



GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA

OFICINA DE PARTES - FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	27 NOV. 2008
Hora	12:00
Nº Ingreso	1198

INFORME FINAL TÉCNICO Y DE DIFUSIÓN

PROYECTO

“Evaluación de cepas nativas de la bacteria *Pasteuria penetrans* para el biocontrol de nematodos fitoparásitos asociados a cultivos de vid, tomate y cítricos”

EJECUTOR

UNIVERSIDAD DE TALCA

Mauricio Lolas, Eduardo Donoso y Claudio Sandoval

Noviembre 2008



I. ANTECEDENTES GENERALES

Código: FIA-PI-C- 2004-1-A-C-93

Nombre del Proyecto: Evaluación de cepas nativas de la bacteria *Pasteuria penetrans* para el biocontrol de nematodos fitoparásitos asociados a cultivos de vid, tomate y cítricos

Región: VII

Agente Ejecutor: Universidad de Talca.

Agente Asociados: Bio Insumos Nativa Ltda.

Coordinador del Proyecto: Mauricio Lolas Caneo

Periodo de Ejecución: Diciembre 2004 a Noviembre de 2008

COSTO TOTAL DEL PROYECTO

(Valores Reajustados)

: \$

FINANCIAMIENTO SOLICITADO A FIA

(Valores Reajustados)

: \$

APORTE DE CONTRAPARTE Universidad de Talca

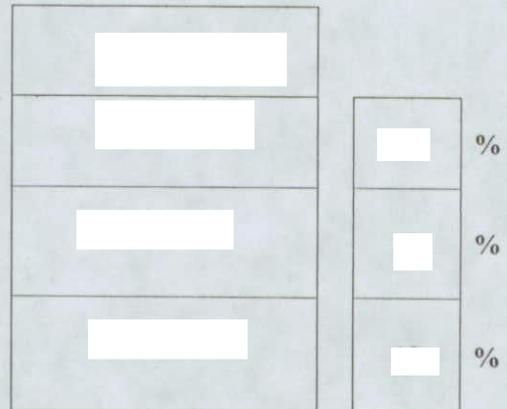
(Valores Reajustados)

: \$

APORTE DE CONTRAPARTE Bio Insumos Nativa Ltda.

(Valores Reajustados)

: \$





Nombre Completo	Profesión	Especialidad	Función y Actividad en el Proyecto	Dedicación al Proyecto (% año)
<u>Mauricio Alberto Lolas Caneo</u>	<u>Ing. Agrónomo</u> <u>Ms; PhD</u>	<u>Fitopatología Y</u> <u>Nematología</u>	<u>Coordinador</u>	<u>18 %</u>
<u>Claudio Roberto Sandoval Briones</u>	<u>Ing. Agrónomo</u> <u>Ms; Doctor</u>	<u>Fitopatología</u>	<u>Coordinador</u> <u>Alterno</u>	<u>11 %</u>
<u>Eduardo Patricio Donoso Cuevas</u>	<u>Ing. Agrónomo</u>	<u>Control biológico</u>	<u>Asistente de</u> <u>investigación</u>	<u>45 %</u>
<u>Víctor Rojas</u>	<u>Tec. Agrícola.</u>	<u>Mantenimiento de</u> <u>ceparios</u>	<u>Asistente de</u> <u>laboratorio</u>	<u>45 %</u>
<u>Cristian Marcelo Muñoz Morales</u>	<u>Tec. Agrícola</u>	<u>Fitopatología Y</u> <u>Nematología</u>	<u>Producción e</u> <u>identificación de</u> <u>nematodos</u>	<u>9 %</u>
<u>Ximena Astorquiza Fierro</u>	<u>Ing. Agrónomo</u>	<u>Producción de</u> <u>microorganismos</u>	<u>Producción masiva</u> <u>de <i>Pasteuria</i></u>	<u>45 %</u>
<u>Jorge Fuentes</u>	<u>Tec. Agrícola</u>	<u>Fitopatología</u>	<u>Producción de</u> <u>nematodos</u>	<u>100 %</u>

RESUMEN EJECUTIVO

El presente proyecto, logro el cumplimiento de sus objetivos, a través de la aislación de cepas nativas de la bacteria *Pasteuria penetrans* y además de otros organismos no considerados inicialmente en el proyecto. Ambos grupos de bio controladores, presentaron altos y consistentes niveles de control de nematodos de los géneros *Meloidogyne* y *Tylenchulus*, tanto en condiciones *in vitro*, *in vivo* y bajo condiciones de campo, con niveles de control similares a los obtenidos por los programas tradicionales, en base a plaguicidas químicos. Por desgracia, no fue posible asilar cepas activas contra nematodos del genero *Xiphinema*.

La producción a escala superior a la de laboratorio, de las cepas de *Pasteuria*, es un reto no resuelto, tanto por el proyecto como por otros grupos de investigación en el mundo. Pero dada la aislación de las bacterias formadoras de endosporas (BFE), las que son fácilmente reproducibles *in vitro* y en escala industrial, fue posible, obtener las bases tecnológicas, para el desarrollo de un producto comercial, disponible en el corto plazo. El que por sus características, se espera que no posea restricciones para su uso en ningunos de los sistemas de certificación usados actualmente.

Además, se logro establecer relaciones de trabajo con grupos de investigadores en Rothampstead (UK) y con la Universidad e Florida (USA), ambos centros con líneas de investigación en el control biológico de nematodos.

Objetivos del Proyecto:

3. Objetivos Generales

Recolectar, aislar y evaluar la capacidad biocontroladora de cepas nativas de *Pasteuria penetrans* recolectadas en las Regiones Metropolitana, VI y VII, para nematodos fitoparásitos causantes de enfermedades en cultivos de vid, cítricos y tomate.

3.1. Objetivos Específicos

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

Los objetivos del proyecto fueron cumplidos con creces, dado que se logro la aislación de cepas de *Pasteuria penetrans* en Chile, siendo esta el primer reporte de la presencia de este organismo en el país. A esto se sumo la detección y aislación de bacterias formadoras de endosporas (BFE), con capacidad nematocida.

Las evaluaciones de actividad, tanto de las cepas de *Pasteuria* como de las BFE, lograron niveles de control tanto *in vitro*, *in vivo* y en condiciones de campo, similares a las obtenidas por productos químicos tradicionales.

El sistema de producción, fue complejo y difícil de lograr, siendo el mayor problema la reproducción de las cepas de *Pasteuria*, no así las de BFE, las que han podido ser reproducidas a nivel industrial y formuladas en forma adecuada.

La difusión de los resultados del proyecto, se realizo a través de exposiciones en congresos científicos, tanto nacionales como internacionales, así como charlas divulgativas y reuniones con asesores y equipos técnicos de empresas relevantes del sector agrícola.

Además se involucro a asesores, en la realización de los ensayos.

4 Metodología del Proyecto:

El proyecto fue dividido en 5 etapas, las que son:

- Prospección de cepas de *Pasteuria* spp.
- Evaluación *in vitro*
- Evaluación *in vivo*
- Evaluación en campo
- Desarrollo de un sistema de producción y transferencia

4.1 Etapa I. Prospección

4.1.1 Recolección de cepas nativas de *Pasteuria* (*Pp*)

Los lugares de recolección comprendieron huertos de cítricos, viñas, hortalizas frutales y zonas de vida silvestre, ubicadas entre las regiones I y X.

El primer paso para el aislamiento de *Pp* se realizó a través de la extracción de nematodos, usando el método estándar del embudo Baermann, de cada una de las muestras recolectadas, reservando su mitad para futuros análisis. Los nematodos así extraídos son mantenidos a 4° C hasta su análisis.

Cada población de nemátodos, se observa individualmente por microscopía con contraste de fase, siendo los individuos sospechosos de poseer la bacteria, los que eran aislados y puestos en portaobjetos, para su observación individual.

Una vez confirmada la presencia de endosporas adheridas al cuerpo del nematodo, se procedía a la inspección de nódulos, en el caso de *Meloidogyne*, con el fin de buscar hembras infectadas, lo que se realizaba por medio de la disección de los nódulos y extracción de las hembras, las que se colocaban en un porta objeto y eran reventadas con un cubre objeto, observándose la presencia de endosporas.

Para el resto de los géneros, se tomaba el suelo, del que provenían los nematodos infectados, el que era utilizado para el cultivo de tomates y posteriormente infectados con J2 de *Meloidogyne*.

4.1.2 Asesoría especialista extranjero

La visita del asesor extranjero Keith Davies, proveniente del Horticultura Research Internacional Rothamsted, Reino Unido, se realizó para los días 23 de abril al 01 de mayo, durante su estadía, se confirmaron la presencia de varias cepas de *Pasteuria*, tanto en nematodos fitoparásitos como saprofitos, siendo destacable la aislamiento de una cepa de Pp. obtenida sobre *Meloidogyne* spp. En un cultivo de tomate al aire libre, en la localidad de Chacarillas, Maule.

El asesor Keith Davies, desarrollo una capacitación exhaustiva en el aislamiento, identificación y reproducción de Pp. Además se realizó una charla divulgativa, invitándose tanto a investigadores, organismos de gobierno como agricultores.

4.1.3- Recolección y mantención de nematodos fitoparásitos

De las muestras colectadas, se han extraídos nematodos de cada una de las especies en estudio, siendo identificados microscópicamente, y luego de que se ha determinado que no portan bacterias u hongos adheridos, se ha almacenado a 4° C. Estas poblaciones se utilizaron para inocular plantas de limón, tomate y vid. Permitiendo así contar con los nematodos necesarios para los ensayos, los que fueron producidos en suelo estéril y separados por especie.

4.1.4 Aislación de bacterias formadoras de endosporas (BFE) con actividad nematocida

En base a información disponible, se evaluó producir *Pasteuria* en un sistema *in vitro*, para lo que se tomaron nematodos infectados con la bacteria, a los que se les cortó tanto la cabeza como la cola, luego de lo cuales, fueron lavados profusamente con agua destilada estéril y posteriormente colocaron en matraces con agar nutriente en agitación a 25° C por 144 horas, luego de lo cual se observó la presencia de endosporas. Una vez ocurrido esto los medios fueron colocados a 60° C por 10 minutos, con el fin de solo permitir la reproducción de bacterias formadoras de endospora, entre las cuales estaría *Pasteuria* spp. Al tomar estas esporas, y ser sembradas en agar nutriente, se observó crecimiento bacteriano, de bacterias con forma bacilar, las que fueron reproducidas, tanto para su identificación como para su evaluación en ensayos.

4.1.5 Identificación de cepas de bacterias formadoras de endosporas (BFE) con actividad nematocida.

Los procesos de identificación consistieron en observación morfológica, test bioquímicas, secuenciamiento del fragmento ribosomal 16S y comparación de este con las secuencias presentes en Gen Bank y reconstrucción filogenética. Para lo cual un mililitro de cultivo fue centrifugado por 10' a 6000r.p.m. las células obtenidas se lavaron con tampón TE 1X (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0 +/-0.2). Para la lisis celular el "pellet" resultante fue resuspendido en 200µl de tampón TE 1X más 2mg/ml de lisozima y se incubó durante 30' a 37°C. Posteriormente para lograr la degradación de las proteínas se añadió 300µl de tampón TE1X más 1% (p/v) de SDS y proteinasa K a concentración final de 100µg/ml, la mezcla se incubó a 65°C por 1 hora. Para eliminar los péptidos y lípidos residuales se adicionó 84µl de una solución 5M de NaCl más 60µl de CTAB (10% (p/v) disuelto en 0.7M de NaCl) y se incubó 20' a 65°C. La suspensión resultante se trató con una mezcla 24:1 de fenol-cloroformo. Una vez separadas las fases por centrifugación, la fase acuosa se trató con 2-propanol para lograr la precipitación del ADN. El ADN precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v) y fue secado a 37°C y resuspendido en tampón TE 1X. Para la determinación de la pureza y concentración de los ADN obtenidos se empleó un espectrofotómetro. Se aplicó corrección de fondo al de 320nm. Los genes 16S rRNA eran amplificados por medio de PCR con los partidores universales para el fragmento 16S 518 (forward) y 800 (reverse). El volumen final de la reacción de PCR fue de 30µl, conteniendo tampón de PCR 1X, 2.5mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 20pmol de cada cebador y 2U de Taq – ADN polimerasa (PROMEGA), más 3µl de ADN o muestra (~120ng para los ADN puros). Se empleó un termociclador Eppendorf programado de la siguiente manera: 1 minuto a 95°C, seguidos de 40 ciclos compuestos por 30s a 94.0°C, 20s a 51.0°C, 30s a 74.0°C y un paso final de extensión de 8' a 74°C.

El producto de PCR fue enviado a Macrogen (Korea), para su secuenciamiento. Adicionalmente se enviaron cultivos puros de las bacterias para su procesamiento completo en la misma empresa, de manera de validar los protocolos de extracción, purificación y amplificación del fragmento 16S.

Las secuencias de rRNA 16S fueron sometidas a alineamiento, por medio del programa CLUSTALX 1.83 (Thompson et al. 1997), usando los ajustes de los parámetros por defecto y posteriormente al ojo usando BIOEDIT (Hall, 1999). Las secuencias totalizaron 1610 pares de bases (bp) para el gen 16S rRNA. Los datos fueron analizados bajo máxima parsimonia por medio del programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002). Utilizando solo los caracteres informativos, tratados como no ordenados y sin pesaje, dado el número de taxas, se realizó una búsqueda exhaustiva. Los caracteres fueron optimizados mediante ACCTRAN (Hall et al. 2004). La robustez de los árboles obtenidos se evaluó por un bootstrap de 1000 replicas.

4.2 Etapa II: Evaluación *in vitro*

4.2.1 Evaluación *in vitro* de capacidad de adherencia de cepas de *Pasteuria* sobre nematodos fitoparásitos.

Para evaluar la capacidad efectiva de los aislados de *Pp*, se utilizó la siguiente metodología:

En placas Petri de 5 cm. de diámetro se colocaron 5 ml de una suspensión de 50 nematodos fitoparásitos, a la que se agregó 1 ml de una suspensión de un cultivo de *Pp*, a una concentración de 10^6 esporas/ml, para luego ser dejadas en incubación, en oscuridad a 25° C de temperatura por 3 días, en agitador calefaccionado. Cada combinación bacteria/nematodo tuvo 5 repeticiones, utilizando un diseño completamente al azar.

4.2.2 Evaluación de bacterias formadoras de esporas con actividad nematocida

En placas Petri con 10 ml de agua estéril y 80 J2 de *Meloidogyne incognita* se agregó 1 ml de una suspensión de esporas puestas en zeolita a una concentración de 10^8 UFC/g de cada una de las cepas de BFE, en distintas dosis (Tratamientos con 0 (control), 0.5, 1, 1.5 y 3 gr/l) fueron, a una concentración de 10^8 esporas/gr., incubándose por 72 horas en agitación, luego de lo cual se determinó la población de J2 sobrevivientes y se observó la presencia de endosporas adheridas a los nematodos de *Tylenchulus semipenetrans*, utilizando 450 J2. y *Pratylenchus* utilizando 120 J2 por placa.

Ensayo IV: Determinación de la compatibilidad de BFE con agroquímicos utilizados para el control de nematodos.

En matraces de 100 ml con agua destilada estéril, se suspendieron 1,5 gr (1×10^8 UFC/g) de cada una de las BFE, además se adicionó la cantidad recomendada por litro de los siguientes productos utilizados, en el control convencional de nematodos Rugby, Nema-cur, Biorend, Mocap y Furadan. Los matraces se mantuvieron en agitación por dos horas, luego de lo cual se tomó una alícuota de 1 ml, el que fue diluido en proporción 1:1000, desde esta dilución se tomaron 500 μ l, los que fueron sembrados en una placa Petri con agar nutriente, la que se incubó por 48 horas, luego de las cuales se contabilizó la cantidad de colonias. Esto fue comparado con tratamientos control, sin la presencia de los nematocidas químicos.

4.3 Etapa III: Evaluación *in vivo*

4.3.1 Evaluación de capacidad de supresión de nematodos por suelos naturalmente infectado por *Pasteuria*, sobre de poblaciones de nematodos fitoparásitos.

Se tomaron muestras desde suelos naturalmente infectados con *Pasteuria*, las muestras se colocaron en tubotes de 145 ml de capacidad, de los que fueron eliminados los nematodos, por aplicación de calor 40° C por 30 minutos, para luego, aplicar 5 ml con 50 nematodos/ ml, y sobre esto una planta de 2 hojas verdadera de tomate. Las que se cultivan en la cámara de crianza, por un periodo de 12 semana, al fin del cual, se evaluó la cantidad de nódulos en las raíces, poblaciones de nematodos en el suelo, nivel de infección, n y población de nematodos final Esto se ha realizado con 15 suelos naturalmente infectados con Pp y 15 poblaciones de *Meloidogyne*. Con 3 repeticiones por combinación.

En el caso de *Tylenchulus*, se realizo la misma metodología usando macetas de 4 litros y plantas de naranjo.

4.3.2 Evaluación de capacidad nematicida de cepas de *Pasteuria* sp. sobre poblaciones de *Meloidogyne* y *Tylenchulus semipenetrans*. En plantas de tomate, vid y limón en condiciones controladas.

Tomate

En macetas de 4 litros de capacidad con un sustrato estéril compuesto por arena, compost, perlita y turba 1:2:2:2, se trasplantaron plantas de tomate CV. Maria Italia.

Los tratamientos consistieron en:

- Testigo negativo (solo suelo estéril)
- Testigo Positivo (inoculado con nematodos)
- *Pasteuria* cepa 97 en dosis de 1×10^6 esporas/ml, en 500 ml por planta
- *Pasteuria* cepa 97 en dosis de 1×10^7 esporas/ml en 500 ml por planta
- *Pasteuria* cepa 97 en dosis de 1×10^8 esporas/ml en 500 ml por planta
- *Pasteuria* cepa 213 en dosis de 1×10^6 esporas/ml, en 500 ml por planta
- *Pasteuria* cepa 213 en dosis de 1×10^7 esporas/ml en 500 ml por planta
- *Pasteuria* cepa en 213 dosis de 1×10^8 esporas/ml en 500 ml por planta
- Nematicida: Furadan, dosis comercial.

Las aplicaciones se realizara inmediatamente después de transplante, y 2 horas después se inoculara cada planta, en los tratamientos que corresponda con 3000 J2 por maceta de *Meloidogyne incognita* que fueron colectados desde un cultivo de tomate en Quillota, identificado y luego reproducidos en forma artificial.

A las 12 semanas, se evaluó población final, altura y peso seco de las plantas, así como índice de nodulación (0: sin nódulos; 1: 10%; 2: 25 %; 3: 50 %; 4:75% y 5:100%) y porcentaje de J2 y hembras infectadas.

Vid

En macetas de 20 litros de capacidad con un sustrato estéril compuesto por arena, compost, perlita y turba 1:2:2:2, se trasplantaron plantas de vid CV. Merlot

- Testigo negativo (solo suelo estéril)

- Testigo Positivo (inoculado con nematodos)
- Pasteuria cepa 213 en dosis de 1×10^6 esporas/ml, en 500 ml por planta
- Pasteuria cepa 213 en dosis de 1×10^7 esporas/ml en 500 ml por planta
- Pasteuria cepa 213 en dosis de 1×10^8 esporas/ml en 500 ml por planta
- Nematicida Nema-cur, dosis comercial.

Las aplicaciones se realizara inmediatamente después de trasplante, y 2 horas después se inoculara cada planta, en los tratamientos que corresponda con 3000 J2 por maceta de *Meloidogyne arenaria* que fueron colectados desde un cultivo de vid ubicado en Villa Alegre, identificado y luego reproducidos en forma artificial.

