

## 1. ANTECEDENTES GENERALES

**Nombre del Proyecto:** Evaluación de cepas nativas de la bacteria *Bacillus subtilis* en el biocontrol de enfermedades bacterianas de cultivos hortofrutícolas de importancia regional.

**Código:** FIA-PI-C-2002-1-A-84

Región: VII

**Fecha de aprobación o adjudicación:** Agosto 2002

Forma de Ingreso al FIA: Concurso

**Agente Ejecutor y Asociados:** Universidad de Talca.

**Coordinador del Proyecto:** Mauricio Lolos Caneo

**Costo Total:** \$ 67.641.964

**Aporte del FIA:** \$ 41.532.752

**Porcentaje del costo total:** 61.4%



## 2. RESUMEN EJECUTIVO

El proyecto ha logrado pasar a las fases de evaluaciones en campo y transferencia del sistema de producción, a la empresa Bio Insumos Nativa Ltda. En el primer punto se han establecido ensayos en Quillota y Colin para el control de enférmeles en tomate y en los sectores de Colbún y El Colorado para cerezo, siendo promisorios los resultados preliminares, obtenidos en ambos cultivos. En el caso de tomate se ha generado una alta expectativa en los agricultores, quienes han expresado su voluntad de empezar a utilizar comercialmente esta mezcla de Bacillus.

En cuanto a difusión, se han realizado reuniones con asesores de tomate, tanto en Colin y Quillota, involucrándolos en los ensayos. Por otra parte se han realizado presentaciones en reuniones científicas y de difusión a agricultores, en Chillan y Santiago.

## 3. OBJETIVOS

General: Evaluar la capacidad biocontroladora de cepas nativas de *Bacillus subtilis* (Bs) recolectadas en la VII Región, para enfermedades bacterianas en cultivos agrícolas de importancia regional.

Específicos:

- A) Evaluación de la capacidad inhibitoria in vitro de cepas nativas de Bs para aislados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganense*; *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, P.s. pv. *tomato*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.
- B) Evaluación *in vivo* de la capacidad biocontroladora de las cepas de Bs efectivas en cultivos inoculados con las bacterias fitopatógenas *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganense*; *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, P.s. pv. *tomato*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.
- C) Evaluación *in vivo* de la capacidad biocontroladora de las cepas de Bs efectivas en cultivos establecidos por agricultores de la zona y con historial de enfermedades bacterianas.
- D) Desarrollar un sistema de producción masivo y de almacenaje de las cepas de Bs biocontroladoras de las bacterias fitopatógenas en estudio.
- E) Difundir ampliamente los resultados alcanzados del proyecto entre grupos de agricultores con potencialidad de adoptar esta tecnología.
- F) Desarrollar e insertar un producto comercial de Bs, en conjunto con alguna empresa relacionada con insumos para producción orgánica e integrada

## 4. METODOLOGÍA

### Ensayos en campo.

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

Estos ensayos se están realizando en paralelo, en 3 predios de la zona de Quillota y dos en la zona de Colin, donde hubo incidencia de enfermedades bacterianas en la temporada pasada. En todos los predios se utiliza la misma metodología, solo variando la cantidad de hileras por repetición, dependiendo esto de la disponibilidad de plantas. En todos los predios se utilizo la mezcla de *Bacillus*, Antumavida, Vilcun, Mallerauco y Maguellines 2.

##### **Predio Enrique Correa, sector Escuela de Caballería Quillota.**

Unidad experimental: 1 nave con 4 mesas de 2 hileras, Var. Fortaleza.

##### **Predio Serafín Salazar, sector Quebrada del Ají, Boco.**

Unidad experimental: 1 nave con 4 mesas de 2 hileras, Var. Fortaleza.

##### **Predio Agrotom, sector Camino San Isidro.**

Unidad experimental sector temporada pasada con *Pseudomonas*: 1 nave con 3 mesas de 1 hileras, Var. Fortaleza.

