre cormos brotados de azafrán y gladiolos.

METODOLOGÍA

Se realizaron dos ensayos los que fueron realizados en el Laboratorio e Invernadero de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso, ubicados en la provincia de Quillota, V Región, el primero efectuado con plantas de *Crocus* y el segundo con plantas de gladiolo, ambas desarrolladas bajo condiciones controladas de invernadero.

Para la implementación de los respectivos ensayos se llenaron macetas de tres litros de capacidad con sustrato compuesto por suelo, arena y tierra de hoja, el cual fue esterilizado mediante vapor. En éstos fueron puestos a germinar cormos de azafrán y de gladiolos, el 11 y 18 de enero respectivamente. Una vez que los cormos emitieron follaje se seleccionaron las 50 plantas de azafrán que presentaban un crecimiento más homogéneo. Para el caso de los cormos de gladiolos se procedió de la misma manera, a excepción de que los cormos sembrados en una primera fecha hubo que reemplazarlos por cormos ya brotados por una emergencia muy dispareja de éstos.

Selección de cepas e inoculación

Para la inoculación se seleccionaron cuatro cepas de *Burkholderia gladioli* (sin. *Pseudomonas gladioli* pv. *gladioli*), provenientes del cepario de bacterias del Laboratorio de Fitopatología, las cuales se conservan en forma liofilizada a -18°C . Estas cepas fueron aisladas desde cormos de azafrán micropropagados y caracterizadas e identificadas en el mismo laboratorio, correspondiendo a las cepas 252, 253, 254 y 255. Posteriormente dos de estos cultivos fueron enviados al Servicio de Identificación de CABI Bioscience en Inglaterra, en donde se corroboró el género detectado y se clasificó en la especie correspondiente (IMI N° 386805 y 386806). Una vez el ensayo estuvo preparado, las cepas fueron recuperadas y multiplicadas en medio B de King (MBK), preparando una suspensión bacteriana a una concentración de 10^6 ufc/ml/cepa, calculada mediante espectrofotómetro.

A las 10 semanas post siembra (22 de marzo), se procedió a despejar la zona de la superficie cercana al corno para luego inocular, asperjando una dosis de 50 ml de la suspensión bacteriana por maceta. En los tratamientos con heridas se realizaron 10 heridas por planta mediante aguja hipodérmica, inmediatamente antes de la inoculación. Para los tratamientos testigos se dejaron plantas sin inocular.

Tratamientos evaluados

Para ambas especies se realizaron 10 tratamientos con cinco repeticiones cada uno, distribuidos completamente al azar. Se utilizaron cuatro cepas de *Burkholderia gladioli* (252, 253, 254 y 255) en tratamientos con heridas y sin heridas. Los tratamientos testigos se manejaron de la misma manera, pero sin inocular.

- T0: Testigo (sin inocular) sin heridas
- T1: Testigo (sin inocular) con heridas
- T2: Cepa 252 sin heridas
- T3: Cepa 252 con heridas
- T4: Cepa 253 sin heridas
- T5: Cepa 253 con heridas
- T6: Cepa 254 sin heridas
- T7: Cepa 254 con heridas
- T8: Cepa 255 sin heridas
- T9: Cepa 255 con heridas

Manejos realizados

Las plantas permanecieron bajo condiciones controladas de temperatura y humedad en un invernadero climatizado, manteniendo las temperaturas entre 12 y 30°C, mediante aire acondicionado.

Durante el transcurso del cultivo las plantas se mantuvieron en óptimas condiciones nutritivas, hídricas y sanitarias.

Evaluación

Después de diez semanas de realizada la inoculación y 20 semanas post siembra (31 de mayo) se evaluó el nivel de daño de cada cepa en ambas especies vegetales, a nivel de follaje pero principalmente a nivel de cormo. Se realizaron reaislamientos a las plantas inoculadas, caracterizándose nuevamente las cepas obtenidas, a modo de completar los postulados de Koch. Con los datos de incidencia obtenidos se realizó un análisis estadístico.