Limón

En macetas de 20 litros de capacidad con un sustrato estéril compuesto por arena, compost, perlita y turba 1:2:2:2, se trasplantaron plantas de limon CV. Eureka

- Testigo negativo (solo suelo estéril)
- Testigo Positivo (inoculado con nematodos)
- Pasteuria cepa 329 en dosis de 1×10^6 esporas/ml, en 500 ml por planta
- Pasteuria cepa 329 en dosis de 1×10^7 esporas/ml en 500 ml por planta
- Pasteuria cepa 329 en dosis de 1×10^8 esporas/ml en 500 ml por planta
- Nematicida Nema-cur, dosis comercial.

Las aplicaciones se realizara inmediatamente después de trasplante, y 2 horas después se inoculara cada planta, en los tratamientos que corresponda con 5000 J2 por maceta de *Tylenchulus semipenetrans* que fueron colectados desde un cultivo de limones ubicado en Pomaire, identificado y luego reproducidos en forma artificial.

4.3 Ensayos *in vivo* de control de *Meloidogyne* spp y *Tylenchulus semipenetrans* por bacterias con actividad nematicida, bajo condiciones controladas.

Ensayos en tomate

En este cultivo se utilizo población identificada por corte perineales como *Meloidogyne incognita*, obtenida del predio de de Colin donde se estableció el ensayo en campo, y se utilizo la misma variedad de tomate CV. Maria Italia.

Plantas de 4 semanas de edad se trasplantaron a macetas de 10 litros, con un sustrato estéril compuesto por arena, compost, perlita y turba 1:2:2:2.

Tres días previo al trasplante, los tratamientos que correspondía se inoculo con 2000 J2 de *Meloidogyne incognita* cada maceta.

Los tratamientos siguientes se aplicaron inmediatamente después del trasplante.

Los tratamientos consistieron en:

- Control negativo (solo suelo estéril)
- Control Positivo (inoculado con nematodos)
- Pasteuria cepa 213 en dosis de 50 ml/planta a una concentración 1×10^6 esporas/ml
- Pasteuria cepa 97 en dosis de 50 ml/planta a una concentración 1×10^6 esporas/ml
- Mezcla de cepas 97 y 213 (1:1) en dosis de 1×10^6 esporas/ml en 500 ml por planta
- BFE en dosis de en dosis de 50 ml/planta a una concentración de 1,5 gr/litro (1×10^8 esporas/g).

Las aplicaciones se realizaron inmediatamente después de trasplante, 2 horas después se inoculo cada planta, con 3000 J2 de *M. incognita*.



Las evaluaciones se realizaron 8 semanas después de la aplicación de los tratamientos, consistentes en mediciones de la población y tasa de crecimiento poblacional de *M. incognita* y determinación de nivel de nodulación en raíces, así como peso aéreo y radicular de las plantas.

Ensayos en limón

En este cultivo se utilizó población identificada por corte perineales como *Tylenchulus semipenetrans*, obtenidos desde el predio de Pomaire donde se estableció el ensayo en campo, y se utilizó la misma variedad de limón CV. Eureka.

Plantas de 16 meses de edad se trasplantaron a macetas de 10 litros, con un sustrato estéril compuesto por arena, compost, perlita y turba 1:2:2:2.

Tres días previo al trasplante, los tratamientos que correspondía se inoculó con 5000 J2 de *Tylenchulus semipenetrans* cada maceta.

Los tratamientos siguientes se aplicaron inmediatamente después del trasplante.

Los tratamientos consistieron en:

- Control negativo (solo suelo estéril)
- Control Positivo (inoculado con nematodos)
- Pasteuria cepa 329 en dosis de 50 ml/planta a una concentración 1×10^6 esporas/ml
- Mezcla de cepas 329 y BFE (1:1) en dosis de 1×10^6 esporas/ml en 500 ml por planta
- BFE en dosis de en dosis de 50 ml/planta a una concentración de 1,5 gr/litro (1×10^8 esporas/g).

Las aplicaciones se realizaron inmediatamente después de trasplante, 2 horas después se inoculó cada planta, con 5000 J2 de *Tylenchulus semipenetrans*.

Las evaluaciones se realizaron 18 semanas después de la aplicación de los tratamientos, consistentes en mediciones de la población y tasa de crecimiento poblacional de *Tylenchulus semipenetrans* y determinación de nivel de nodulación en raíces, así como peso aéreo y radicular de las plantas.

4.4 Ensayos *in vivo* de control de *Meloidogyne* spp por bacterias con actividad nematocida, con formulación y dosis final.

Ensayos en tomate

En este cultivo se utilizó población identificada por corte perineales como *Meloidogyne incognita*, obtenida del predio de de Colin donde se estableció el ensayo en campo, y se utilizó la misma variedad de tomate CV. María Italia. En este ensayo se utilizó la formulación sólida de Pp y de las BFE.

Plantas de 4 semanas de edad se trasplantaron a macetas de 10 litros, con un sustrato estéril compuesto por arena, compost, perlita y turba 1:2:2:2.

Tres días previo al trasplante, los tratamientos que correspondía se inoculó con 2000 J2 de *Meloidogyne incognita* cada maceta.

Los tratamientos siguientes se aplicaron inmediatamente después del trasplante.

Los tratamientos consistieron en:

- Control negativo (solo suelo estéril)
- Control Positivo (inoculado con nematodos)
- BFE en dosis de en dosis de 50 ml/planta a una concentración de 2 g/litro (1×10^8 esporas/g).
- BFE (2g/l) + Pp 97 (10^9 esporas/litro).
- Control químico, Furadan.

Las aplicaciones se realizaron inmediatamente después de trasplante, 2 horas después se inoculó cada planta, con 3000 J2 de *M. incognita*.

Las evaluaciones se realizaron 12 semanas después de la aplicación de los tratamientos, consistentes en mediciones de la población y tasa de crecimiento poblacional de *Tylenchulus semipenetrans* y determinación de nivel de nodulación en raíces, así como peso aéreo y radicular de las plantas.

4.4 Etapa IV: Ensayos en campo.

Los ensayos se establecieron en predios comerciales, donde solo se modificó el manejo de nematodos. El tamaño de los tratamientos varió según la disponibilidad de esporas de *Pasteuria*.

4.4.1 Evaluación de bacterias con capacidad nematocida en cultivos de tomate.

Hermanos Miranda Colin

Temporada 2007/2008 y 2008/2009

El ensayo en Colin, se estableció en el predio de Gustavo Miranda, ubicado frente a escuela agrícola, utilizándose 2 naves con riego tecnificado y que habían sido previamente fumigados con Metham sodio y presentaba una población de 5 J2 de *Meloidogyne*/250 gr de suelo y plantas de 3ra hoja verdadera variedad Maria Italia. Los tratamientos fueron aplicados 3 días después de trasplante siendo los detallados más abajo.

T0: Control Manejo del predio (Bromuro de metilo)

T1: BFE

T2: *Pasteuria* cepa 97 + BFE

T3: *Pasteuria* cepa 97

Las dosis de aplicación fueron de 50 ml/planta de una suspensión de 10 g/l con una concentración de 1×10^6 esporas/ml. Aplicados al cuello de la planta.

Cada 6 semanas, se extrajeron muestras de suelo, de los mismos lugares, para determinar la dinámica poblacional del nematodo. Posterior a cosecha se determinó la población final de *Meloidogyne* y otros nematodos presentes y la biomasa aérea y radicular de las plantas así como su índice de nodulación. Cada tratamiento constó de 6 repeticiones cada una compuesta por 12 plantas.

Este ensayo se realizó de la misma forma, manteniendo la misma ubicación de los tratamientos, por dos temporadas seguidas.

Este ensayo se realizó por dos temporadas seguidas en el mismo predio.

Pepino

El ensayo en Colin, se estableció en el predio de Gustavo Miranda, ubicado frente a escuela agrícola, utilizándose 2 naves con riego tecnificado y que habían sido previamente fumigados con Metham sodio y presentaba una población de 0 J2 de *Meloidogyne*/250 gr de suelo y plantas de pepino en 5ta hoja. Los tratamientos fueron aplicados 3 días después de trasplante siendo los detallados más abajo.

T0: Control Manejo del predio (Bromuro de metilo)

T1: BFE

T2: Pasteuria cepa 97 + BFE

T3: Pasteuria cepa 97

Las dosis de aplicación fueron de 50 ml/ planta de una suspensión de 10 g/l con una concentración de 1×10^6 esporas/ml. Aplicados al cuello de la planta.

A las 6 semanas, se extrajeron muestras de suelo, de los mismos lugares, para determinar la dinámica poblacional del nematodo. Posterior a cosecha se determinó la población final de *Meloidogyne* y otros nematodos presentes y la biomasa aérea y radicular de las plantas así como su índice de nodulación. Cada tratamiento consto de 6 repeticiones cada una compuesta por 12 plantas.

Predio Los arrayanes Olmue

Temporada 2007/2008

Se utilizó un invernadero frío ubicado en la localidad de Olmue, en este invernadero se contó con sectores fumigados y no fumigado con bromuro de metilo, lo que permitió tener un control absoluto y comparar la eficiencia combinada de los biocontroladores evaluados y bromuro de metilo.

Los tratamientos fueron los siguientes

T0: Control sin fumigación

T1: Manejo del predio (Bromuro de metilo)

T1: Pasteuria cepa 97 + BSP2

T2: BFE 2.3 g/l

T3: BFE 2.6 g/l

T4 Pasteuria cepa 97 + BSP1 3 g/l

Al igual que en el ensayo de Colín, en este ensayo se mantuvieron el mismo invernadero y ubicación de los tratamientos por dos temporadas seguidas

Las dosis de aplicación fueron de 50 ml/ planta aplicados al cuello con una concentración de Pasteuria de 1×10^6 esporas/ml. Y la concentración de las BFE 1×10^6 esporas/g.

Temporada 2008-2008

En esta temporada, por un error del administrador del campo, el lugar del ensayo fue fumigado con bromuro de metilo, por lo que no se contó con un control absoluto. Además, dados los resultados de la temporada anterior, se utilizó solo la dosis de 3 g/l. La ubicación de los tratamientos se ajustó a los tratamientos de la temporada anterior, manteniendo el número de repeticiones y plantas por repetición.

Quedando los tratamientos como sigue.

T1: Manejo del predio (Bromuro de metilo)

T2: Pasteuria cepa 97 + BFE

T3: BFE 6 g/l

T4 Pasteuria cepa 97

En otro cuartel del predio, se realizó una prueba a nivel comercial, que consistió en la aplicación de las BFE a dosis de 2 Kg/ha. La que fue aplicada sobre un paño previamente fumigado con bromuro, y en el

paño contiguo se mantuvo solo la aplicación de bromuro. En cada sector se evaluó la población inicial de nematodos, parámetros de vigor y cantidad de frutos por planta.

Predio La capilla Boco Quillota. temporada 2008-2009

En el ensayo de Guillermo Morkio, con apoyo de Alejandro Diomuvic, se planteo un ensayo similar al realizado en los Arrayanes.

En el sector destinado al ensayo, se dejo una mesa sin bromuración y otra bromurada, lo que determino los bloques del diseño.

En cada bloque se realizaron los siguientes tratamientos.

T1: Control

T2: Pasteuria cepa 97

T3: BFE 6 g/l

T4 Pasteuria cepa 97 + BFE

Cada tratamiento consto de 6 repeticiones, de 12 plantas cada una.

Se realizo una evaluación de las poblaciones iniciales, al momento de aplicar los tratamientos y 2 mas en 3 racimo y la de cosecha se realizara en enero.

En cada evaluación de poblaciones, se evaluó altura y numero de racimos presentes.

4.4.2 Evaluación de bacterias con capacidad nematicida en cultivos de vid.

Ensayo en vid Viña el Aromo temporada 2006-2007

Se establecieron un ensayo en vid Cv. Merlot, en Villa Alegre, propiedad de Viñedos El Aromo. Previo a la aplicación de los tratamientos, se extrajeron muestras de suelo, de plantas específicas, donde se establecerán las repeticiones y tratamientos, con el fin de determinar las poblaciones iniciales de *Meloidogyne* y *Xiphinema*. Estas poblaciones fueron aisladas y utilizadas en los test de adherencia de las cepas de Pasteuria, en base a lo cual ,se establecieron los tratamientos, La aplicación se realizo a través de collarín (1×10^6 /ml) en un volumen de 500 ml/planta.

Las cepa seleccionada fue la 329, ya que fue la única que presento un porcentaje de adhesión superior al 50%, en los test *in vitro*. Así los tratamientos quedan como sigue.

T0: Manejo del predio

T1: Cepa 329

Dada la escasez de Pasteuria, cada tratamiento consiste en 3 repeticiones de 4 plantas cada una..

En cierre de racimo, se realizo un muestreo de población y en cosecha, se realizo además de la medición de población una evaluación del desarrollo vegetativo y rendimiento.

Temporada 2007/2008

En el mismo sector del ensayo anterior se establecieron los siguientes tratamientos

T0: Control (Manejo del predio)

T1: Pasteuria cepa 213 + BFE

T2: BFE

T3: Pasteuria cepa 213



Previo a la aplicación de los tratamientos, se extrajeron muestras de suelo, realizándose un mapeo de poblaciones de *Meloidogyne* por plantas de manera de tener poblaciones del fitoparásitos similares en todas las plantas utilizadas. La aplicación se realizó a través de collarín (1×10^6 esporas/gr) en un volumen de 500 ml/planta. Dada la escasez de *Pasteuria*, cada tratamiento consiste en 4 repeticiones de 4 plantas cada una.

Las cepas utilizadas, fueron *Pasteuria* cepa 213, en base a datos *in vitro* y la cepa BSP1 de las bacterias formadora de esporas.

A las 30 semanas, se extrajeron muestras de suelo, para determinar la población y tasa de crecimiento de los nematodos y en cosecha se evaluó largo de brote, número, peso de racimos y rendimiento por planta. Este ensayo se mantuvo por las temporadas 2007/2008 y 2008/2009

La temporada 2008/2009, será evaluada en marzo por Bio Insumos Nativa Ltda. y adjuntada al boletín de divulgación.

Ensayo en vid Viña el Emiliana Temporada 2008-2009

Este ensayo se estableció en el fundo Cordillera, Casa Blanca, de viñedos Emiliana sobre un Cabernet Sauvignon bajo manejo orgánico. Siendo un ensayo demostrativos, se tomaron dos sectores de riego, cada uno de 10 ha, en uno de los cuales se aplicó una dosis de 2 Kg/ha de BFE y en el otro, sin aplicaciones. En el límite de ambos sectores de riego, se tomaron muestras de suelo, con el fin de determinar la población inicial de nematodos.

Las evaluaciones serán en Diciembre y marzo, realizadas por Bio Insumos Nativa Ltda.

Ensayo en cítricos Predio Pomarolo (AGRICOM) Pomaire

Este ensayo se estableció en limón Cv. Eureka, en Pomaire, propiedad de AGRICOM.

En este cultivo realizó un mapeo de poblaciones de *Tylenchulus semipenetrans*, seleccionándose plantas con el mismo nivel poblacional (3,200-3.600 J2/ 250 g de suelo), luego de lo cual se realizaron los siguientes tratamientos.

- Control (manejo del huerto)
- *Pasteuria* cepa 220 en dosis de 300 ml/planta a una concentración de 1×10^6 esporas/ml
- Cepas BSP2 300 en dosis de 300 ml/planta a una concentración de 1 g/litro a una concentración de 1×10^6 esporas/gr
- Mezcla de BSP2 y *Pasteuria* cepa 220 en dosis de 150 ml/planta de cada una a una concentración de 1 g/litro a una concentración de 1×10^6 esporas/gr

La temporada 2008/2009 será evaluada en diciembre por Bio Insumos Nativa Ltda.

4.5 Etapa V: Desarrollo sistema de producción y transferencia

4.5.1 Sistema de producción de cepas nativas de *Pasteuria*.

Estos ensayos se realizarán dentro de una cámara de crianza con control de temperatura, humedad y luz, con el fin de estandarizar las condiciones del ensayo.

Ensayo I

Los métodos evaluados inicialmente para la reproducción fueron

1.- Inoculación con suelo original: consistente en tomar muestras del suelo, donde se aisló *Pasteuria* y el que fue agregado a una mezcla estéril de arena, perlita y compost 2:1:1, a este cual se transplantaron plantas de tomate, cítricos o vides, de acuerdo a la especie de nematodo y cultivo presente en la zona de origen de la muestra.

2.- En suelo estéril: en este métodos, se tomo un sustrato previamente esterilizado de arena, perlita y compost 2:1:1, al cual se agregaron nematodos infectados in vitro, en una cantidad de 2000 J2/200 gr de suelo para *Meloidogyne* y 5000 para *Tylenchulus*., con un promedio de 3,7 esporas/nematodo.

3.- Suelo original. En este método se tomo el suelo original y se transplantaron plantas en forma directa.

Las plantas se mantuvieron bajo un régimen de 16 horas de luz x 8 de oscuridad, en un rango de temperatura diurna de 20-28° y 18-25° noche. El riego fue mantenido al menor nivel posible, de manera de favorecer el desarrollo de los nematodos y no producir arrastre.

Adicionalmente en cada método, se cautivaron plantas de berenjena, zanahoria y albaca.

Las evaluaciones para *Meloidogyne* consistieron en poblaciones finales de nematodos, número de hembras por peso de raíz, porcentaje de hembras infectadas y número de esporas/hembra.

En el caso de *Tylenchulus*, no se detectaron hembras infectadas, por lo que se determino número de nematodos infectados.

Ensayo II: Producción en sustrato:

Se evaluaron los siguientes sustratos, para producir las plantas de tomate inoculadas con *Meloidogyne* spp., hospederos de nematodos, en un sistema con fertirrigación. Así los tratamientos fueron:

T1: Suelo del lugar.

T2: Mezcla de perlita, turba y arena (1:1:1)

T3: Mezcla de vermiculita, arena y turba (1:1:1).

T4: Mezcla de compost, arena y perlita (1:1:1)

Todos los sustratos fueron esterilizados (autoclave 121° C por 30 minutos), luego de lo cual se llenaron bolsa de 2 litros para tomate y 8 para vid y limón, a los que se transplantaron las especies correspondientes después de 30 días se realizó la inoculación con los nematodos infectados con un promedio de 2 esporas por nematodo. Estas macetas fueron ubicadas en la cámara de cultivo de plantas, por cultivo.

Ensayo III: Producción en bandeja flotante:

Este ensayo consistirá en realizar la producción de las plantas, en un sistema hidropónico de mesa flotante, donde se evaluarán dos soluciones nutritivas, Wye y FAO.

Después de 30 días de crecimiento de raíces, se realizara la inoculación con los nematodos respectivos, por cultivo. 30 días después de inoculación con nematodos, se realizara la inoculación con las cepas de Pp. seleccionadas en los ensayos anteriores

A los 30, 60, 120 y 180 días o hasta la muerte de las plantas, se extraerán raíces completas, las que serán sometidas al proceso de extracción de *Pasteuria* ya mencionado, evaluándose la población de esta bacteria y su actividad, a través de la metodología del ensayo I. Esto constara de 10 repeticiones por tratamiento y por fecha, en aun arreglo completamente al azar con medias repetidas en el tiempo. Esto se repetirá por dos temporadas

4.5.2. Sistema de producción de cepas de BFE, cultivadas *in vitro*.

Ensayo I medios

En este ensayo se evaluaron los siguientes medios:

- . Caldo nutriente.
- . Gys
- . Lb

Se inocularon matraces de con 100 ml de medio de cultivo, desde placas Petri con cultivos puros de cada bacteria, luego estos matraces fueron puestos en incubación bajo agitación constante por 72 horas, después de lo cual se determino el porcentaje de esporulación y población por ml.