Unidad experimental sector temporada pasada con *Clavibacter*: 1 nave con 3 mesas de 1 hileras, Var. Fortaleza.

Los tratamientos consisten en:

T1: Tratamiento tradicional del huerto, basado en aplicaciones periódicas de compuestos cúpricos (Pitón) y antibióticos (Streptoplus) cada 15 días.

T2: Aplicación de la mezcla de *Bacillus* cada 15 días.

T3: Aplicación de la mezcla de *Bacillus*, mas los bactericidas químicos cada 15 días.

Las mediciones, consisten en conteo de plantas con incidencia de enfermedades, con énfasis en las de origen bacteriano. A fin de temporada, se seleccionaran 50 plantas de cada repetición, para medir parámetros de vigor, como altura, biomasa aérea y seca y número de racimos alcanzados.

Cada tratamiento esta conformado por 3 repeticiones, cada una de las cuales es una unidad experimental.

##### **Predio Felipe Riggeti, sector San Miguel Colin.**

Unidad experimental sector temporada pasada con *Clavibacter*: 1 hilera, Var. Maria Italia.

T1: Tratamiento tradicional del huerto, basado en aplicaciones periódicas de compuestos cúpricos (Pitón) y antibióticos (Streptoplus) cada 15 días.

T2: Aplicación de la mezcla de *Bacillus* cada 15 días.

T3: Aplicación de la mezcla de *Bacillus*, mas los bactericidas químicos cada 15 días.

Las mediciones, consisten en conteo de plantas con incidencia de enfermedades, con énfasis en las de origen bacteriano. A fin de temporada, se seleccionaran 50 plantas de cada repetición, para medir parámetros de vigor, como altura, biomasa aérea y seca y número de racimos alcanzados.

Cada tratamiento esta conformado por 4 repeticiones, cada una de las cuales es una unidad experimental.

### **Unidades de Validación**

Con agricultores relevantes de las zonas de Colin y Quillota, se han montado unidades de validación, para los que se eligieron predios con presencia de enfermedades bacterianas al momento de montar las unidades de validación.

En estos predios no se montaron ensayos, dado que los agricultores al observar aumento de la presencia de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, aplicaron a todo el sector destinado al ensayo la mezcla de Bacillus, teniendo según su propia apreciación un buen resultado.

#### **Predio Carolina Marcoti, sector Escuela Militar Quillota.**

Al momento de instalación de esta unidad de validación, existían 2 mesas con incidencia de *Pseudomonas*.

#### **Predio Jerónimo Morchio, sector La Capilla Boco Quillota.**

Al momento de instalación de esta unidad de validación, existían 3 naves con incidencia severa de *Pseudomonas*.

#### **Predio Juan Hernández, sector San Miguel Colin.**

Al momento de instalación de esta unidad de validación, existían 2 naves con incidencia severa de *Pseudomonas*, las que fueron arrancadas, pero en los invernaderos aledaños se presentaron síntomas, siendo en 2 de estas naves donde se aplica el Bacillus

#### **Predio Pablo Salazar, sector San Miguel Colin.**

Este predio muestra incidencia y severidad alta de *Pseudomonas* en 5 naves y en hileras aisladas de otros invernaderos, siendo 4 de estas naves asperjadas con Bacillus y una con Streptoplus.

## **4.2 Evaluación capacidad biocontroladora de una mezcla de *Bacillus* spp., para el control de enfermedades bacterianas, en cerezo.**

### **Ensayo Agrícola Trallay**

Este ensayo aun esta en ejecución, siendo necesario esperar hasta noviembre 2005 para poder realizar las evaluaciones, dado que los síntomas históricamente se han expresado en esa época. A pesar de lo anterior, las aplicaciones de cada tratamiento se realizaron durante todo el invierno luego de ocurrida una lluvia, coincidiendo con las aplicaciones convencionales del huerto en base a compuestos cúpricos. A partir de floración se siguió con las aplicaciones en base a condiciones (lluvia).

