



“Evaluación de cepas nativas de la bacteria *Bacillus subtilis* en el biocontrol de enfermedades bacterianas de cultivos hortofrutícolas de importancia regional”

Universidad de Talca
Facultad de Ciencias Agrarias - Fitopatología
Eduardo Donoso, Mauricio Lolas, Cristián Muñoz

ISBN XXX – XXXX - X

Universidad de Talca

Fundación para la Innovación Agraria

La presente publicación reúne y sistematiza un conjunto de información técnica desarrollada por la Universidad de Talca en materia de control biológico de enfermedades bacterianas, incluyendo los resultados obtenidos en el proyecto Evaluación de cepas nativas de la bacteria *Bacillus subtilis* en el biocontrol de enfermedades bacterianas de cultivos hortofrutícolas de importancia regional, realizado entre los años [2002 y 2006] con el apoyo financiero de la Fundación para la Innovación Agraria (FIA).

INDICE

INTRODUCCION	1
CONCEPTO DE ENFERMEDAD	2
ENFERMEDADES BACTERIANAS	3
Enfermedades causadas por bacterias del género <i>Pseudomonas</i>	4
Enfermedades causadas por bacterias del género <i>Xanthomonas</i>	5
Enfermedades causadas por bacterias del género <i>Clavibacter</i>	6
Enfermedades causadas por bacterias del género <i>Erwinia</i>	7
<i>Bacillus</i> Y CONTROL BIOLÓGICO	8
HISTORIA DEL PROYECTO	9
OBJETIVOS DEL PROYECTO	10
ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	11
ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	12
ENSAYOS DE CAMPO	13
Control de Cáncer Bacterial en Cerezo	14
Control de Mancha Bacteriana en Tomate	15
Control de Cáncer Bacterial en Tomate	16
DESCRIPCIÓN Y RECOMENDACIONES DE USO DEL FORMULADO	17
BIBLIOGRAFIA	18

INTRODUCCION

Las enfermedades bacterianas son uno de los problemas fitopatológicos más difíciles de manejar en un cultivo, dado por su alta capacidad de multiplicación cuando existen condiciones medioambientales favorables y la baja disponibilidad de compuestos químicos activos, los que se reducen a sales cúpricas y antibióticos. Estos últimos además altamente cuestionados por sus efectos negativos sobre el medio ambiente y la generación de cepas resistentes no sólo a ellos sino que también en los utilizados para salud humana.

Pese a lo anterior, existen alternativas biológicas para el control de bacterias fitopatógenas, entre los que se cuentan otras bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*. Sin embargo, la mayor parte de los antecedentes existentes a nivel mundial corresponde sólo a ensayos *in vitro* o en condiciones controladas, existiendo pocos realizados en el campo, los cuales se han concentrado para enfermedades bacterianas en cultivos de tomate y brásicas.

Dentro de las enfermedades bacterianas de mayor relevancia en Chile, se encuentran las asociadas a tomate: **Mancha Bacteriana** (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*), **Peca Bacteriana** (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) y **Cancro Bacteriano** (*Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*); a frutales de carozo: **Cáncer Bacterial** (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) y, a papa: **Pudrición Acuosa** (*Erwinia carotovora*).

Es en base a estos antecedentes, que en el año 2002, el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Talca, presenta a la Fundación para la Innovación Agraria el proyecto “Evaluación de cepas nativas de la bacteria *Bacillus subtilis* en el biocontrol de enfermedades bacterianas de cultivos hortofrutícolas de importancia regional” cuya finalidad fue la búsqueda, selección, evaluación y desarrollo de cepas nativas de bacterias pertenecientes al genero *Bacillus*, para el control biológico de enfermedades bacterianas. Después de 3 años de arduo trabajo el equipo de trabajo, obtuvo un formulado pre-industrial de 5 cepas de *Bacillus* spp. y *Brevibacillus brevis*, con alta capacidad para el control de los patógenos en estudio, superando la eficacia de control de los agroquímicos actualmente en uso. Dado lo relevante de estos resultados en el año 2004, la Universidad de Talca firmo un convecino con la empresa Bio Insumos Nativa Ltda. Para el desarrollo industrial y comercialización de este formulado. Así ese mismo año Bio Insumos Nativa Ltda. gano un proyecto FONTEC, para realizar la industrialización y obtención del Registro SAG de este biocontrolador.

Dentro de las actividades del proyecto, como en todas la iniciativas FIA, uno de los aspectos importantes, es la difusión de los resultados obtenidos a los posibles usuarios del conocimiento científico y tecnológico, por lo que elabora el presente documento, que no solo busca entregar en forma sistemática y de fácil comprensión los resultados del proyecto, sino que también aportar con información de las enfermedades bacterianas presentes en Chile, sus síntomas, ciclos y formas de control.

ENFERMEDADES BACTERIANAS



Definición de enfermedad:

La serie de invisibles y visibles respuestas de las células y tejidos de la planta a un organismo patogénico o factores ambientales, que resultan en cambios adversos en la forma, función o integridad de la planta y puede llevar a la muerte de partes o de la planta completa.

Las enfermedades infecciosas, son las causadas por patógenos, que son los agentes bióticos transmisibles que causan enfermedades en plantas. Los patógenos afectan el metabolismo de las células, a través de toxinas, enzimas reguladores de crecimiento y otras sustancias secretadas por estos organismos, o bien por absorber nutrientes para su propio crecimiento desde las células hospedero, donde se encuentran.

Algunos patógenos, también pueden causar enfermedades por multiplicarse en el xilema o floema, entorpeciendo el transporte de agua y nutrientes.

Los organismos causantes de enfermedades en plantas son:

- Hongos
- Bacterias y mollicutes (bacterias fastidiosas)
- Plantas superiores parásitas y algas.
- Virus y viroides
- Nemátodos
- Protozoos

Las enfermedades también pueden ser causadas por factores abióticos que desencadenan enfermedades como por ejemplo:

- Temperatura, exceso o déficit.
- Humedad del suelo, exceso o déficit.
- Luz, exceso o déficit.
- Falta de oxígeno.
- Presencia de contaminantes.
- Nutrientes, exceso o déficit.
- Minerales tóxicos.
- Acidez o alcalinidad del suelo.
- Toxicidad de pesticidas.
- Manejos culturales inapropiados.

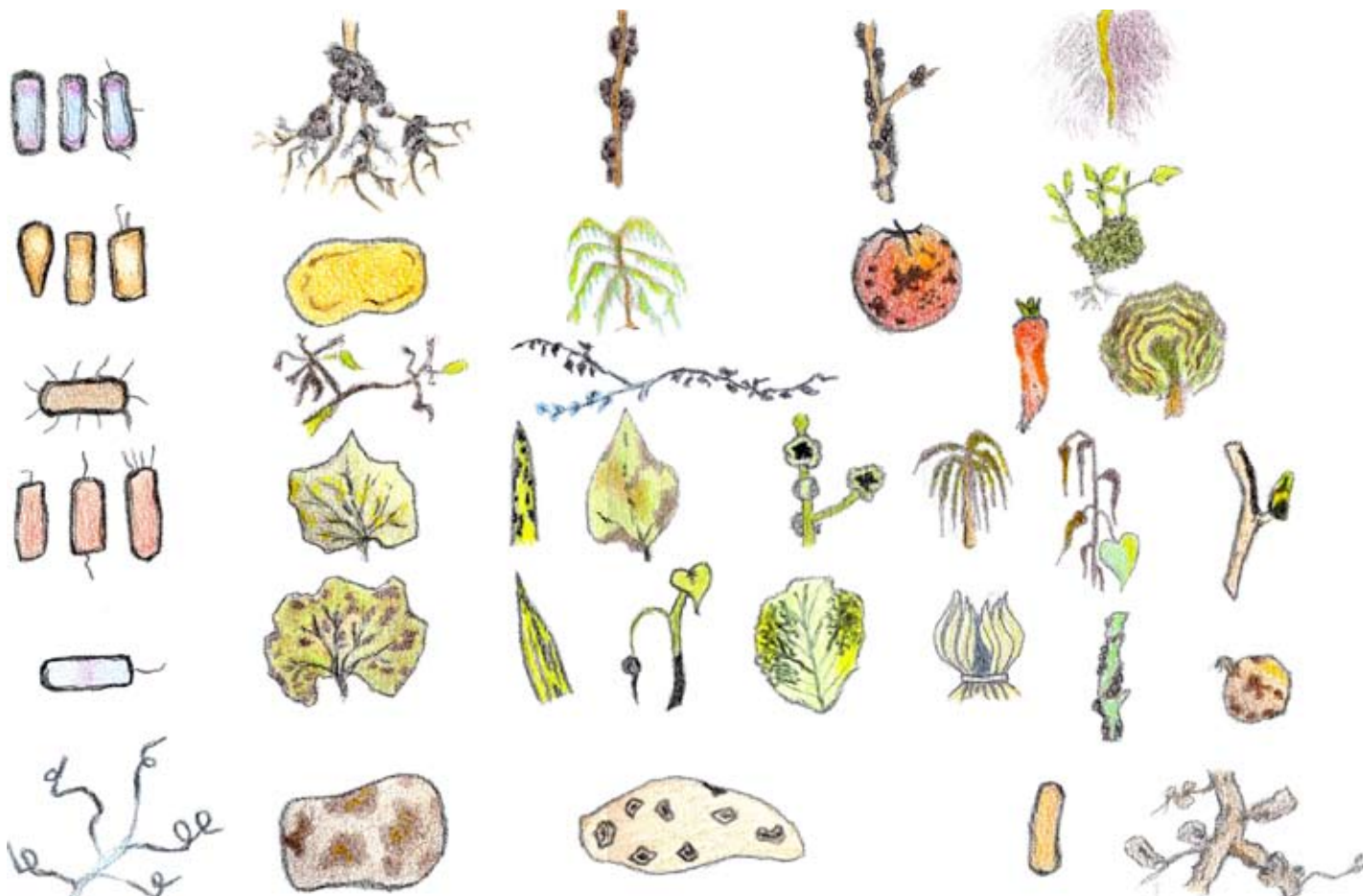


FIGURA 1, Morfología de los 6 géneros bacterianos, capaces de generar enfermedades en plantas y sus respectivos síntomas.

Enfermedades causadas por el género *Erwinia*



FIGURA 2. Efecto de *Erwinia* sobre papas en almacenaje.

Taxonomía

Bacteria gram negativa, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae

Tiene forma de bastón, recto a curvo, de 0,5-1 por 1,0 – 3 micrómetros, son móviles por medio de numerosos flagelos perimetrales. Es la única bacteria fitopatógena, que es anaeróbica facultativa. La mayor parte de las especies de *Erwinia*, poseen una fuerte capacidad pectolítica, que causa pudriciones blandas en plantas.

Pudrición acuosa, pie negro, pudrición blanda y hedionda

Agente causal: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

Erwinia carotovora subsp. *atroseptica* (papa y zanahoria)

Erwinia carotovora var. *chrysantemi* (zanahoria)

Erwinia carotovora subsp. *betavascularum* (remolacha)

Hospedero: Apio, espárrago, papa, zanahoria, remolacha, cala y tabaco.

Síntomas: Papa, Presencia de lesiones necróticas, tejidos acuosos y negros en la base de los tallos. En el follaje se aprecia una marchitez y clorosis, seguida por necrosis foliar y del tejido vascular.

El crecimiento se detiene. En los tubérculos se produce una pudrición acuosa y blanda, donde los tejidos toman un color café oscuro, mucilaginosos y de mal olor, tanto en campo como en almacenaje.

Se favorece con suelos excesivamente húmedos templados a fríos ($T^{\circ} < 20^{\circ} \text{C}$), esto en plantación y luego en de emergencia con temperaturas de $25-20^{\circ} \text{C}$. Además condiciones anaeróbicas tanto en suelo como en almacenaje, así como heridas favorecen su desarrollo.

Apio: Manchas acuosas en la base de los pecíolos, la corona se descompone y da mal olor.

Espárrago: Dos a tres días después de cosecha se observan lesiones acuosas y de mal olor en los turiones, se favorece con temperaturas de $11-28^{\circ} \text{C}$. Zanahoria: Se favorece por temperaturas mayores a 20°C .