Una vez que los cultivos alcanzaban un 80% de esporulación, fueron secados en zeolita a 30° C en agitación constante, luego de 24 horas, 1 gr de cada cepa secada, fue suspendido en 100 ml de agua destilada estéril y esto sometido a dilución 1:1000, de esta dilución, 0,5 ml fue sembrada en placas con agar nutriente, las que se incubaron a 25° por 48 horas, luego de lo cual se determino las UFC por placa, permitiendo así determinar la concentración en el formulado secado

Ensayo II temperatura de cultivo

Una vez determinado el medio de cultivo con mayor producción, se evaluó las siguientes temperaturas de producción:

- . 20°
- . 25°
- . 30 °

La inoculación y medición de poblaciones en medio de cultivo y luego de formulado, se realizo en la misma forma ya descrita, para el ensayo de medios.

Ensayo III pH de cultivo

Una vez determinado el medio de cultivo con mayor producción, se evaluaron los siguientes pH de medio iniciales.

- . 6
- . 6,5
- . 7
- . 7,5

La inoculación y medición de tiempo de esporulación al 80% se realizo igual que en los ensayos anteriores.

Evaluación de sustratos inertes y forma de secado para almacenaje y formulación

Desde un cultivo con 80% de esporulación, se tomaron 20 ml con una concentración de 10^9 esporas/ml, los que fueron asperjados sobre 100 g de cada uno de los acarreadores (zeolita, Caolín, Talco y Sílice), previamente esterilizados (180° por 2 horas) y puesto en agitación bajo cámara de flujo laminar. Luego de lo cual se almacenaron por 7 días. Después del periodo de almacenaje, se tomo 1 g de cada sustrato, el que fue diluido (1:1000) en agua destilada estéril desde la cual se extrajeron 500 μ l, los que fueron sembrados en placas Petri con agar nutriente, y puestas a incubación por 48 horas, luego de lo cual se determino la concentración de unidades formadoras de colonia por gr.

Cada uno de los medios cultivados, fueron sometidos a 3 métodos de estimulación de esporulación, cultivo de 7 días, dilución del medio de cultivo con agua destilada estéril (50%) y golpe térmico (60° C). Cada uno de los tratamientos fue adicionalmente sometido a tres formas de secado, estufa a 45° C, secada a temperatura ambiental (aire) y en betonera.

Ensayo de almacenaje

Desde un cultivo con 80% de esporulación, se tomaron 20 ml con una concentración de 10^9 esporas/ml, los que fueron asperjados sobre 100 g de zeolita, previamente esterilizada (180° por 2 horas) y puesto en agitación bajo cámara de flujo laminar. Luego de lo cual se almacenaron por 7 días. Cada 30 días, se tomaron 1 g de cada sustrato, el que fue diluido (1:1000) en agua destilada estéril desde la cual se extrajeron 500 μ l, los que fueron sembrados en placas Petri con agar nutriente, y puestas a incubación por 48 horas, luego de lo cual se determino la concentración de unidades formadoras de colonia por gr.

Se evaluaron las siguientes condiciones de almacenaje.

T1 Temperatura ambiente y condición natural de luz.

T2 Temperatura ambiente y oscuridad.

T3 Refrigeración a 4° C.

4.5.3 Transferencia Sistema de Producción.

La transferencia del sistema de producción, se ha realizado en varias etapas, siendo la primera la firma de un convenio entre la Universidad de Talca y Bio Insumos Nativa Ltda. por medio del cual, se establecen las condiciones para que la empresa pueda producir y comercializar las cepas de *Pasteuria* y *BFE* y además recibir la tecnología de producción, además de establecer los mecanismos de control de calidad tanto del producto como de las recomendaciones de uso.

En una segunda fase, se entregaron copias de las cepas a Bio Insumos Nativa Ltda. de manera de duplicar el material almacenado y entrenar al personal de la empresa en la reproducción de las cepas y en su identificación.

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

Así en estos momentos la empresa esta integrando los parámetros de producción óptimos, mencionados anteriormente, para aplicarlo a una escala industrial, a través del uso de un biodigestor de 100 litros, el que esta siendo acondicionado para su producción.



Dado que los volúmenes de producción son bajo, mientras el biodigestor no este en plena producción, lo que se ha producido de Pasteuria y BFE se esta utilizando para realizar demostraciones con agricultores claves, en los rubros de carozos y tomates.

Además la empresa ha iniciado los procesos de inscripción de marca y la recopilación de antecedentes para la obtención del registro SAG.



5 Actividades del Proyecto:

Descripción	Fecha Programada	Fecha real	Observaciones
Recolección y aislación de cepas <i>Pp</i>	Abr/05	May/07	Pese a que se obtuvieron cepas en la fecha estipulada, se continuo la colecta hasta Mayo de 2007
Recolección y mantención nematodos	Abr/05	May/07	Lo mismo que en la actividad anterior.
Visita Asesor Ingles	Abr/05	Abr/05	
Reproducción de las cepas de <i>Pp</i>	Jun/05	May/07	Pese a que se reprodujo una cepa en la fecha estipulada, recién en mayo de 2007, se pudieron reproducir en cantidades suficientes para establecer ensayos en campo.
Ensayo laboratorio I (Cepas)	Sep/05	Mar/06	Se atraso por problemas en reproducción de cepas.
Ensayo II (EC50)	Ene/06	Mar/06	Se atraso por problemas en reproducción de cepas.
Ensayo VI (Producción en sustrato)	Dic/06	ago/06	
Ensayo VII (Producción en bandeja flotante)	Dic/06	Sep/08	El primer ensayo se realizo en la fecha correspondiente, pero en 2008 se volvió a repetir por disponibilidad de nueva metodología.
Ensayo VIII: Almacenamiento de <i>Pasteuria</i> , de cultivo <i>in vivo</i> .	Dic/06	Oct/08	Se uso el máximo tiempo posible.
Presentación congreso científico	Oct/05	Nov/05	Participación en ONTA
Día de campo	Dic/05	Abr/05	Charla con visita de asesor ingles. Presentación en II Seminario "Insumos para la Agricultura Orgánica" y III Seminario "Insumos para la Agricultura Orgánica"
Ensayo III (Dosis y momento de aplicación) Ensayo IV (Forma de dispersión) Ensayo V (Persistencia)	May/06	Ene/06	Se modificaron por falta de Pasteu ensayos en combinación con BFE
Ensayo en tomate temporada 1	Dic/06	Jul/06	Se adelanto para recuperar tiempo
Ensayo en vid temporada 1	Abr/07	Sep/06	Se adelanto para recuperar tiempo
Ensayo en cítricos temporada 1	Mar/07	Oct/06	Se adelanto para recuperar tiempo
Finalización de ensayos temporada 1 de tomate, cítricos y vid	Mar/07	Mar/07	
Día de campo tomate	Oct/06	Nov/06	Reunión con asesores y productores de tomate de Quillota Reunión asesores tomate en Colin y Maule
Día de campo vid	Dic/06	Nov/06	Reunión equipo técnico de Agricom



Presentación congreso científico	Oct/06	Abril/06	Lanzamiento del "Catalogo de Insumos para el Control de Plagas y Enfermedades en la Agricultura Orgánica, en Chile" ejecutado por CCO
Ensayo en tomate 2	Dic/07	Jul/07	
Ensayo en vid temporada 2	Abr/08	Sep/07	
Ensayo en cítricos temporada 2	Mar/08	Oct/07	
Finalización de ensayos temporada 2 de tomate, cítricos y vid		Mar/08	
Ensayo IX: Desarrollo sistema de producción	May/08	Sep/08	
Día de campo cítricos	Mar/07	May/07	Reunión asesores y productores de cítricos
Día de campo Tomate	Oct/07	Dic/07	Reunión asesores de tomate en Colin y Quillota
Presentación congreso científico	Oct/07	Dic/07	XVII Congreso Sochifit Concepción
Día de campo Vid	Dic/07	Jul/08	Reunión equipo técnico y asesores de viña el Aromo
Ensayos de toxicidad	Abr/08	Oct/08	Se espero a tener la identificación de las cepas.
Identificación de cepas	Abr/08	Oct/08	Realizado con cepas de BFE seleccionadas
Puesta en marcha de sistema de producción industrial	Sep/08	Ene/08	Se modifico por descubrimiento de BFE; que permitió un sistema de producción mas simle y eficiente.
Día de campo cítricos	Mar/08	May/08	Reunión asesores y productores de cítricos
Día de campo finalización	Jul/08	Oct/08	
Publicación en revista	Ago/08		Se esperara hasta estudio de patentabilidad
Elaboración e impresión boletín divulgativo	Nov/08	Ene/09	Se esperara a tener los resultados de la 2ª temporada.
Elaboración informe final	Nov/08	Sep/08	

6 Resultados del Proyecto:

6.1 Etapa I. Prospección

6.1.1 Recolección de cepas nativas de *Pasteuria* (Pp)

Como se presenta en la tabla 1, hasta el momento existen en colección 21 cepas aisladas de Pp., pero solo se han podido reproducir 3 cepas en forma controlada, se ha continuado la recolección de cepas y el desarrollo de mejoras en la reproducción de estas.

Cuadro 1. Listado de cepas de *Pasteuria* sp. obtenidos desde distintos cultivos en la zona central de Chile.

	Código	Localidad	Planta	Nematodo
1	57	Panguilemo	<i>Lycopersicum esculentum</i>	<i>Meloidogyne</i>
2	63	Altos de Lircay	<i>Chusquea culeu</i>	<i>Scutellonema</i>
3	65 a	Altos de Lircay	<i>Nothofagus dombeyi</i>	Saprophyto
4	65 b	Altos de Lircay	<i>Nothofagus dombeyi</i>	Saprophyto
5	69	Altos de Lircay	<i>Drymis winteri</i>	<i>Scutellonema</i>
6	97	Colin	<i>Lycopersicum esculentum</i>	<i>Meloidogyne arenaria</i>
7	104	Colin	<i>Lycopersicum esculentum</i>	<i>Meloidogyne arenaria</i>
8	139	El Belloto	<i>Cipres</i>	Saprophyto
9	213	Chacarillas	<i>Lycopersicum esculentum</i>	<i>Meloidogyne javanica</i>
10	220	Panguilemo	<i>Lycopersicum esculentum</i>	<i>Meloidogyne</i> sp
11	247	Teno	<i>Citrus sinensis</i>	<i>Tylenchulus semipenetrans</i>
12	249	Ovalle	<i>Capsicum annun</i>	<i>Meloidogyne</i>
13	254 ^a	Chacarillas	<i>Lycopersicum esculentum</i>	<i>Meloidogyne javanica</i>
14	254 ^b	Chacarillas	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Saprophyto
15	282	Quilicura	<i>Carica papaya</i>	Saprophyto
16	210	Chanco	<i>Anemophila arenaria</i>	Solo espora
17	325	Pencahue	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Meloidogyne</i>
18	329	Panguilemo	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Meloidogyne arenaria</i>
19	350	Chacarillas	<i>Lycopersicum esculentum</i>	<i>Meloidogyne incognita</i>
20	354	Olmue	<i>Lycopersicum esculentum</i>	<i>Meloidogyne</i> sp
21	372	San Javier	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Meloidogyne</i> sp

6.1.2.- Asesoría especialista extranjero

La visita de Keith Davies, permitió confirmar la presencia de *Pasteuria* en el país, capacitando al personal del proyecto, tanto en aislamiento, identificación y reproducción de las cepas.

Por otra parte durante su estadía se realizó una actividad de difusión, con la participación de estamentos académicos, de gobierno y productores de alto nivel, para difundir el conocimiento existente a nivel mundial sobre este biocontrolador.

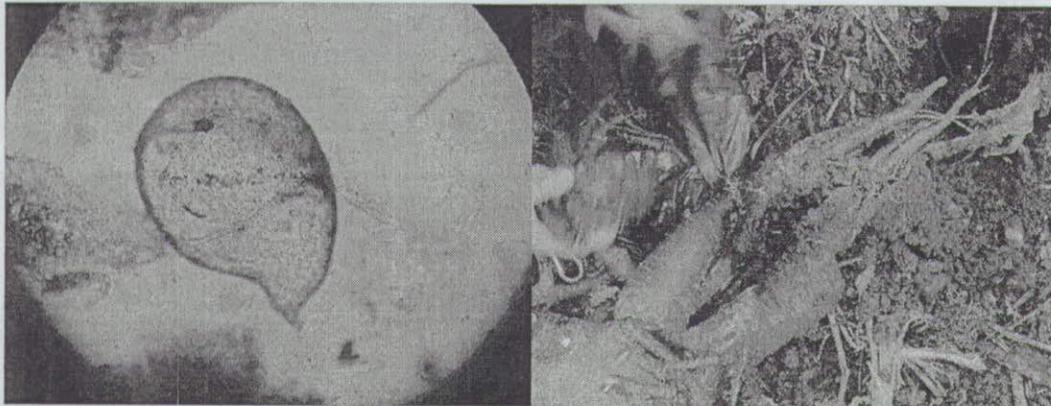


Figura 1 Hembra de *Meloidogyne* sp. obtenida de plantas de Papayo, de la zona de Ovalle (Izq.), observándose también el daño provocado en el cultivo (Der.).

6.1.3- Recolección y mantención de nematodos fitoparásitos

Las tres especies de nematodos fitoparásitos en estudio, han sido recolectadas y cultivadas, pero dada la falta de la cámara de cultivo y la rudeza del pasado invierno, nos vimos limitados en la cantidad de plantas destinadas a la crianza de estos fitoparásitos, pese a lo cual se cuentan con 7 aislados de *Meloidogyne*, 3 de *Tylenchulus* y 3 de *Xiphinema*.

6.1.4 Aislación de bacterias formadoras de esporas con actividad nematocida

En base a información disponible, se evaluó producir *Pasteuria* en un sistema *in vitro*, para lo que se tomaron nematodos infectados con la bacteria, a los que se les corto tanto la cabeza como la cola, luego de lo cuales, fueron lavados profusamente con agua destilada estéril y posteriormente colocaron en matraces con agar nutriente en agitación a 25° C por 144 horas, luego de lo cual se observó la presencia de bacterias formadoras de endosporas. Una vez ocurrido esto los medios fueron colocados a 60° C por 10 minutos, con el fin de solo permitir la reproducción de bacterias formadoras de endospora, entre las cuales estaría *Pasteuria* spp. Este cultivo de bacterias fue secado en zeolita, dando una concentración de 1×10^8 esporas/gr.

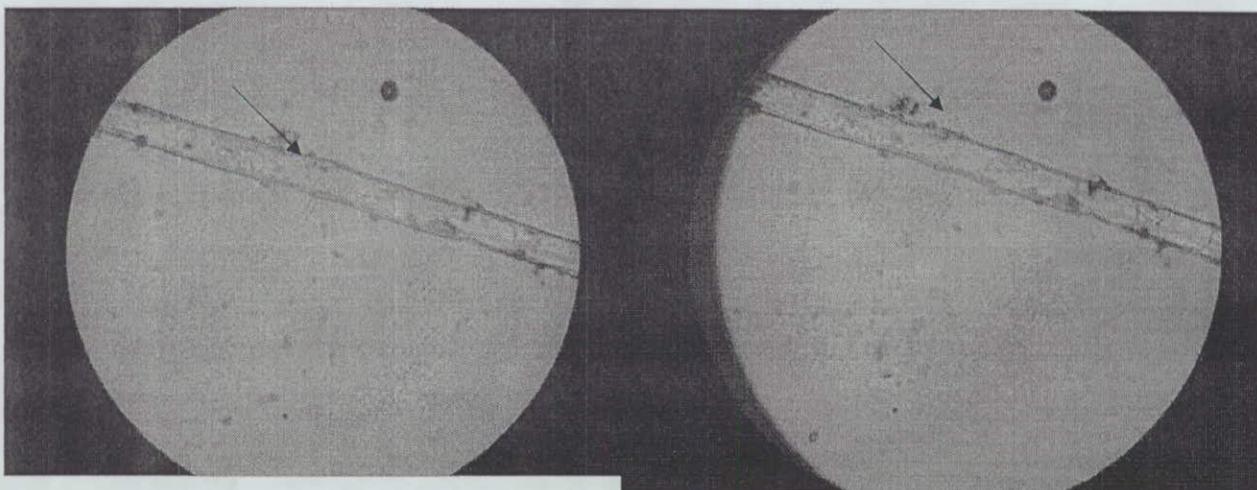


Figura.2 Micrografía de bacterias formadoras de endosporas adheridas a J2 de *Meloidogyne incognita*.

