

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**ESCUELA DE AGRONOMIA**

**Evaluación de cepas de *Bacillus subtilis* para biocontrolar *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* en cala (*Zantedeschia* sp) y *Rhizoctonia solani* Kühn en papa (*Solanum tuberosum* L )**

Tesis presentada como parte de los  
requisitos para optar al grado de  
Licenciado en Agronomía.

**Jessica Paola Carrión Soto**

VALDIVIA – CHILE  
2007

FIRMA

PROFESOR PATROCINANTE:

Juan Nissen M.

Ing.Agr. , Dr . rer. hort

-----

PROFESORES INFORMANTES:

Luigi Ciampi P

Ing.Agr. , M. Sc. , Ph.D

-----

Ricardo Fuentes P

Ing. Agr. , M. Sc.

-----

INSTITUTO DE INGENIERIA AGRARIA Y SUELOS

A photograph of several pink calla lilies with yellow centers, set against a background of green leaves. The image is semi-transparent, allowing the text to be overlaid.

**Tesis financiada por Proyecto**

**Fondef DO3I- 1140**

*A MIS PADRES, POR SU PACIENCIA Y APOYO INCONDICIONAL DURANTE TODOS  
ESTOS AÑOS.*

*A MI HIJA, JAVIERITA POR DARME LA FUERZA PARA SEGUIR ADELANTE.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer en primer lugar a mi Profesor patrocinante Juan Nissen, por su incondicional y constante apoyo en la ejecución de esta tesis, al profesor Luigi Ciampi por su buena disponibilidad para transmitir y compartir sus conocimientos, también al profesor Ricardo Fuentes por su paciencia en la realización del análisis estadístico.

También quiero agradecer a dos personas que trabajan en el Laboratorio de Fitopatología, quienes estuvieron en todo momento para ayudarme en la fase práctica de mi tesis Cesar y Chispa, gracias por su paciencia y disposición.

Tampoco podría dejar de agradecer a mis padres quienes me han apoyado en todo momento y a mi tía Edith por cuidar a mi hija cuando yo tenía que estudiar, sin ellos no hubiese podido completar esta etapa.

Finalmente, agradezco a mi hija Javiera por haber llegado a este mundo, a darle un giro a mi vida. Te quiero mucho. Juntas saldremos adelante.

## INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1	El cultivo de cala ( <i>Zantedeschia sp</i> ) en Chile	3
2.1.1	Descripción de <i>Erwinia carotovora</i> en cala	5
2.1.2	Sintomatología de la pudrición húmeda en calas	6
2.2	El cultivo de la papa en Chile	7
2.2.1	<i>Rhizoctonia solani</i> en papa	9
2.2.2	Sintomatología de sarna negra	13
2.3	Principales antagonistas biológicos estudiados	14
2.4	<i>Bacillus subtilis</i> como bioantagonista	16
2.5	Bioplaguicidas que se aplican a través del riego	19
3	MATERIAL Y METODO	21
3.1	Materiales utilizados para el estudio en calas	21
3.1.1	Preparación del inóculo de <i>Erwinia carotovora</i> en calas	21
3.1.2	Propagación cepa antagonista BC10	21
3.1.3	Materiales para la preparación de túberos de calas para su posterior plantación	22
3.1.4	Materiales para las evaluaciones en calas	22
3.1.5	Cepa antagonista	22
3.1.6	Cepa control	23
3.2	Método usado para el ensayo de calas	23
3.2.1	Propagación de cepa patógena en calas	23
3.2.2	Preparación y propagación de la cepa antagonista en calas	24
3.2.3	Preparación del sustrato y túberos	25

Capítulo		Página
3.2.4	Preparación de las bolsas de polietileno con sustrato y túberos	26
3.2.5	Parámetros a medir en el ensayo de calas	26
3.2.6	Diseño estadístico	27
3.2.7	Segundo ensayo de calas	27
3.2.8	Parámetros a medir durante el segundo ensayo de calas	28
3.2.9	Diseño estadístico del segundo ensayo de calas	29
3.3	Materiales utilizados para ensayo en papas	29
3.3.1	Preparación del inóculo de <i>Rhizoctonia solani</i> en papas	29
3.3.2	Propagación cepa antagonista BC2	29
3.3.3	Preparación de tubérculos de papas para su posterior plantación	30
3.3.4	Materiales para las evaluaciones en papas	30
3.3.5	Cepa antagonista para controlar <i>R. solani</i>	30
3.3.6	Cepa control	30
3.4	Método usado para el ensayo de papas	30
3.4.1	Preparación del inóculo en papas	30
3.4.2	Preparación de la cepa antagonista	31
3.4.3	Preparación del sustrato y tubérculos de papa	32
3.4.4	Preparación de las bolsas de polietileno con sustrato y tubérculos	32
3.4.5	Parámetros a medir en el ensayo de papas	33
3.4.6	Diseño estadístico del ensayo de papas	34
4	RESULTADOS	35
4.1	Pruebas de antagonismo contra <i>E. carotovora</i> en cultivo de calas bajo cámara de ambiente controlada	35
4.1.1	Altura de plantas de calas	35
4.1.2	Cantidad de brotes o tallos	37
4.1.3	Porcentaje de sobrevivencia de plantas de calas primer ensayo	43

Capítulo		Página
4.1.4	Estado de túberos y plantas de calas medidas al momento de cosecha	44
4.2	Pruebas de antagonismo contra <i>E.carotovora</i> en invernadero	46
4.2.1	Altura de las plantas	46
4.2.2	Cantidad de brotes de plantas de calas del segundo ensayo	47
4.2.3	Porcentaje de pudrición de túberos de calas después de realizada la inducción de <i>E. carotovora</i> en el segundo ensayo	49
4.2.4	Porcentaje de sobrevivencia de plantas de calas del segundo ensayo	52
4.3	Pruebas de antagonismo hacia <i>R.solani</i> en plantas de papas	53
4.3.1	Altura del follaje	53
4.3.2	Cantidad de brotes en plantas de papas	54
4.3.3	Materia seca total	56
4.3.4	Número de tubérculos producidos por plantas de papas	56
4.3.5	Peso de tubérculos producidos por plantas de papas	57
4.3.6	Largo de la raíz	58
4.3.7	Materia verde	60
4.3.8	Evaluaciones de esclerocios en los tubérculos	60
4.3.9	Evaluaciones de esclerocios sobre los tubérculos en relación a las dosis de antagonista	61
4.3.10	Evaluaciones de los tubérculos en relación a las dosis de <i>R.solani</i>	62
4.3.11	Porcentaje de sobrevivencia en plantas de papas	63
5	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	64
6	CONCLUSIONES	77
7	RESUMEN	79



	SUMMARY	81
8	BIBLIOGRAFÍA	83
	ANEXOS	92

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Superficie, producción y rendimiento de papas en Chile	8
2	Principales bioantagonistas usados para el control de enfermedades con su nombre comercial, los cultivos donde se aplica y patógenos que controla	15
3	Bioantagonistas , su nombre comercial, formulación y modo de aplicación	20
4	Altura promedio de plantas de calas del primer ensayo según las distintas variables medidas (cm)	35
5	Promedio de la altura de plantas de calas ,según los distintos tratamientos en la fecha 31-10-2005	36
6	Número promedio de brotes de plantas de calas del primer ensayo según las distintas variables medidas	40
7	Promedio del número de brotes en plantas de calas del primer ensayo según los distintos tratamientos en la fecha de medición 14-10-2005	41
8	Promedio del número de brotes en plantas de calas del primer ensayo según los distintos tratamientos en la fecha de medición 10-11-2005	41
9	Promedio del número de brotes en plantas de calas del primer ensayo, según los distintos tratamientos en la fecha de medición 21-11-2005	42
10	Promedio del número de brotes en plantas de calas del primer ensayo según los distintos tratamientos en la variable 02-12-2005	42
11	Porcentaje de sobrevivencia de plantas de calas	43
12	Promedio del porcentaje de sobrevivencia de plantas de calas según los distintos tratamientos	44

Cuadro		Página
13	Promedio del estado de túberos y plantas de calas en cosecha (según escala de valoración relativa, Cap. 3.2.5)	44
14	Promedio del estado de túberos y estado de plantas de calas al momento de cosecha según los distintos tratamientos(según escala relativa indicada en el Cap 3.2.5)	45
15	Análisis de varianza del parámetro altura de plantas de cala del segundo ensayo	46
16	Análisis de varianza del parámetro cantidad de brotes de cala en el segundo ensayo	47
17	Análisis de varianza del parámetro porcentaje de pudrición de túberos después de inducción en el segundo ensayo de calas	50
18	Promedio del porcentaje de sobrevivencia de plantas de calas del segundo ensayo en los distintos tratamientos	52
19	Análisis de varianza del parámetro altura del follaje en plantas de papas (cm)	53
20	Cantidad promedio de brotes en plantas de papas a través de todas las fechas de medición	54
21	Promedio de la cantidad de brotes de plantas de papas en la fecha de medición 28-11-2005 a través de los distintos tratamientos	55
22	Análisis de varianza del parámetro materia seca total en plantas de papas	56
23	Promedio del número de tubérculos producidos por la papa madre de las plantas de papas	57
24	Peso promedio de tubérculos hijos producidos por las plantas de papas	58
25	Promedio del largo de raíz en la cosecha de plantas de papas (cm).	58
26	Promedio del largo de la raíz en plantas de papas, según los distintos tratamientos (cm)	59
27	Análisis de varianza del peso de materia verde en plantas de papas	60