Ciclo

Diseminación: Principalmente por traslado de material infectado, por drenaje superficial tanto por lluvia como por riego y a través de maquinaria y herramientas con suelo infectado. En almacenaje algunos insectos la pueden diseminar.

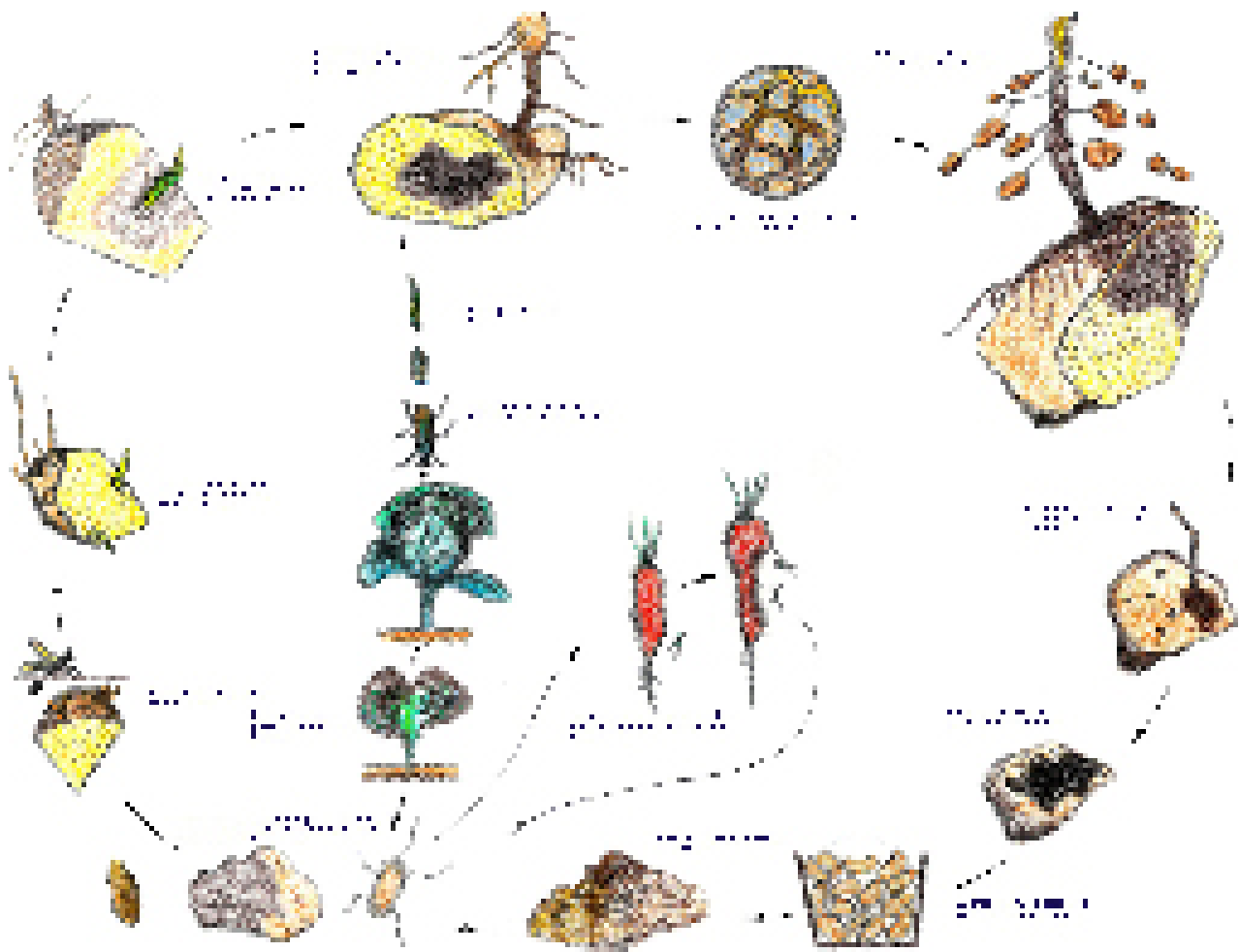
Sobrevivencia: Persiste en tubérculos, tanto interna como externamente. En ausencia de hospederos es capaz de mantenerse en suelos templados y húmedos, por largo tiempo. Es habitante normal del suelo. **Control:** El único control efectivo es utilizar semilla limpia y certificada como libre de bacteriosis. Evitar exceso de humedad, fertilización equilibradamente. Eliminar plantas enfermas. Conservar los tubérculos en baja temperatura 3-5 °C. No existen tratamientos químicos efectivos en cultivo de papa. En apio y zanahoria se recomienda aplicación de cúpricos antes de cosecha e inmersión de las plantas en hipoclorito de sodio (50-100 ppm por 1-5 min.). En espárrago posterior a la cosecha refrigerarlos entre 0 y 1 °C., además de inmersión en hipoclorito de sodio (100-150 ppm, pH 7-8).

Zanahoria: Se favorece por temperaturas mayores a 20 °C.

Ciclo

Diseminación: Principalmente por traslado de material infectado, por drenaje superficial tanto por lluvia como por riego y a través de maquinaria y herramientas con suelo infectado. En almacenaje algunos insectos la pueden diseminar.

Sobrevivencia: Persiste en tubérculos, tanto interna como externamente. En ausencia de hospederos es capaz de mantenerse en suelos templados y húmedos, por largo tiempo. Es habitante normal del suelo. **Control:** El único control efectivo es utilizar semilla limpia y certificada como libre de bacteriosis. Evitar exceso de humedad, fertilización equilibradamente. Eliminar plantas enfermas. Conservar los tubérculos en baja temperatura 3-5 °C. No existen tratamientos químicos efectivos en cultivo de papa. En apio y zanahoria se recomienda aplicación de cúpricos antes de cosecha e inmersión de las plantas en hipoclorito de sodio (50-100 ppm por 1-5 min.). En espárrago posterior a la cosecha refrigerarlos entre 0 y 1 °C., además de inmersión en hipoclorito de sodio (100-150 ppm, pH 7-8).



Enfermedades causadas por el género *Pseudomonas*

FIGURA 4: Síntomas de Cáncer Bacterial cerezos generando canchales en la corteza (sup. izq.) y muerte de yemas (sup. der.) y de Peca Bacteriana en tomate, afectando tallo (Inf. izq) y frutos (Inf. der).



Taxonomía

Bacteria Gram negativa,
Familia Pseudomonadaceae

Son con forma de bastón rectos a curvados, de 0,5 -1 por 1,5-4 micrómetros.

Móviles por 1 o mas flagelos polares. Muchas especies son habitantes comunes del suelo, agua dulce y ambientes marinos. La mayor parte de las especies patógena, lo son para plantas, existiendo muy pocas que afecten mamíferos

la superficie de los foliolos. En fruto se generan manchas necróticas sub superficiales, de color pardo oscuro. En algunos casos se pueden generar lesiones negro oleosas en tallos, pecíolos y pedicelos. Se favorece por ambientes húmedos y temperaturas relativamente bajas (18-24 °C).

Peca bacteriana, mancha bacteriana

Agente causal: *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Sin. P. tomato)

Hospedero: Tomate

Síntomas: En hojas se forma manchas necroticas pequeñas, en cuyo perímetro se desarrolla un prominente halo clorótico, estas lesiones, se puede agrupar afectando un gran porcentaje de

Diseminación: Principalmente por semilla infectada y por salpicado y arrastre tanto por lluvia como por riegos de aspersión. Además es capaz de infectar a través de herramientas y manipulación de las plantas.

Sobrevivencia: Tanto en restos de plantas afectadas, como en la rizósfera de plantas hospederas. Es un habitante común del suelo.

Control: Rotación de cultivos, evitando solanáceas, uso de semilla certificada y desinfectada. Los tratamientos químicos, presentan baja eficacia, pese a lo cual el manejo propuesto para esta enfermedad es:

- Desinfección de semilla con hipoclorito de sodio 1% por 1 min.
- En follaje estreptomycin, óxido cuproso, óxido cúprico y caldo bórdeles, según recomendaciones de los fabricantes.

Cáncer bacteriano en carozos

Agente causal: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Hospedero: almendro, guindo, cerezo, ciruelo, damasco, duraznero y nectarino

Infección: La bacteria puede penetrar por los estomas de las hojas, alcanzando las yemas axilares y la ramilla a través del sistema vascular. Esta penetración es mayor luego de una helada en primavera, cuando un descenso lento de la temperatura forma cristales en los espacios intercelulares, expulsando el aire y concentrando el contenido celular por deshidratación, sin causar la muerte de los tejidos. Al ascender la temperatura se produce el descongelamiento, y por descompresión del material sólido de la célula las gotas de agua sobre la superficie de la hoja son succionadas hacia los espacios intercelulares, arrastrando con ellas a los microorganismos presentes. Otros sitios de infección son las lenticelas en las ramillas, las grietas en las escamas de yemas en latencia, los cortes de poda y las heridas causadas por insectos.

Ocasionalmente la bacteria infecta ramilletes florales y frutos inmaduros. La infección es favorecida por una alta humedad ambiental y temperaturas entre -0.5°C y -2°C , con un rango óptimo para el desarrollo de síntomas de 15°C a 25°C .

Síntomas

La bacteria causa rompimiento de la célula apareciendo heridas cancerosas, con abundante exudación de goma en las bifurcaciones de ramas, base de las yemas y cortes de poda. El área afectada se presenta hundida y más oscura que el tejido sano. Las hojas sobre una región anillada por un cáncer presentan síntomas de falta de nutrientes y al cabo de algunas semanas la ramilla afectada muere. La mayoría de las yemas infectadas en latencia mueren antes de brotar, pero a veces crecen normalmente en primavera para morir a comienzos de verano.

La producción de goma o 'gomosis' no es un síntoma exclusivo del cáncer bacteriano, pudiendo deberse a diferentes causas, como infecciones virales que acentúan el daño causado por otros parásitos y por desbalances hídricos y nutricionales. El exceso de boro (más de 140 ppm en las hojas) provoca la muerte regresiva de ramillas acompañada de exudación de goma. La falta de este elemento (menos de 20 ppm) produce la muerte de yemas a comienzos de primavera. Síntomas similares en verano pueden estar relacionados con una deficiencia de cobre. Un análisis foliar de los árboles, efectuado entre mediados de enero y fines de febrero, permite conocer su estado nutricional.

Al levantar la corteza, se observan tejidos acuosos, necróticos, de color amarillento o café, con abundante goma, límites difusos y olor a fermentación. En ramillas nuevas se produce muerte de yemas. Brotación tardía y desuniforme. Anillado de brazos y ramas por crecimiento de los canchales. Rebrotación de raíces abundante.

En flores se puede producir atizónamiento, con lesiones necróticas con halo clorótico en hojas, incluso produciéndose perforaciones en las hojas.

Diseminación: Principalmente por salpicado y escurrimiento de agua lluvia. También por árboles infectados desde vivero.

Sobrevivencia: En forma epifita en yemas y ramillas, tanto especies cultivadas como de malezas. También es capaz de sobrevivir en canchales activos y en el tejido vascular, de plantas afectadas.

Control preventivo: La estrategia más efectiva para enfrentar el cáncer bacteriano del cerezo radica en contrarrestar los factores predisponentes, aplicando las siguientes medidas:

- Establecer el huerto con plantas sanas. El árbol puede venir infectado desde el vivero por el patrón o yemas con la bacteria. Esta situación se agrava cuando se usa como patrón guindo ácido recolectado directamente desde siembras provenientes de plantas madres silvestres infectadas.

- El exceso de humedad o la falta prolongada de agua y las heladas favorecen la enfermedad. Al escoger sectores con temperaturas invernales moderadas, se debe seleccionar variedades que tengan menores requerimientos de frío para romper el reposo de las yemas y tener una floración uniforme. La plantación en camellones es útil para un mejor control de la humedad y aireación del suelo.

- Podar a comienzos de verano. Desinfectar las herramientas de poda con una solución de hipoclorito al 2%.