Material Vegetal: Huerto de cerezos de 10 años, ubicado en Colbun, VII Región.

Adicionalmente al ensayo reportado en el informe anterior, se ha montado un ensayo adicional, abarcando una mayor superficie, la que cuenta con los siguientes tratamientos:

Los tratamientos de este ensayo corresponden a:

T1-. Manejo del huerto

T2-. Aplicación de Bacillus, 10 días posterior a la aplicación de cúpricos

Cada tratamiento consta de 4 repeticiones, cada una de estas conformada por una hilera de 60 árboles.

Después de la 3ra aplicación de Bacillus, se tomaron muestras de yemas, 12 muestras, cada una conformada por 5 yemas por cada repetición y tratamiento, adyacentes a canchales activos, las que fueron sembradas en medio B-King, para luego de 72 hrs. Determinar la incidencia de la enfermedad, por medio de la presencia de fluorescencia.

### **Ensayo El Colorado**

En el huerto Santa Irene de Agrícola Trallay, ubicado en la localidad del Colorado, se instaló un ensayo similar al anterior, para el que se utilizó un huerto de 1 año de plantación, el que muestra síntomas de infección por cáncer bacterial.

Se estableció un diseño de bloques al azar, donde los bloques están conformados por las variedades. Existiendo un sector con la variedad Symphony sobre Majaleb y el segundo sector con la variedad Sweet Herat sobre Merecier.

Tratamientos: Se establecieron los siguientes tratamientos:

- T1 Aplicación de Nordox 200 g/100 l.
- T2 Aplicación de Nordox + la mezcla de *Bacillus*
- T3 Aplicación de Bs. 10 días posteriores a la aplicación de Nordox. En dosis de 50 gr. /100 l. de agua, a una concentración de  $10^7$  UFC/g.

Cada tratamiento consta de 3 repeticiones, cada una de las cuales conformada por una hilera de 100 árboles cada una, cada árbol fue clasificado por una escala de severidad de 0 a 3, siendo 0 árbol sano, 1 árbol con baja severidad, 2 severidad media y 3 severidad alta. Al momento de cosecha se evaluó el estado de cada árbol.

Después de la 3ra aplicación, se tomaron 20 flores por repetición, de cada uno de los tratamientos, las que fueron maceradas en agua destilada estéril + NaCl (0,85%), para luego ser sembradas en medio B de King. Estas placas fueron puestas en incubación por 72 hrs., luego de las cuales, se determinó presencia o ausencia de *Pseudomonas*, por fluorescencia.

## **4.3 Desarrollo de un sistema de producción masivo de las cepas de *Bacillus***

### **Determinación de pH inicial óptimo de cultivo**

Se están probando 4 pH se evaluó rapidez de esporulación y biomasa producida.

Los pH a evaluar son: 6.0, 6.5 7.5 y 8.0 en cada temperatura se evaluarán todas las cepas en dos medios, uno rico en nutrientes y uno pobre siendo el medio caldo nutriente y gys respectivamente, los medios en que se evaluó ya que son los que producen esporulación más rápidamente y con una biomasa similar.

En botellas cada una con 50 ml de uno de los medios y pH se inoculo con una de las cepas (39, 40, 102, 107 y 110), a los cinco días se evalúa por medio de un frotis el estado de la bacteria si esta esporulada o no, si es así se procede a realizar un conteo de biomasa por medio de diluciones y su posterior sembrado en placa y conteo de las colonias que se forman a las 24 hrs. De sembrado.

Si no están esporuladas se realizan frotis cada 3 días hasta completar los 10-12 días aproximadamente.