RESULTADOS

Ensayo Crocus

Al evaluar los distintos tratamientos (10 semanas post inoculación), se pudo observar clorosis de follaje y posterior marchitez y muerte de algunas plantas post inoculación. Sin embargo, el daño principal se observó a nivel de cormos, los cuales presentaban lesiones café oscuro a rojizas, muy hendidas y que afectaban también tejido interno. En condiciones de alta humedad se observó una pudrición blanda, síntoma observado principalmente en las plantas muertas.



Figura 1: Síntomas de pudrición blanda en cormos inoculados con cepas de *Burkholderia gladioli*, previa realización de heridas (Quillota, mayo 2002).

Desde la zona de avance de las lesiones presentes en los cormos de los diferentes tratamientos inoculados se tomaron trozos de tejido para análisis fitopatológico. Después del período de incubación correspondiente se aisló en forma consistente colonias bacterianas correspondientes a *Burkholderia gladioli*, completando los postulados de Koch (aislamiento del agente causal, inoculación, producción de síntomas característicos y recuperación del patógeno).

Según prueba estadística de Duncan, los tratamientos con heridas presentan diferencia significativa con respecto a los tratamientos sin heridas y a los respectivos testigos (Cuadro 1 y Figura 2).

Cuadro 1: Porcentaje de incidencia de *Burkholderia gladioli* en cormos de azafrán después de 10 semanas post inoculación (Quillota, mayo 2002).

Tratamientos	Cepa	% de Incidencia	Diferencia de medias
T0	Testigo sin heridas	0	b
T1	Testigo con heridas	0	b
T2	Cepa 252 sin heridas	20	b
T3	Cepa 252 con heridas	100	a
T4	Cepa 253 sin heridas	40	b
T5	Cepa 253 con heridas	100	a
T6	Cepa 254 sin heridas	20	b
T7	Cepa 254 con heridas	100	a
T8	Cepa 255 sin heridas	40	b
T9	Cepa 255 con heridas	100	a

Letras distintas indican medias estadísticamente diferentes al nivel de significancia $P=0.05$, según Test de Duncan.

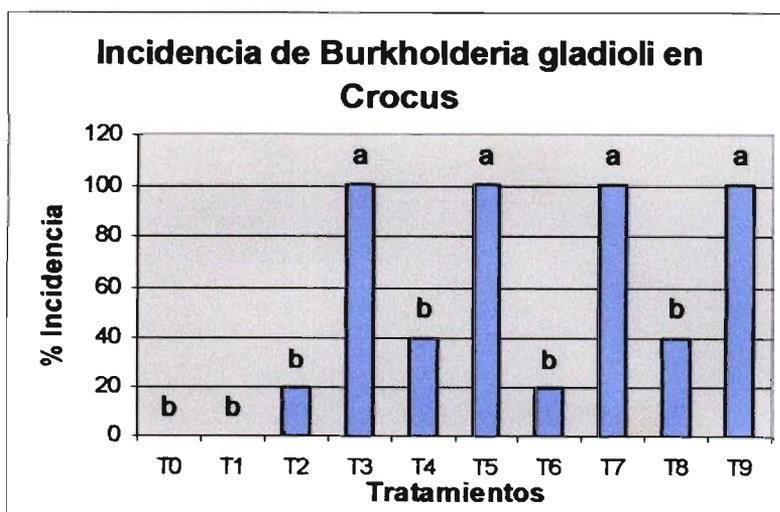


Figura 2: Porcentaje de incidencia de *Burkholderia gladioli* en cormos de azafrán (*Crocus sativus*) 10 semanas post inoculación (Quillota, mayo 2002).