- Proteger los cortes inmediatamente después de efectuados usando una mezcla de pintura látex y fungicida para hongos de la madera. En caso de no disponer de fungicida, usar únicamente pintura sola, la que actúa como sellante en la herida. La pintura no debe contener metales pesados porque son fitotóxicos.

- Evitar exceso de fertilizantes, especialmente nitrógeno, y no aplicarlos tardíamente en la temporada, al igual que los riegos, para no promover nuevas brotaciones. Los tejidos nuevos son más propensos a la colonización bacteriana

cuando se presentan las primeras heladas en otoño.

- Mantener el pH del suelo entre 6,0 y 6,5 para un mejor crecimiento de las raíces y vigor del árbol. En la fertilización nitrogenada se debe preferir fuentes neutras de este elemento, como nitrato de amonio cálcico, a otros de reacción fuertemente ácida, como el fosfato di-amónico, el sulfato de amonio y la urea. En un huerto establecido no es posible corregir mediante encalado la acidez en torno a las raíces. En esa situación debe utilizarse fertilizantes de reacción básica, como nitrato de calcio, nitrato de potasio y salitre.

- Controlar posibles ataques de nemátodos que puedan debilitar la planta.

- El control químico se basa en la aplicación preventiva de productos cúpricos en otoño (caída de hojas) y salida de invierno, antes de yema hinchada. Esta práctica protege de una infección inicial, pero no impide el avance de la enfermedad una vez que la infección ha ocurrido. La efectividad de este tratamiento es reducida por la aparición de resistencia en el patógeno, al igual que con el uso de antibióticos, como la estreptomina.

Tizón bacteriano de la flor

Agente causal: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Hospedero: Peral

Síntomas: En flores, hojas y brotes se produce una necrosis rápida, adquiriendo los tejidos afectados, un aspecto atizado, similar al daño de helada. Necrosis parcial o total en yemas, pérdida de flores y disminución importante de la producción. En frutos inmaduros se pueden formar manchas necróticas de un color café oscuro con un halo rojizo. No afecta tejido lignificado. Condiciones predisponentes son dadas por temperaturas bajas (0-12 °C) y abundante agua libre (lluvias, rocíos y neblinas) durante la floración. Las heladas aumentan la incidencia. En condiciones no predisponentes solo afecta flores.

Diseminación: Principalmente por salpicado y escurrimiento de agua lluvia. Algunos insectos polinizantes pueden transportar la enfermedad entre flores.

Sobrevivencia: En forma epifitas en yemas y ramillas, tanto de perales como de otras especies cultivadas y malezas.

Control: Evitar malezas, en los primeros años del huerto.

Los tratamientos químicos recomendados son:

- Compuestos cúpricos en yema hinchada.
- Compuestos cúpricos y estreptomina en floración.

Mancha angular

Agente causal: *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*.

Hospedero: cucurbitáceas, en especial pepino y melón.

Síntomas: En el follaje aparecen, manchas angulosas y pequeñas, acuosas o necroticas, las que normalmente están limitadas por las nervaduras secundarias o terciarias. Manchas similares aparecen en pecíolos, tallos y frutos. Desarrollo de perforaciones en las hojas, parecido al tiro de munición. La enfermedad se ve favorecida por temperaturas entre 20 y 27°C, bajo lluvia, riego por aspersión o humedad relativa superior al 95%.

Diseminación: Por el agua del salpicado de lluvia y drenaje superficial, por semilla contaminada y en menor medida por labores de cultivo

Sobrevivencia: En suelo en restos de plantas infectadas por 1 a 2 años y en semilla.

Control: Rotación de cultivos, uso de semilla certificada y desinfectada. Los tratamientos químicos, presentan baja eficacia, pese a lo cual el manejo propuesto para esta enfermedad es :

- Desinfección de semilla con hipoclorito de sodio 1% por 1 min.
- En follaje estreptomina, óxido cuproso, óxido cúprico y caldo bórdeles, según recomendaciones de los fabricantes.

Tizón bacteriano de la flor en arándano

Agente causal: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Hospedero: Arándano

Síntomas: Se produce una marchitez y necrosis, rápida en hojas, flores y brotes, lo que le da un aspecto atizonado a las ramillas.

Diseminación: Por salpicado y escurrimiento de agua lluvia.

Sobrevivencia: En forma epifitas en plantas cultivadas y malezas.

Control: Aplicación de compuestos cúpricos previo a la brotación.

Necrosis vascular

Agente causal: *Pseudomonas corrugata*.

Hospedero: Tomate

Síntomas: Marchitez y amarillamiento del follaje, iniciándose en las hojas basales. Aparición de estrías negras y canchales en tallos. Los tallos toman una consistencia esponjosa, con ahuecamiento de estos. El tejido vascular se necrosa y proliferan las raíces adventicias. Se favorece en ambientes templados y húmedos.

Diseminación: No se ha determinado la forma de dispersión, pero se cree que puede ser por uso de herramientas infectadas, por el riego o en semillas o almácigos infectados.

Sobrevivencia: Presumiblemente en suelo infectado o residuos de plantas que queden sobre el suelo.

Control: Eliminación de plantas enfermas inmediatamente detectadas, evitar desbalances de fertilización, en especial excesos de nitrógeno. Utilizar semilla y almácigos sanos.

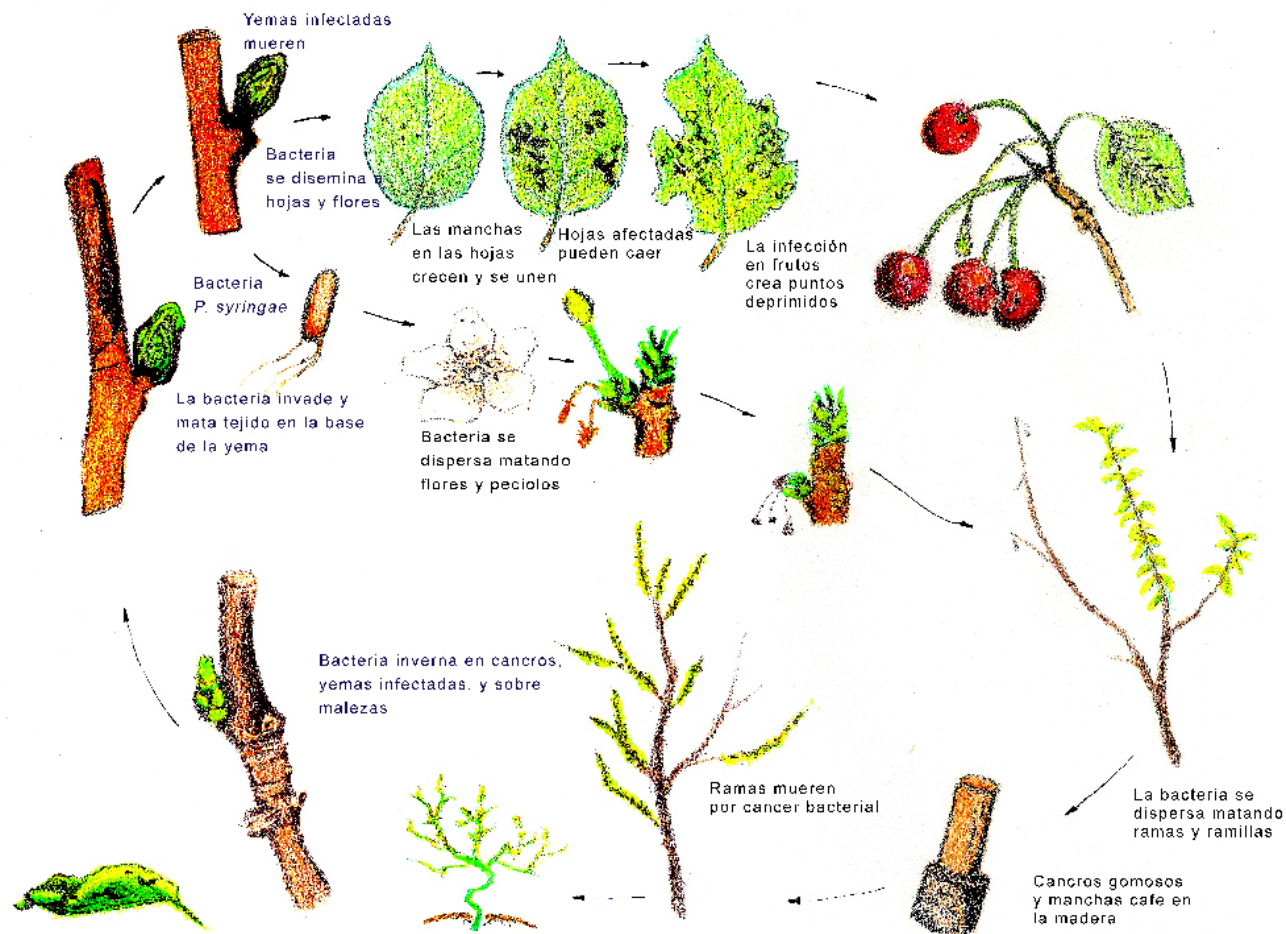


FIGURA 5, Ciclo de *Psuedomonas syringae* pv *syringae*, en cerezos.

Enfermedades causadas por el género *Clavibacter*



FIGURA 6. Síntomas de Cáncer Bacterial en tomate, evidenciado por canchros en los tallos (Izq.) y tejido vascular necrosado (Der.)

Taxonomía

Thallobacteria gram positiva

Biología: Células con forma de bastón recta o ligeramente curvadas, de 0,5-0,9 por 1,5- 4 micrómetros. Normalmente no móviles.

Cancro bacteriano en tomate

Agente causal: *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*

Hospedero: Tomate

Síntomas: Marchitez, clorosis y desecación del follaje, normalmente parte por un solo lado, para luego afectar toda la planta. En tallos se producen canchros abiertos, precedidos por estrías blancas. El tejido vascular toma una tonalidad amarillenta y se necrosa. En frutos ocasionalmente, se producen pequeños canchros rodeados por un halo blanquecino. La infección se produce en forma sistémica por el tejido vascular, infectando así las semillas. Se favorece en ambientes cálidos (24-27° C) y húmedos.

Diseminación: Por semilla, labores de cultivo especialmente preparación de almácigos, podas, deshojes, desbrotes e injertación.

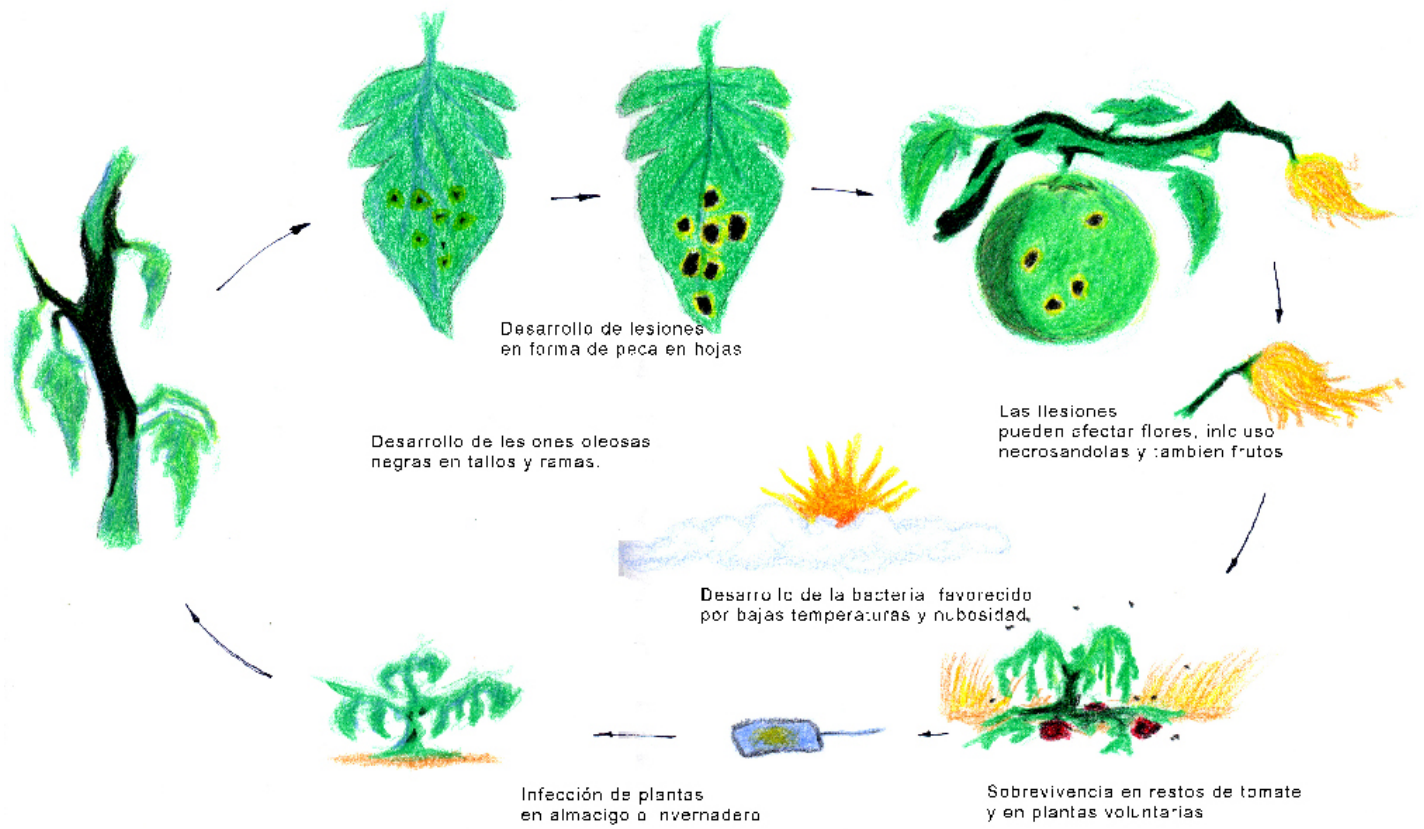
Sobrevivencia: En semilla infectada, residuos