Cuadro		Página
28	Promedio y diferencias entre los tratamientos en la evaluación de esclerocios en los tubérculos hijos	61
29	Análisis de varianza sobre la evaluación de los esclerocios presentes en los tubérculos cosechados en relación al antagonista	62
30	Promedio y diferencias entre las dosis de <i>R solani</i> en relación a la evaluación de esclerocios sobre tubérculos hijos (escala mencionada en el Cap 3.4.5)	62
31	Análisis de varianza en el parámetro porcentaje de sobrevivencia en plantas de papas	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Volumen de exportaciones de calas de colores en Kg y el valor FOB en el transcurso de los años 2003 a 2005	3
2	Ciclo biológico de <i>Rhizoctonia solani</i> , el agente causal de la “sarna negra” de la papa.	12
3	Esquema representativo de los 18 tratamientos correspondientes a 3 niveles de patógeno y 6 de la cepa antagonista en el ensayo de calas	25
4	Esquema representativo de los 18 tratamientos correspondientes a los 3 niveles de patógeno ( $R_0, R_M, R_A$ ) y 6 de la cepa antagonista ( $A_0, A_4 \dots A_{14}$ ) en ensayo de papas	32
5	Escala de evaluación para el porcentaje de esclerocios sobre los tubérculos hijos	34
6	Plantas de calas del nivel E0 ( <i>Erwinia</i> cero), con las distintas concentraciones de la cepa antagonistas a las tres semanas de plantación	38
7	Plantas de calas del nivel de infestación EM( <i>Erwinia</i> medio), con las distintas concentraciones de la cepa antagonistas a las tres semanas de plantación	38
8	Plantas de calas del nivel de infestación EA( <i>Erwinia</i> alto), con las distintas concentraciones de la cepa antagonistas a las tres semanas de plantación	38
9	Plantas de calas del nivel de infestación E0 ( <i>Erwinia</i> cero), con las distintas concentraciones de antagonistas al momento de cosecha	39
10	Plantas de calas del nivel de infestación EM( <i>Erwinia</i> medio), con las distintas concentraciones de antagonistas al momento de cosecha	39
11	Plantas de calas del nivel de infestación EA( <i>Erwinia</i> alto), con las distintas concentraciones de antagonistas al momento de cosecha	39

Figura		Página
12	Escala relativa del estado de los tuberos y plantas al momento de la cosecha	45
13	Plantas de calas en el nivel medio de infestación con <i>Erwinia</i> y con las cinco concentraciones de antagonistas a las tres semanas de plantación	48
14	Plantas de calas en el nivel medio de infestación con <i>Erwinia</i> y con las cinco concentraciones de antagonistas tres semanas antes de la cosecha	49
15	Plantas de calas en el nivel medio de infestación con <i>Erwinia</i> y con las cinco concentraciones de antagonistas antes de la cosecha o corte de los tallos	49
16	Tuberos del tratamiento EM-A0, en la izquierda antes de inducción y a la derecha después de la inducción ( Sin pudrición después de la inducción)	50
17	Tuberos del tratamiento EM-A4, en la izquierda antes de inducción y a la derecha tuberos que resultaron con algún porcentaje de pudrición después de la inducción	50
18	Tuberos del tratamiento EM-A6, en la izquierda antes de inducción y a la derecha tuberos que resultaron con algún porcentaje de pudrición después de la inducción	51
19	Tuberos del tratamiento EM-A8, en la izquierda antes de inducción y a la derecha tuberos que resultaron con algún porcentaje de pudrición después de la inducción	51
20	Tuberos del tratamiento EM-A11, en la izquierda antes de inducción y a la derecha tuberos que resultaron con algún porcentaje de pudrición después de la inducción	51
21	Plantas de papas del nivel R0 ( <i>Rhizoctonia</i> cero), con las distintas concentraciones de antagonistas en cámara de frío	55

Figura		Página
22	Plantas de papas del nivel de infestación RM ( <i>Rhizoctonia</i> medio), con las distintas concentraciones de antagonistas en cámara de frío	55
23	Plantas de papas del nivel de infestación RA ( <i>Rhizoctonia</i> alto), con las distintas concentraciones de antagonistas en cámara de frío	56
24	Raíces y tubérculos de papas del tratamiento RM-A0, que presentaron el menor promedio del largo de raíces, según interacción	59
25	Raíces y tubérculos de papas del tratamiento RM-A4, que presentaron el menor promedio del largo de raíces según la interacción	60
26	Raíces y tubérculos de papas del tratamiento RM-A11, que presentaron mayor promedio del largo de raíces, según la interacción	60

**ÍNDICE DE ANEXOS**

Anexo		Página
1	Análisis de varianza del parámetro altura de plantas de calas con las distintas variables mediadas a través del ensayo	93
2	Análisis de varianza del parámetro cantidad de brotes en el primer ensayo con plantas de calas, según las distintas variables medidas	94
3	Análisis de varianza del porcentaje de sobrevivencia de plantas de calas del primer ensayo	95
4	Análisis de varianza del porcentaje de sobrevivencia del segundo ensayo de calas	95
5	Análisis de varianza del parámetro cantidad de brotes del ensayo de papas	96
6	Análisis de varianza del parámetro número de tubérculos producidos por el tubérculo madre de las plantas de papas	97
7	Análisis de varianza del parámetro peso de tubérculos hijos	98
8	Análisis de varianza del parámetro largo de raíz en plantas de papas	98



## 1 INTRODUCCION

Los plaguicidas biológicos están teniendo un gran auge, debido a la creciente preocupación mundial de mantener o disminuir la contaminación medioambiental y de aminorar los daños a la salud de las personas. Lo anterior también está sustentado, por el hecho de que algunos plaguicidas químicos usados para controlar agentes causantes de enfermedades, poseen un casi nulo control sobre algunos patógenos que afectan a cultivos de importancia económica en el mundo.

El hongo *Rhizoctonia solani* causa la enfermedad conocida como “sarna negra”, principalmente en papa (*Solanum tuberosum*), encontrándose distribuido en todo el mundo. Su mayor importancia radica en la disminución del rendimiento por la muerte anticipada de la planta, destruyendo los brotes primarios bajo el suelo, causando cancro en los tallos, necrosis en los estolones y presencia de esclerocios en los tubérculos, ocasionando así la disminución comercial de estos.

Por otra parte, la bacteria *E. carotovora* causa la enfermedad conocida como “pudrición húmeda”. Este patógeno es el que causa el principal problema al cultivo en calas de colores (*Zantedeschia sp*). Los síntomas son pudriciones blandas en túberos y raíces, una errática emergencia de plántulas y caída de plantas.

Las prácticas culturales y aplicaciones de plaguicidas químicos para controlar estas dos enfermedades no han tenido el resultado esperado. Por lo anterior, en los últimos años se han acentuado las investigaciones en el campo del uso de microorganismos para fines agrícolas. Uno de estos es *Bacillus subtilis*, que se utiliza y se acepta mundialmente como componente de varios bio-pesticidas. De esta forma, se puede inferir que mediante cepas seleccionadas de *B.subtilis* provenientes de aislamientos obtenidos de fuentes naturales, es posible ejercer un control frente a *E. carotovora* en calas y *R. solani* en papas.

En base a todos estos antecedentes, la presente investigación tiene como objetivo general evaluar la capacidad inhibitoria de dos cepas de *B.subtilis*, una utilizada frente a

*E.carotovora* (pudrición húmeda) en calas y la otra frente a *R. solani* (sarna negra) en papas, bajo condiciones controladas.