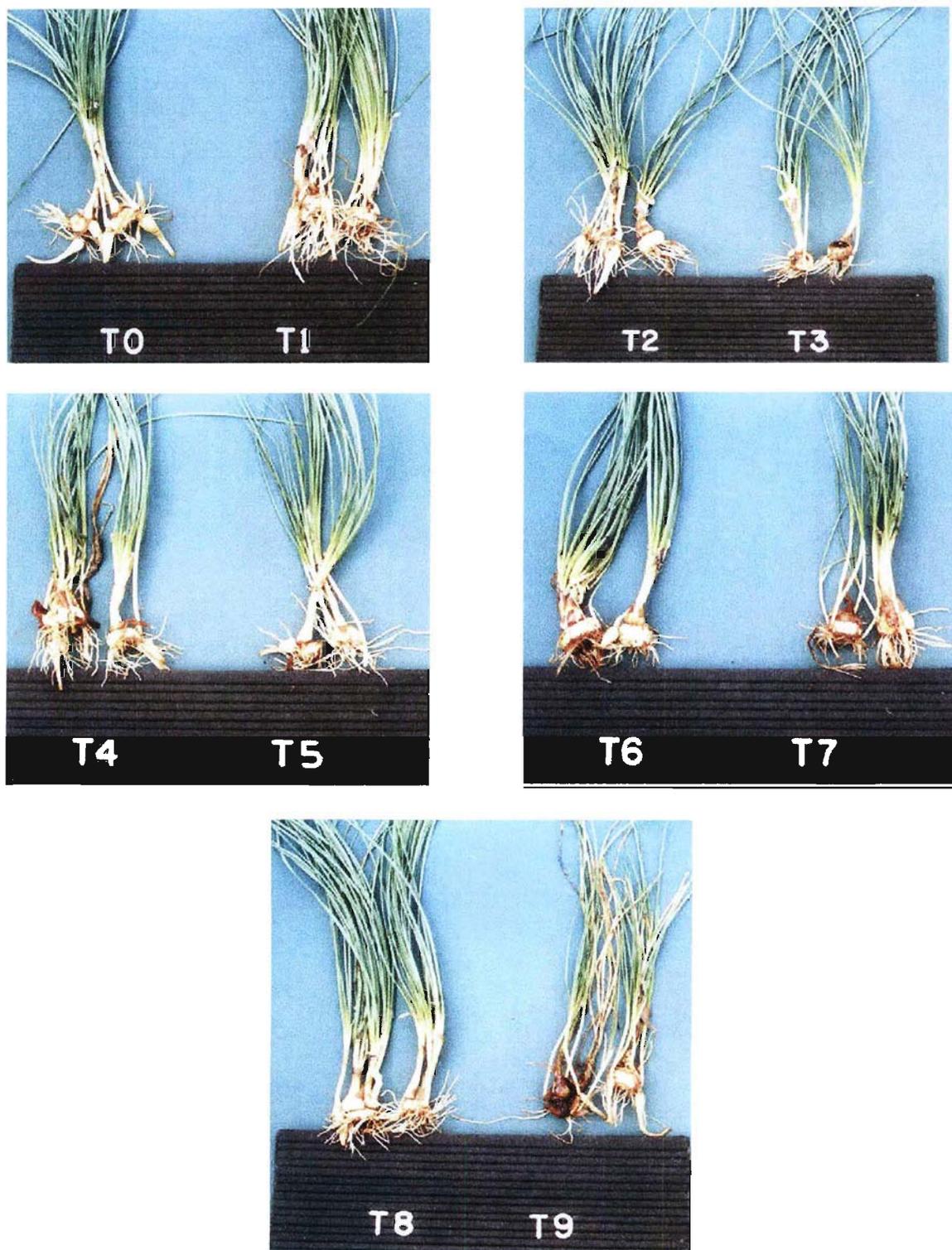


Figura 3: Síntomas observados en los distintos tratamientos evaluados, obsérvese la ausencia de lesiones en los tratamientos testigo (T0 y T1) y en los tratamientos sin heridas (izquierda de las fotos) (Quillota, mayo 2002).