de tomates enfermos y plantas voluntarias, es saprofito facultativo.

Control: Rotación de al menos un año libre de tomate. Uso de semilla y almácigos certificados y desinfectados. Desinfectar utensilio en solución desinfectante en base a yodo o hipoclorito de sodio al 1%.

Tratamientos químicos:

- En semilla, desinfección por agua caliente 50 °C por 30 min.; 52 °C por 25 min o 56 °C por 20 min. Adicionalmente hipoclorito de sodio al 1% por 40 min.; fermentación de la pulpa durante la extracción de la semilla por 76-96 hrs.
- Al follaje. Estreptomina, hidróxido de cobre, oxicloruro de cobre y caldo bórdeles, según recomendación del fabricante.



Enfermedades causadas por el género *Xanthomonas*



FIGURA 8, Síntoma de Mancha Bacteriana en fruto de tomate.

Taxonomía

Gram negativa familia Pseudomonadaceae

Biología: Células con forma de bastón rectas 0,4-1 por 1, 2-3 micrómetros. Son móviles por medio de un flagelo polar. Todas las especies patogénicas son encontradas únicamente en asociación con plantas o material vegetal.

Mancha bacteriana, tizón bacteriano o sarna bacteriana en tomate

Agente causal: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Hospedero: Tomate

Síntomas: Manchas acuosas o necroticas pequeñas, redondas, rodeadas por un halo

necrotico, tanto en folíolos como en tallos. Estas lesiones se juntan, necrosando buena parte del área foliar. En frutos inmaduros, aparecen pequeñas lesiones necroticas, rodeadas por un halo acuoso. Es una enfermedad frecuente en zonas con periodos cálidos (24-30 °C) y lluvias. El ambiente húmedo y la temperatura entre 25 y 30 °C, con un óptimo de 27 °C favorecen el desarrollo de la enfermedad. En las condiciones centroamericanas, la época lluviosa o la de sequía con riego por aspersión, son condiciones apropiadas para el desarrollo de la mancha bacteriana. El patógeno se disemina por el viento húmedo y por salpique de la lluvia; se introduce en las hojas a través de estomas y heridas y en los frutos, por estas últimas.

La bacteria sobrevive en el suelo en asocio con residuos de cosecha por 3 o 6 meses y en plantas de chile o tomate que persisten en los campos de cultivo por más de doce meses. También puede sobrevivir como epífita de las raíces o de las partes aéreas de las plantas remanentes de cosechas anteriores o en hospedantes secundarios, principalmente solanáceas y brasicáceas silvestres. Como saprófito del suelo, muere a los cinco meses. Una fuente importante de inóculo primario es la semilla, ya que la bacteria puede persistir allí por períodos de 10 años, aún en semillas secas. Sin embargo, la importancia en la epidemiología de la semilla contaminada es relativamente desconocida.

El patógeno presenta una gran variación en su población bacterial, la cual se expresa en términos de razas fisiológicas, que tienen como fundamento la interacción entre los genes que confieren virulencia a *X. e. vesicatoria* y los genes que confieren resistencia en genotipos específicos de chile y tomate. En tomate se conocen tres razas denominadas T1, T2, T3 no patogénicas al chile, complementariamente las razas P0, P1, P2, P3, P4, P5 y P6 atacan sólo al Chile.

Diseminación: Por salpicado y arrastre de agua lluvia o de riego por aspersión. También se transmite por semilla infectada.

Sobrevivencia: En semilla infectada, residuos de tomates enfermos y plantas voluntarias, es saprofito facultativo.

Control: Rotación de al menos un año libre de tomate. Uso de semilla y almácigos certificados y desinfectados.

Tratamientos químicos, son poco efectivos, recomendándose los siguientes:

- En semilla, desinfección por hipoclorito de sodio al 1% por 1 minuto.
- Al follaje. Estreptomina, hidróxido de cobre, oxiclورو de cobre y caldo bórdeles, según recomendación del fabricante.

Peste negra del nogal

Agente causal: *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (*Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*; *Xanthomonas juglandis*).

Hospedero: Nogal

Síntomas: Los amentos se ennegrecen parcial o totalmente. Las inflorescencias hembras presentan lesiones necroticas en el estigma. En los foliolos se desarrollan machas necroticas en los bordes, afectando el crecimiento de estos. Las nueces en un primer momento presentan lesiones acuosas, las que se necrosan y ennegrecen la nuez. Infecciones posteriores al endurecimiento de la cascara, solo afectan superficialmente. En ramillas se producen lesiones cancrasas. Se favorece con lluvias frecuentes y temperaturas moderadas.

Diseminación: Por salpicado y escurrimiento de agua lluvia. Por polen infectado y posiblemente por insectos.

Sobrevivencia: Epifitamente en yemas y ramillas tanto de nogal como de malezas. Además de sobrevivir en los canchros de las ramillas nuevas.

Control: Podar ramillas enfermas y eliminarlas de huerto.

Tratamientos químicos:

- En amentos recién expuestos y bajo condiciones favorables, también en inicio y 50% de flores pistiladas abiertas y luego continuar según condiciones. Los productos recomendados son estreptomina, kasugamicina, oxiclورو de cobre y oxido de cobre. Suprimir el uso de antibióticos en floración y cuaja.

Mancha angular de las Brasicas

Agente causal: (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*).

Hospedero: Brócoli, coliflor, nabo, repollo, rábano, repollo chino y repollito de Bruselas.

Síntomas: Lesiones necroticas y cloroticas en forma de **V**, con márgenes cloroticos difusos. Las venas de hojas y tallos, se marchitan y ennegrecen, con el tiempo la enfermedad se vuelve sistémica, apareciendo anillos vasculares necroticos. Se favorece con temperaturas cálidas (28 -30 °C).

Diseminación: Por salpicado y arrastre de agua de lluvia y riego. En semilla infectada, almácigos enfermos y en maquinaria o utensilios infectados. Posiblemente labores de suelo y algunos insectos podrían transportar la enfermedad.

Sobrevivencia: Internamente en semilla infectada, residuos de cultivos enfermos y epifitamenté, pudiendo persistir hasta 2 años en suelo, asociado a restos de plantas. Es invasor de suelo.

Control: Uso de semilla y almácigos certificados y desinfectados. Rotación con un mínimo de 2 años libre de brasicas. Eliminar completamente residuos de plantas, por aradura profunda. Controlar malezas crucíferas. Disminuir al máximo las labores del cultivo.

Tratamientos químicos:

- En semilla, inmersión en 1 hora en estreptomycina, luego enjuagar y sumergir en hipoclorito de sodio (0,5%) por 30 minutos, enjuagar y sembrar.

- Al follaje. En presencia de síntomas o condiciones predisponentes, kasugamicina, hidróxido de cobre, oxiclورو de cobre y caldo bórdeles, según recomendación del fabricante.

Bacteriosis del avellano

Agente causal: *Xanthomonas campestris* pv. *corylina* (*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*, *Xanthomonas corylina*)

Hospedero: Avellano

Síntomas: Los síntomas varían dependiendo si se producen en vivero o en huerto. En vivero, los brotes de mas de 1 año muestran decaimiento y necrosis en sus ápices, mientras que las hojas desarrollan manchas, esto en primavera posterior a la brotación. A medida que la bacteria se mueve hacia abajo en el árbol, las ramas van marchitándose, y generando canchros de 10-25 cm de longitud. Necrosis cafésosa se desarrolla en los puntos de intersección de los brotes. Esta necrosis puede terminar anillando el brote y matándolo consecuentemente.

Las ramillas nuevas, muestran lesiones oleosas, partiendo en la punta, diseminándose rápidamente a la base de estos. Yemas bajo la zona necrotica, se desarrollan anormalmente, los brotes debajo de la zona necrótica se desarrollan anormalmente, dando un aspecto espeso característico.

Las hojas muestran numerosas lesiones poligonales, aceitosas, las que pueden converger y generar la caída prematura de la hoja.

En huerto, las lesiones en brotes y yemas, así como los canchros, se desarrollan igual que en vivero, mientras que las lesiones en hojas son raras. Los frutos muestran el "Talón negro" el que genera una necrosis cafésosa tanto en la cáscara como en la almendra, la que es cubierta con una película bacteriana. Lesiones oleosas de 3 a 7 mm. algunas veces se desarrollan en el fruto antes de lignificación.

Diseminación: La principal forma de diseminación es a través de material vegetal, en vivero. El potencial de dispersión natural es bajo. Semillas provenientes de árboles infectados, pueden producir plántula infectadas.

Sobrevivencia: Puede sobrevivir hasta 4 meses en hojas caída, pero no resiste el invierno. La infección de brotes ocurre durante el crecimiento vegetativo y son la principal fuente de inóculo en primavera.

Control: Eliminación de material infectado y producción de plantas de vivero sanas, son las únicas medidas de control disponibles.