Los objetivos específicos son los siguientes:

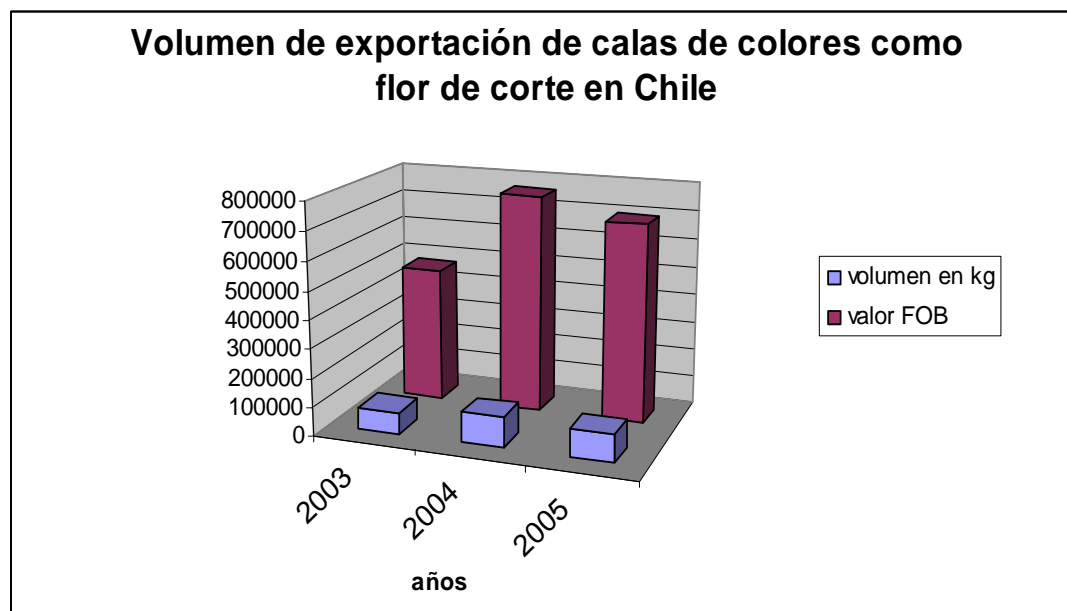
- Evaluar la cepa de *B. subtilis*, Bc 2 frente a *R. solani* en papas bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperíodo en un sustrato de suelo arcilloso esterilizado.
- Evaluar la cepa de *B. subtilis*, Bc 10 frente a *E. carotovora* en calas bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperíodo en un sustrato de mezcla de humus vegetal y turba.
- Determinar la inocuidad de las dos cepas antagonistas en calas y papas.
- Obtener dosis óptimas de la cepa antagonista en calas y papas, que controlen o reduzcan la enfermedad y que contribuya con el normal desarrollo de la planta.

## 2 REVISION BIBLIOGRAFICA

### 2.1 El cultivo de cala (*Zantedeschia sp*) en Chile.

En Chile, el cultivo de calas de colores fue iniciado comercialmente hace más de 10 años, cada vez con un mayor aumento, gracias a la incipiente exportación a los mercados de Holanda y Estados Unidos. Actualmente, hay medianos y grandes agricultores que se dedican a este rubro, siendo el mayor inconveniente la elevada inversión en material genético importado para producir flores de alta calidad, requerido por los mercados internacionales (MOLKENBUHR y TAPIA, 2005).

El volumen de las exportaciones de esta flor de corte entre enero y octubre del 2005 alcanzó a los 96750 kg, lo que indica que hay un leve aumento del volumen desde los años 2003 como lo indica el Figura 1.



**FIGURA 1** Volumen de exportaciones de calas de colores en kg y el valor FOB (US\$) en el transcurso de los años 2003 a 2005. FUENTE: MOLKENBUHR y TAPIA, 2005.

Las principales Regiones de producción como flor para corte y producción de túberos son la Metropolitana, Novena, Décima y Duodécima. Sin embargo, en los últimos años se ha visto un gran aumento en la superficie cultivada con cala de color en la provincia de Valdivia, Región de los Lagos, donde las condiciones de agua, luz y temperatura son las adecuadas para esta planta (MOLKENBUHR y TAPIA, 2005).

Si bien la zona sur de Chile presenta condiciones climáticas favorables para el cultivo de cala, la alta incidencia que provoca la bacteria patógena *Erwinia*, que ocasiona grandes pérdidas es una limitante en su producción. Por esta razón, en la Universidad de la Frontera de Temuco se realizó una investigación en calas de colores para disminuir el ataque de esta bacteria realizado por Pamela Leal Rojas Doctora en Ciencias, mención Biología Celular y Molecular. Esta se llevó a cabo por que se sabe que a nivel mundial las calas blancas son más tolerantes a la *Erwinia* que las de color, pero por incompatibilidad genética no se puede hacer cruce entre ellas, entonces a través de la ingeniería genética o tecnología molecular se transferió una característica de tolerancia a dicha bacteria (UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA. UFRO, 2005).

La cala de color es mucho más pequeña y liviana que la cala corriente y cuenta con una gran variedad de colores. Su cosecha se realiza entre fines de noviembre y enero, por lo que el 50% de los envíos se realiza durante el mes de diciembre (MOLKENBUHR y TAPIA, 2005).

La competencia en los mercados internacionales es muy grande. Por ello, tal vez la única forma en que Chile puede continuar avanzando con éxito en este negocio es ofreciendo productos de alta calidad y con un mayor valor agregado, que lo diferencie de la competencia y le permita acceder a nichos de mercados más exigentes (MOLKENBUHR y TAPIA, 2005).

Para lograr este objetivo es fundamental tener un manejo adecuado de la poscosecha, que permita mantener las flores el mayor tiempo posible en condiciones óptimas, tanto durante el transporte como en el florero. En Chile existe muy poco

conocimiento sobre este manejo; por lo tanto, si se quiere llegar a los mercados externos con un producto de calidad, es necesario continuar investigando y mejorar en esta materia (MOLKENBUHR y TAPIA, 2005).

**2.1.1 Descripción de *Erwinia carotovora* en cala.** La enfermedad más grave y aniquilante en este cultivo es la bacteria *E. carotovora*. No existe control para ella, sólo hay que prevenir que se desarrolle. Esto se logra a través de un cultivo sano, que crezca en condiciones óptimas, tanto de temperatura como de humedad y de un suelo limpio, libre de patógenos (CHAIN, 2001).

Esta bacteria pertenece a la familia Enterobacteriaceae, es de forma bacilar, Gram negativa y anaeróbica facultativa; no formadores de endosporas, se desplazan por medio de flagelos peritricos y sus colonias pueden ser blancas o amarillas. Se caracteriza por ser una bacteria oportunista, es decir, una infección latente en el tubero puede convertirse en activa cuando la planta se estresa bajo condiciones de temperatura y humedad. Las temperaturas mínimas, óptimas y máximas para que se desarrolle la enfermedad son de 5, 22, 37 °C, respectivamente (GUSS, 1999).

Las especies del género *Erwinia* pertenecientes al grupo *carotovora* son normalmente denominadas “erwinias causantes de pudriciones húmedas” por que su principal capacidad, es la de producir grandes cantidades de enzimas pécticas que les permiten macerar tejido parenquimático de un amplio rango de especies de plantas (SMITH *et al.*, 1992).

Este patógeno no puede sobrevivir por si mismo en el suelo, puede invernar en restos de cosecha o sobrevivir en la rizósfera de las malezas como hospedante. Así una vez que invada al tejido intercelular de la planta hospedera, se multiplica en él y posteriormente empieza la bacteria a generar enzimas pectolíticas (WALKER, 1965).

Esta bacteria se puede diseminar por insectos, agua de riego, maquinaria de cultivo, agua de lluvia y por utilización de material de propagación infectado (SMITH *et al.*, 1992).

*E. carotovora* inverna en los órganos carnosos infectados, ya sea almacenados o en restos que contienen partes de plantas infectadas, asociadas a las raíces en terreno. La enfermedad puede aparecer primeramente en el campo a través de heridas en los tuberos. La inoculación por bacterias de órganos carnosos y su diseminación posterior son facilitadas por insectos, los cuales permiten el avance de la infección en forma bastante eficiente, tanto en el almacenamiento como en el campo. Cuando las bacterias de las pudriciones blandas penetran en las heridas, se alimentan y se propagan inicialmente en los líquidos liberados por las células degradadas de la superficie herida del órgano (AGRIOS, 1996).

Esta bacteria en la etapa de propagación produce cantidades crecientes de enzimas pectinolíticas que degradan las sustancias pécticas de la lámela media y de la pared celular, produciendo la maceración de los tejidos; además, producen enzimas celulolíticas que causan la degradación parcial y el ablandamiento de la celulosa de las paredes celulares. Como resultado de la acción de estas y otras enzimas, el agua de los protoplastos de las células se difunde por los espacios intercelulares; las células plasmolizan, colapsan y mueren. Esta licuefacción de sustancias pécticas, que está presente comúnmente en los tejidos suculentos y la exosmosis del agua de los protoplastos en espacios intercelulares, producen la maceración de los tejidos invadidos y su transformación en una masa mucilaginosa (AGRIOS, 1996).

**2.1.2 Sintomatología de la pudrición húmeda en calas.** Los síntomas causados por esta bacteria son la pudrición húmeda en tuberos y raíces, una errática emergencia de las plántulas, caída de las mismas y el colapso del pedúnculo de la flor cortada en poscosecha (DOLE y WILKINS, 1999).

En las plantas, la patología comienza en la base de los tallos los que muestran una pudrición cuya coloración tiende a ser parda, luego de lo cual puede llegar a afectar al tubero o al tallo por completo. Al estar infectado el tubero las plantas presentan hojas amarillentas y decaimiento en general. Según sea la severidad del ataque puede incluso producirse la muerte de la planta. El tubero sufre un proceso de pudrición que lo puede inutilizar por completo (WRIGHT, 1994). En los tuberos, la pudrición se puede reconocer porque los tejidos adquieren una consistencia blanda, acuosa, de olor desagradable, donde los residuos celulares de la acción de enzimas bacterianas degradan la lámina media de las células afectadas, provocando la maceración de los tejidos (AGRIOS, 1996).