6.1.5 Identificación de cepas de bacterias formadoras de endosporas (BFE) con actividad nematocida.

Los resultados de la secuenciación y comparación de estas con los datos presentes en Genbank nos indica que todas las cepas de BFE, forman parte de la clase Firmicutes, abarcando los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus*

Cuadro 2 Identificación de BFE, realizada por secuenciamiento de fragmento 16s y reconstrucción filogenética

Cepa	Coincidencia Gen Bank	Porcentaje de similitud	Identificación similitud + filogenia + test bioquímicos
2 Ps31	<i>Bacillus sp</i> <i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus anthracis</i> <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	98%	<i>Bacillus cereus</i>
2Ps11	<i>Bacillus sp</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus anthracis</i>	90% 89% 87%	<i>Bacillus cereus</i>
39	<i>Bacillus halodurans</i> <i>Brevibacillus parabrevis</i> <i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i>	89% 89% 88% 88%	<i>Brevibacillus parabrevis</i>
6Conti 3K	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus thuringiensis serovar israelensis</i>	99% 99%	<i>Bacillus cereus</i>
6 Conti 21	<i>Bacillus cereus</i>	100%	<i>Bacillus cereus</i>
5 Ps	<i>Bacillus simplex</i> <i>Bacillus weihenstephanensis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus anthracis</i>	82% 82% 82% 80%	<i>Bacillus simplex</i>

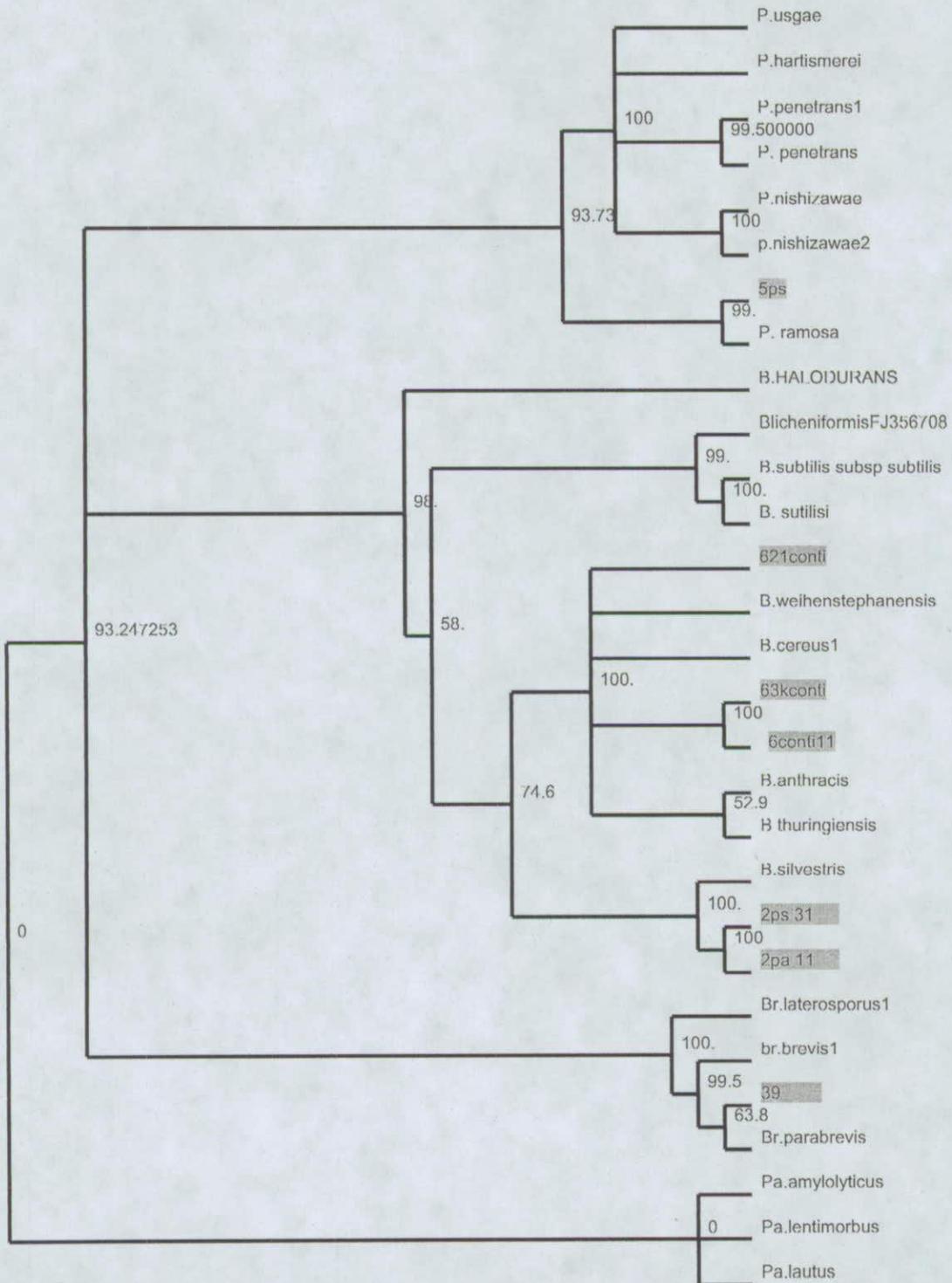


Figura 3. Reconstrucción filogenética de cepas de BFE. Valores indican significancia de bootstrap (Valores mayores a 70 son significativos)

6.2 Etapa II: Evaluación *in vitro*

6.2.1 Evaluación *in vitro* de capacidad de adherencia de cepas de *Pasteuria* sobre nematodos fitoparásitos.

Este en el caso del genero *Meloidogyne*, las cepas con mayor amplitud de rango fueron 213 y 97 (8 de 10 poblaciones). Siendo la cepas 213 la mas eficiente en *M. arenaria* y *M. javanica* y la 97 en *M. incognita*, lo que es coincidente con la especie desde la cual fueron extraídas las cepas de Pp. Pese a esto todas las cepas mostraron falta total de capacidad de adhesión en a lo menos una población de *Meloidogyne*, lo que nos indica la amplitud de rangos de especificidad que existe entre cepas de *Pasteuria*.

Cuadro 3 Porcentaje de nematodos infectados y esporas promedio/nematodos, de distintas poblaciones de *Meloidogyne* spp., con 3 cepas de *Pasteuria penetrans*.

Cepas		213	354	220	97	329
<i>M. javanica</i> Tomate	Inf%	45,8 a	0 c	0 c	4,2 b	0,0 c
	E/n	12,0 a	0 c	0 c	7,5 b	0,0 c
<i>M. javanica</i> vid	Inf%	29,5 a	0 c	10,5 b	0,0 c	10,3 b
	E/n	3,0 a	0 c	1,4 b	0,0 c	1,7 b
<i>M. arenaria</i> Pimentón	Inf%	85,4 a	0 c	0 c	24,5 b	33,3 b
	E/n	4,0 b	0 c	0 c	13,1 a	1,0 c
<i>M. arenaria</i> Papa	Inf%	75,1 a	25,8 b	0 c	25,8 b	0 c
	E/n	4,0 a	2 b	0 c	2,0 b	0 c
<i>M. incognita</i> Tomate	Inf%	54,3 b	89,5a	4,2 c	88,3 a	5,0 c
	E/n	1,8 a	15,4 a	1 b	1,2 b	1,1 b
<i>M. incognita</i> Tomate	Inf%	54,4 b	24,5 bc	5 c	89,5 a	4,2 c
	E/n	2,0 bc	1,2 bc	1,1 c	15,4 a	1,0 c
M. sp Vid	Inf%	0,0 c	7,46 b	35,5 a	7,5 b	35,5 a
	E/n	0,0 c	2,2	1,7	2,2	1,7
M. sp Vid	Inf%	4,0 c	0 d	0 d	62,8 b	93,3 a
	E/n	1,5 b	0 c	0 c	1,4b	5,9 a
M. sp Lechuga	Inf%	25,0 a	24,2 a	0 b	24,2 a	0,0 d
	E/n	3,0a	2,1 a	0 b	2,1a	0,0 c
M. sp tomate	Inf%	85,4 a	4,17 c	0 d	0 c	67,0 b
	E/n	12 ab	7,5 b	0 c	0 c	25,0 a

Para el caso de *Pratylenchus*, que pese a no estar en los objetivos del proyecto, se realizaron ensayos de especificidad, observándose que las 5 cepas, presentaban capacidad de adhesión a por lo menos una población de *Pratylenchus* spp. siendo las cepas 213, 354 y 97, las con mayor porcentaje de infección.

Cuadro 4. Porcentaje de nematodos infectados y esporas promedio/nematodos, de distintas poblaciones de *Pratylenchus* spp., con 3 cepas de *Pasteuria penetrans*.

Cepas		213	354	220	97	329
Tomate	Inf%	25,4 a	24,53 a	0 b	24,5 b	0,0 b
	E/n	2 b	12 a	0 c	12,0 a	0,0 c
Pepino	Inf%	26,4 a	0 c	4,17 b	0,0 c	4,17 b
	E/n	2 a	0 b	1,2 a	0,0 b	1,2 a
Pimentón	Inf%	0 b	74,67 a	0 b	74,7 a	0,0 b
	E/n	0 b	12,4 a	0 b	15,4 a	0,0 b
Lechuga	Inf%	78,4 a	0 b	0 b	0 b	0 b
	E/n	5 a	0 b	0 b	0 b	0 b
Papa	Inf%	24,5 a	0 b	0 b	0 b	0 b
	E/n	2,0 a	0 b	0 b	0 b	0 b

Cuadro 5. Porcentaje de nematodos infectados y esporas promedio/nematodos, de distintas poblaciones de *Tylenchulus* spp., con 3 cepas de *Pasteuria penetrans*.

En el nematodo de los cítricos, solo la cepa 220, aislada desde *Tylenchulus*, presenta capacidad de adhesión sobre este nematodo, con niveles bajos de infección y de esporas por nematodos, incluso no siendo capaz de adherirse a todas las poblaciones.

Cepas		213	354	220	97	329
Naranja Teno	Inf%	0 b	0 b	26,4 a	0 b	0 b
	E/n	0 b	0 b	3 a	0 b	0 b
Limón Quillota	Inf%	0 b	0 b	35,4 a	0 b	0 b
	E/n	0 b	0 b	4 a	0 b	0 b
Limón Pomairé	Inf%	0	0	0	0	0
	E/n	0	0	0	0	0

En el caso de *Xiphinema*, ninguna de las cepas de *Pasteuria* fue capaz de adherirse a ninguna de las 6 poblaciones del fitoparásito, lo que es concordante con lo reportado por otros investigadores.

6.2.2 Aislación y evaluación de bacterias formadoras de esporas con actividad nematocida

Se obtuvieron 7 aislados de bacterias desde nematodos infectados con *Pasteuria penetrans*, de las cuales la cepa BSP1 fue la que mostró una mayor acción, ya que a cualquiera de las dosis provocó una mortalidad del 100% de *Meloidogyne*, las otras cepas que mostraron una actividad interesante fueron las BSP2 y BSP4, que a dosis de 1,5 y 3 g/litro, lograron mortalidades estadísticamente similares a la obtenida por BSP1. En cuanto a *Tylenchulus*, se observa que a diferencia de *Meloidogyne* la única cepa con actividad fue la BSP2, lo que indica un nivel de especificidad de estas bacterias.

Al observar las micrográficas de nematodos sometidos a la presencia de estas bacterias, podemos ver que presentan lo que parece esporas bacterianas adheridas a su epidermis, aunque presentan similitudes

morfológicas con esporas de *Pasteuria*, estas esporas son de mayor tamaño y se ha reportado que algunas cepas de *Brevibacillus lentimorbus*, son capaces de matar nematodos y formar endosporas con capacidad de adhesión sobre los nematodos.

Grafico 1 Evaluación *in vitro* de 5 concertaciones bacterias formadoras de endosporas, sobre *Meloidogyne incognita*

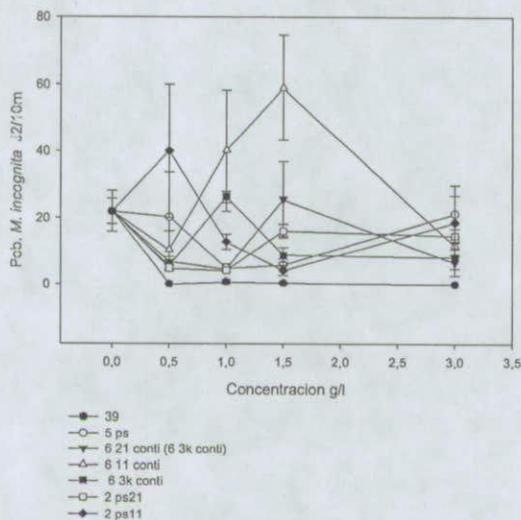


Grafico 2 Evaluación *in vitro* de 5 concertaciones bacterias formadoras de endosporas, sobre *Tylenchulus semipenetrens*

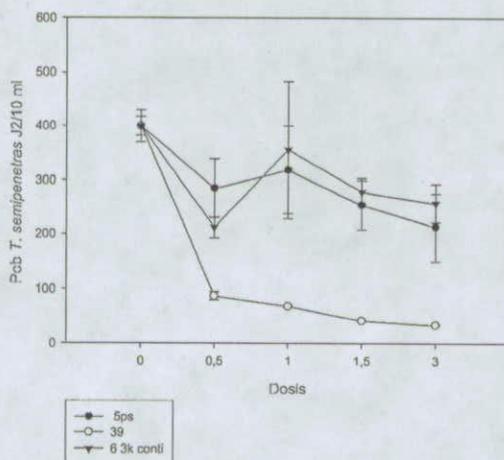
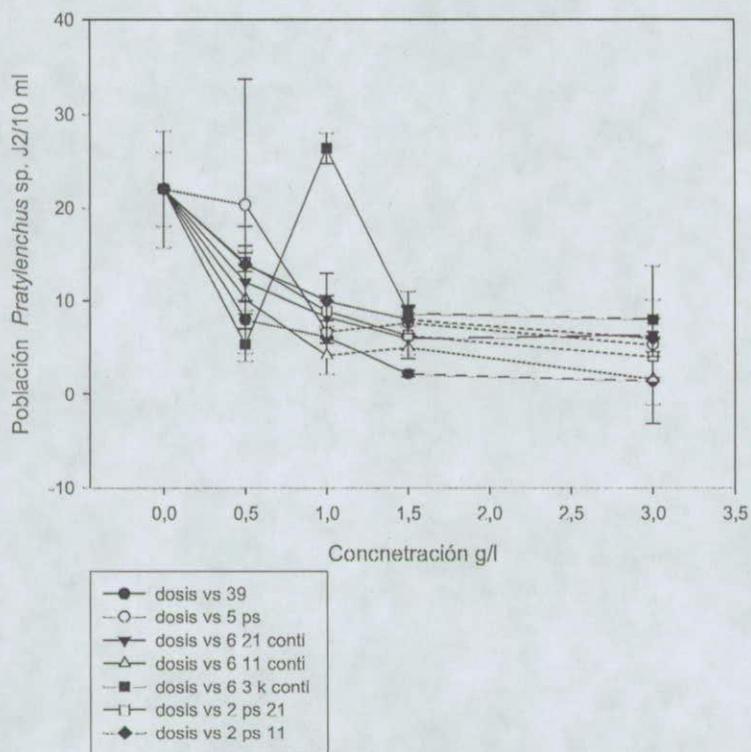


Grafico 3 Evaluación *in vitro* de 5 concertaciones bacterias formadoras de endosporas, sobre *Pratylenchus* sp.



6.2.6 Evaluación de compatibilidad de con agroquímicos

Las BFE, mostraron una alta compatibilidad con los nematicidas, normalmente usados en agricultura, por lo que se podrían realizar aplicaciones combinadas. Pero los productos dirigidos al control de bacterias como oxido cuproso y antibióticos, presentan niveles de inhibición superior al 70%, por lo que no deberían realizarse aplicaciones conjuntas. Estos productos no son usados para el control de nematodos y no se usan aplicaciones al suelo o por riego con estos agentes de control, por lo que no habrían dificultades en la implementación de un programa de manejo, basado en BFE. .

Cuadro 8. Porcentaje de nematodos infectados y esporas promedio/nematodos, de distintas poblaciones de *Tylenchulus semipenetrans* . inoculadas en suelos naturalmente infectados por *Pasteuria penetrans*.

cepa	Pob. Pomaire	Pob. Teno	Pob. Boco
220	3 %c	52,3%a	32,4%b

6.3.2 Evaluación de capacidad nematocida de cepas de *Pasteuria* sp. sobre poblaciones de *Meloidogyne* y *Tylenchulus semipenetrans*. En plantas de tomate, vid y limón en condiciones controladas.

Ambas cepas 97 y 213, lograron una disminución significativa de la población de nematodos con la concentración de 10^6 UFC/ml sobre las poblaciones de *Meloidogyne* en cultivos de tomate y un resultado similar se obtuvo en el ensayo sobre el mismo nematodo en plantas de vid, con la cepas 213. Por su parte la cepas 329 solo mostró una disminución significativa en la población de *Tylenchulus* en la concentración de 10^8 UFC/ml. Siendo estos niveles de control inferiores al obtenido por el nematocida químico, pero superiores al control positivo.

En cuanto a desarrollo de las plantas no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, pero si con el control negativo. La cantidad de hembras infectadas entre los distintos tratamientos con *Pasteuria*, no mostró diferencias significativas, no superando el 5% y en el caso de la cepa 213 con la menor concentración no se detectó ninguna hembra infectada. Pese a lo anterior si existieron diferencias significativas en la cantidad de J2 infectadas, observándose que las mayores concentraciones tienden a presentar un mayor porcentaje de J2 infectados,

En vid se observó el mismo patrón, siendo el tratamiento con la mayor concentración el que logró resultados similares a los obtenidos por el control químico, siendo además el único tratamiento donde se detectaron hembras infectadas.

Cuadro 9. Población final, porcentaje de nematodos y hembras infectados de *Meloidogyne incognita*., y parámetros de vigor, de plantas de tomate, tratadas con *Pasteuria penetrans*.

Tratamiento	Pob. final	Índice nodulación	Peso aéreo	Peso raíz	Porcentaje de J2 infectados	Porcentaje de hembras infectadas
Testigo negativo	0 e	0 c	5,9 a	4,7 a	0	0
Testigo Positivo	187 a	4,8 a	3,3 b	2,4 b	0	0
Pp 97 10^6	114 b	2,3 b	3,9 b	2,9 b	14,0 ab	2,0
Pp 97 10^7	97 b	2,1 b	4,2 b	3,6 b	23,3 ab	2,3
Pp 97 10^8	86 bc	1,7 b	4,1 b	3,4 b	35,6 ab	4,6
Pp 213 10^6	118 b	1,8 b	3,6 b	3,5 b	16,1 b	0
Pp 213 10^7	87 bc	1,5 b	4,4 b	3,1 b	21,3 ab	3,5
Pp 213 10^8	76 c	1,4 b	4,7 ab	3,8 b	37,2 a	3,8
Furadan	46 d	1,1 b	4,5 ab	3,5 b	0	0

Cuadro 10. Población final, porcentaje de nematodos y hembras infectados de *Meloidogyne arenaria*., y parámetros de vigor, de plantas de vid, tratadas con *Pasteuria penetrans*.

Tratamiento	Pob. final	Índice nodulación	Peso aéreo	Peso raíz	Porcentaje de J2 infectados	Porcentaje de hembras infectadas
Testigo negativo	0 e	0 c	25,3 a	9,7 a	0 b	0 b
Testigo Positivo	192 a	3,2 a	19,3 b	5,3 b	0 b	0 b
Pp 213 10 ⁶	108 b	1,1 b	13,6 b	6,5 b	12,1 b	0 b
Pp 213 10 ⁷	77 bc	1,2 b	24,4 ab	6,4 b	19,3 a	0b
Pp 213 10 ⁸	66 cd	1,1 b	27,2 ab	7,8 b	27,2 a	2,2 a
Furadan	56 d	0,9 b	24,5 ab	7,7 b	0 b	0 b

En el ensayo de *Tylenchulus*, todas las concentraciones lograron una disminución significativa respecto al control positivo, pero menos efectivo que el control químico, y con un efecto similar a este en cuanto a altura de plantas. Es destacable, que en no hubo diferencias en el porcentaje de nematodos infectados por Pp, independiente de las concentraciones.

Cuadro 11. Población final, porcentaje de nematodos y hembras infectados de *Tylenchulus semipenetrans*., y parámetros de vigor, de plantas de vid, tratadas con *Pasteuria penetrans*.

Tratamiento	Pob. final	Altura	Porcentaje de J2 infectados
Testigo negativo	0 e	35,3 a	0 b
Testigo Positivo	492 a	29,3 b	0 b
Pp 329 10 ⁶	201 b	33,8 b	12,3 a
Pp 329 10 ⁷	178 bc	34,4 ab	11,3 a
Pp 329 10 ⁸	166 c	37,2 ab	17,2 a
Furadan	96 d	34,4 ab	0 b

4.3 Ensayos *in vivo* de control de *Meloidogyne* spp y *Tylenchulus semipenetrans* por bacterias con actividad nematocida, bajo condiciones controladas.

Tanto la mezcla de BFE, como la cepa 97 de *Pasteuria* y la mezcla de esta con la 213, lograron disminuir en forma significativa el tamaño y tasa de crecimiento población de *Meloidogyne*, como se aprecia en las figuras 5.3 y 5.4 es ineficiente en el control de esta especie de nematodo. La disminución de actividad de la peca 97 en mezcla con 213, debe ser atribuida a que la primera cepa solo se encontró a mitad de concentración. Por su parte la cepa 97, mostró un nivel poblacional estadísticamente similar al control negativo, sin inoculación de nematodos, y elimino por completo la formación de nódulos (figura 5.5 y tabla 1).

En cuanto a impacto sobre el desarrollo de las plantas, ninguno de los tratamientos logro diferenciarse del tratamiento control positivo, excepto el control negativo, que presento los valore más altos en biomasa.

Grafico 4 Efecto de bacterias nematocidas, sobre la población de *Meloidogyne incognita*, en plantas de tomate cultivadas en maceta, bajo condiciones controladas.