#### **Desarrollo de cepas resistente a compuesto cúpricos y antibióticos.**

Se ha trabajado en la generación de variedades resistentes a la acción de compuestos cúpricos (Nordox) y antibióticos (Streptoplus), para lo que se han realizado cultivos *in vitro* en medio agar nutriente, a los que se les ha agregado 1/8 de la concentración recomendada para su uso en campo de los bactericidas ya mencionados. Después de 72 hrs. se seleccionan colonias puras, las que son cultivadas en AN con concentraciones crecientes de estos compuestos. Después de la obtención de cepas resistentes a 1/4 de concentración, se toman las colonias resistentes a Nordox para ser cultivadas, en medio con 1/8 de la concentración de Streptoplus y así sucesivamente, hasta obtener cepas resistentes a la dosis completa de Nordox y Streptoplus.

A medida, que se desarrolla la resistencia, se realizan pruebas *in vitro*, para comprobar que las cepas mantienen su actividad.

#### **Transferencia Sistema de Producción.**

La transferencia a Bio Insumos Nativa, a consistido en el inicio de una producción a escala de laboratorio de las cepas de Bacillus y el método de secado. Logrando ya haber realizado 3 producciones de cada una de las cepas en las dependencias de Nativa, logrando niveles de concentración y actividad, similares a los obtenidos en los laboratorios de la Universidad de Talca.

Por su parte la empresa a adquirido un birreactor, el que en el corto plazo empezara la producción de las cepas a una escala semi industrial.

## 5.- DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES Y TAREAS EJECUTADAS

Objetivo especific. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término	Observaciones
8.2.3	8.2.3.2	Ejecución de ensayo de Campo en Tomate en Colin Y Quillota	Ago/05	Abr/06	En ejecución
	8.2.3.3	Desarrollo de ensayo de Campo en cerezo.	Abr/04	Abr/06	En ejecución
8.2.4	8.2.4.6	Evaluación de pH	Sept/05	Oct/05	En ejecución
8.2.5	8.2.5.3	Exposición en Simposio de Control Biológico INIA Quilamapu	Ago/05	Ago/05	Presentación en actividad organizada por FIA e INIA Quilamapu
	8.2.5.4	Exposición en Seminario "Insumos para la Agricultura Organica"	Ago/05	Ago/05	Organizado por Asociación de Agricultura Orgánica
8.2.6	8.2.6.3	Transferencia técnica de producción a empresa	Ago/05	Dic/05	En ejecución, marcha blanca de producción.

## ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE LAS ACTIVIDADES PROGRAMADAS Y REALIZADAS

ACTIVIDADES		Fecha proyectada	Fecha realización	Observaciones
8.1.4	Compra materiales e insumos	Ene/05	jun/05	Terminado
8.2.3.2	Desarrollo de Ensayo de Campo en cerezo	Ene/04	Sep/05 – Abr/06	Terminado 1ª temporada En ejecución 2ª temporada
8.2.3.3	Desarrollo de Ensayo de Campo en Cerezo.	Ene/04	Sep/05- Abr/06	Terminada evaluación 1ª temporada en ejecución 2ª
8.2.4.2	Ensayos de extracción almacenaje	Dic/03	Oct/05- dic/05	En ejecución, resultados parciales

8.2.5.7	Día de campo	Ene/05	Oct/05	Por realizar
8.2.5.8	Exposición en Congreso Científico	Oct/05	Nov/05	Por realizar
8.2.5.9	Día de campo	Jul/05	Dic/05	Por realizar en Quillota
8.2.6.2	Transferencia de tecnología de producción y almacenaje.	Ago/05	Mar/06	En ejecución
8.2.6.3	Evaluación de producción y almacenaje de empresa.	Jun/05	Dic/05	En ejecución
8.2.6.4	Inicio producción comercial	Sept/05	Mar/06	
8.2.5.10	Día de campo	Ago/05	Dic/05	Por realizar para resultados parciales cerezo
8.2.5.11	Elaboración e impresión boletín divulgativo	Oct/05	Dic/05	Se esperara a tener lo resultados de esta temporada.
8.2.6.2	Transferencia de tecnología de producción y almacenaje.	Mar/05	Sep/05	En ejecución
8.2.6.4	Inicio producción comercial	Oct/05	Mar/06	Se esperara a que la empresa cuente con el Biodigestor, para asegurar volumen.
8.1.5	Elaboración informe final	Oct/05	Abr/05	