Para prevenir el ataque de organismos causantes de pudrición de tuberos en terreno, se deben considerar los siguientes factores: realizar rotación de cultivos, el suelo alrededor del tubero debe tener buena aireación y buen drenaje, utilizar material vegetal libre de enfermedades, idealmente debe provenir de cultivo de tejido y no tener más de dos ciclos de crecimiento. Además, desinfectar el equipo de trabajo, evitar dañar tuberos durante su manipulación, realizar el curado y almacenamiento de rizomas bajo condiciones adecuadas, desechar tuberos enfermos, y en el caso de tuberos que provengan de partidas de propágulos en los que se encuentran algunos de éstos infectados por *Erwinia*, se deben desinfectar aquellos que aparentemente no están enfermos (CHAIN, 2001).

**2.2 El cultivo de la papa en Chile.** Actualmente, la papa es el cuarto alimento básico en el mundo, después del arroz, el trigo y el maíz. El principal uso que se le da a esta hortaliza es la industrialización (RODRIGUES, 2004).

La papa se cultiva en Chile a lo largo de todo el país, desde las quebradas en Tarapacá hasta la Isla de Tierra del Fuego, con producciones comerciales concentradas en la Zona Centro Norte y Central y en la Zona Sur, para la producción de tubérculo semilla (RODRIGUES, 2004).

Según TAPIA (2005) e INE (2006), la papa ocupa el cuarto lugar en importancia de área sembrada. Presentó en el año agrícola 2005/2006 una cosecha de 13,9 millones de quintales, con un aumento de 24,7% en su producción y un rendimiento de 9,7% superior al del período 2004/2005, en este período el rendimiento llegó a alcanzar los 220,2 qm/ha. En el mismo período 2004/2005, la superficie de este cultivo en Chile alcanzó las 60 mil hectáreas, con un consumo per capita estimado de 70 kg año<sup>-1</sup>.

El rendimiento ha ido incrementando a través de los años, ya que en los años 90 alcanzaba un rendimiento de 15 ton ha<sup>-1</sup>, para llegar en el año 2005 con un promedio de 22 ton ha<sup>-1</sup> (TAPIA, 2001).

Estas cifras demuestran que la papa es uno de los alimentos básicos para la población nacional. La superficie cultivada se distribuye a lo largo de todo el país, pero se concentra en las Regiones X, IX y IV, como se demuestra en el Cuadro 1.

**CUADRO 1. Superficie , producción y rendimiento de papas en Chile**

Región	Superficie (ha)		Producción (ton)		Rendimiento (ton/ha)	
	2003/04	2004/05	2003/04	2004/05	2003/04	2004/05
IV	5.400	4.960	109.620	106.541	20,3	21,5
V	1.200	1.550	15.000	25.575	12,5	16,5
RM	4.000	3.260	63.360	43.228	15,8	13,3
VI	3.450	2.820	65.550	56.513	19,0	20,0
VII	3.800	2.800	57.190	42.448	15,1	15,2
VIII	6.400	6.290	128.320	127.498	20,1	20,3
IX	16.800	15.620	302.400	321.303	18,0	20,6
X	17.200	17.010	390.784	380.684	22,7	22,4
Resto país	1.310	1.310	11.946	11.946	9,1	9,1
<b>TOTAL</b>	<b>59.560</b>	<b>55.620</b>	<b>1.144.170</b>	<b>1.115.736</b>	<b>19,2</b>	<b>20,1</b>

Fuente: INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICAS, (2006).

La producción chilena de papas está fundamentalmente destinada al mercado interno y las exportaciones son muy pequeñas. Las compras de papas al exterior



crecieron fuertemente durante la década de los 90, mientras que las exportaciones se han mantenido en valores bastante menores (TAPIA, 2005).

El comercio exterior de papas y sus derivados se ha mantenido en los últimos cuatro años. Los principales productos derivados que se comercializan son deshidratado de papa, semillas, fécula (almidón), papas preparadas congeladas (papas prefritas), preparadas no congeladas (snack) y harina. Estas exportaciones se han mantenido desde el año 2003 vendiéndose productos por un valor FOB total de US \$ 2 millones ( TAPIA, 2005).

**2.2.1 *Rhizoctonia solani* en papa.** Una de las grandes limitaciones del cultivo de la papa son los problemas fitopatológicos, que producen pérdidas importantes en los rendimientos y calidad del producto, afectando su comercialización tanto en el mercado interno como externo. Entre las enfermedades más recurrentes en los tubérculos de papa en la zona sur de nuestro país está la rhizoctoniasis (ACUÑA *et al.*, 2004).

Esta enfermedad se encuentra en muchas áreas productoras del mundo, diseminándose con el agua de riego, la lluvia o por órganos infectados o contaminados. Afecta al cultivo desde la emergencia hasta la cosecha, atacando también a una extensa cantidad de especies vegetales, causando una baja calidad de la semilla, caída de plántulas, pudrición de raíces y enfermedades foliares (PARMENTER,1970).

*R.solani* es un hongo que consta de por lo menos cuatro formas más o menos emparentadas, estas cepas se distinguen entre sí debido a que las anastomosis (fusión de las hifas), sólo se producen entre los aislados de un mismo grupo de anastomosis. Presenta una fase anamórfica que se ubica dentro del Phylum Basidiomycota, género *Rhizoctonia* (anamorfo). En esta fase el hongo presenta un micelio castaño oscuro con hifas algo gruesas, posee ramificaciones en ángulo recto, constricciones en el punto de origen de la ramificación de la hifa y formación de una septa en el punto de origen (AGRIOS, 1996).

Estas características morfológicas anteriormente descritas no permiten diferenciar *R. solani* de otros aislamientos del mismo género, por esta razón se debe recurrir a características más específicas como son sus células jóvenes multinucleadas, aparato septal desarrollado y las características de su fase sexual (OGOSHI, 1987).

La fase telomórfica o sexual, se producen basidiosporas, para el caso de *R. solani* se denomina *Thanatephorus cucumeris*, perteneciente al Phylum Basidiomycota, orden Ceratobasidiales, género *Thanatephorus*, en esta fase se presentan hifas de más de 17µm de diámetro con constricciones cerca del punto de ramificación y basidias hialinas. Este hongo forma basidiosporas en condiciones ambientales especiales, siendo raro de encontrarlas en la naturaleza; de ahí que estas basidiosporas sean de poco valor en el diagnóstico del hongo, y en la práctica se hace referencia sólo a su fase anamórfica (AGRIOS, 1996).

El micelio se puede reconocer por medio de microscopía óptica, porque consta de células largas con ramificaciones, que crecen en ángulo recto con respecto a la hifa principal. Además, las hifas se estrechan a nivel de la bifurcación y poseen una septa cerca de ella (AGRIOS, 1996).

Este hongo vive principalmente en forma de micelio y/o esclerocios en el suelo, en plantas perennes o en órganos de propagación como los tubérculos de papa. Cuando las condiciones son favorables, el hongo germina e invade los tallos de las plantas o los brotes emergentes, especialmente a través de las heridas (FRANK, 1980), esto se puede apreciar en la Figura 2.

Este hongo se expande a través del estolón y la raíz para formar una extensa red de hifas. Durante esta etapa, la planta no produce síntomas. La etapa de infección se produce cuando ocurre la diferenciación de las células de la punta de la hifa en ramificaciones en forma de T, desarrollándose la almohadilla de infección sobre los

tallos y estolones susceptibles. Estas hifas más tarde penetran en el tejido de la planta (JEGER *et al.*, 1996).

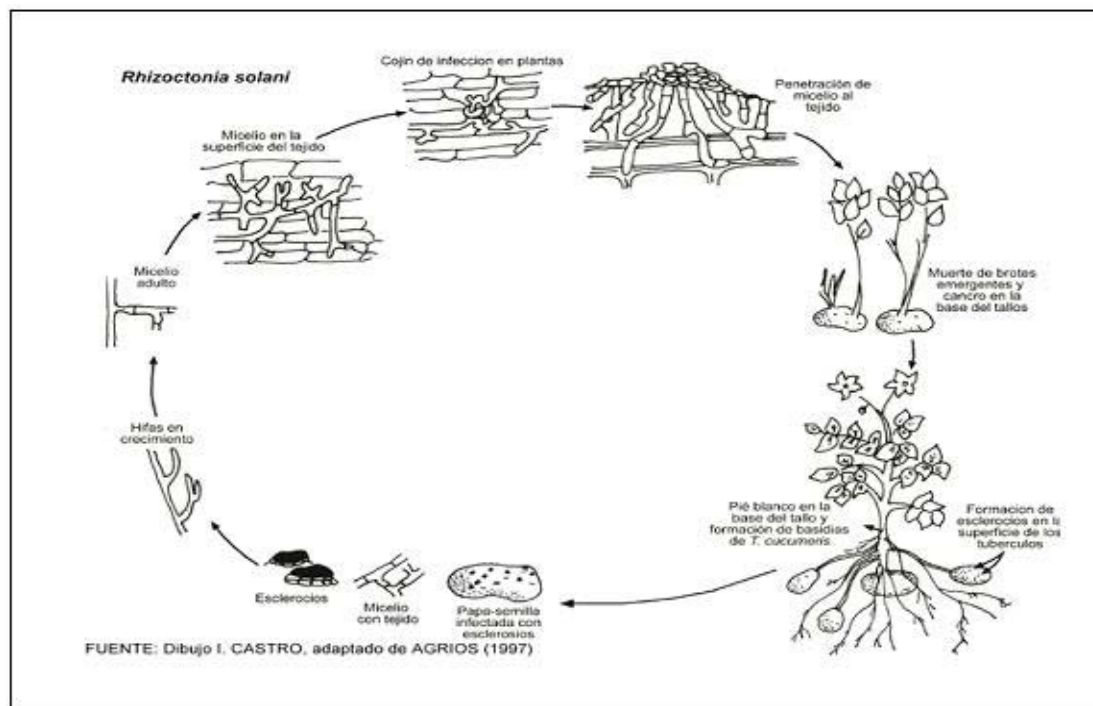
Sin embargo, la penetración no es puramente mecánica (mediante almohadillas de infección), este patógeno produce una variedad de enzimas como las pectinolíticas, celulolíticas y proteolíticas capaces de destruir varios componentes del hospedero, junto con la acción de toxinas que son producidas por micelio en crecimiento activo (Bateman, 1970, citado por BETANCOURT, 1996).