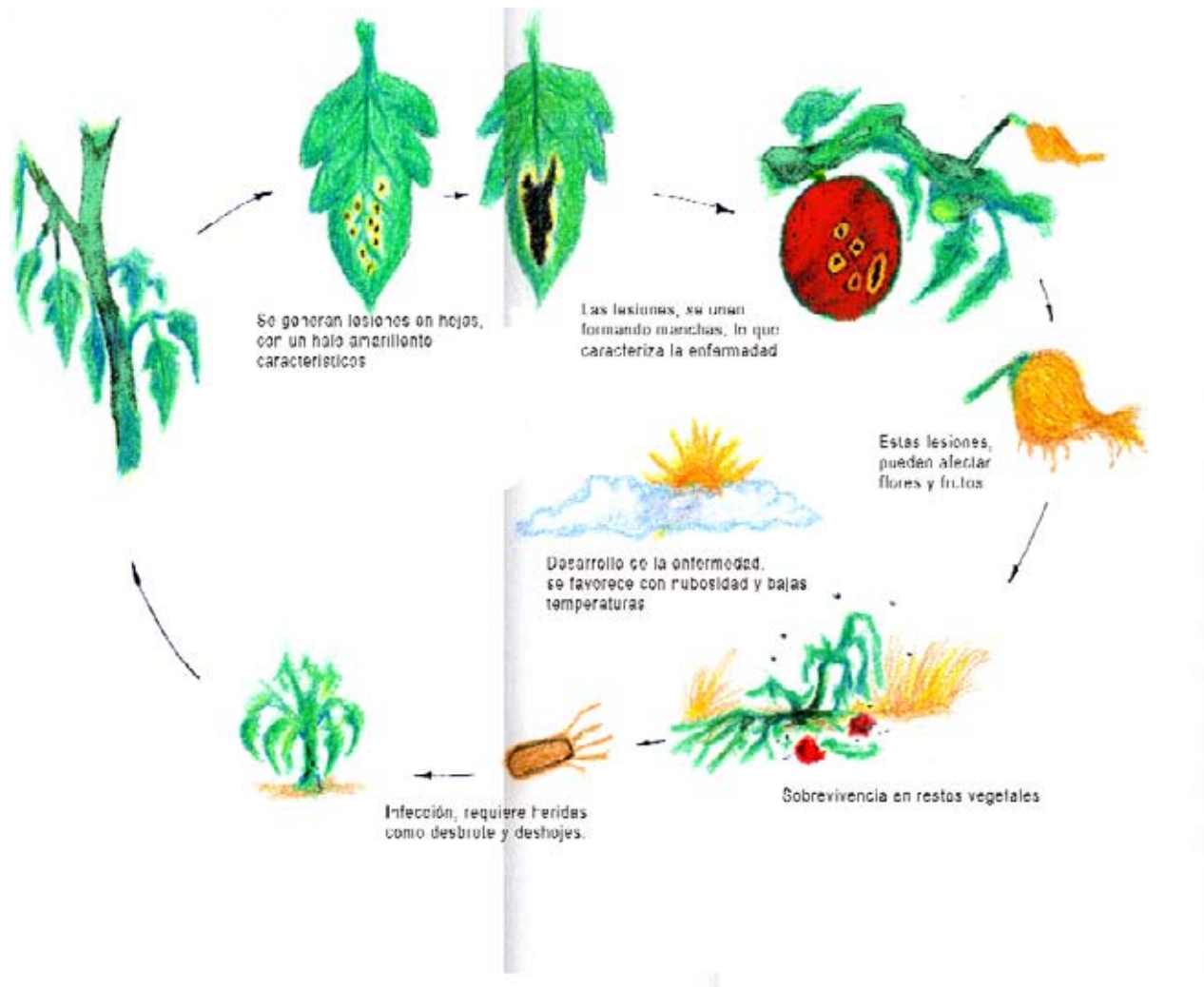


FIGURA 9, Ciclo de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* causante de mancha bacteriana en tomate

Control Biológico de fitopatógenos bacterianos en cultivos, con *Bacillus* spp.

Las bacterias de genero *Bacillus*, son una grupo extremadamente diverso, que incluye bacterias patógenas como el anthrax (*Bacillus anthracis*) así como también, varias especies usadas para sintetizar antibióticos. Las esporas de *Bacillus*, dada su alta resistencia a la temperatura y desinfectantes, son usadas como test de esterilización. Además se utilizan en detergentes, enzimas para bioprocesos industriales y control biológico de plagas y enfermedades destacando en el primer caso *Bacillus thuringiensis* y en el segundo *Bacillus subtilis*, ambos con productos comerciales disponibles tanta a nivel mundial como en Chile.

Los *Bacillus*, exhiben un amplio rango de habilidades fisiológicas, que le permiten vivir en una alta diversidad de habitats, incluyendo muchos ambientes extremos, como desiertos de arena, aguas termales y suelos árticos. Especies de este genero pueden ser termofilicas (resistentes a temperatura), psicrofilicas (resistentes a frío), acidofilicas (resistentes a acidez), alkalifilicas (Resistentes a pH elevados) y halofilicas (resistentes a salinidad) y son capaces de crecer a pH valores, temperaturas y concentraciones de sal donde pocos otros organismos son capaces.

Debido a su diversidad metabólica, las bacterias del genero *Bacillus*, son capaces de colonizar diversos habitats, lo que va desde suelo a insectos y humanos. *Bacillus thuringiensis* parásita insectos y es el principal agente de control biológico a nivel mundial.

Aunque los *Bacillus* mejor conocidos, son los patogénicos, la mayoría de las especies, son saprófitos que se desarrollan en material orgánica en descomposición. Otros como *Bacillus subtilis*, habitan la rizosfera, asociados a las raíces de plantas.

Se ha demostrado que *Bacillus subtilis* entra en conducta caníbal, en casos extremos de sobrevivencia, para supervivencia en ambientes

hostiles, los *Bacillus* pueden formar endosporas, pero esto es altamente demandante en energía, por lo que una vía mas fácil es producir antibióticos, que matan a su vecinos y liberan nutrientes para los supervivientes

El manejo de de patógenos en la agricultura a través del uso de controladores biológicos, es de principal importancia, dados los cuestionamientos sobre los pesticidas convencionales, tanto por su efectos sobre la salud humana como el daño medioambiental que provocan (Spurrier, 1990; Mendgen et al. 1992). Por otra parte las prácticas de manejo de bacterias fitopatógenas, en base a bactericidas químicos, no han dado buenos resultados, así tanto compuestos cúpricos, como la combinación de estos con ethylenebis-dithiocarbamate (EBDC) no logran un control adecuado de la enfermedad cuando existen condiciones predisponentes (Chellemi et al., 1992; Dillard et al., 1991, 1993). Los antibióticos, con una alta tasa de uso en los cultivos de tomate de Chile, no presenta una buena alternativa por las existencia de poblaciones bacterianas resistentes (Minsavage et al., 1990; Ritchie and Dittapongpitch, 1991). Sumado a lo anterior, se ha documentado la aparición de casos de resistencia en la mayoría de las especies de bacterias fitopatógenas, con una rápida y amplia diseminación, ya que normalmente los genes de resistencia se presentan en plasmidos que pueden ser fácilmente transferidos a otros individuos (Ritchie and Dittapongpitch 1991). La resistencia a estreptomycin (Ritchie and Dittapongpitch 1991; Basim, 1999; Scheck, 1996) y tetraciclina, así como a cobre (Vargas, 1998, 1995), usados principalmente en huertos de frutales, se ha esparcido entre patógenos de plantas y bacterias asociadas a ambientes de viveros y huertos. Los determinantes de la resistencia de estas bacterias son muy similares con aquellos encontrados en patógenos clínicos humanos, indicando que las plantas podrían servir de reservorio de resistencia a antibióticos de uso humano (Sundin, 2000).

Actualmente hay mucha información sobre el control biológico de fitopatógenos de origen micótico pero no de bacterias fitopatógenas. Con estos últimos microorganismos se han realizado estudios *in vitro* para lo cual se han utilizado especies *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Clavibacter michiganensis* (Raupach, 2000), *Pseudomonas syringae* pv *syringae* (Pal Bais, 2003) y *Erwinia carotovora*, (Bernal, 2002; Sankar, 1996), logrando buenos niveles del control de los patógenos al compararse con antibióticos sintéticos.

Varias especies de *Bacillus*, especialmente *B. subtilis*, son conocidas por producir una variedad de sustancias antimicrobianas, involucradas en la supresión de enfermedades (Schreiber et al., 1988; Buchenauer, 1998; Wulf. et al., 2002).

En ensayos en condiciones de campo, solo se han realizado para el control de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Utkhede, 2004) y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

(Massomo, 2004), *X. c.* pv. *vesicatoria* (Byrne, 2005) siendo en todos los casos especies del genero *Bacillus*, con predominancia de *Bacillus subtilis*.

Existen numerosos estudios de control biológico, utilizando bacterias no patógenas, sobre diversos patovares de *Xanthomonas* a nivel *in vitro* o en condiciones de invernadero (controladas), pero existen escasos trabajos a nivel de campo. Hasta el momento se han realizado estudios sobre el control de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* en repollo utilizando *B. cereus*, *B. lentimorbus* y *B. pumilus* (Massomo et. al 2004) además del trabajo de Byrne et. al (2005) quien reporto el control de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* con cepas de *Cellulomonas turbata* BT 1 y *Pseudomonas syringae*.

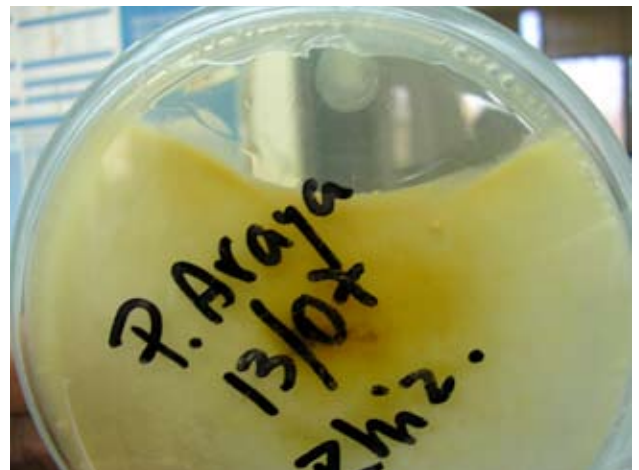
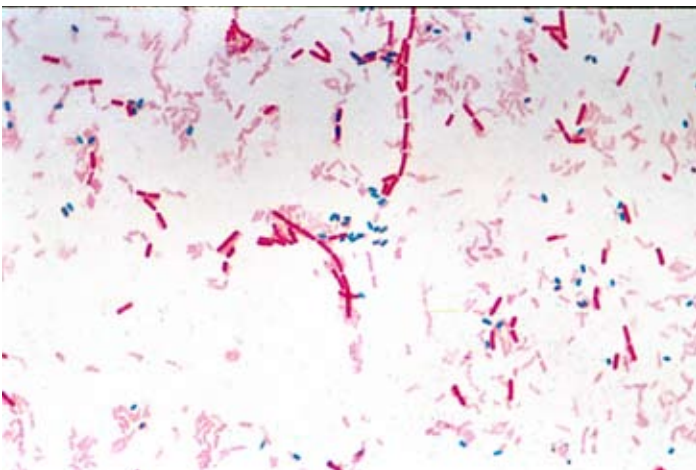


FIGURA 10. Esporas (verdes) y células vegetativas (rojas) de *Bacillus subtilis* (Der.) Y su efecto inhibitorio sobre *Rhizoctonia solani*.

INVESTIGACIÓN REALIZADA POR UNIVERSIDAD DE TALCA

El laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Talca, se adjudicó el año 2002, el proyecto titulado “Evaluación de cepas nativas de la bacteria *Bacillus subtilis* en el biocontrol de enfermedades bacterianas de cultivos hortofrutícolas de importancia regional”, financiado por la Fundación para la Innovación Agraria.

Los objetivos de este proyecto fueron en general: Evaluar la capacidad biocontroladora de cepas nativas de bacterias del género *Bacillus* recolectadas en la VII Región, para enfermedades bacterianas en cultivos agrícolas de importancia regional.

Para lograr lo anterior el proyecto constó de 4 etapas, las que fueron prospección y aislación, evaluación *in vitro*, evaluación *in vivo* y desarrollo de sistema de producción y transferencia.

ETAPA I: Prospección y aislación de cepas nativas de *Bacillus* spp.

La recolección de cepas se realizó abarcando distintos ecosistemas naturales, así como predios agrícolas. El área de recolección abarcó todas las reservas de CONAF de la Séptima Región, y otras zonas de vida silvestre tanto en cordillera, valle central, secano interior y costero y costa, entre las regiones Metropolitana y VIII. Los predios agrícolas, tanto orgánicos como convencionales de hortalizas, frutales y cultivos anuales.

Para la obtención de colonias puras de *Bacillus*, se utilizó el protocolo de Cook (1989), de *Bacillus* mediante test de Gram y morfología celular.

Una vez identificadas las cepas a nivel de género, se realizaron pruebas de bioactividad, lo que permitió seleccionar 5 cepas, las que fueron identificadas mediante morfología, test bioquímicos y PCR de 16S ribosomal. Siendo estas cepas mostradas en el cuadro 1, indicando origen e identificación.

ETAPA II: Evaluación *in vitro*.

Esta etapa permitió la selección de las cepas con mayor capacidad de inhibición a nivel de laboratorio, se realizaron 3 tipos de test para determinar actividad, concentración mínima inhibitoria, depredación y compatibilidad de cepas. Esto entregó una selección de las 5 mejores cepas por patógeno.