## 6. Resultados

### Ensayos de Campo

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

##### Predio Enrique Correa, sector Escuela de Caballería Quillota.

En este ensayo no se han detectado síntomas de enfermedades bacterianas, pero si se registro un ataque de *Phytophthora infestans*, siendo posible cuantificar un efecto controlador de la mezcla de *Bacillus* logro un efecto significativo en el control de esta enfermedad. Cuadro 6.1

Cuadro 6.1 Incidencia de *Phytophthora infestans*, en plantas de tomate bajo plástico, tratadas con *Bacillus* spp.

Tratamiento	Incidencia Porcentaje
T1. Manejo del predio	6.3 a
T2. <i>Bacillus</i> .	1.12 b
T3. Manejo del predio + <i>Bacillus</i>	3.6 ab

##### Predio Serafín Salazar, sector Quebrada del Ají, Boco.

En este predio se detecto el ataque de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, siendo posible medir el efecto de *Bacillus* sobre el patógeno, el que como se aprecia en el cuadro 6.2 es estadísticamente superior al obtenido por los tratamientos de compuestos cúpricos y *Streptoplus*.

Cuadro 6.2 Incidencia de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, en plantas de tomate bajo plástico, tratadas con *Bacillus* spp.

Tratamiento	Incidencia Porcentaje
T1. Manejo del predio	1.7 a
T2. <i>Bacillus</i> .	0 b
T3. Manejo del predio + <i>Bacillus</i>	0.05 ab

Pese a los buenos resultados obtenidos en estos predios, es necesario esperar hasta cosecha, para poder estimar el grado de control de la mezcla de *Bacillus* sobre estos patógenos.

### **Predio Agrotom, sector Camino San Isidro y Predio Felipe Riggeti, sector San Miguel Colin.**

En el predio de Agrotomo, propiedad de Miguel Arnaud como en el de Felipe Rigetti, recién se han montado los ensayos, no existiendo hasta ahora síntomas de enfermedades bacterianas.

En cuanto a las unidades de validación en el predio Carolina Marcoti, sector Escuela Militar Quillota, se han realizado 3 aplicaciones de la mezcla de *Bacillus* en dos sectores que han sido afectados por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, logrando evitar la infección de nuevas plantas y logrando un efecto curativo sobre las ya infectadas, apreciándose en estas plantas un desecamiento de la lesión y aparición de cicatrices blanquecinas (Figura 6.1). Lo mismo se observó en el huerto de Jerónimo Morchio, donde la aplicación solo se realizó a las plantas afectadas, por lo que las plantas adyacentes sin aplicación de *Bacillus* han presentado síntomas, evidenciando así la acción de *Bacillus* sobre este patógeno.



Plantas infectadas 5 días desde la aplicación de *Bacillus*



Plantas infectadas sin la aplicación de *Bacillus*

Las unidades de validación de Colin, han sido recientemente instaladas, por lo que no hay datos que reportar.

### **6.2 Evaluación capacidad biocontroladora de una mezcla de *Bacillus* spp., para el control de enfermedades bacterianas, en cerezo.**

Los ensayos en cerezo, dada la condición sistémica y estacional de la enfermedad, requieren que las mediciones se realicen en post cosecha, pese a esto las mediciones de poblaciones epifitas en el predio Santa Irene en Colbún nos indican un efecto de *Bacillus* sobre las poblaciones del patógeno, presentes en las yemas de los árboles como se ve en el cuadro 6.3

Cuadro 6.3 Incidencia de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, en yemas de cerezo, tratadas con *Bacillus* spp. Huerto Santa Inés

Tratamiento	Incidencia Porcentaje
T1. Manejo del predio	60.47 a
T2. <i>Bacillus</i> .	35.41 b

En el huerto de Colbún se obtuvieron resultado similar, siendo el tratamiento de la mezcla de *Bacillus* con Nordox, el que obtuvo la menor incidencia.