Al momento de cosecha, se producen los esclerocios sobre los tubérculos hijos; esto aparece porque los exudados de los tubérculos estimulan el desarrollo de la costra negra, redistribuyendo recursos de las hifas a los esclerocios (JAGER *et al.*, 1996).

Los esclerocios corresponden a conjunto de hifas variables en tamaño que se forman sobre los tubérculos hacia el final del ciclo vegetativo de la planta y que constituyen la forma de resistencia del hongo, ya que pueden vivir largo tiempo en el suelo, hasta que se presenten las condiciones adecuadas para germinar. Un medio frío y húmedo es propicio para el desarrollo de este hongo, atacando primero a los brotes y llegando a destruirlos cuando el clima favorece el desarrollo del patógeno. Cuando el clima no favorece el desarrollo del patógeno, los brotes son débiles, se retarda el crecimiento de la planta y se producen tubérculos deformes (ROHM y HASS, 1980).

Por lo tanto, existen en papa tres fases distintas. La primera es parasítica sobre plantas de papa, que corresponde a un esclerocio presente principalmente sobre tubérculos; estos sirven para mantener al hongo durante la época invernal. Las otras dos fases no son patogénicas; una de ellas se presenta sobre plantas de papas, produciendo un micelio superficial blanco presente sobre la zona baja de los tallos y que representa al estado sexual del hongo llamado *T. cucumeris*. La otra fase representa al estado sexual del hongo; esta se presenta en la superficie de los tallos, exactamente sobre la línea del suelo, formando una capa tenue, blanca plomiza sobre la que se originan las

basidiosporas y le dan a la superficie una apariencia polvorienta (HOOKER, 1980). Esta etapa se produce cuando hay suficiente humedad (AGRIOS, 1996).



**FIGURA 2. Ciclo biológico de *Rhizoctonia solani*, el agente causal de la “sarna negra” de la papa. FUENTE: AGRIOS (1996)**

Smith y Wilson (1978), citados por SCHNETTLER (1993), señalan que las temperaturas cardinales para el hongo son un óptimo de 25 a 30° C, un mínimo de 7,7° C y un máximo de 31 a 35 ° C. Indican que los esclerocios germinan de 7,7 a 30 ° C con el óptimo a 23 ° C, y el óptimo para la germinación de basidiosporas fluctúa entre 21 a 25° C.

BAKER y MARTINSON (1970), señalan que estaciones húmedas unidas a suelos mal drenados y pesados, favorecen el desarrollo de la enfermedad. El riego abundante aumenta la infección en las plantas, especialmente en raíces jóvenes.

**2.2.2 Sintomatología de sarna negra.** El hongo sobrevive en el suelo como micelio, atacando la parte inferior de la planta, destruyendo raíces y tallos subterráneos. Cuando los brotes comienzan a desarrollarse, en diferentes porciones se observan manchas de color oscuro que terminan por destruir el tejido y matar el brote, que generalmente no alcanza a emerger. Cuando la planta se ha desarrollado y están afectadas las raíces y el tallo subterráneo, se manifiestan los síntomas en el follaje. En un comienzo el color normal de las hojas apicales y los brotes se torna amarillento y luego adquiere un tono rojo desteñido. Los tallos suelen engrosarse y las yemas axilares comienzan a alargarse y engrosarse, originando tubérculos aéreos. En los estolones y raíces aparecen al principio manchas castaño oscuras, que posteriormente se transforman en canchales alargados y bien delimitados (CALDERONI, 1978).

Estos canchales pueden continuar creciendo y llegar a estrangular la parte afectada especialmente en plantas nuevas; en plantas adultas la formación del canchal debilita la parte aérea y la hace más susceptible a otras enfermedades (ACUÑA *et al.*, 2004).

Los esclerocios se desarrollan sobre la superficie del tubérculo y estos pueden variar de tamaño desde muy pequeño, planos, con punteado negro, hasta grandes masas irregulares que cubren una gran parte del tubérculo, perjudicando su apariencia y calidad (ACUÑA *et al.*, 2004).

Se han propuesto muchos métodos para controlar esta enfermedad, pero hasta la fecha ninguno ha sido efectivo. A continuación se detallarán algunas formas de controlar *R. solani* :

- Rotación de cultivos, por lo menos 3 o 4 años, con cultivos de cereales y crucíferas que no son afectados por esta enfermedad.
- Uso de semilla certificada, que garantice la pureza de la variedad.
- Uso de cultivares menos susceptibles a *R. solani*.
- Prácticas culturales que induzcan una rápida emergencia y desarrollo de plantas.
- Cosecha rápida de los tubérculos.
- Tratamiento químico a la semilla (ACUÑA *et al.*, 2004).

### 2.3 Principales antagonistas biológicos estudiados.

Los antagonistas como agentes de control biológico de patógenos de plantas incluyen bacterias, Actinomycetes, hongos, virus, plantas superiores y microfauna depredadora (BAKER y COOK, 1974).

En el extranjero se han determinado hongos antagonistas para el control biológico como *Rhizoctonia* spp binucleada para el control de *Rhizoctonia solani*, *Gliocladium virens* y *Trichoderma harzianum*, efectivos sobre enfermedades conocidas como caída de plántulas en ornamentales y hortalizas (AGRIOS, 1996).

En cuanto a agentes antagonistas bacterianos, se encuentran los géneros como *Bacillus* spp, *Streptomyces* spp., *Fusarium* spp, *Verticilium* spp, *Gaeumannomyces* spp y especialmente *Pseudomonas* spp. Estas bacterias tienen propiedades específicas para controlar infecciones causadas por patógenos en las raíces del suelo, ya que producen antibióticos y una competencia por el hierro +3 (VAN DRIESCHE y BELLOWS, 1996).

*Agrobacterium radiobacter* es una bacteria antagonista que controla la enfermedad *Agrobacterium tumefaciens*, agente responsable de la formación de tumores en plantas; comercialmente ahora es usado para el tratamiento de semillas, plántulas y esquejes (AGRIOS, 1996).

*Streptomyces scabies*, organismo que causa la sarna común en papas, es suprimido naturalmente por *Bacillus subtilis* y el saprófito *Streptomyces* spp (AGRIOS, 1996).

Las Rhizobacterias (bacterias colonizadoras de raíces), como las del género *Pseudomonas*, aplicadas en trozos de semilla y raíces de plantas, muestran resultados en menor caída de plántulas e incrementos consistentes en crecimiento y rendimiento en diversos cultivos (AGRIOS, 1996).

**CUADRO 2 Principales bioantagonistas usados para el control de enfermedades con su nombre comercial, los cultivos donde se aplica y patógenos que controla.**

<b>Antagonista</b>	<b>Nombre comercial</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Fitopatógenos a controlar</b>
<i>Bacillus subtilis</i>	Serenade SC Y WP	Uva de mesa	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Uncila necator</i> Pudrición Acida
<i>Trichoderma harzianum</i> y <i>T.polysporum</i>	Binab T	Frutales y plantas ornamentales	<i>Fusarium</i> spp, <i>Botrytis</i> spp, <i>Rhizoctonia</i> spp, <i>Sclerotium</i> spp, <i>Sclerotinia</i> spp
<i>Trichoderma harzianum</i>	Trichodex 25 WP	Uva de mesa y vínifera	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Streptomyces</i> spp	Actinovate Mycostop	Papa	<i>R.solani</i>
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus</i> spp. Y <i>Pseudomonas fluorescens</i>		Papa	<i>R.solani</i>
<i>Fusarium</i> spp	Biofox C, <i>Fusaclean</i>	Tomate, espárrago	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Pythium oligandrum</i>	<i>Polyversum</i>	Tomate, papas, pepinos, Brassicaceae, frutales leguminosas, cereales	<i>Pythium</i> spp, <i>Fusarium</i> spp, <i>Botrytis</i> spp, <i>Phytophthora</i> spp, <i>Alternaria</i> spp, <i>Rhizoctonia solani</i> .
<i>Pseudomonas</i> spp	BioJect Spot-Less, Bio-save, BlightBan, Cedomon	Cesped Frutales Papa Cereales	Antracnosis <i>B.cinerea</i> , <i>Penicillium</i> spp, <i>E.amylovora</i> <i>Fusarium</i> spp
<i>Agrobacterium</i> spp.	Galltrol, Nogall	Frutales y plantas ornamentales	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>

FUENTE: ASOCIACION NACIONAL DE FABRICANTES E IMPORTADORES DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS AGRICOLAS (2002, 2003).