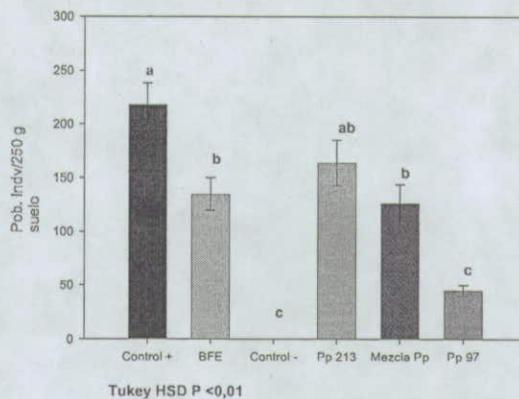


Grafico 5 Efecto de bacterias nematocidas, sobre la tasa de crecimiento poblacional de *Meloidogyne incognita*, en plantas de tomate cultivadas en maceta, bajo condiciones controladas.

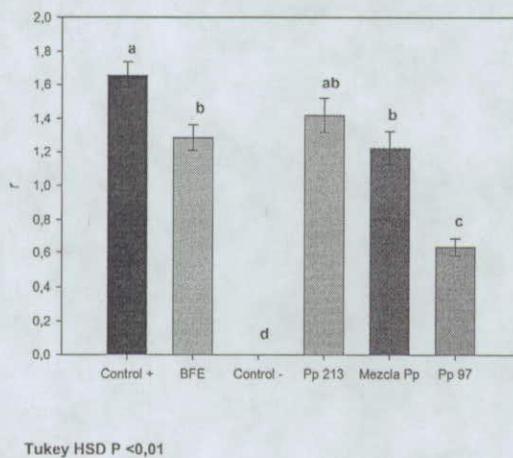


Grafico 6 Efecto de bacterias nematicidas, sobre cantidad de nódulos producidos por *Meloidogyne incognita*, en plantas de tomate cultivadas en maceta, bajo condiciones controladas.

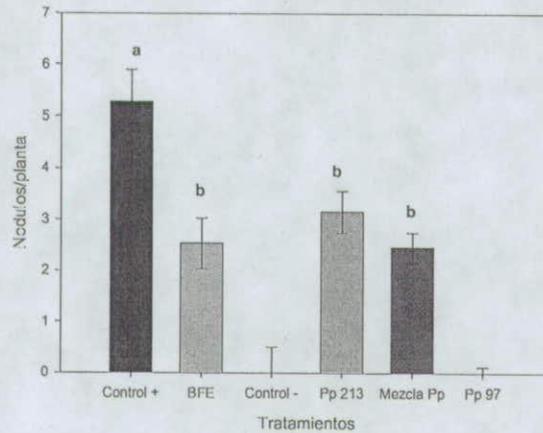
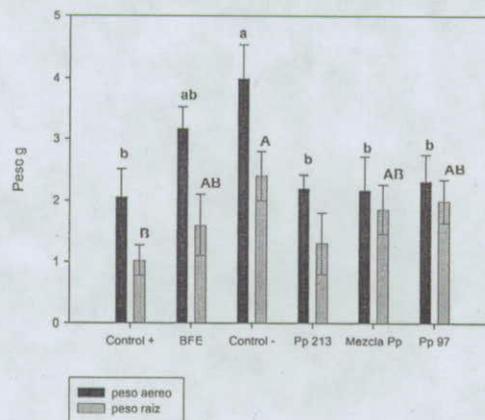


Grafico 7 Efecto de bacterias nematicidas, sobre el peso aéreo y radicular de plantas de tomate cultivadas en maceta, bajo condiciones controladas inoculadas con *Meloidogyne incognita*.



Tukey HSD P <0,01

Cuadro 12 Efecto de bacterias nematicidas, sobre el índice de nodulación en plantas de tomate cultivadas en maceta, bajo condiciones controladas inoculadas con *Meloidogyne incognita*.

Control +	5,000	a
Control -	0,000	c
Pp 213	3,150	ab
Mezcla Pp	2,450	b
Pp 97	0,000	c
BFE	2,525	b

6.3.4 Ensayos *in vivo* de control de *Meloidogyne* spp por bacterias con actividad nematocida, con formulación y dosis final.

En este ensayo, podemos apreciar, que tanto BFE como en mezcla con Pasteria, lograron reducir significativamente, tanto la población de *Meloidogyne*, como su tasa de crecimiento, siendo incluso superior a la lograda por el nematocida químico Furadan. La falta de actividad de este nematocida, puede deberse, al contenido de materia orgánica, en el suelo, la que posee la capacidad de inmovilizar los ingredientes activos de este plaguicida.

En cuanto a parámetros de vigor, solo se observó diferencias significativas, respecto al control sin presencia de nematodos.

Grafico 8 Efecto de bacterias nematocidas, sobre la población de *Meloidogyne incognita*, en plantas de tomate cultivadas en maceta, bajo condiciones controladas.

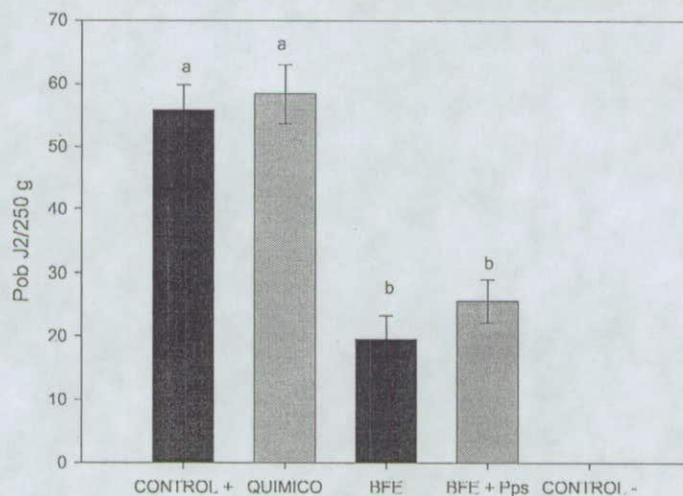


Grafico 9 Efecto de bacterias nematocidas, sobre la tasa de crecimiento poblacional de *Meloidogyne incognita*, en plantas de tomate cultivadas en maceta, bajo condiciones controladas.

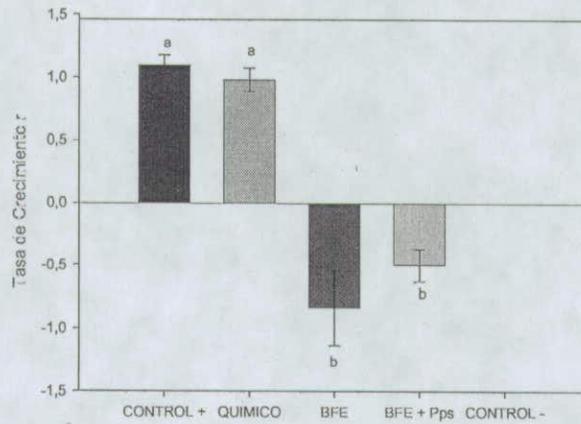


Grafico 10 Efecto de bacterias nematicidas, sobre la altura de plantas de tomate cultivadas en maceta, bajo condiciones controladas bajo distintos métodos de control de *Meloidogyne incognita*.

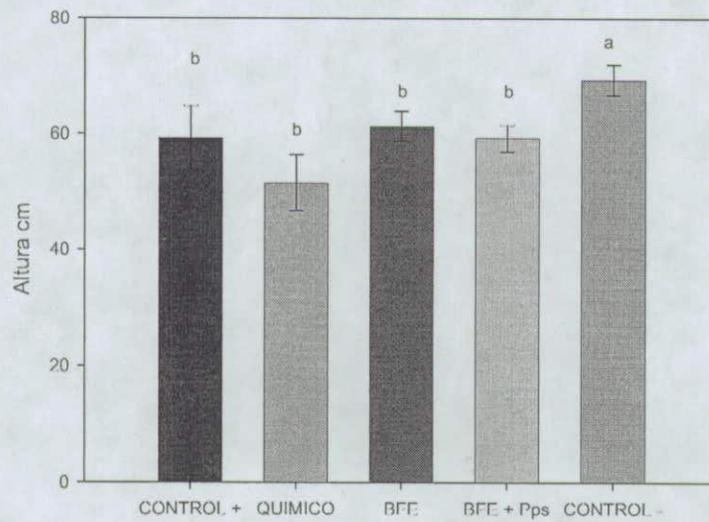
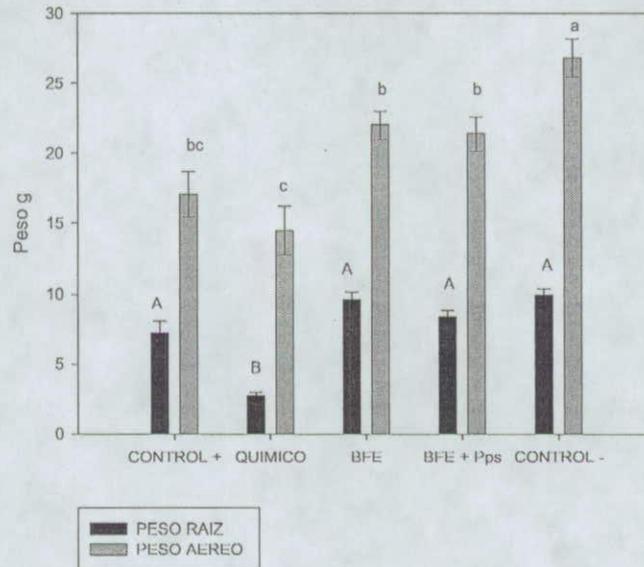


Grafico 11 Efecto de bacterias nematicidas, sobre el peso aéreo y radicular de plantas de tomate cultivadas en maceta, bajo condiciones controladas inoculadas con *Meloidogyne incognita*.



Cuadro 12 Efecto de bacterias nematicidas, sobre el índice de nodulación en plantas de tomate cultivadas en maceta, bajo condiciones controladas inoculadas con *Meloidogyne incognita*.

Tratamiento	Índice de nodulación	Significance
Control +	5,000	a
Control -	0,000	c
BFE	3,150	ab
BFE + Pps	2,450	b
Quimico	1,430	c

6.4 Etapa IV: Ensayos en campo.

6.4.1 Evaluación de bacterias con capacidad nematicida en cultivos de tomate.

Ensayo tomate Hermanos Miranda Colin Temporada 2007/2008

En este ensayo todos los tratamientos control, consistente en una aplicación de Furadan, siendo los tratamientos que incluían la cepa de Pasteuria 97, los que lograron los mejores resultados, por su parte BFE, logro diferenciarse del control, así como también del tratamiento de Pasteuria (Fig. 5.16). Este patrón se repitió en la tasa de crecimiento poblacional (Fig. 5.17).

La formación de nódulos solo se diferencio estadísticamente en los tratamientos que incluyeron a la cepa 97 de *Pasteuria*, pero la mezcla de *Pasteuria* y BFE, mostró la menor cantidad de nódulos (Fig. 5.18)

En cuanto al desempeño de las plantas bajo los distintos tratamientos, solos que incluían a BFE mostraron un incremento en el peso total y aéreo de las plantas, no presentándose diferencias en cuanto a peso radicular (Fig. 5.19).

Grafico 13 Efecto de bacterias nematicidas, sobre la población de *Meloidogyne* spp., en plantas de tomate cultivadas en condiciones de campo.

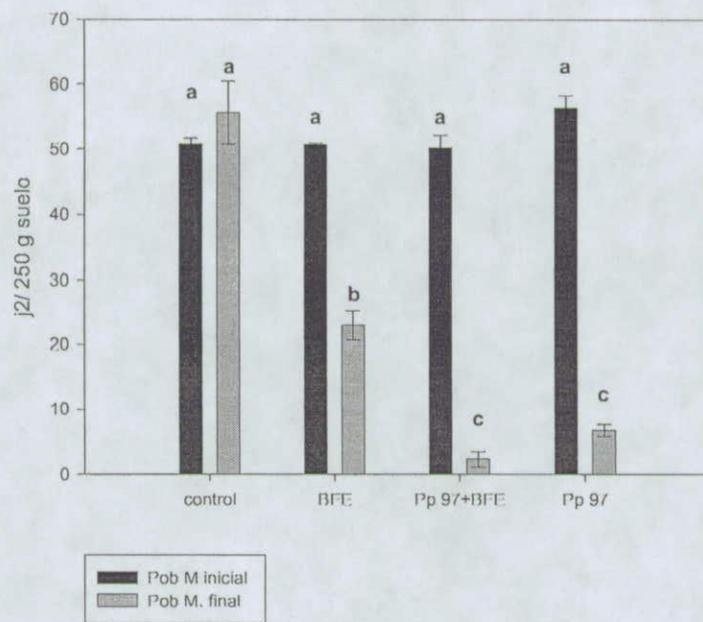


Grafico 14 Efecto de bacterias nematocidas, sobre la tasa de crecimiento poblacional de *Meloidogyne* spp., en plantas de tomate cultivadas en condiciones de campo.

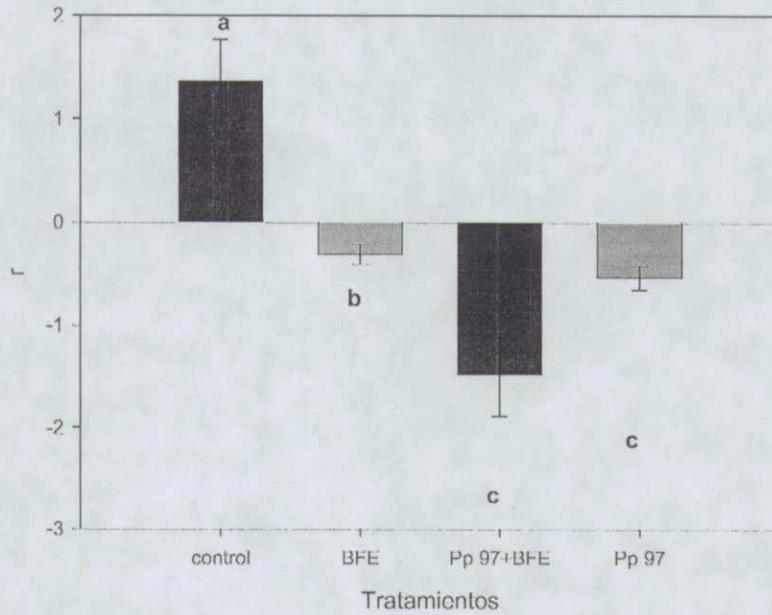


Grafico 15 Efecto de bacterias nematocidas, sobre cantidad de nódulos producidos por *Meloidogyne* spp, en plantas de tomate cultivadas bajo condiciones de campo.

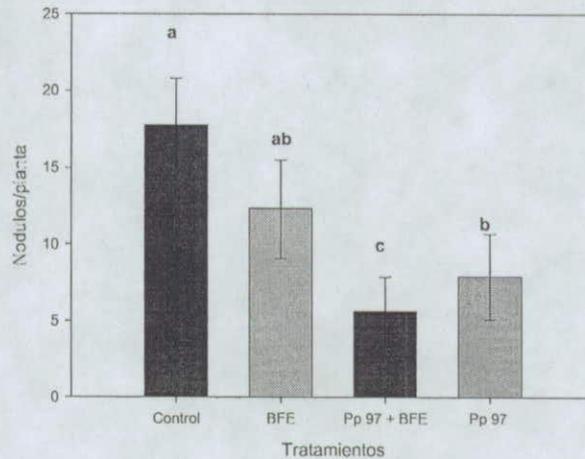
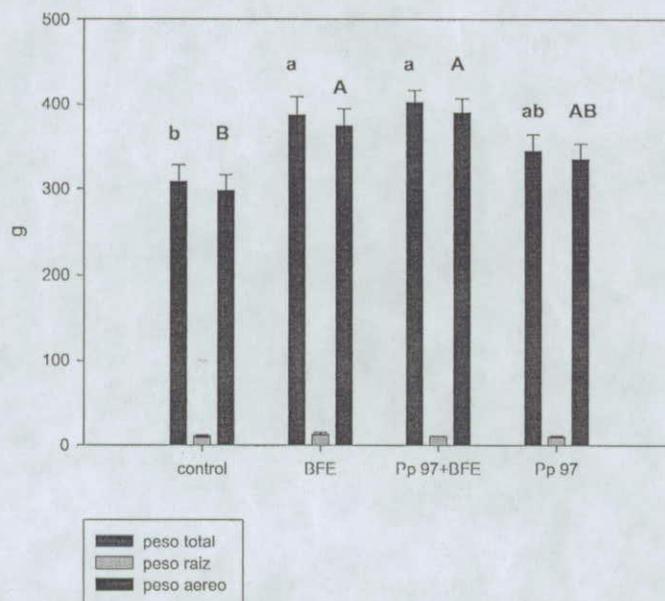


Grafico 16 Efecto de bacterias nematocidas, sobre el peso total, aéreo y radicular de plantas de tomate cultivadas en condiciones de campo, infectadas naturalmente por *Meloidogyne* spp.



Temporada 2008/2009

En esta temporada a diferencia de la primera se observó un mejor desempeño de BFE sobre *Pasteuria* y similar a la mezcla de ambas, probablemente debido a las mejoras en el sistema de producción y formulación, de todas formas hay que considerar que los datos de la presente temporada, son preliminares, ya que la fecha de evaluación final y cosecha es a fines de diciembre, que es cuando

podremos comparar realmente las dos temporadas. En los parámetros de vigor solo se midió altura de plantas, sin diferencias significativas y número de frutos por planta, donde el tratamiento Mezcla, obtuvo el mayor número. Pero dado que aun no se calcula el rendimiento total, es difícil establecer las diferencias definitivas.

Los datos de esta temporada indican que la aplicación de todos los tratamientos, mejora la eficacia de control del tratamiento químico, en este caso fumigación con metham sodio, permitiendo mantener las poblaciones de nematodos en niveles bajos.

Grafico 17 Efecto de bacterias nematicidas, sobre la población de *Meloidogyne* spp., en plantas de tomate cultivadas en condiciones de campo.

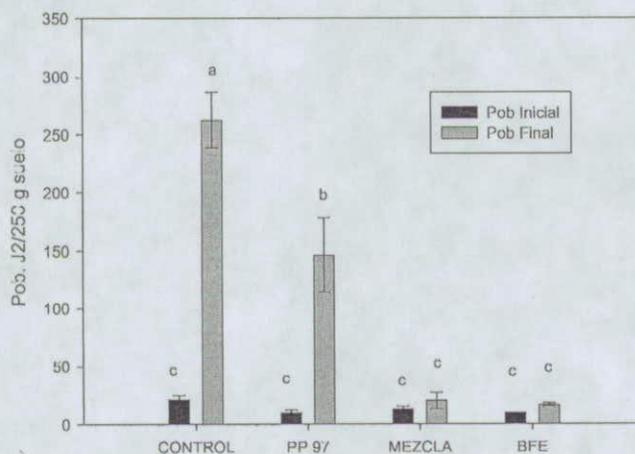


Grafico 18 Efecto de bacterias nematocidas, sobre la tasa de crecimiento poblacional de *Meloidogyne* spp., en plantas de tomate cultivadas en condiciones de campo.

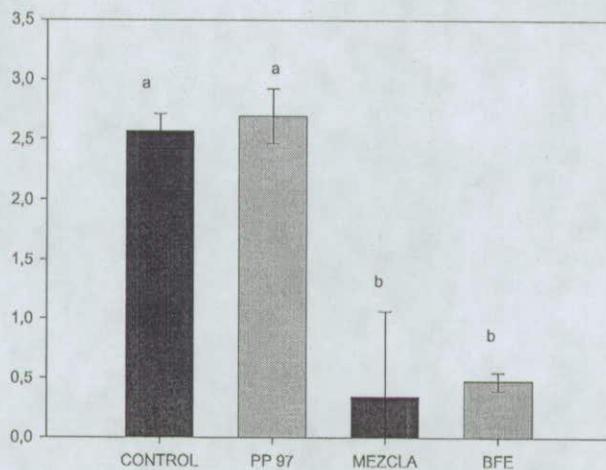


Grafico 19 Efecto de bacterias nematocidas, sobre la altura de plantas de tomate cultivadas en condiciones de campo, infectadas naturalmente por *Meloidogyne* spp.