Cuadro 6.4 Incidencia de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, en flores de cerezo, tratadas con *Bacillus* spp. Huerto Santa Irene

n°	Tratamiento	Incidencia porcentaje
T1	Nordox	36.67 a
T2	Nordox + <i>Bacillus</i> mezcla	6.66 b
T3	Nordox + <i>Bacillus</i> desfasado	20 b

### 6.3 Desarrollo de un sistema de producción masivo de las cepas de *Bacillus*

#### Determinación de pH inicial optimo de cultivo

Estos estudios están en desarrollo, por lo que se espera que a fines de octubre se tengan los primeros resultados.

#### Desarrollo de cepas resistente a compuesto cúpricos y antibióticos.

Se han logrado obtener variantes resistentes de todas las cepas de *Bacillus*, tanto para Nordox como para Streptoplus, en el cuadro 6.5 se detallan los niveles alcanzados para cada cepa.

Cepa	Nordox (N)	Streptoplus (S)	Mezcla N + S
Maguellines (40)	¼ de concertación comercial	¼ de concertación comercial	¼ de Streptoplus y 1/8 Nordox
Maguellines 2 (39)	¼ de concertación comercial	¼ de concertación comercial	¼ de Streptoplus y 1/8 Nordox
Antumavida (102)	¼ de concertación comercial	¼ de concertación comercial	¼ de Streptoplus y ¼ Nordox
Vilcun (107)	¼ de concertación	¼ de concertación	1/8 de Streptoplus y

	comercial	comercial	1/8 Nordox
Mallerauco (110)	¼ de concertación comercial	¼ de concertación comercial	¼ de Streptoplus y 1/8 Nordox

## 7. PROBLEMAS

Los principales problemas enfrentados han sido lograr lo niveles de producción suficientes, para suplir la demanda de producto para los ensayos, esto por una parte por la baja producción que se logra a escala de laboratorio y por el gran interés de los agricultores en especial de tomate, de probar la mezcla de *Bacillus*, pidiendo producto para áreas cada vez mayores. Otro problema es el seguimiento de enfermedades bacterianas y las mismas cepas de *Bacillus*, a nivel de campo, lo que no nos permite estimar a ciencia cierta el tiempo de residualidad en campo.

## **9. DIFUSIÓN DE RESULTADOS OBTENIDOS**

Los resultados de este proyecto han sido difundidos a través del establecimiento de unidades de validación en Quillota y Colín y con reuniones con asesores de las dos localidades, entre ellos Alejandro Diomovic, Patricia Peñalosa y Homero Cristi.

Además se han presentado los resultados en el I Simposio de Control Biológico, realizado en INIA Quilamapu, los días y en el Seminario de Insumos para la Agricultura Orgánica, organizado por la Asociación de Agricultura Orgánica en Santiago el día.

## **10.- ACTIVIDADES PRÓXIMO PERÍODO**

Las actividades del próximo periodo contemplan, la continuación de los ensayos de campo y unidades de validación tanto en tomate como en cerezos. La realización de dos días de campos para productores de tomate, uno en Colín y el otro en Quillota y uno para productores de cerezo.

Se elaborará un boletín divulgativo de los resultados del proyecto y se continuará con la transferencia de la tecnología de producción de Bio Insumos Nativa.

## **11.- IMPACTOS DEL PROYECTO**

La instalación de los ensayos de campo, ya ha generado expectación en productores, los que ya están solicitando producto para su utilización a escala comercial tanto en Quillota como en Colín

## **12. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

Los resultados obtenidos a mostrado que la actividad de *Bacillus*, está logrando niveles de control superiores a los controles tradicionales, en base a cobre y antibióticos, lo que estaría asegurando el éxito de proyecto. Así la generación de un producto comercial, podría revolucionar lo existente en cuanto a control de bacterias fitopatógenas.