En el Cuadro 2 se puede observar los principales antagonistas usados, según ASOCIACION NACIONAL DE FABRICANTES E IMPORTADORES DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS AGRICOLAS (2002, 2003) para el control de enfermedades.

Las Rhizobacterias son encontradas naturalmente en la rizósfera de las plantas, que es un volumen de suelo que está dentro de la zona de influencia de las raíces vivas, extendiéndose al menos uno o dos milímetros de la superficie radicular. En esta zona se encuentra una línea de defensa contra el ataque de patógenos, por lo tanto es posible encontrar microorganismos que pueden ser ideales para ser empleados como agentes de biocontrol (WELLER, 1988).

Las más corrientes enfermedades controladas por bacterias del suelo son la caída de plántulas y enfermedades de las raíces causadas por los hongos *Pythium*, *Pythoptora*, *Rhizoctonia*, *Fusarium* y *Gaeumannomyces* (AGRIOS, 1996).

#### **2.4 *Bacillus subtilis* como bioantagonista.**

Las bacterias antagonistas, según BAKER y COOK (1974), forman parte de un numeroso grupo de microorganismos del suelo y de la rizósfera. Aunque la microflora cerca de la raíz, es considerada como la primera línea de defensa en el sistema radicular contra el ataque de patógenos, muy pocas bacterias tienden a ser descritas individualmente como antagonistas capaces de controlar patógenos de las raíces. Las únicas especies utilizadas como control biológico en este caso son *Bacillus* spp y muy pocas bacterias del género *Arthrobacter* y *Pseudomonas*. Estas bacterias fueron seleccionadas y reintroducidas al suelo para controlar patógenos, aun cuando son habitantes naturales de la rizósfera en plantas. Esto puede ser explicado por el mecanismo que usan estos microorganismos para control biológico, donde fueron seleccionados por la capacidad de producir antibióticos; esta propiedad ocurre con



frecuencia en las especies de *Bacillus*, más bien que en los otros mencionados (RODRIGUEZ y JULIA, 2006).

*B. subtilis* es una bacteria Gram positiva de forma bacilar, cuyo habitat natural es el suelo, viven entre los límites de temperatura de 55-70 °C, y su límite inferior de pH es de 2 a 3. Esta bacteria produce endosporas, estructuras altamente resistentes y viables por períodos de tiempo inconmensurables, estas también pueden ser invulnerables a factores físicos perjudiciales como la desecación, radiación, ácidos y desinfectantes químicos (GONZALEZ y FRAGOSO, 2002).

La producción de endosporas por *Bacillus* ocurre al finalizar la fase exponencial de crecimiento, destruyendo posibles agentes que interfieran en el normal desarrollo de estos microorganismos. Asociado a la esporulación, la producción de un gran número de metabolitos secundarios o antibióticos son producidos por la bacteria perturbando al metabolismo de especies enemigas, al punto que mueran a sean incapaces de reproducirse (BUTT, *et al*, 1999; ROLLINS, 2000; SCHMIEDEKNECHT *et al.*, 2001; IAÑEZ, 1998).

La producción de metabolitos de esta bacteria presenta propiedades antibacterianas y antifúngicas; esta última es la más conocida y estudiada frente a hongos como *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Phytophthora* y *Gaeumannomyces*, entre otras. Esta actividad antifúngica se debe a polipéptidos producidos por *Bacillus*, como la iturina, subtilina, bacitracina (SALLE, 1968), mycobacillin, mycosubtillin, fengimincina y bacillomycin (SINCLAIR, 1992), que actúan sobre la pared celular de los hongos. En el caso de la actividad antibacteriana producida por *Bacillus* no existe mucha información, sólo existen informes de control frente a *Xanthomonas campestris* y a *E. carotovora*, donde el principal antibiótico producido es la surfactina, que posee un poder bactericida, modificando la superficie hidrófoba bacteriana. Algunos antibióticos polipeptídicos producidos por miembros del género *Bacillus* parecen destruir las bacterias, dañando principalmente la pared celular como la bacitracina o interfiriendo con la función de la membrana celular, destruyendo

así la barrera de permeabilidad de la célula, como es el caso de las iturinas y surfactinas (CARRILLO, 2003).

Normalmente, esta serie de antibióticos mencionados, son producidos *in vitro*, cuando se comprueba la inhibición con el patógeno en cuestión, ocupando un medio óptimo para su crecimiento. Pero la producción *in situ*, o sea en invernadero o en campo, es casi siempre más sensible, ya sea por las condiciones químicas (pH, salinidad, nutrientes) o físicas (textura) del suelo, temperatura, humedad (OWNLEY *et al.* 1992; ENGELKES *et al.* 1997), en la cual las bacterias no pueden desarrollarse normalmente.

Esta bacteria es capaz de lograr el antagonismo por diversos mecanismos tales como:

- Competencia por nutrientes en la rizósfera en lo que respecta a la utilización de carbohidratos y nitrógeno.
- Exclusión de sitio, en la que el antagonista debe ser más rápido que el patógeno al momento de colonizar la rizósfera.
- Colonización de la bacteria en el patógeno y o liberación de componentes celulares durante el crecimiento, protegiendo su nicho, inhibiendo el crecimiento de los competidores y utilizando la misma fuente nutricional.
- Antibiosis, este consiste en la inhibición de un microorganismo por parte de otro a través de la acción del metabolito, para que ocurra la síntesis de esta sustancia antibiótica por parte del antagonista, debe existir una adecuada fuente de carbono, el cual puede encontrarse en diversas formas de alimentos producidos por los exudados radiculares o de las semillas, siendo la calidad de este sustrato alimenticio un factor determinante en la calidad y cantidad del antibiótico producido.
- Además esta bacteria ha demostrado además inducir la resistencia sistemática natural de la planta contra patógenos bacterianos y fungos (BUTT, *et al.*, 1999).

## **2.5 Bioplaguicidas que se aplican a través del riego.**

Hoy en día, se encuentran productos comerciales disponibles en el mercado en formulaciones constituidas por microorganismos vivos. Estas formulaciones tienen como principales componentes a hongos y bacterias (UNITED STATES, DEPARTAMENT OF AGRICULTURE, 1998).

Existe un biofungicida llamado Serenade creado por una empresa en California, que usa como antagonista a *B. subtilis*, para el control de enfermedades como Oídio, *Botrytis*, *Erwinia amylovora*, y pudrición acida en vides. Esta formulado como suspensión mojable o suspensión concentrada que es utilizada a través del riego en Chile (SOFFIA, 2005).

Las diferentes formas de cómo los productos biológicos están formulados, va a depender de la forma de su aplicación; por esto las hay granulares, en pellets con células congeladas, sustrato de turba, líquido, polvo seco y células vivas en agar (UNITED STATES, DEPARTAMENT OF AGRICULTURE, 1998).

La forma de aplicación de estos productos es muy variada, pero la mayor parte es realizada por aspersion líquida e incorporación en el suelo (UNITED STATES, DEPARTAMENT OF AGRICULTURE, 1998). En el Cuadro 3 se puede apreciar las distintas formas de aplicación de diversos bioantagonistas.

**CUADRO 3. Bioantagonistas, su nombre comercial, formulación y modo de aplicación**

<b>Bioantagonista</b>	<b>Nombre comercial</b>	<b>Formulación</b>	<b>Aplicación</b>
<i>Pseudomonas</i> spp	BIOJECT	Líquido	Riego
<i>Pseudomonas</i> spp	BLIGH BAM	Polvo mojable	Aerosol
<i>Streptomyces</i> spp	ACTINOVATE	Granulo dispersable en agua	Riego
<i>Streptomyces</i> spp	MYCOSTOP	Polvo	
<i>Fusarium</i> spp	BIOFOX C	Granulo	Tratamiento semilla e incorporación al suelo
<i>Fusarium</i> spp	FUSACLEAN	Micro gránulo	Riego
<i>Bacillus subtilis</i>	KODIAK	Polvo seco	Tratamiento semilla
<i>B. subtilis</i>	SUBTILEX	Polvo	Riego
<i>Trichoderma harzianum</i> y <i>T. polysporum</i>	BINAB	Polvo mojable y pellets	Aerosol
<i>T. harzianum</i>	TRICHODEX	Polvo mojable	Aerosol

FUENTE : MC SPADDEN (2005).

### 3 MATERIAL Y METODO

La presente investigación, que forma parte del Proyecto Fondef DO3I-1140, se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile, en donde se probó la acción antagonista de dos cepas de *B. subtilis* en ensayos de macetas, para posteriormente poder establecer una posible dosis óptima de estas, para el control de *R. solani* y *E. carotovora* en papas y calas, respectivamente.