Selección de cepas de *Bacillus*, con capacidad inhibitoria de bacterias fitopatógenas.

Cada cepa fue evaluada para cada patógeno, determinándose aquellas con actividad alta, media, baja y nula, en relación a la consistencia de halo de inhibición en las repeticiones efectuadas. De las 170 cepas evaluadas, 81 presentaron algún nivel de actividad inhibitoria para alguno de los patógenos, lo que implicaría un alto porcentaje (47%). En la figura 11 se aprecia el detalle del efecto inhibitorio de una cepa de *Bacillus* sobre un cultivo de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, causante del cáncer bacterial en carozos.

Por su parte en el cuadro 1, se indican la procedencia de las cepas seleccionadas, los patógenos sobre los que actúa cada una y la especie a la que pertenecen. Estas cepas fueron caracterizadas además por las concentraciones mínimas, expresadas como UFC/ml, donde UFC corresponde a las unidades formadoras de colonias de las bacterias, que se asume que es una célula. Esto es un buen indicador de la actividad de

cada una de las cepas, lo que se detalla en el cuadro 2.

Durante los ensayos de inhibición, se detecto una forma no conocida de control de *Bacillus*, sobre los patógenos, correspondientes a los géneros *Xanthomonas*, *Pseudomonas* y *Clavibacter*, que como se ve en la figura 2, las cepas de *Bacillus* (líneas blancas), son capaces de crecer y eliminar

al patógeno, en este caso *Xanthomonas* (líneas amarillas), lo que de darse en condiciones de campo, significaría que estos biocontroladores podrían erradicar al patógeno.

Otra de las pruebas que se realizo, fue determinar la capacidad de sinergismo o antagonismo entre las cepas de *Bacillus*, sobre su acción sobre los patógenos. Como se ve en el gráfico 1, las

Cuadro 1, Origen, especie y patógeno, sobre el que actúa cada una de las 5 cepas de *Bacillus* y *BreviBacillus*, seleccionadas.

Cepas	Patógeno	Especie	Origen
Maguellines 2	<i>Clavibacter</i>	<i>Brevibacillus brevis</i>	Constitución Muelle
Vilcún	<i>Clavibacter</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Vilcún (Altos de Lircay)
Antumavida	<i>Clavibacter</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Laguna Torca
Maguellines	<i>Erwinia</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Constitución Muelle
Mallerauco	<i>Clavibacter</i> , <i>Xanthomonas</i> y <i>Pseudomonas</i> <i>Erwinia</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Enladrillado

Cuadro 2, Concentraciones mínimas inhibitorias, alcanzadas por 5 cepas de *Bacillus* spp. sobre cuatro bacterias fitopatógenas.

LUGAR	<i>Clavibacter</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Pseudomonas</i>
Maguellines 2	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶
Vilcun	10 ⁶	10 ³	10 ⁶	10 ⁵
Antumavida	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ³
Mallerauco	10 ⁵	10 ³	10 ⁴	10 ²
Maguellines	10 ⁶	10 ⁶	10 ³	10 ⁶
Serenade ®	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁶

GRÁFICO 1, Actividad de las cepas de *Bacillus* y sus mezclas, sobre cuatro bacterias fitopatógenas, expresada como mm de diámetro de inhibición.

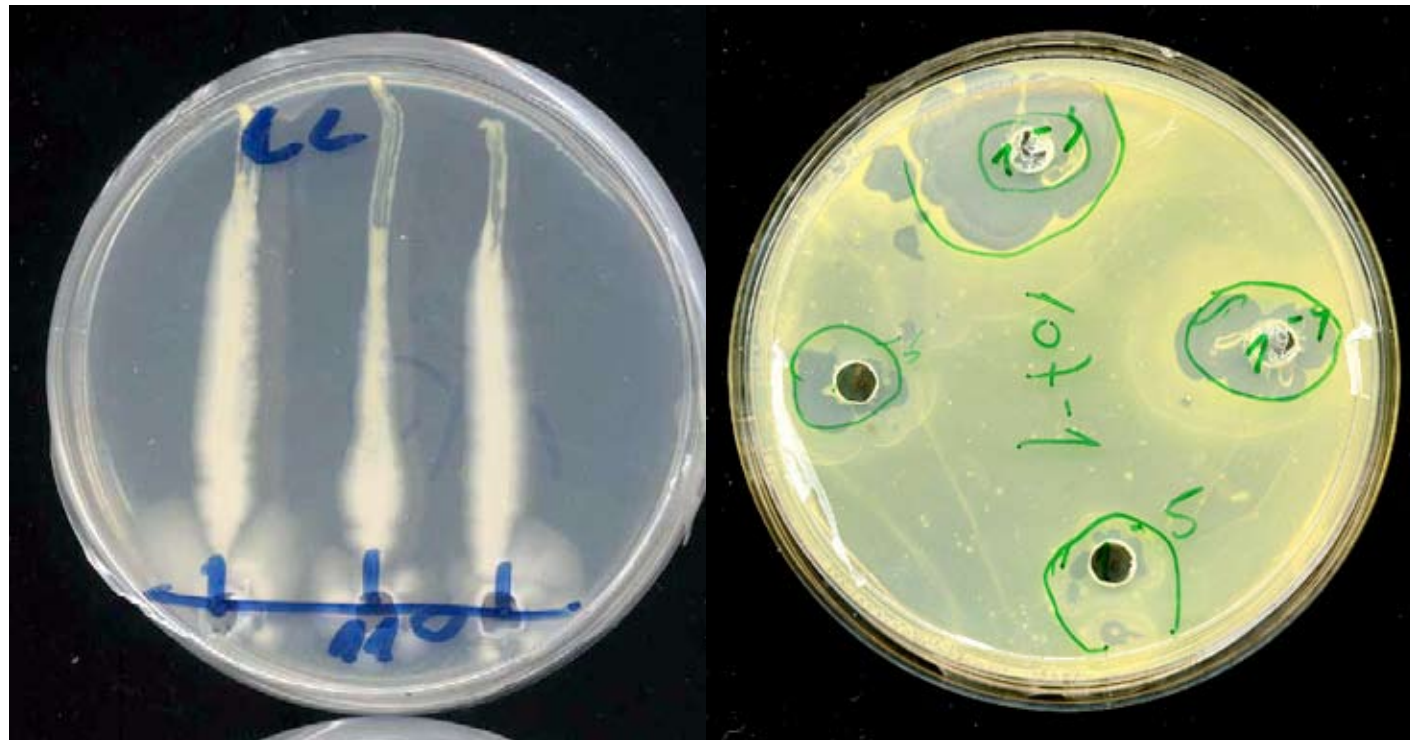
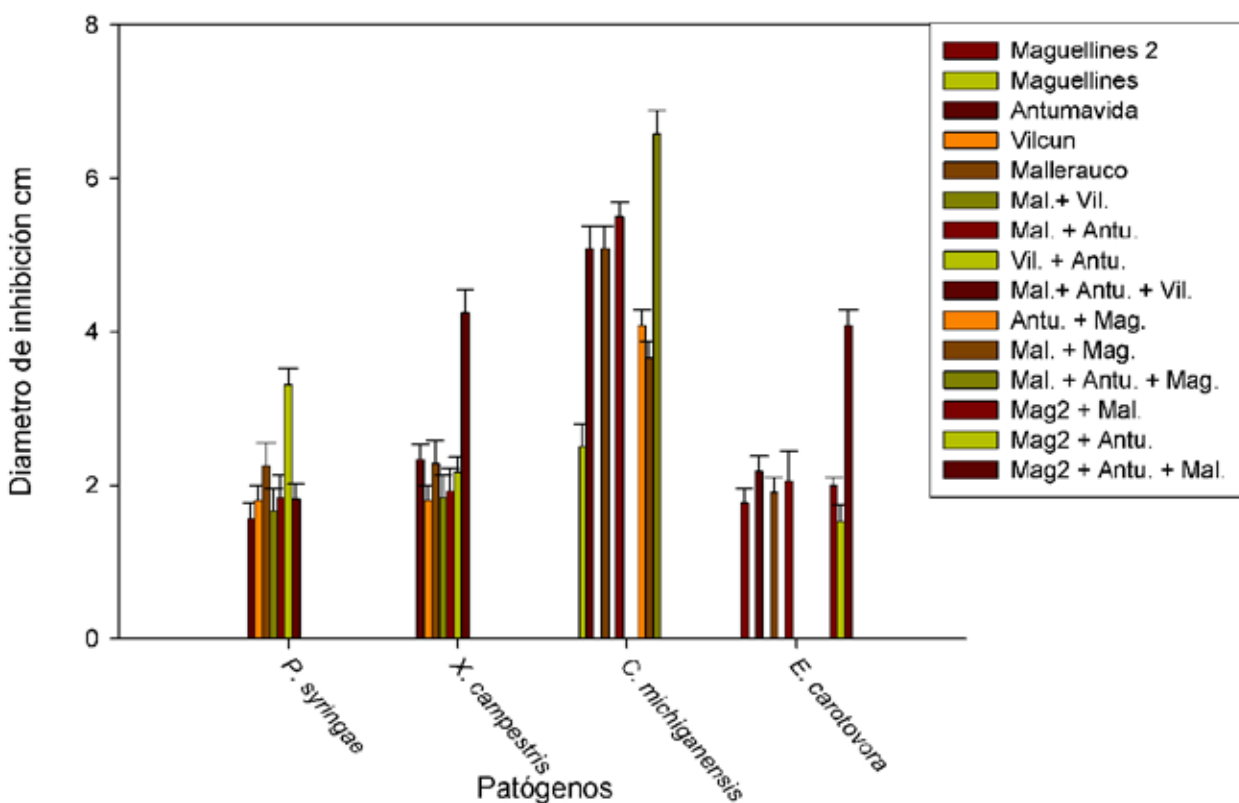


FIGURA 11. Formas de acción de *Bacillus* spp. sobre bacterias fitopatógenas. Inhibición (Der.) y depredación (Izq.)

ETAPA III: Ensayos *in vivo*.

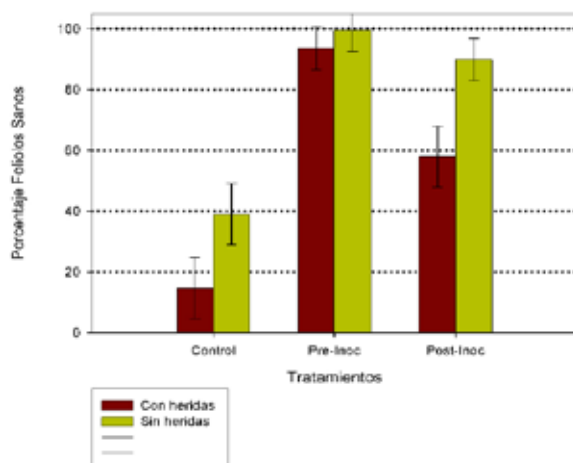
En esta etapa con la mejor combinación de cepas, obtenidas para cada patógeno, se realizaron pruebas sobre plantas tanto en condiciones controladas como en predios comerciales, permitiendo así validar los resultados de los ensayos *in vitro*.

Ensayo: Evaluación *in vivo* de la capacidad biocontroladora de las cepas de *Bacillus* en cultivos de tomate, inoculados con las bacterias fitopatógenas

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* **Mancha Bacteriana del Tomate**

En el gráfico 2, se aprecia el efecto de aplicaciones de *Bacillus* sobre plantas de tomate inoculadas con la bacteria fitopatógena. El porcentaje de folíolos afectados por la mancha bacteriana fue significativamente mayor en los testigos inoculados en relación a los tratamientos que incluyeron aplicaciones de *Bacillus*. Lo anterior confirma la efectividad de las cepas de *Bacillus* en el biocontrol de la bacteria *X. campestris* en tomate. En cuanto a la severidad (Fig. 5), se aprecia que el mejor resultado lo dio la aplicación preventiva en ausencia de heridas

GRÁFICO 2, Efecto de control de *Bacillus* sobre Mancha bacteriana expresado como porcentaje de folíolos sanos.