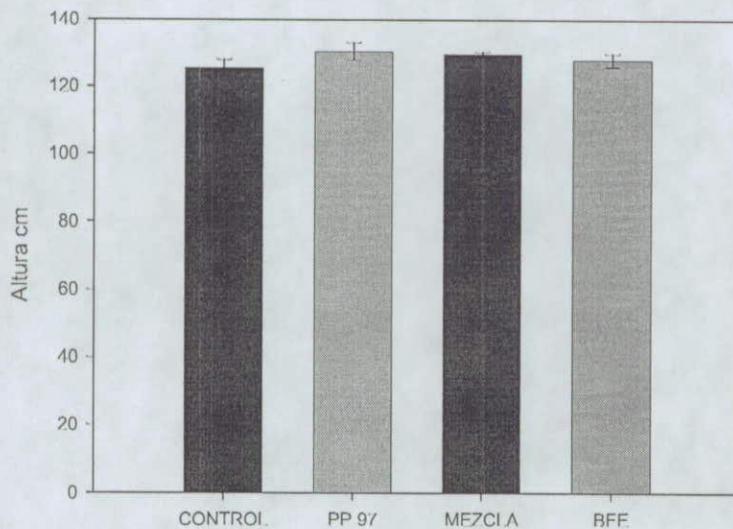
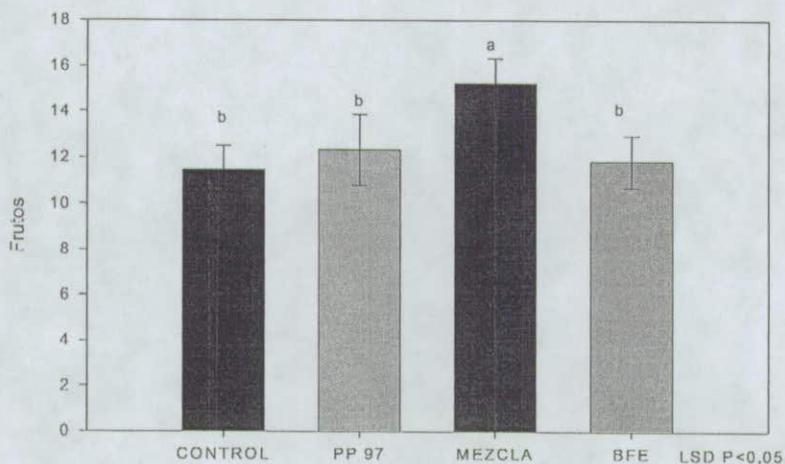


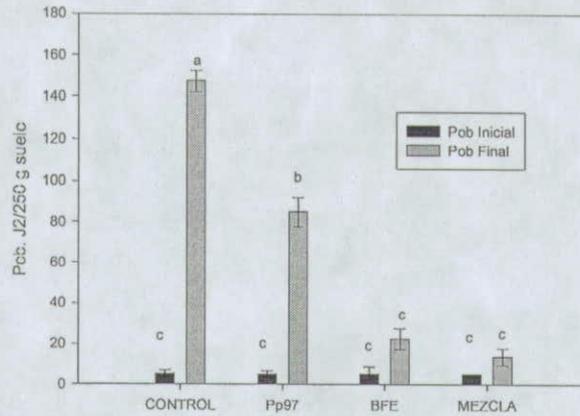
Grafico 20 Efecto de bacterias nematicidas, sobre la cantidad de frutos de plantas de tomate cultivadas en condiciones de campo, infectadas naturalmente por *Meloidogyne* spp.



**Predio Los arrayanes Olmue
Temporada 2008/2009**

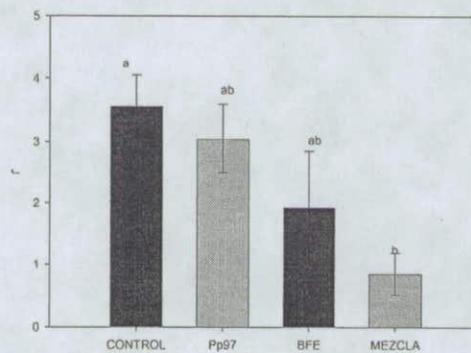
En esta segunda temporada, al igual que en el predio de Colin, los datos son preliminares, dado que la cosecha es a principios de Diciembre. De todas formas se observa un efecto significativo de todos los tratamientos sobre la población final de *Meloidogyne* spp. siendo los tratamientos con BFE tanto solo como en mezcla con *Pasteuria*, los con menores poblaciones, diferenciándose estadísticamente tanto del control, como de la aplicación de Pp. 97.

Grafico 21 Efecto de bacterias nematicidas, sobre la población de *Meloidogyne* spp., en plantas de tomate cultivadas en condiciones de campo.



Las tasas de crecimiento, son positivas, ya que la haber sido fumigado el suelo con bromuro de metilo, las poblaciones iniciales eran bajas, aun así podemos ver una clara tendencia a la disminución en las tasa de crecimiento poblacional de los nematodos, siendo el tratamiento de mezcla de Pp 97 con BFE, el único que se diferencia estadísticamente del control.

Grafico 22 Efecto de bacterias nematicidas, sobre la tasa de crecimiento poblacional de *Meloidogyne* spp., en plantas de tomate cultivadas en condiciones de campo.



En cuanto a vigor (altura) y rendimiento (numero de frutos), no se aprecian diferencias significativas, lo que era esperable, dado que la fumigación de bromuro, logra una disminución importante de los nematodos en las fases iniciales de desarrollo y solo es esperable observar diferencias, al final del cultivo, cuando los nematodos logran niveles poblacionales altos.

Grafico 23 Efecto de bacterias nematocidas, sobre la altura de plantas de tomate cultivadas en condiciones de campo, infectadas naturalmente por *Meloidogyne* spp.

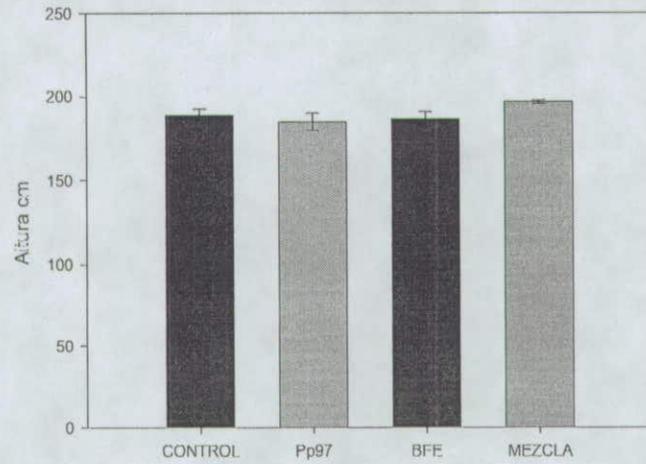
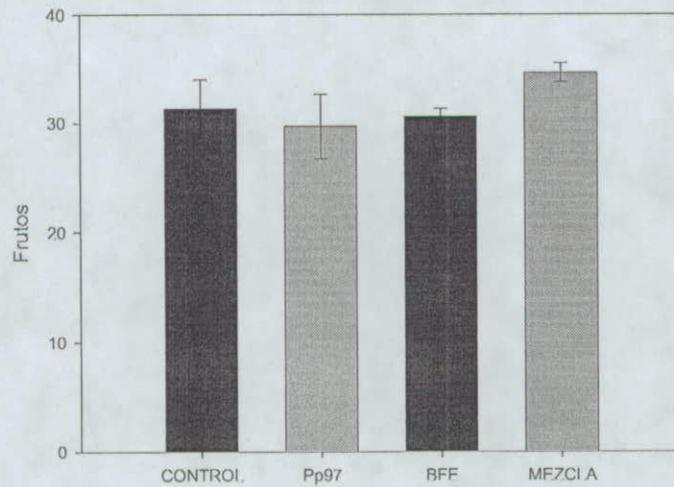


Grafico 24 Efecto de bacterias nematocidas, el numero de frutos de plantas de tomate cultivadas en condiciones de campo, infectadas naturalmente por *Meloidogyne* spp.



**Predio La capilla Boco Quillota.
Temporada 2008-2009**

En este predio, también se cuenta con datos preliminares, por las razones ya expuestas.

Los datos de poblaciones, indican que tanto en los casos con uso de bromuro, como si uso de este, los tratamientos con Pp. 97 y BFE, así como su mezcla lograron disminuir en forma significativa, las poblaciones de *Meloidogyne*, siendo el tratamiento con BFE, el que presento las menores poblaciones con diferencias significativas en el tratamiento con Bromuro y sin diferencias con Pp.97 y la mezcla en el tratamiento sin bromuro.

Grafico 25 Efecto de bacterias nematicidas, sobre la población de *Meloidogyne* spp., en plantas de tomate cultivadas en condiciones de campo con uso de Bromuro de metilo.

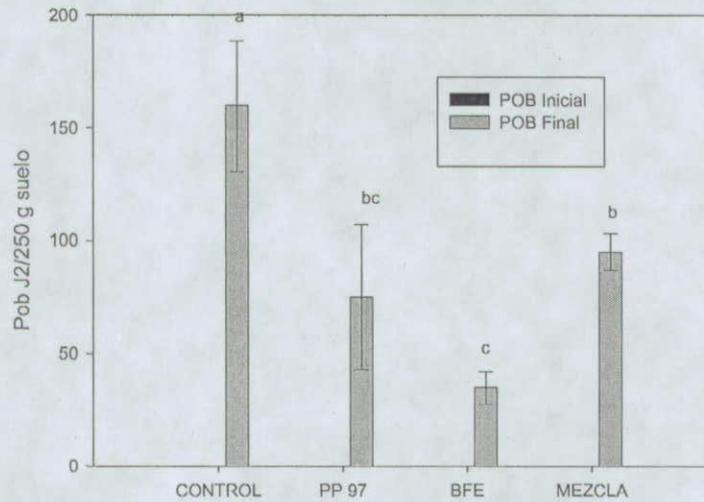
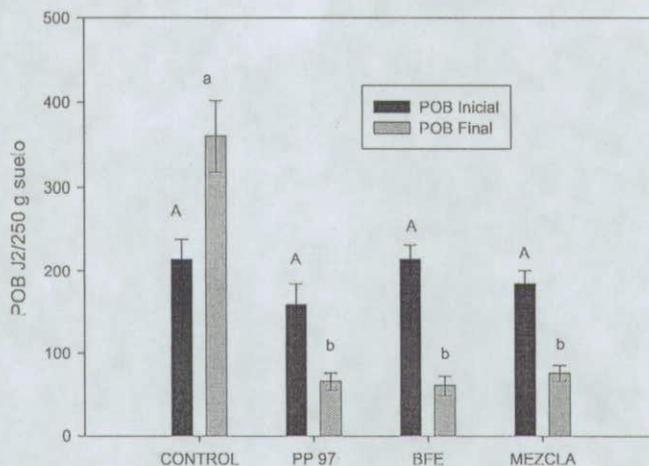
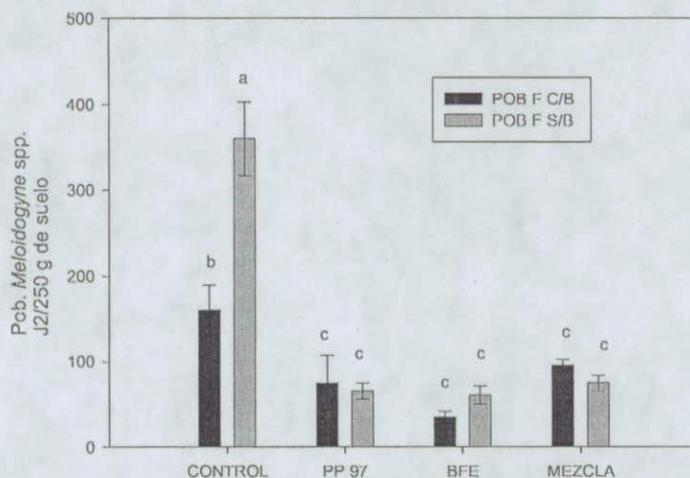


Grafico 26 Efecto de bacterias nematicidas, sobre la población de *Meloidogyne* spp., en plantas de tomate cultivadas en condiciones de campo sin uso de Bromuro de metilo.



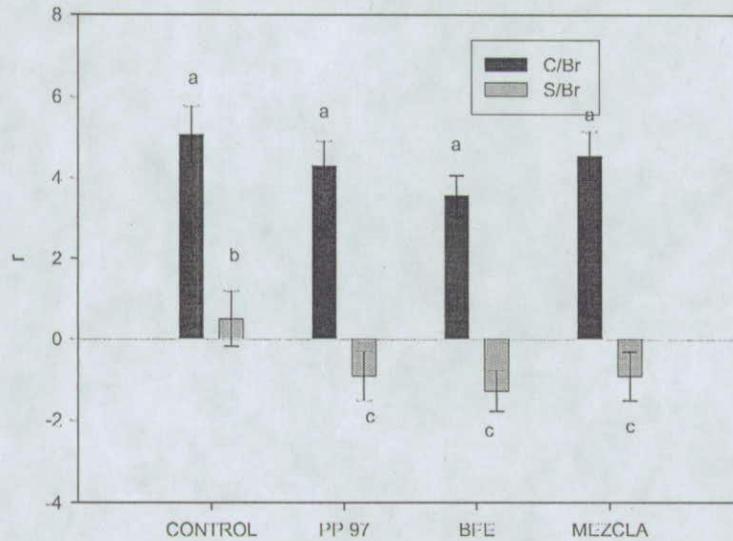
Al comparar las poblaciones finales, con y sin uso de bromuro, es interesante desatacar, que todos los tratamientos disminuyeron en forma significativa las poblaciones de nematodos, superando incluso la eficacia del bromuro, sin presentar diferencias entre los tratamientos.

Grafico 27 Efecto de bacterias nematicidas, sobre las poblaciones finales de *Meloidogyne* spp., en plantas de tomate cultivadas en condiciones de campo con y sin uso de Bromuro de metilo.



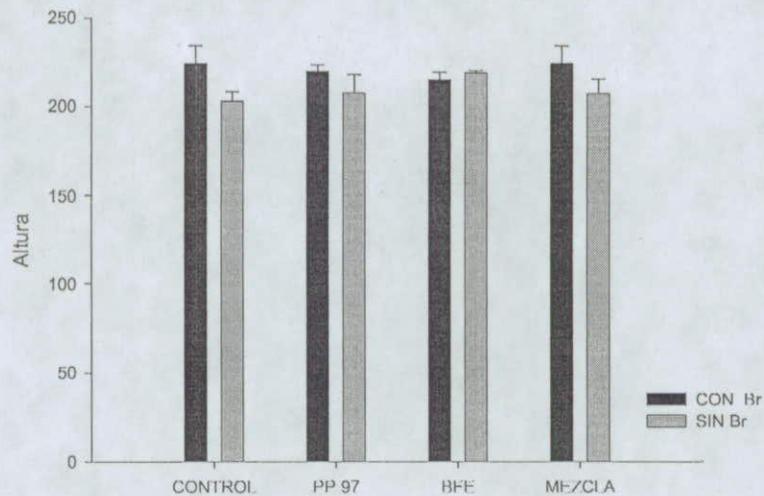
En este caso las tasa de crecimiento, sin bromuro, indican una clara tendencia a la disminución de las poblaciones de nematodo. Pero en el caso de uso de bromuro, no hay diferencias significativas y con una tendencia hacia el incremento de las poblaciones, dado principalmente, por el hecho de haber partido desde una situación de la ausencia de nematodos, de la zona de muestreo.

Grafico 28 Efecto de bacterias nematocidas, sobre la tasa de crecimiento poblacional de *Meloidogyne* spp., en plantas de tomate cultivadas en condiciones de campo.



En cuanto a altura de plantas, solo es posible observar diferencias significativas entre los bloques con y sin bromuro.

Grafico 29 de bacterias nematocidas, sobre la altura de plantas de tomate cultivadas en condiciones de campo, infectadas naturalmente por *Meloidogyne* spp.



Ensayo vid Viña el Aromo

Las mediciones iniciales de nematodos, permitieron seleccionar plantas con poblaciones similares de *Meloidogyne* spp y *Xiphinema* spp, obteniéndose grupos de plantas que no diferían estadísticamente en estas poblaciones.

En este ensayo se observó un efecto significativo de todos los tratamientos sobre la población final de *Meloidogyne*, pero solo el tratamiento consistente en la mezcla de la cepa 97 de *Pasteuria* y BFE, lograron una disminución significativa de la tasa de crecimiento poblacional del nematodo

Grafico 30 Efecto de bacterias nematocidas, sobre población de *Meloidogyne* spp. , en plantas de vid Cv. Merlot en condiciones de campo.

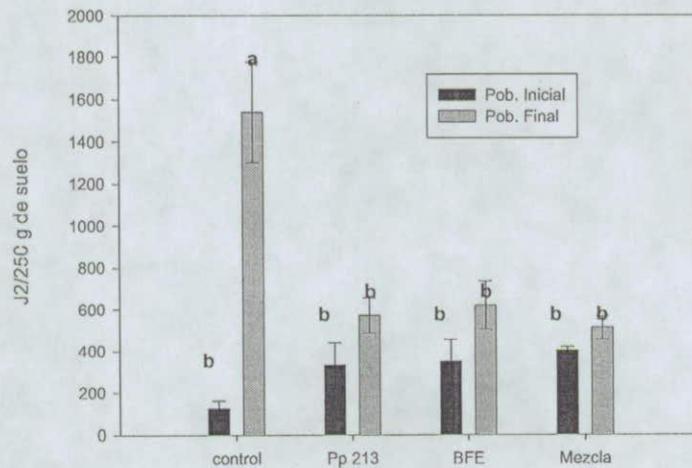
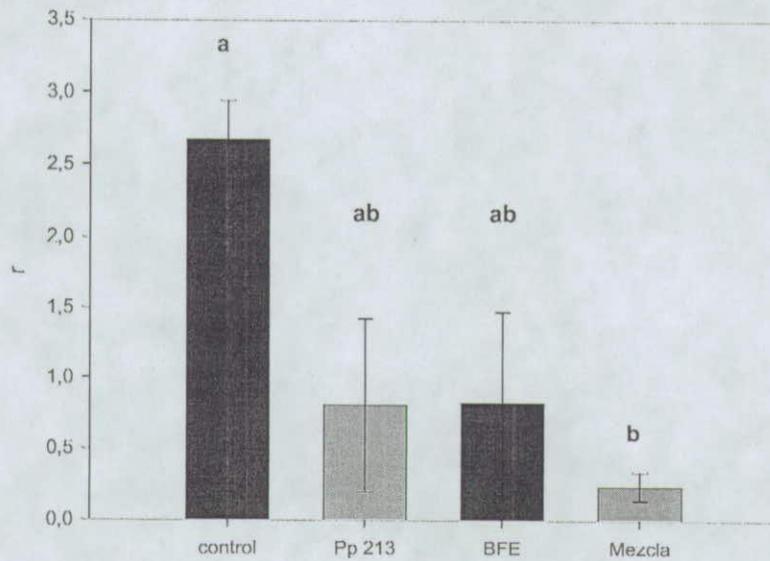


Grafico 31 Efecto de bacterias nematocidas, sobre la tasa de crecimiento poblacional de *Meloidogyne* spp, en plantas de vid (Cv. Merlot en condiciones de campo.