El estudio, en su fase práctica, se realizó en el período comprendido entre octubre de 2005 y marzo de 2006.

#### 3.1 Materiales utilizados para el estudio en calas.

A continuación se detallan los materiales a utilizados en este ensayo.

**3.1.1 Preparación del inóculo de *Erwinia carotovora* en calas.** Placas de Petri, asa de siembra, pipetas estériles, micropipetas, puntas estériles, tubos de ensayo estériles, tubos falcon, matraces Erlenmeyer, agitador orbital, cámara de flujo laminar, agua destilada estéril, cámara de incubación, autoclave, microscopio óptico, portaobjetos, y cronometro digital.

Medio de cultivo (agar peptona)

- Extracto de carne      3g L<sup>-1</sup>
- NaCl                      5g L<sup>-1</sup>
- Peptona de caseína    10g L<sup>-1</sup>
- Agar                      20g L<sup>-1</sup> (\*)

\*Caldo peptona, contiene los mismos ingredientes exceptuando agar.

**3.1.2 Propagación de la cepa antagonista BC10.** Matraces Erlenmeyer, pipetas estériles, agitador orbital, fermentador, agua potable estéril, bomba peristáltica,

mangueras estériles, frascos estériles, autoclave, microscopio óptico, portaobjetos, balanzas analíticas y espátulas.

Medio de cultivo.

- Cultivo madre de melaza (20 g L<sup>-1</sup>)
- Sacarosa (2 g L<sup>-1</sup>)
- Extracto de levadura (1 g L<sup>-1</sup>)
- Sulfato de amonio (5 g L<sup>-1</sup>)
- Buffer fosfato KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a pH 5.5 (utilizado solo en cultivos de los matraces).
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.3 g L<sup>-1</sup>) (solamente en fermentador)
- HCl y NaOH 2N, para regular pH del fermentador.

**3.1.3 Materiales para la preparación de túberos de calas para su posterior plantación.** Agua destilada estéril, escobilla suave, hipoclorito de sodio al 5%, agua destilada, toalla nova estéril, horno Pasteur, autoclave, estufa esterilizadora y bisturí estéril.

**3.1.4 Materiales para las evaluaciones en calas.** Para las evaluaciones se utilizaron los siguientes materiales:

- Bolsa de polietileno de 3 litros de capacidad usadas como macetas
- Mezcla de turba y humus vegetal en una relación 1:10
- 216 túberos de cala (*Zantedeschia* sp) de la variedad Lady Lack de segunda y tercera temporada, sin síntomas aparentes de pudrición blanda.
- Cámara de crecimiento con condiciones controladas de temperatura y fotoperíodo.

**3.1.5 Cepa antagonista.** Se utilizó en el cultivo de calas una cepa BC10, correspondiente a una especie de *B. subtilis*, aislada de hojas provenientes del jardín botánico que presenta antagonismo comprobado frente a *E. carotovora*, en estudios realizados *in vitro* (MENDEZ, 2005).

**3.1.6 Cepa control.** La cepa control para verificar la capacidad antagónica de la cepa BC10, correspondió a *E. carotovora* LC-37<sup>1</sup>, aislada de túberos de calas, los cuales presentaban síntomas propios de la enfermedad causada por este tipo de patógeno.

### **3.2 Método usado para el ensayo de calas.**

A continuación se describirá la metodología a emplear para el aislamiento y propagación de la cepa patógena, preparación y propagación de la cepa antagonista, preparación de los sustratos y la plantación de los túberos.

**3.2.1 Propagación de la cepa patógena en calas.** Se repicó frecuentemente *Erwinia* LC-37 virulenta que se encontraba almacenada en placas con agar peptona, para obtener finalmente cultivos frescos. Para la propagación de esta cepa patógena, se inoculó mediante azadas de las colonias típicas en caldos peptona, contenidos en dos tubos Falcon estériles con 40 mL cada uno. Estos fueron agitados por 24 horas a 25 °C y 100 rpm en un agitador orbital. Posteriormente, se retiraron para volver a inocular en caldo peptonado, esta vez 2 litros de caldo peptona estéril divididos en 4 matraces de un litro de capacidad, los cuales contenían 500 mL de medio de cultivo cada uno. El inóculo será al 4 %, siendo sometido a las mismas condiciones de agitación, tiempo y temperatura de la primera etapa. Posterior a este tiempo se verificó el crecimiento bacteriano mediante lectura de la densidad óptica del cultivo a 600 nanómetros (D.O<sub>600</sub>). Esta lectura se basó en estudios previos que demuestran que para un cultivo de *E. carotovora* cultivada en caldo peptona y cuya D.O<sub>600</sub> es cercana a 1, su población es de  $1 \times 10^8$  ufc/mL. A partir de los 2 litros de cultivo de *Erwinia* de concentración  $1 \times 10^8$  ufc/mL, se efectuaron diluciones en agua destilada para evaluar tres niveles de infestación, como se muestra a continuación.

---

<sup>1</sup> Risco, D. (2006). Estudiante de Tecnología Médica. Universidad Austral de Chile. Comunicación personal.

a)  $E_0 = 0$  ufc/mL (Bajo). Tratamiento control para demostrar que el sustrato donde se plantaron los túberos de calas no es dañino, verificar la presencia de túberos que presenten la enfermedad aún siendo previamente higienizados y sin enfrentarse al inóculo de *Erwinia* ( $E_0$ ) y por último verificar la inocuidad de la cepa antagonista (BC10) en distintos niveles de aplicación.

b)  $E_m = 10^4$  ufc/mL (Medio). Tratamiento donde se esperó un posible efecto antagonista dependiendo de la concentración del antagonista.

c)  $E_A = 10^8$  ufc/mL (Alto). Tratamiento que aseguraría la enfermedad (pudrición blanda en los túberos plantados en las macetas) y así validar los tratamientos alto y medio.

En cada maceta de plástico se agregó 250 mL del patógeno por cada nivel de infestación, por lo tanto las poblaciones por cada nivel son:  $EM = 2,5 \cdot 10^6$  UFC,  $EA = 2,5 \cdot 10^{11}$  UFC y en  $E_0 = 0$  UFC; en este último nivel sólo se incorporó agua destilada.

**3.2.2 Preparación y propagación de la cepa antagonista en calas<sup>2</sup>.** La cepa antagonista BC10 provino de un cultivo líquido en medio base de melaza, cultivado en agitador orbital a 28 °C y 250 rpm por 24 horas. Posteriormente, se prepararon 10 litros del mismo medio en fermentador, autoclavado a 121°C por 30 minutos, para poder satisfacer las necesidades del ensayo como es la concentración del *Bacillus* y el volumen que se inoculó en las macetas. Los parámetros utilizados para fermentación fueron los siguientes: pH 5.5, temperatura de 28 °C, aireación de 1 v/vm, agitación constante y el tiempo de cultivo 40 horas.

Una vez obtenido el inóculo del fermentador en una población aproximada de  $1 \times 10^{14}$ , se prosiguió con las distintas diluciones en agua destilada para así conformar los distintos niveles de cepa antagonista, los que fueron enfrentados a *E. carotovora*. Estas concentraciones son las siguientes:

---

<sup>2</sup>Ruminot, C. (2006). Ingeniero en Alimentos. Instituto de Producción y Sanidad vegetal. Universidad Austral de Chile. (Comunicación personal).



$$A_0 = 0 \text{ ufc/mL}$$

$$A_4 = 10^4 \text{ ufc/mL}$$

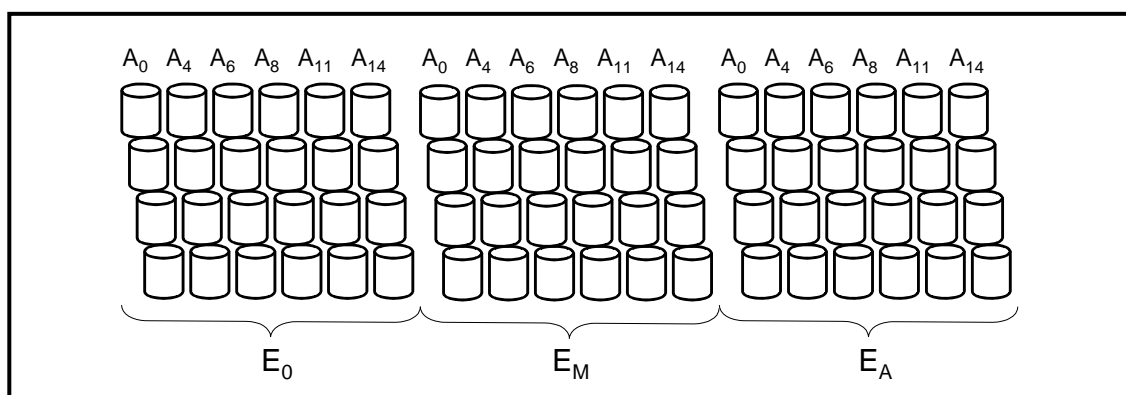
$$A_6 = 10^6 \text{ ufc/mL}$$

$$A_8 = 10^8 \text{ ufc/mL}$$

$$A_{11} = 10^{11} \text{ ufc/mL}$$

$$A_{14} = 10^{14} \text{ ufc/mL}$$

En resumen, fueron 3 niveles de inóculo del patógeno por 6 dosis de la cepa antagonista, o sea 18 tratamientos con cuatro repeticiones, como se muestra en la Figura 3.