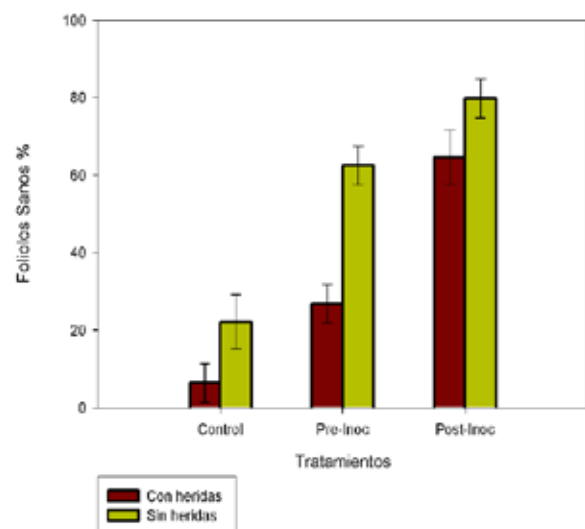


Los resultados indicaron que un mayor porcentaje de folíolos sanos se lograban al aplicar las cepas de *Bacillus* previo a la inoculación, sugiriendo que éstas deben estar presentes antes que la bacteria llegue a las plantas de tomate. Del mismo modo, la inoculación de la bacteria fitopatógena se vio favorecida cuando se practicaron heridas en las plantas (desbrote), encontrándose un porcentaje significativamente mayor de folíolos afectados en estos tratamientos que en aquellos sin heridas.

Clavibacter michiganense subsp. *michiganense* **Cancro bacterial del Tomate**

El gráfico 3 indica el efecto de aplicaciones de *Bacillus* sobre plantas de tomate inoculadas con *C. michiganense*. El porcentaje de folíolos afectados por la marchites fue significativamente mayor en los testigos inoculados en relación a los tratamientos que incluyeron aplicaciones de *Bacillus*. Lo anterior confirma la efectividad de las cepas de *Bacillus* en el biocontrol de la bacteria *C. michiganensis* en tomate.

GRÁFICO 3, Efecto de control de *Bacillus* sobre Cancro Bacterial en tomate expresado como severidad de ataque (0, planta sana; 1, síntomas leves; 2, Severo) en condiciones controladas de invernadero.



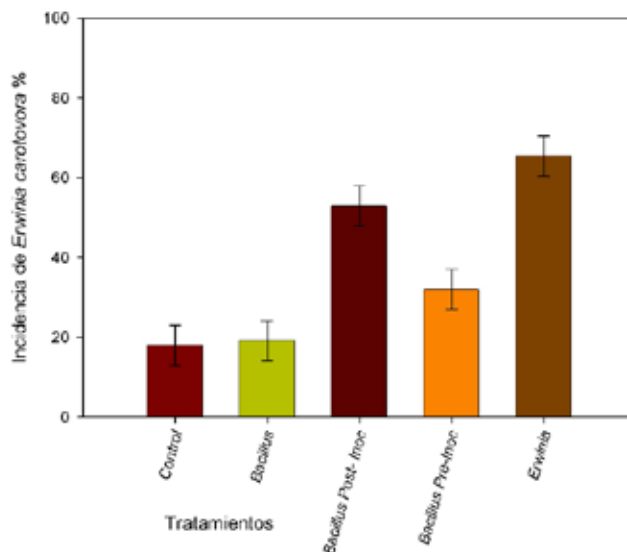
Los resultados indicaron que un mayor porcentaje de folíolos sanos se lograban al aplicar las cepas de *Bacillus* después de la inoculación, sugiriendo que éstas pueden ser aplicadas después que la bacteria tome contacto con las plantas de tomate, lo que permitiría realizar las aplicaciones después de realizadas las labores del cultivo que generen heridas, como podas, desbrotes y deshojes. Del mismo modo, la inoculación de la bacteria fitopatógena se vio favorecida cuando se practicaron heridas en las plantas (quebradura de tricomas superficiales de las hojas), encontrándose un porcentaje significativamente mayor de folíolos afectados en estos tratamientos que en aquellos sin heridas .

Ensayo: Evaluación de metodologías de una mezcla de cepas de *Bacillus*. en el control de *Erwinia carotovora*, en papa en almacenaje.

Los tratamientos utilizados en este ensayo consistieron en T0: Testigo con aplicación de agua destilada estéril; T1 Testigo con aplicación de la mezcla de *Bacillus*; T2 Inoculación con *Erwinia* y posterior aplicación de mezcla de *Bacillus*; T3 Aplicación de mezcla de *Bacillus* y posterior inoculación con *Erwinia*; T4 Testigo con inoculación con *Erwinia*.

Después de 90 días de almacenaje, los tratamientos fueron evaluados a través de la determinación del porcentaje de papas dañadas por *Erwinia*, considerándose dañada cualquier tubérculo con pudrición acuosa maloliente. En el gráfico 4 se aprecia el efecto de los tratamientos utilizados, siendo la inoculación con *Erwinia* efectiva en causar pudrición de tubérculos, lo que demostró la significativa efectividad del tratamiento preventivo de *Bacillus* (T3). Este fue similar al efecto que tuvieron papas sin inocular y mojadas (T0) o tratadas sólo con *Bacillus* (T1). De los datos se desprende que *Bacillus* no sería tan efectivo al ser empleado como tratamiento curativo (T2), ya que éstos fueron similares al testigo inoculado con *Erwinia* solamente (T4).

GRÁFICO 4. Incidencia de papas podridas por *Erwinia carotovora*, tratadas con y sin *Bacillus*



Pese a las diferencias significativas con el testigo inoculado, el porcentaje de daño debido a la inoculación con *Erwinia*, en el tratamiento de *Bacillus* preventivo (T3,) sigue siendo alto por lo que es necesario realizar estudios a dosis más altas del biocontrolador. Sin embargo dadas las condiciones altamente predisponentes para la infección y el inóculo empleado, estos datos son suficientes para poder recomendar el uso de *Bacillus* en el control de *Erwinia*.

Ensayo: Evaluación de la capacidad biocontroladora de cepas de *Bacillus* sobre la enfermedad Cáncer Bacterial en Carozos (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*)

En un huerto de cerezos var. Sweet heart, de 10 años, severamente afectado por Cáncer bacterial, se seleccionaron 50 árboles, por tratamiento, los que consistieron en:

- Manejo del predio: 4 aplicaciones de óxido cuproso durante caída de hojas mas aplicaciones después de cada lluvia y aplicaciones de Estreptomycin en floración.

- *Bacillus*: 2 aplicaciones de *Bacillus* durante caída de hojas, mas aplicaciones después de cada lluvia. En floración se utilizo el antibiótico.

- *Bacillus* + manejo del predio: consistió en realizar las aplicaciones de óxido cuproso en conjunto con el *Bacillus*, en los mismos momentos ya mencionados.

Cada uno de los árboles de cada uno de los tres tratamientos, fue evaluado en una escala de severidad que va de 0: árbol sano a 10: árbol muerto. Esta evaluación se realizo al inicio del ensayo, en caída de hojas y se repitió en caída de hojas de la temporada siguiente, evaluándose la variación en la severidad de cada árbol. Así los árboles que mostraron variaciones negativas, indican un efecto positivo de los tratamientos.

Este ensayo se realizo en la temporada 2003/2004 y se repitió en la temporada 2004/2005, solo que en esta ultima cada tratamiento constaba de 150 árboles.

En gráfico 5, se muestran los resultados de estas dos temporadas y el efecto acumulado de cada uno de los tratamientos, apreciándose que solo el tratamiento con *Bacillus* logro una disminución significativa en la severidad de ataque, mientras que la combinación de *Bacillus* con el manejo del huerto, solo logro evitar un aumento de severidad y finalmente el manejo de predio, mostró un aumento del daño generado por la enfermedad.

En cuanto a numero de árboles por categoría de severidad, vemos que el tratamiento con *Bacillus*, logró disminuir la cantidad de árboles, dentro de las categorías 2, 3 y 4, y aumentó la cantidad de árboles en la categoría 1, que son árboles sanos (gráfico 6).

Indicando que el tratamiento con este biocontrolador solo es efectivo en árboles con severidad media a leve, es decir árboles, con canchros activos y ramillas muertas, pero sin presentar aun ramas

completas muertas.

En las categorías con severidad alta a muy severa, solo logro evitar un aumento de árboles afectados, pero no una recuperación.

GRÁFICO 5, Variación en severidad de daño en cerezos, ocasionado por Cáncer Bacterial en cerezo, con distintos tratamientos en base a *Bacillus*. y bactericidas cúprico.

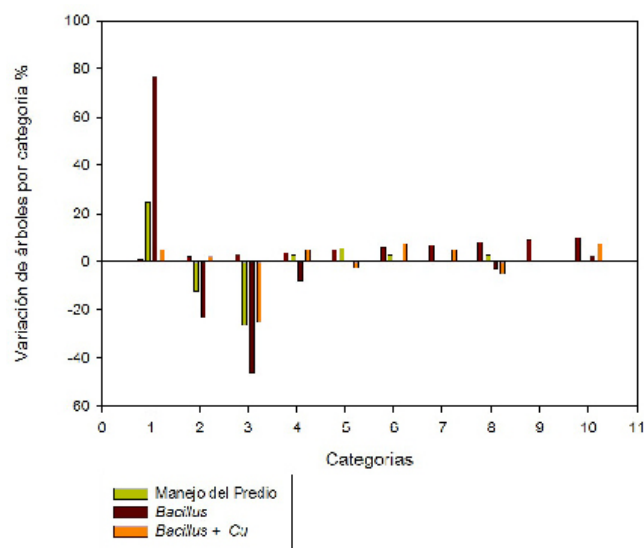
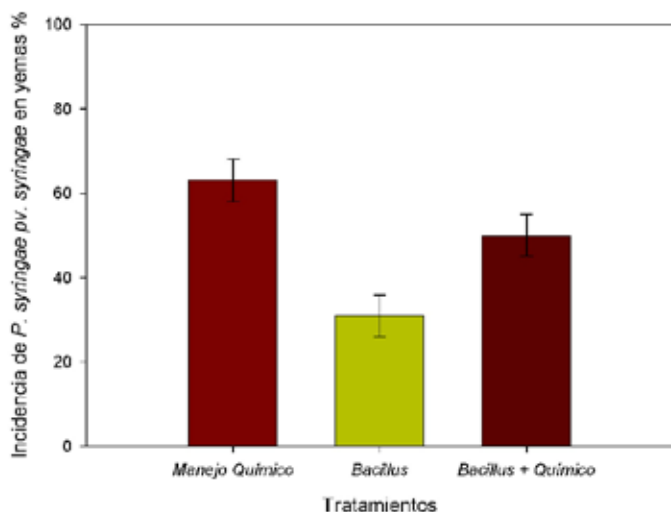


GRÁFICO 6 Porcentaje de árboles, según categorías de severidad (0 sano, 10 muerto) de daño por de cáncer bacterial en cerezo, tratados con una mezcla de *Bacillus* y compuestos cúpricos y la mezcla de estos.

Por ultimo, dada la condición sistémica y estacional de la enfermedad, para poder determinar, que la disminución de severidad, se debía a un efecto directo de *Bacillus* sobre el patógeno, se realizaron mediciones de poblaciones del patógenos en yemas de árboles, de los distintos tratamientos, observándose una disminución en la incidencia de *P. syringae*, en los árboles tratados con *Bacillus*. (Gráfico 7).

GRÁFICO 7, Incidencia de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, en yemas de cerezo, tratadas con *Bacillus*.



Ensayo: Evaluación capacidad biocontroladora de una mezcla de *Bacillus*, para el control de enfermedades bacterianas, en cultivos bajo plástico de tomate.

Para determina la eficacia de *Bacillus*, en el control de enfermedades bacterianas en tomate, se realizaron ensayos de campo, tanto en invernaderos de Colín como de Quillota.