En el caso de *Xiphinema* no existieron diferencias significativas, como tampoco lo hubo en la tasa de crecimiento, pero es relevante que pese a la variabilidad de los datos en el tratamiento consistente en la de Pp 97 y BFE, no se detecto la presencia de *Xiphinema* en ninguna de las repeticiones.

Grafico 32 Efecto de bacterias nematicidas, sobre población de *Xiphinema* spp., en plantas de vid (Cv. Merlot en condiciones de campo).

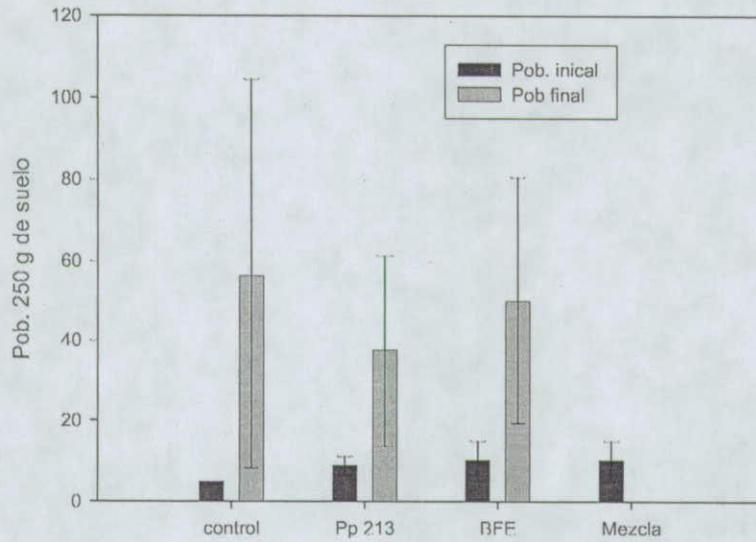
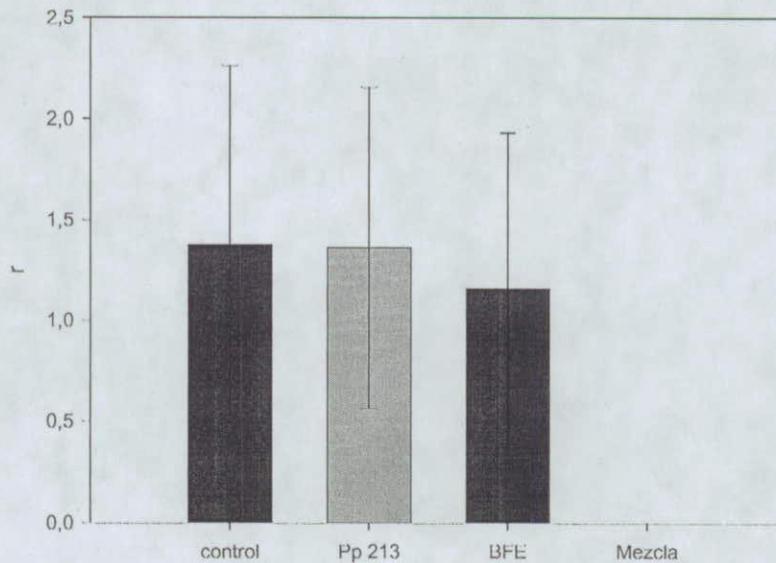
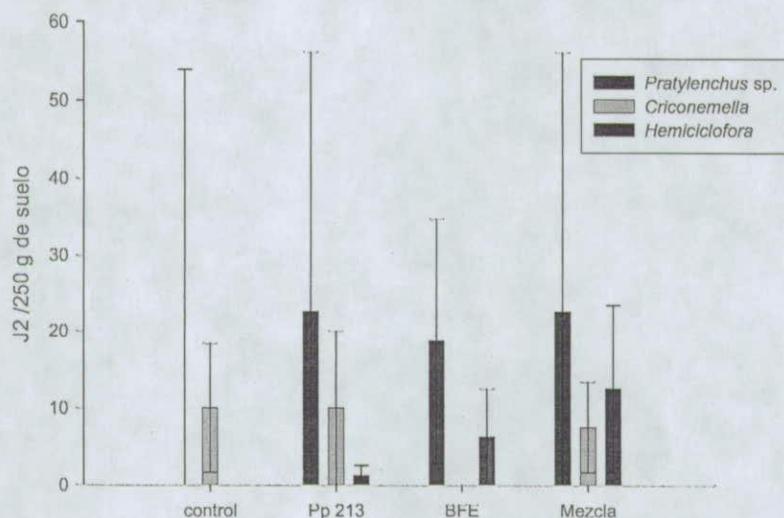


Grafico 33 Efecto de bacterias nematicidas, sobre la tasa de crecimiento poblacional de *Xiphinema*, en plantas de vid (Cv. Merlot en condiciones de campo).



En la evaluación final se midió la población de otros nematodos fitoparásitos presente, pero ninguno presentaba poblaciones importantes, no existiendo a su vez diferencias entre los tratamientos.

Grafico 34 Efecto de bacterias nematicidas, sobre la población de distintos nematodos fitoparásitos, en plantas de vid Cv. Merlot en condiciones de campo.



En relación al efecto sobre el desarrollo de la planta, podemos apreciar que no existió un efecto significativo sobre el número y peso de racimos por plantas (figura 5.12 y 5.13), pero sí sobre la cantidad de fruta producida por planta, la que mostró una tendencia a verse incrementado ($P=0,041$) en el tratamiento consistente en la mezcla de *Pasteuria* cepa 97 y Bsp1 (figura 5.14). El vigor de las plantas expresado como largo de brotes, tampoco mostró diferencias significativas, lo que es esperable, después de solo una temporada de aplicación de los tratamientos.

Grafico 35 Efecto de bacterias nematicidas, sobre el número de racimos por planta vid Cv. Merlot en condiciones de campo.

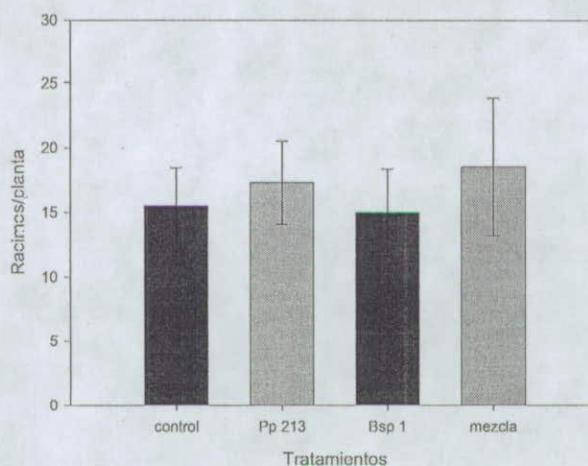


Grafico 36 Efecto de bacterias nematicidas, sobre el peso de racimos por planta vid Cv. Merlot en condiciones de campo.

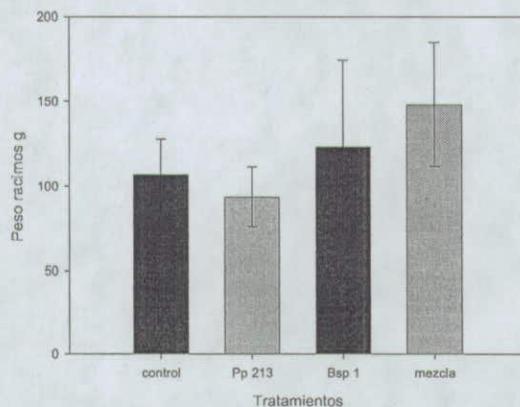


Grafico 37 Efecto de bacterias nematicidas, sobre rendimiento por planta vid Cv. Merlot en condiciones de campo.

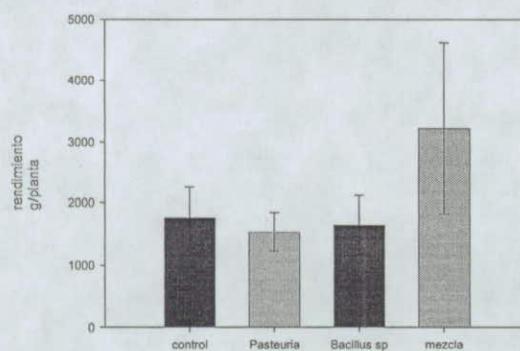
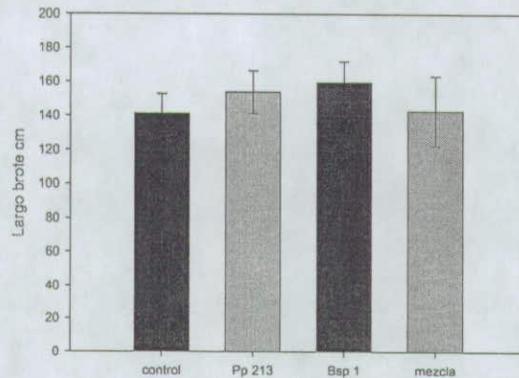


Grafico 38 Efecto de bacterias nematicidas, sobre largo de brotes de plantas vid Cv. Merlot en condiciones de campo.



Ensayos en limones

En este ensayo pese a no detectarse diferencias significativas, se observa una tendencia marcada de los tratamientos consistentes en la cepas BSP2 y la mezcla de esta con *Pasteuria* cepa 220, de disminuir la tasa de crecimiento de *Tylenchulus semipenetrans* ($P=0,085$), lo que indica la necesidad de la repetición de este ensayo con un incremento en el número de árboles utilizados. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en el ensayo in vitro de la cepa BSP2, que se muestra como un posible controlador de este nematodo.

Grafico 39 Efecto de bacterias nematicidas, sobre la población de *Tylenchulus semipenetrans*, en plantas de limón cultivadas en condiciones de campo.

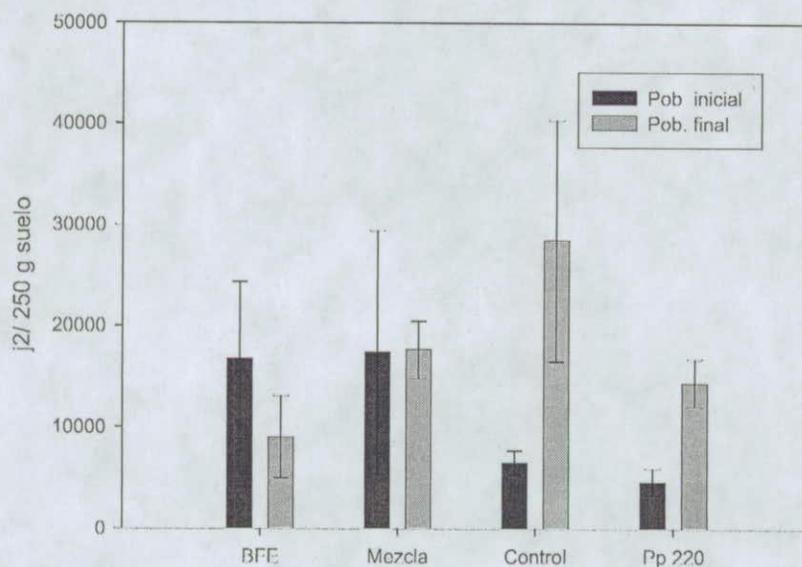


Grafico 40 Efecto de bacterias nematicidas, sobre la tasa de crecimiento poblacional de *Tylenchulus semipenetrans*, en plantas de limón cultivadas en condiciones de campo.

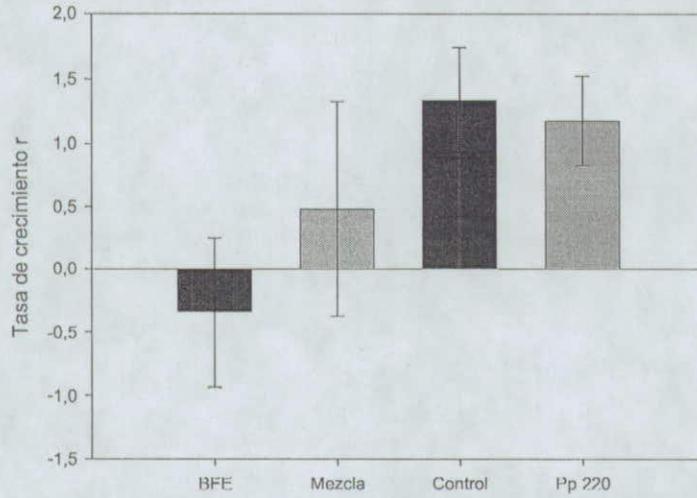
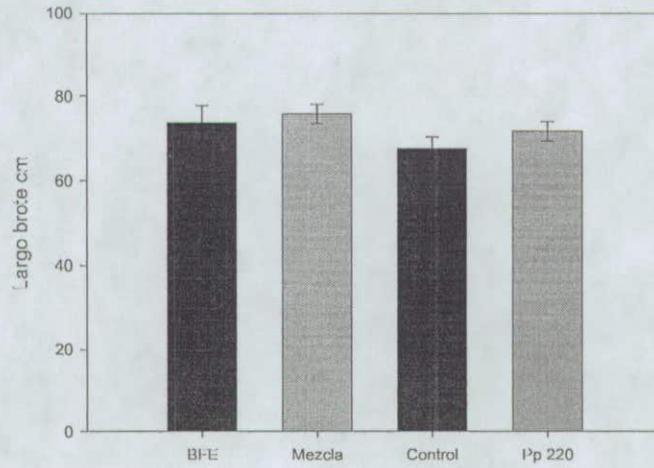


Grafico 41 Efecto de bacterias nematicidas, sobre el rendimiento de plantas de limón cultivadas en condiciones de campo., infectadas naturalmente por *Tylenchulus semipenetrans*.



6.5 Etapa V: Desarrollo sistema de producción y transferencia

6.5.1 Sistema de producción de cepas nativas de Pasteuria.

Ensayo I

De todas las cepas de Pasteuria obtenidas, solo las cepas 97, 213, 220 y 329, fueron posible reproducirlas en condiciones ratificales. Todas ellas en *Meloidogyne*.

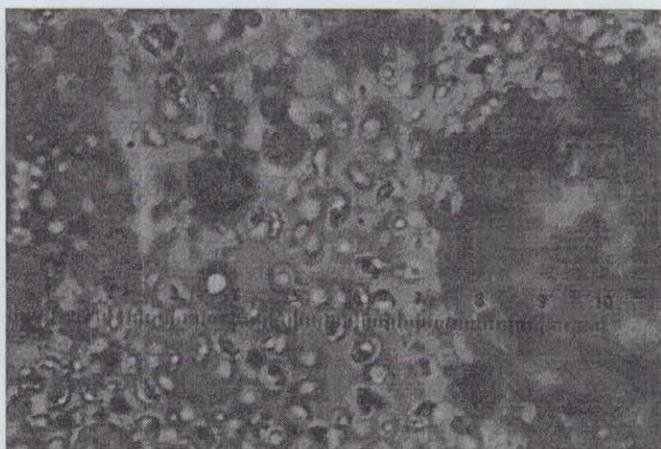


Figura 4 Endosporas de PP. obtenidas artificialmente, a partir de aislado nativo.

Ensayo I

De las especies evaluadas para producción de esporas, las dos mas promisorias son tomate y albahaca para la reproducción de Pp. en *Meloidogyne*. En el caso de *Tylenchulus* la cepa aislada desde este nematodo, no ha podido ser reproducida, pero se consta con una cepa proveniente de *Meloidogyne*, que es capaz de adherirse a *Tylenchulus*, la que fue utilizada en los ensayos en maceta y campo.

En cuanto a la mantención de los nematodos fitoparásitos, se cuenta con poblaciones puras de *Meloidogyne arenaria*, *M. javanica* y *M. incognita*. Así como de *Tylenchulus semipenetrans* y *Xiphinema*. Los que son reproducidas en tomate, naranjo y vid, respectivamente.

De los 3 sistemas de producción, el más efectivo fue el tratamiento 3, pese a que en albahaca se produce la misma cantidad de esporas, que en tomate, en este último es más fácil la obtención de esporas, por el mayor porcentaje de hembras infectadas y facilidad de manejo de los nódulos. En el caso de zanahoria y berenjena, no se logro encontrar hembras infectadas.



Cuadro 13. Producción de esporas de Pp. producidas en plantas de tomate, bajo 3 sistemas de cultivo de *Meloidogyne* spp.

Sistema	Hembras/planta	Hembras infectadas %	Esporas/hembra	Esporas/planta
Cultivo de plantas sobre suelo con presencia natural de nematodos y esporas.	59	2,7 % b	2.045.055	3,26E+6 b
Cultivo de plantas en suelo estéril con nematodos infectados artificialmente con Pp.	63	3,2 % b	1.934.945	3,9E+6 b
Cultivo de plantas sobre suelo, con presencia natural de Pp. Libre de nematodos e inoculados con poblaciones puras de nematodos.	58	13 % a	2.103.043	1,59E+7 a

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ($P < 0,05$)

Cuadro 14. Producción de esporas de Pp. producidas en plantas de Albahaca, bajo 3 sistemas de cultivo de *Meloidogyne* spp.

Sistema	Hembras/planta	Hembras infectadas %	Esporas/hembra	Esporas/planta
Cultivo de plantas sobre suelo con presencia natural de nematodos y esporas.	148	2 %	2.003.040	6,01E+7
Cultivo de plantas en suelo estéril con nematodos infectados artificialmente con Pp.	174	1,8 %	1.994.940	6,25E+6
Cultivo de plantas sobre suelo, con presencia natural de Pp. Libre de nematodos e inoculados con poblaciones puras de nematodos.	165	1,6 %	2.056.050	1,02E+7

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ($P < 0,05$)

Estos resultados, se han traducido en el siguiente protocolo de producción de Pp.

Plantas que son cultivadas en una mezcla de arena, compost, perlita y turba 2:1:1:1.

La producción de esporas de Pp. En base a los resultados mostrados mas abajo, se esta realizando, sobre plantas, cultivadas con la mezcla de sustrato ya descrita. Una vez que las plantas alcanzan 6 semanas, son inoculadas con la especie de nematodos a utilizar, los cuales van con endosporas adheridas de la cepa de Pp. Una vez hecho esto, las plantas se dejan crecer por 8 semanas a una temperatura de 25°C y un régimen de luz de 12 horas de luz, por 12 de oscuridad. Pasadas las 8 semanas, en el caso se constata la presencia de nódulos, y de haberlos, se extraen las hembras, para determinar la presencia de esporas. Una vez determinada la presencia de esporas, se revientan las hembras, almacenándose las endosporas, para lo que son suspendidas en agua destilada estéril y luego asperjadas sobre zeolita también estéril, secándose bajo movimiento constante y ajustado a una concentración de 10^6 esporas/gr.

Ensayo II

Como muestra el cuadro 8, el mejor sustrato es el compuesto por Compost, arena, perlita y turba (2:1:1:1) seguido por Compost, arena y perlita (1:1:1), pero es necesario realizar varios ciclos de cultivo, para determinar no solo la producción sino la confiabilidad del sistema, pensando en un futuro sistema comercial de producción.

Cuadro 15. Producción de hembras y J2 de *Meloidogyne* spp., producidos en plantas de tomate, utilizando distintos sustratos.