Como se puede observar en la figura anterior (Figura 3), los tratamientos con heridas (ubicados al lado derecho de las fotos) muestran los síntomas de pudrición en los cormos, a diferencia de los tratamientos sin heridas (lado izquierdo) y de los tratamientos testigo. También se puede observar que el T9 (cepa 255 con heridas), provocó un mayor decaimiento en las plantas mostrando marchitez de follaje y muerte de la planta completa (Figura 4).



Figura 4: Planta de azafrán completamente seca a causa de la inoculación del cormo con la cepa 255 de *Burkholderia gladioli* (Quillota, mayo 2002).

Ensayo gladiolos

Diez semanas post inoculación se evaluó el ensayo realizado en plantas de gladiolos. En esta fecha se observó una pequeña diferencia en cuanto a la sintomatología de la parte aérea pero no en los cormos. A nivel de follaje se observaron manchas de márgenes definidos en los tratamientos inoculados, desde las cuales se aisló en forma consistente colonias correspondientes a *Burkholderia gladioli* (Figura 5). A nivel de cormos, no se observó diferencia visible entre los distintos tratamientos. Esto se podría explicar por la rápida producción de nuevos cormos desde el cormo original inoculado, y posiblemente el tiempo de observación no fue suficiente para la aparición de síntomas en los nuevos cormos.



Figura 5: Manchas alargadas en las hojas de gladiolo en plantas inoculadas con *Burkholderia gladioli*. Obsérvese la ausencia de daño en el cormo nuevo y la gran producción de cormillos sobre el cormo viejo (Quillota, mayo 2002).

Según Test de Duncan, los únicos tratamientos que se diferencian estadísticamente de los testigos son el T6 y T9, sin embargo, en todos los tratamientos inoculados, sean sin o con producción de heridas previas a la inoculación, se observaron algunas manchas en hojas, desde las que se reaisló *Burkholderia gladioli*. (Cuadro 2 y Figura 6)

Cuadro 2: Porcentaje de incidencia de *Burkholderia gladioli* en cormos de gladiolo después de 10 semanas post inoculación (Quillota, mayo 2002).

Tratamientos	Cepa	% de Incidencia	Diferencia de medias
T0	Testigo sin heridas	0	b
T1	Testigo con heridas	0	b
T2	Cepa 252 sin heridas	20	a b
T3	Cepa 252 con heridas	60	a b
T4	Cepa 253 sin heridas	40	a b
T5	Cepa 253 con heridas	60	a b
T6	Cepa 254 sin heridas	80	a
T7	Cepa 254 con heridas	60	a b
T8	Cepa 255 sin heridas	60	a b
T9	Cepa 255 con heridas	80	a

Letras distintas indican medias estadísticamente diferentes al nivel de significancia $P=0.05$, según Test de Duncan.

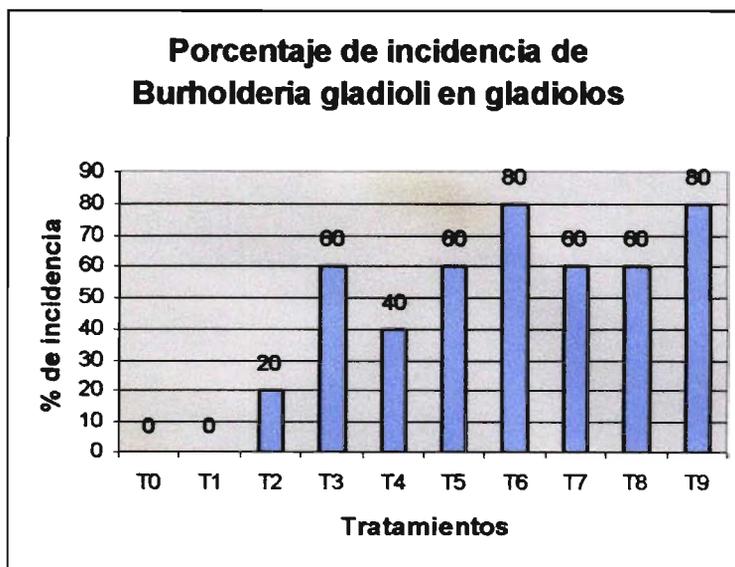


Figura 6: Porcentaje de incidencia de cuatro cepas de *Burkholderia gladioli* sobre cormos de gladiolo sin y con heridas, en comparación con testigos no inoculados (Quillota, mayo 2002).

CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos se puede concluir que todas las cepas de *Burkholderia gladioli* son patogénicas para plantas de azafrán, pero que requiere de la presencia de heridas para su infección.

Este punto es bastante importante ya que esta bacteria no está descrita en Chile para ninguna de las dos especies evaluadas, por lo que habría que tomar las medidas necesarias para chequear el material ingresado y evitar así la propagación de una nueva enfermedad.

Si bien, en plantas de gladiolo no se observaron síntomas a nivel de cormos, los aislamientos realizados desde hojas comprueban que la bacteria es patogénica para la especie. Sin embargo, el nivel de daño logrado no fue suficiente para obtener un resultado claro sobre esta especie.

"Determinación de Patogenicidad de *Burkholderia gladioli* sobre gladiolo y azafrán"

Id	Nombre de tarea	Duración	Comienzo	Fin	año 2											
					dic '01	ene '02	feb '02	mar '02	abr '02	may '02	jun '02	jul '02	ago '02	sep '02	oct '02	
1	Adquisición de cormos de gladio	4 d	lu 17-12-01	vi 21-12-01	□ Carolina Fredes											
2	Selección de cormos de azafrán	2,94 d	mi 26-12-01	vi 28-12-01	□ Carolina Fredes, Alejandra Ramírez											
3	Desinfección de cormos	1 d	lu 03-12-01	lu 03-12-01	□ Carolina Fredes, Alejandra Ramírez											
4	Entrega de Material a Laboratc	1 d	lu 03-12-01	lu 03-12-01	□ Carolina Fredes											
5	Establecimiento de Cormos de c	21,75 d	mi 02-01-02	ju 31-01-02	□ Laboratorio de Fitopatología, Cormos de gladiolo											
6	Establecimiento de cormos de c	21,75 d	mi 02-01-02	ju 31-01-02	□ Laboratorio de Fitopatología, Cormos de azafrán											
7	Producción de cuatro cepas de l	61,25 d	lu 03-12-01	ju 28-02-02	□ Laboratorio de Fitopatología											
8	Inoculaciones de Burkholderia e	19,69 d	vi 01-02-02	ju 28-02-02	□ Laboratorio de Fitopatología											
9	Inoculaciones de Burkholderia	19,69 d	vi 01-02-02	ju 28-02-02	□ Laboratorio de Fitopatología											
10	Evaluaciones en gladiolo	82,88 d	lu 03-12-01	vi 29-03-02	□ Laboratorio de Fitopatología											
11	Evaluaciones en azafrán	82,88 d	lu 03-12-01	vi 29-03-02	□ Laboratorio de Fitopatología											
12	Análisis estadístico de los dato	19,75 d	lu 04-03-02	vi 29-03-02	□ Laboratorio de Fitopatología											
13	Elaboración de Informe	41,5 d	lu 04-03-02	ma 30-04-02	□ Laboratorio de Fitopatología											
14	Recopilación de antecedentes b	82,94 d	lu 03-12-01	lu 01-04-02	□ Mónica Castro, Carolina Fredes											
15	Elaboración Informe Final	21,75 d	ma 02-04-02	mi 01-05-02	□											

Carolina Fredes
 Proyecto C-98-1-A-051 (bacteria)
 lu 03-12-01

Tarea		Resumen		Progreso resumido	
División		Tarea resumida		Tareas externas	
Progreso		División resumida		Resumen del proyecto	
Hito		Hito resumido			