Los ensayos se dividieron en dos tipos, unos fueron enfocados a medir la eficacia preventiva de *Bacillus*, respecto a los tratamientos convencionales, utilizados por los agricultores. Y los segundos ensayos se enfocaron en determinar la actividad curativa de *Bacillus*, específicamente en plantas afectadas por Peca bacteriana, causado por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

En los primeros ensayos podemos ver en el gráfico 8 el tratamiento con *Bacillus*, con un total

de 180 plantas, ninguna presento síntomas de Peca bacteriana, mientras que en el tratamiento con compuestos cúpricos (4 aplicaciones) y antibióticos (1 aplicación), se obtuvo un 11% de plantas infectadas y en el tratamiento combinado de *Bacillus* con químicos, se logro un 1,5%. Indicando así la alta efectividad preventiva de *Bacillus*, en comparación con los tratamientos convencionales.

En el predio Agrochepita donde se realizo el mismo protocolo, no hubo incidencia de enfermedades bacterianas, pero si se presento un ataque de Tizón Tardío (*Phytophthora infestans*), donde *Bacillus* mostró un buen desempeño en comparación con el manejo predio (Gráfico 9).

GRÁFICO 8. Incidencia de Peca Bacteriana , en plantas de tomate bajo plástico, tratadas con *Bacillus* spp.

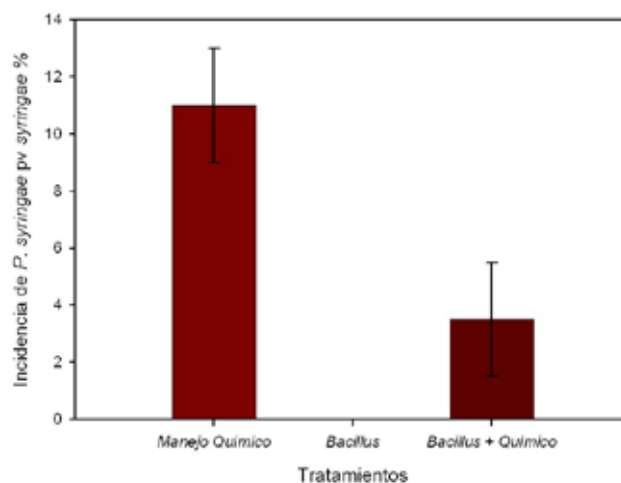
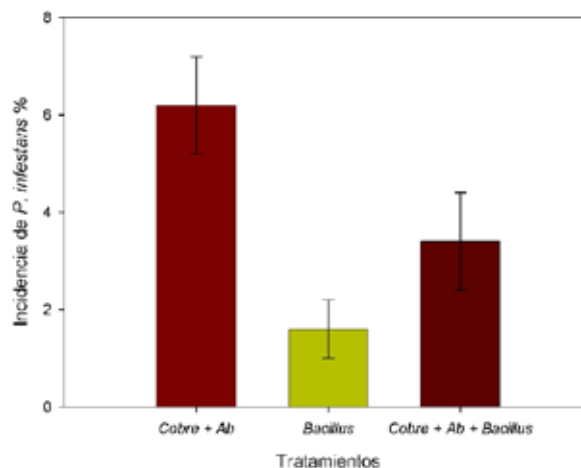


GRÁFICO 9, Incidencia de *Phytophthora infestans*, en plantas de tomate bajo plástico, tratadas con *Bacillus*.

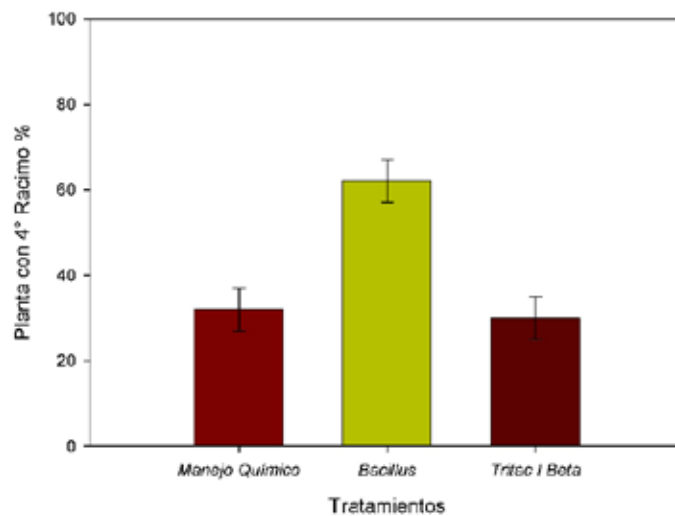


En cuanto a las unidades de validación, donde se manejo la presencia de Peca Bacteriana en forma curativa, se cuenta con la experiencia de Carolina Marcotti y Jerónimo Morchio, agricultores de Quillota, quienes después de 3 aplicaciones lograron detener completamente la enfermedad. Por su parte en el predio de Pablo Salazar de Colín, se comparo la eficacia curativa de *Bacillus*, versus compuestos cúpricos (4 aplicaciones) mas antibióticos (3 aplicaciones) y 3 Tac I Beta ® (Avance Biotechnologies).

Dado que en el predio de don Francisco Salazar, el ensayo partió con un alta incidencia de la enfermedad, no fue posible evaluar incidencia, pero si se evaluó el porcentaje de plantas que alcanzo el cuarto racimo.

Como se aprecia en el gráfico 10, los tratamientos con *Bacillus*, lograron que sobre el 60% de las plantas alcanzaron el 4to racimo, significativamente superior a los otros tratamientos, los cuales no superaron el 32%, manejo químico y 20%, 3 Tac I Beta ® .

GRÁFICO 10. Porcentaje de plantas con 4 racimos, afectadas por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, bajo 3 tratamientos curativos.



SECTORES DE MUESTREO.

1. Cultivo Tomate, bajo plástico en Colín.

2. Cultivo de cerezo.

3. Cultivo de Papas

4. Cultivo trigo, La Serena



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES DE USO

Los resultados obtenidos por nuestra investigación, nos indican la factibilidad de utilizar *Bacillus* spp. Para el control de enfermedades bacterianas en cultivos, mostrando un efecto superior al de los productos químicos actualmente en uso y sin las consecuencias negativas tanto para la salud humana, como para el medio ambiente.

La prospección realizada y selección de cepas, nos muestra que los *Bacillus* provenientes de bosques y otras zonas de vida nativa silvestre, mostraron una potente acción biocontroladora en relación a las cepas obtenidas de ambientes agrícolas y cepas extranjeras.

El uso de *Bacillus*, presenta varias ventajas prácticas frente a los manejos químicos, entre las que destacan alta efectividad, bajo riesgo de generación de resistencia, inocuidad tanto para aplicadores, consumidores y bajo impacto ambiental.

En el cuadro 3, se resumen las recomendaciones en cuanto a enfermedades controladas, dosis y momentos de aplicación.

Compatibilidad con agroquímicos

Bacillus 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 *Bacillus*, es un polvo mojable, el que mantenido en un ambiente seco y fresco es capaz de mantener su población y actividad por 12 meses. Una vez abierto el envase de *Bacillus*, debe evitarse su contacto con la humedad, en caso contrario debe utilizarse inmediatamente.

Toxicidad

Las especies de *Bacillus*, seleccionadas en el presente proyecto presentan baja toxicidad para mamíferos, pese a lo cual 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 vómito. 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, está compuesto por esporas de la bacteria y los compuestos obtenidos durante la fermentación de esta, más 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 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 más cálidas 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 *Bacillus*.

Cuadro 3 . Recomendaciones de uso de *Bacillus* spp. para el control de enfermedades bacterianas en cultivos de tomate, papa y carozos

CULTIVO	PATOGENOS	DOSIS	ÉPOCAS DE APLICACIÓN
Carozos	Cáncer bacterial (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>)	300 g/100 l	Aplicación con 5, 25, 50 75 y 100% de caída de hojas. En caso de heladas invernales que cause heridas. Aplicar en brotación y plena flor.
Tomate	Cáncer bacterial (<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>Michiganensis</i>) Peca bacteriana (<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Vesicatoria</i>) Mancha bacteriana (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>)	300 g/100 l	En almácigo, transplante y posterior a cualquier labor que genere heridas. En almácigo, transplante dos días antes e inmediatamente después de cualquier labor que genere heridas. C u r a t i v o , aplicaciones cada 3 Díaz, hasta que lesiones se presenten secas y sin avance
Papa	Pudrición acuosa (<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>Carotovora</i>)	100 g/100 Kg. de papas	Aplicación inmediatamente después de cosecha.

BIBLIOGRAFIA

- Basim H, Stall R, Minsavage G & Jones J. 1999. Chromosomal gene transfer by conjugation in the plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 89:1044-1049.
- Bernal G, Illanes A & Ciampi L. 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*. Vol. 5: 1.
- Buchenauer H. 1998. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. *Journal of Plant Disease and Protection*, v. 105:329-348.
- Byrne J, Dianese A, Campbell P, Cuppels D, Louws F, Miller S, Jones J & Wilson M. 2005. Biological control of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North America. *Biological Control* 32: 408–418.
- Chellemi D, Olson S, Dankers H & Snell J. 1992. Evaluation of bactericides for control of bacterial spot of tomato. *Fungic. Nemat. Tests* 47, 140.
- Dillard H, Cobb A & Brink D. 1993. Evaluation of bactericides for control of bacterial speck and spot on processing tomatoes, 1992. *Fungic. Nemat. Tests* 48, 188.
- Dillard H, Moore C & Cobb A. 1991. Evaluation of bactericides for control of bacterial speck and spot on tomato, 1990. *Fungic. Nematic. Tests* 46: 175.
- Massomo S, Mortensen C, Mabagala R, Newman M, & Hockenhull J. 2004. Biological Control of Black Rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of Cabbage in Tanzania with *Bacillus* strains. *J. Phytopathology* 152: 98–105.
- Mendgen K, Schiewe A, & Falconi C. 1992. Biological crop protection. Biological control of plant diseases. *Bayer AG, Leverkusen* 45: 5-20.
- Minsavage G, Canteros B & Stall R. 1990. Plasmid-mediated resistance to streptomycin in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 80: 719–723.
- Pal Bais H, Fall R & Vivanco J. 2003. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of Arabidopsis Roots by *Pseudomonas syringae* Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production. *Plant Physiol.* Vol. 134: 307-319.
- Raupach G, & Kloepper J. 2000. Biocontrol of cucumber diseases in the field by plant growth-promoting rhizobacteria with and without methyl bromide fumigation. *Plant Dis.* 84:1073-1075.
- Ritchie D & Dittapongpich V. 1991. Copper and streptomycin resistant strains and host differentiated races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in North Carolina. *Plant Dis.* 75: 733–736.
- Sankar P & Jeyarajan R. 1996. Compatibility of antagonists with *Azospirillum* in sesamum. *Indian Phytopath.* 49 (1): 67-71.
- Scheck H, Pscheidt J & Moore L. 1996. Copper and streptomycin resistance in strains of *Pseudomonas syringae* from Pacific Northwest nurseries. *Plant Dis.* 80:1034-1039.
- Schreiber L, Gregory G, Krause C & Ichida J. 1998. Production, partial purification, and antimicrobial activity of a novel antibiotic produced by a *Bacillus subtilis* isolate from *Ulmus americana*. *Canadian Journal of Botany* vol. 66: 2338-2346.
- Spurrier C. 1990. Pesticides-there will be change. In: Symposium "Plant Health Management Issues of Public Concern: Focus on Pesticides". California, November 1988. *Plant Disease*, 74 : 103-110.
- Sundin G, Jacobs J, & Murillo J. 2000. Sequence diversity of *ruIA* among natural isolates of *Pseudomonas syringae* and effect on the function of *ruIAB*-mediated UV radiation tolerance. *Microbiol.* 66:5167-5173.

-Vargas E, Alvarez A & Cervantes C.1998. Sistemas bacterianos de expulsión de metales tóxicos. Revista Latinoamericana de Microbiología 40:53-71.

-Vargas E, Alvarez A & Cervantes C. 1995. Mecanismos de resistencia bacteriana a cobre. Ciencia Nicolaita 8:93-103.

-.Utkhede R & Koch C. 2004. Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. Biocontrol. 49 (3): 305 – 313.

-.Wulff E, Mguni, Mortensen C, Keswan C & Hockenhull J.2002. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe European Journal of Plant Pathology 108: 317–325.