Sistema	Hembras/ planta	J2/250 g de suelo.
Suelo original.	148 b	253b
Perlita, turba y arena (1:1:1)	174 b	289 b
Vermiculita, arena y turba (1:1:1).	165 b	345 ab
Compost, arena y perlita (1:1:1)	235 ab	420 ab
arena, compost, perlita y turba 2:1:1:1	367 a	478 a

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ($P < 0,05$)

Ensayo III Producción en bandeja flotante:

Después de una primera experiencia sin resultados, se logro ajustar el sistema, al mejorar el sistema de aireación, lo que ha permitido, tanto la producción abundante de raíces, y se la logrado obtener nódulos abundantes de *Meloidogyne*, pero aun con una baja proporción de hembras infectadas. A lo que se suma, una gran cantidad de raíces sin nódulos. Por lo que aun es necesario mejorar tanto la técnica de inoculación de nematodos como ajustar la proporción de esporas por J2 necesarias.

4.5.2. Sistema de producción de cepas de BFE, cultivadas *in vitro*.

Ensayo I medios

No existieron diferencias significativas en la producción de las bacterias tanto antes como después del proceso de secado, por lo que se opto por el medio GYS, dado que es el de menor costo.

Cuadro 16. Producción de esporas de bacterias con actividad nematocida, en distintos medios de cultivo *in vitro*.

Medio	Esporas/ml	UFC/g
CN	$1,3 \times 10^7$	$9,8 \times 10^6$
GYS	$2,2 \times 10^7$	$6,8 \times 10^6$
LB	$1,5 \times 10^7$	$7,8 \times 10^6$

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ($P < 0,05$)

Cuadro 17. Días de cultivo a 80% de esporulación, de 6 cepas BFE en 4 medios distintos.

Cepa /Medio	GYS	CN	LB
39	4	12 a	24
2 ps11	5	5 b	10
2 ps21	4	10 a	18
6 3k conti	4	10 a	24
6 conti 21	5	12	23
5 ps	4	12 a	18
Significancia	ns	*	Ns

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ($P < 0,05$)



Ensayo II temperatura de cultivo

En cuanto a temperaturas tanto las temperaturas de 25 y 30° C, mostraron una producción significativamente mayor que la

Cuadro 18. Producción de esporas de bacterias con actividad nematocida, a distintos temperaturas de cultivo *in vitro*.

Temperatura	Esporas/ml	UFC/g
20°	1,2x10 ⁷ b	6,8x10 ⁶ b
25°	4,2x10 ⁷ a	7,3x10 ⁶ a
30°	4,5x10 ⁷ a	8,5x10 ⁶ a

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ($P < 0,05$)

Ensayo III pH de cultivo

Como se observa en el cuadro el pH que disminuye los días a esporulación esta entre 6,5 y 7.

Cuadro 19. Días de inoculación a esporulación, en cada una de las distintas cepas a distintos pH en medio GYS (Glucose Yeast Salt)

Cepa / pH	6.0	6.5	7.0	7,5
39	12	6	4	12
2 ps11	12	5	5	12
2 ps21	12	5	5	12
6 3k conti	12	5	5	12
6 conti 21	12	5	5	15
5 ps	12	4	4	13

Evaluación de sustratos inertes y forma de secado para almacenaje y formulación

Cuadro 19 Porcentaje de supervivencia y actividad de *BFE.*, usando 3 sustratos inertes, después de 3 meses de almacenaje

Acarreador	% UFC/gr.	% Actividad
Talco	85.2% ab	45.7% c
Zeolita	100 % a	98.0% a
Sílice	83.2% b	32.0% bc

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ($P < 0,05$)

En los siguientes ensayos se entrega el promedio de las 6 cepas, dado que no se encontraron diferencias significativas entre ellas.

De la primera parte del ensayo, se obtuvo la mayor población de esporas viables al diluir a la mitad el medio de cultivo (Cuadro 19), sin embargo, el mayor porcentaje de esporas se logró con una temperatura de 80° C. Al evaluar la población final de esporas, podemos observar que la dilución, es el método que genera la mayor cantidad de esporas viables.

Cuadro 20 Porcentaje de esporas y numero de esporas viables, después de 3 tratamientos para inducir esporulación, en una cepa de *BFE*

Tratamientos	Esporulación (%)	Esporas viables /ml antes de secado
Cultivo 12 días	72,5 c	2.53 x 10 ⁹ b
Dilución	85,8 b	1.91 x 10 ¹⁰ a
60° C	92,2 a	3.46x 10 ⁸ c

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ($P < 0,05$)

La interacción de los dos factores, esporulación y secado, no fue significativa, indicando que solo el factor esporulación fue significativo para el tratamiento de dilución, lográndose los mayores niveles de población. En cuanto a forma de secado, pese a que no fue significativo, se observa una fuerte tendencia donde el secado a 45° C combinado con dilución, arrojaría la mayor población de la cepa, pese a lo cual es bastante bajo en comparación a la cantidad de UFC iniciales. Por lo tanto, es necesario seguir evaluando procesos de secado.

Cuadro 21 Porcentaje de supervivencia de cepas de BFE , bajo distintos sistemas de estimulación de esporulación y secado.

Método esporulación	Método secado	Supervivencia (%)
cultivo 7 días	aire	0.06 b
cultivo 7 días	Estufa 45°	0.03 b
cultivo 7 días	Betonera	84,3 a
Dilución	aire	0.01 b
Dilución	Estufa 45°	0.12 b
Dilución	Betonera	86,2 a
80° C	aire	0.34 b
80° C	Estufa 45°	0.06 b
80° C	Betonera	70,2 a

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ($P < 0,05$)

Ensayo de almacenaje

Coexistieron diferencias significativas entre las condiciones de almacenaje, pero dado que la presencia de luz genera una disminución en la cantidad de esporas, aunque no significativa, se recomienda el almacenaje en oscuridad.

Cuadro 22. Porcentaje de esporas viables almacenadas, bajo distintas condiciones, por 3, 6 y 8 meses de almacenaje.

Condiciones de almacenaje	3	6	8
T° y luz ambiental	100	95	93
T° ambiental en oscuridad	100	100	100
T° 4°C y oscuridad	100	100	100

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ($P < 0,05$)

7 Fichas Técnicas y Análisis Económico:

- 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*).

Se desarrollo la siguiente ficha técnica para uso de *Bacillus*:

Cuadro 25. Recomendaciones de uso de *Bacillus* spp. para el control de enfermedades bacterianas en cultivos agrícolas.

CULTIVO	PATOGENOS	DOSIS	ÉPOCAS DE APLICACIÓN
Tomate	Nematodos	6 g/100 l 4 Kg/ha	Aplicación en almacigo y Transplante
Vid y citricos	Nematodos	6 g/l 2 Kg./ha	En plantación. A inicio y fin de temporada

Compatibilidad con agroquímicos

BFE debe ser aplicado en forma separada de otros productos agroquímicos, a menos que se realice una prueba de compatibilidad. En el caso de aplicaciones con compuestos cúpricos y antibióticos, estos deben aplicarse antes del biocontrolado y espaciados a lo menos 5 días.

Almacenaje

La formulación de BFE, es un polvo mojable, el que mantenido en un ambiente seco y fresco es capaz de mantener su población y actividad a lo menos por 8 meses. Una vez abierto el envase de BFE, debe evitarse su contacto con la humedad, en caso contrario debe utilizar inmediatamente.

Toxicidad

Las especies de BFE, seleccionadas en el presente proyecto presentan baja toxicidad para mamíferos, pese a lo cual se deben tomarse las medidas de seguridad, propias de toda aplicación fitosanitaria. Debe evitarse la ingestión y el contacto con mucosas y heridas en la piel, en caso de ocurrir realizar lavados con abundante agua y jabón y en caso de ingestión no inducir vomito. Este biocontrolador no posee carencias ni tolerancia y el periodo de reingreso es de 2 horas.

Forma de aplicación

El formulado en polvo desarrollado durante el proyecto, esta compuesto por esporas de la bacteria y los compuestos obtenidos durante la fermentación de esta, mas un acarreador en base a arcillas. Estas esporas son capaces de soportar temperaturas de 80° C y falta absoluta de humedad, pero la bacteria una vez germinada requiere de temperaturas de inferiores a 35° C y humedad para desarrollarse, por lo que las aplicaciones deben realizarse en las horas de menor temperatura durante el verano y las mas calidas durante el invierno en las horas de mayor temperatura. Debe realizarse un eficiente mojado del cultivo a tratar, dado que no se ha demostrado una actividad sistémica de *BFE*.

Costos El estudio de costos, se realizo en conjunto con Bio-Insumos Nativa Ltda. y se obtuvo un precio de equilibrio entre costos de producción, venta, administración, marketing y utilidades de \$45.000 el Kg. lo que lo hace competitivo con nematicidas de uso agrícola.

- Análisis económico actualizado, comparando con los análisis de la propuesta de proyecto.

Al realizar el análisis económico, con los datos actuales, esperamos que la producción aumente en un 10%, dada la ineficiencia de los productos actualmente en uso, además existe una disminución del precio del *Bacillus* formulado de \$32.000 en la propuesta a los actuales \$30.000 y una reducción de un 50% en el uso del caldo bórdeles. Lo que nos genera un aumento de rentabilidad del cultivo de tomate. (Cuadros 26 y 27)

Dado que los compuestos químicos actualmente en uso son poco efectivos y además están siendo cuestionados por sus impactos ambientales y en salud humana, por lo que este bio controlador se estaría posesionando como la mejor alternativa, para el control de nematodos fitopatógenas, en cultivos de vides y tomates, lo que sobrepasa las 160.000 hectáreas en Chile, potenciales que podrían usar este bio controlador.

La producción y formulado del producto se realizaría por Bio Insumos Nativa Ltda. quienes poseen una red de distribución entre las regiones I y X, por lo que se asegura una disponibilidad a lo largo del país. En cuanto a producción, la empresa estaría en condiciones de producir 20.000 Kg. del formulado anualmente.

Se estima un costo por hectárea de cerca de \$80.000 pesos, lo que es significativamente menor que el costo de las alternativas químicas.

Cuadro 28. Numero de aplicaciones dosis y costo por hectárea.

	aplicaciones	dosis	total	\$/kg	\$ total
mocap	1	12	12	24.395	292.740
BFE	1	2	2	40.000	80.000

- Descripción estrategias de marketing de productos, procesos o servicios

La estrategia de marketing en estos momentos esta centrada en, charlas de difusión con agricultores, reuniones con asesores de los cultivos y entrega de muestras del formulado, para la realización de pruebas de campo con agricultores. Este producto por sus características, se espera que no posea restricciones para su uso en ningunos de los sistemas de certificación usados actualmente.

8. Impactos y Logros del Proyecto:

- 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.
- Indicadores de impactos y logros a detallar dependiendo de los objetivos y naturaleza del proyecto:

Impactos Productivos, Económicos y Comerciales

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto	Diferencial
Formación de empresa o unidades de negocio	Convenio con empresa para producción y comercialización.	Convenio con empresa para producción y comercialización.	No existe diferencial
Producción (<i>por producto</i>)	Producción para 2 ha	Sistema de producción establecido, con capacidad para 2500 ha.	El uso y producción de BFE, permitirá una capacidad productiva varias veces mayor a la de Pasteuria.
Costos de producción	No se podía determinar al inicio del proyecto	Precio de venta de \$45.000	Precio adecuado a nivel de control, dosis y relación con competidores.
Ventas y/o Ingresos	No aplica	No se han realizado ventas	
<i>Nacional</i>	No aplica		
<i>Internacional</i>	No aplica		
Convenios comerciales	Convenio con empresa	Convenio con Bio Insumos Nativa Ltda.	

Impactos Sociales

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto	Diferencial
Nivel de empleo anual	1 técnico	2 técnicos 1 product manager	Los equipos de producción requieren mayor preparación técnica y el sistema de secado requiere más mano de obra. La venta del producto requiere de alguien especializado para su comercialización.
Nuevos empleos generados	1	3	2 técnicos jornada completa, y un agrónomo 25% de jornada
Productores o unidades de negocio replicadas	0	1	

Impactos Tecnológicos

Logro	Numero			Detalle
	Nuevo en mercado	Nuevo en la empresa	Mejorado	
Producto	1	1		Formulado de BFE. Para el control de nematodos
Proceso	Fermentación Formulado	Fermentación formulado		
Servicio	No aplica	No aplica		

Propiedad Intelectual	Número	Detalle
Patentes		
Solicitudes de patente		
Intención de patentar	1	Formulado de BFE y uso
Secreto industrial	2	Sistema de producción y secado del formulado anterior
Resultado no patentable	3	Cepas de BFE Forma de uso Especies nuevas para el control biológico de nematodos
Resultado interés público	1	Alternativa al uso de nematocidas y bromuro de metilo.
Logro	Número	Detalle

Convenio o alianza tecnológica	1	Convenio con Bio-Insumos Nativa Ltda. Para la producción y comercialización del formulado de BFE
Generación nuevos proyectos	1	Unidad de negocio y producción.

Impactos Científicos

Logro	Número	Detalle (<i>Citas, título, descripción</i>)
Publicaciones <i>(Por Ranking)</i>	3	En preparación
Eventos de divulgación científica	4	Seminario Internacional "Política Y Gestión De La Ciencia, Tecnología E Innovación, En La Industria Alimentaria, Cimientos Para El Mejoramiento De La Competitividad De La Región Del Maule". Talca Chile." 2008 Seminario "Biodiversidad y Sustentabilidad: Visión de la Ciencia y el Sector Público-Privado en la Región del Maule" 2008 XXVII Congreso ONTA Viña del Mar 2005 XVII Congreso Sochifit Concepción 2007
Integración a redes de investigación	2	Rothampstead (UK) Dr. Keith Davies Universidad e Florida (USA), Dr. Donald Dickson

Impactos en Formación

Logro	Numero	Detalle (<i>Título, grado, lugar, institución</i>)
Tesis pregrado		
Tesis postgrado		
Pasantías		
Cursos de capacitación		

8 Problemas Enfrentados Durante el Proyecto:

- Legales: No se presentaron problema de índole legal.

Técnicos: El principal problema técnico correspondió a la reproducción de cepas de *Pasteuria*, lo que limitó el número y extensión de los ensayos. Atrasando el cronograma del proyecto, por lo que se tuvo que disminuir el número de ensayos y fueron modificados para lograr el cumplimiento de los objetivos del proyecto.

- Administrativos: No se presentaron problemas administrativos
- Gestión: En los inicios del proyecto existieron retrasos, ocasionados por el atraso en la llegada de equipos claves.
- Medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.
El descubrimiento de las bacterias formadoras de endosporas, reproducibles *in vitro*, permitió ampliar el número y extensión de los ensayos y permitirá un formulado comercial.

9 Otros Aspectos de Interés

Los resultados de estos proyectos, poseen tres aspectos que suscitan el interés por sus implicancias en productivas como científicas. Así tenemos como primer hecho a destacar, que este proyecto permitió la primera detección reportada de *Pasteruria* en Chile y la aislación identificación y cepas de bacterias formadores de endosporas, con alta capacidad de control de nematodos fitoparásitos y que son cultivables *in vitro*.

Se han logrado niveles de control similares a los obtenidos por nematicidas convencionales, pero sin las limitaciones ambientales y de certificación (orgánica y BPA).

Y por último la excelente recepción que han tenido los agricultores, especialmente de tomates, para el uso de estos organismos, lo que se explica en parte por la eficacia de bio controlador y por la experiencia que han tenido con productos comerciales, que han sido desarrollados previamente por la Universidad de Talca y Bio Insumos Nativa Ltda.. como Trichonativa, Nacillus y Betk 03.

10 Conclusiones y Recomendaciones:

La principal conclusión del presente ensayo, es que es necesario, permitir cierto nivel de flexibilidad en las metodologías, tanto de prospección, aislación y evaluaciones. Ya que de no haberse explorado metodologías alternativas, no consideradas en la metodología inicial, no se habrían detectado la presencia de las BFE.

Las BFE, presentan una proyección comercial, drásticamente superior a la de *Pasteuria*, dado principalmente por la facilidad en su reproducción a escala industrial y facilidad de formulación. De todas formas es necesario seguir explorando nuevas alternativas para la producción masiva de *Pasteuria*, dado que presenta ventajas como mayor especificidad y menor dependencia de condiciones ambientales, para su efectividad de control.

Los niveles de control obtenidos, por los biocontroladores evaluados, se presentan como una alternativa cierta, frente al control químico, dado por nematocidas convencionales, así como a la fumigación por bromuro de metilo. Si a esto sumamos la existencia de alternativas de control, biológico para hongos de suelo (*Trichoderma*) y bacterias (*Bacillus subtilis*), se podría esperar que en pocos años, las fumigaciones de suelo, tanto por Bromuro como por metham sodio, puedan ser reemplazadas por agentes de control biológico.

Existe una alta demanda, por agentes de control biológico por parte de las empresas agrícolas y forestales, dado que su uso se presenta como una herramienta, que no solo facilita la obtención de certificaciones y el control de ciertas enfermedades que no son controladas en forma adecuada por otra forma, sino que los agricultores lo ven también como una forma de disminuir el riesgo, asociado a rechazos por residuos, lo que se ha acrecentado por la incertidumbre que se da año a año, en las variaciones en tolerancias y carencias para productos químicos.

INFORME DE DIFUSIÓN

- Difusión de los resultados obtenidos **adjuntando** las publicaciones realizadas en el marco del proyecto o sobre la base de los resultados obtenidos, el material de difusión preparado y/o distribuido, las charlas, presentaciones y otras actividades similares ejecutadas durante la ejecución del proyecto.

Tipo evento	Numero	detalle
Presentación en congresos y seminarios	7	<ul style="list-style-type: none"> - II Seminario "Insumos para la Agricultura Orgánica" (Santiago, agosto 2005) - III Seminario "Insumos para la Agricultura Orgánica" (Santiago, Diciembre 2005) XXVII Congreso ONTA Viña del Mar 2005 - Lanzamiento del "Catalogo de Insumos para el Control de Plagas y Enfermedades en la Agricultura Orgánica, en Chile" ejecutado por CCO (Abril 2006) XVII Congreso Sochifit Concepción 2007 Seminario Internacional "Política Y Gestión De La Ciencia, Tecnología E Innovación, En La Industria Alimentaría, Cimientos Para El Mejoramiento De La Competitividad De La Región Del Maule". Talca Chile." 2008 Seminario "Biodiversidad y Sustentabilidad: Visión de la Ciencia y el Sector Público-Privado en la Región del Maule" 2008
Organización de seminarios	1	Seminario de Finalización del Proyecto FIA-UTALCA "Evaluación de cepas nativas de <i>Bacillus subtilis</i> para el control de bacterias fitopatógenas" (Abril 2006)
Día de campos o reuniones técnicas	8	<ul style="list-style-type: none"> - Reunión con asesores de tomate en Quillota (Nov 2006) - Reunión con equipo técnico de AGRICOM (Oct 2006) - Reunión asesores tomate en Colin y Maule (Octubre 2006) - Día de campo, en Colin, con exposición de resultados de ensayos de campo (Noviembre 2005) - Charla de divulgación, realizada en Chillan, en conjunto con Bio Insumos Nativa Ltda. (Chillan, Diciembre 2005) - Reunión asesores de tomate en Colin (Octubre de 2007 y enero de 2008) Reunión Asesores y productores de Cítricos (Jul, 2007) - Reunión asesores de tomate en Quillota (Diciembre de 2007, enero de 2008 y mayo de 2008) - Reunión Equipo técnico huerto Pomarolo (Agricom) (Mayo de 2007 y mayo de 2008) - Reunión equipo técnico Viña el Aroma (Julio de 2008) - Seminario de finalización proyecto (Octubre de 2008)
Boletín de difusión	1 con 500 copias	Boletín de difusión, con resumen de resultados del proyecto e información, sobre biología de nematodos y controladores biológicos en estudio. (En preparación)