**FIGURA 3: Esquema representativo de los 18 tratamientos correspondientes a 3 niveles de patógeno y 6 de la cepa antagonista en el ensayo de calas.**

**3.2.3 Preparación del sustrato y túberos.** Antes de plantar los túberos primero se hizo un lavado con abundante agua potable, utilizando una escobilla suave; posteriormente fueron desinfectados en una solución de hipoclorito de sodio al 5% por 5 minutos. Luego se realizaron enjuagues con agua destilada estéril durante 5 minutos, seguido de un secado con una toalla nova estéril para finalmente ser envueltos en un papel absorbente estéril para mantener su higienización. Estos túberos fueron almacenados en cámara fría, previo al momento de ser plantados.

En el caso del sustrato se usó una mezcla de turba y de humus vegetal en una proporción de (1:10) el que fue previamente esterilizado a 121°C por 2 horas.

**3.2.4 Preparación de las bolsas de polietileno con sustrato y túberos.** A cada bolsa de polietileno, se le introdujo 2.5 kg de sustrato, para después inocular el suelo con 250 mL del patógeno (*E. carotovora*) en las dosis indicadas anteriormente (3.2.1). Luego de 24 h se plantaron los túberos a los que se les debió inducir heridas mediante bisturí estéril para facilitar así la infestación con *Erwinia*. Se plantaron 3 túberos por cada maceta en forma aleatoria a una profundidad de 5 cm; después de 24 h se agregó los 250 mL de la cepa antagonista *Bacillus* BC10, según las concentraciones indicadas (3.2.2). Estas macetas fueron mantenidas por 10 semanas en una cámara bajo condiciones adecuadas de temperatura (25° C), humedad y fotoperíodo (16 h luz y 8 h oscuridad). Cada 3 días fueron regadas con 200 mL de H<sub>2</sub>O destilada sin producir percolación evitando así la pérdida de la cepa antagonista o la cepa patógena.

**3.2.5 Parámetros a medir en el ensayo de calas.** Los parámetros a evaluar fueron los siguientes:

-Para observar el crecimiento y la incidencia de la enfermedad se midió cada 10 días, la altura de las plantas desde el cuello hasta la última hoja, la cantidad de brotes por maceta cada 7 días en las primeras 6 fechas de medición y cada 11 días en las últimas dos fechas, con esto se obtuvo el % de sobrevivencia de las plantas.

-Al final del ensayo, se hizo una observación de los túberos y las plantas de calas, clasificándolas según el grado de pudrición del túbero y el desarrollo que presentaba la planta al momento de su cosecha. La clasificación que se hizo en esta etapa se ajustó a la siguiente escala fitopatológica:

- a) **1** Túbero no emergido. Túbero completamente podrido por causas bacterianas o por otros agentes responsables de pudriciones.
- b) **2** Planta emergida parcialmente (hasta 5 cm), la planta logró emerger con un sólo tallo corto y ha dejado de crecer, a pesar de que el túbero se encuentra completamente podrido por causas bacterianas o por agentes responsables de pudriciones.

- c) **3** Planta emergida parcialmente (sobre 5 cm), la planta logró emerger con un sólo tallo y ha dejado de crecer, ya que el túbero se encuentra totalmente podrido por causas bacterianas o por agentes causantes de pudriciones.
- d) **4** Planta emergida totalmente que ha dejado de crecer, presenta hojas y tallos. Túbero ligeramente dañado y con pocas raíces.
- e) **5** Planta sana, presencia de hojas verdes, varios tallos y largos. Túbero intacto con abundante raíces.

**3.2.6 Diseño estadístico.** Los tratamientos ensayados correspondieron a un arreglo factorial enteramente al azar de 6 niveles de la cepa antagonista *B. subtilis*, 3 niveles de *E. carotovora*; con 4 repeticiones. Se practicó un análisis de varianza en un diseño enteramente al azar en el programa Statgraphics 5.1 en el caso de altura de plantas, cantidad de brotes y % de sobrevivencia. Cuando presentaron diferencias estadísticas en estos parámetros medidos se realizó el Test de Tuckey. Para realizar el análisis de la clasificación de túberos y plantas de calas se uso estadística no paramétrica, utilizando el test de Kruskal-Wallis y posteriormente el test de Dunn.

### 3.2.7 Segundo ensayo de calas

-En forma complementaria se realizó un segundo ensayo de calas, con el nivel de *Erwinia* que poseía los mejores resultados obtenidos del primer ensayo. Por esto sólo se uso el nivel de *Erwinia* medio cuya concentración era de  $10^4$  ufc/mL. Las concentraciones de antagonistas de la cepa BC10 que se utilizaron en este ensayo fueron cinco:

$$A_0 = 0 \text{ ufc/mL}$$

$$A_4 = 10^4 \text{ ufc/mL}$$

$$A_6 = 10^6 \text{ ufc/mL}$$

$$A_8 = 10^8 \text{ ufc/mL}$$

$$A_{11} = 10^{10} \text{ ufc/mL}$$

Este ensayo fue realizado en las mismas condiciones anteriormente expuestas en el punto 3.1 y 3.2 de material y método, las únicas diferencias que existieron fueron a que los túberos no se les indujo heridas en el tejido superficial y que este experimento fue realizado bajo invernadero durante ocho semanas, con el propósito de poder apreciar el comportamiento de la cepa antagonista sobre la planta, en un sistema menos controlado en lo que respecta a temperatura y luz.

**3.2.8 Parámetros a medir durante el segundo ensayo de calas.** Los parámetros analizados durante el ensayo fueron:

- Medición cada 10 días de la altura de la planta, cantidad de brotes para finalmente obtener el % de sobrevivencia.
- Cuando las plantas alcanzaron el 25 % de la floración se procedió a cortar los tallos a 3 cm del suelo suspendiéndole por completo el riego por unas cuatro semanas. Después de esto se procedió a cosechar los túberos de las plantas, momento en el cual se observó y separó visualmente los túberos enfermos de los sanos.
- Los túberos que resultaron sanos se les trató de inducir la enfermedad (*E. carotovora*); para poder comprobar o rechazar la idea de que el túbero podría ser el portador de la enfermedad *Erwinia* spp.

Los pasos a seguir para realizar la inducción fueron los siguientes:

- 1.-Se lavaron con agua corriente y una escobilla suave, para extraer el sustrato que poseían.
- 2.- Se pesaron todos los túberos
- 3.-Se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5 % por 5 minutos.
- 4.-Posteriormente se volvieron a lavar con agua destilada estéril.
- 5.-Después se envolvieron en toalla nova estéril humedecida y con plástico alusa.
- 6.- Se incubaron por 5 días en estufa entre 25° a 30° C (estas son condiciones propicias para que la bacteria se desarrolle si se encontrase en el interior del túbero).
- 7.- Finalmente se observó si se desarrollo la enfermedad en los túberos. Los que habían desarrollado la pudrición húmeda fueron lavados para sacarle el tejido macerado y

volvieron a ser pesados, para posteriormente sacar una relación entre el peso inicial del túbero y el final.

**3.2.9 Diseño estadístico del segundo ensayo de calas.** Los tratamientos ensayados correspondieron a un diseño enteramente al azar con 5 niveles de la cepa antagonista *B. subtilis*, 1 nivel de la cepa patógena *E. carotovora*; con 4 repeticiones. Se practicó un análisis de varianza enteramente al azar en el programa de Statgraphics 5.1. Cuando se presentaron diferencias estadísticas se realizó el Test de Tuckey.

### **3.3 Materiales utilizados para ensayo en papas.**

A continuación se detallan los materiales a utilizar en este ensayo.

#### **3.3.1 Preparación del inóculo de *Rhizoctonia solani* en papas.**

-Placas de Petri, sacabocados, granos de centeno, vaso precipitado estéril, colador, picadora Moulinex, asa de siembra, portaobjeto, cámara de flujo laminar, estufa esterilizadora, agua destilada estéril, cámara de incubación, matraces Erlenmeyer esterilizados, autoclave Quimis, microscopio óptico, cronómetro digital y bandeja de aluminio esterilizada.

#### **3.3.2 Propagación cepa antagonista BC2<sup>3</sup>**

- Matraces Erlenmeyer, pipetas estériles, fermentador, bomba peristáltica, mangueras estériles, frascos estériles, balanzas analíticas y espátulas.

Medio de cultivo.

- Cultivo madre de melaza (10%) (200 mL L<sup>-1</sup>)
- Sacarosa (2 g L<sup>-1</sup>)
- Extracto de levadura o carne (5g L<sup>-1</sup>)
- Sulfato de amonio 5g L<sup>-1</sup> (solamente utilizado en cultivo del fermentador)

---

<sup>3</sup> Ruminot, C. Ingeniero en Alimentos. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. Universidad Austral de Chile. (Comunicación personal. 2006).

- Buffer fosfato  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  (utilizado sólo en cultivos batch de matraces).
- HCl y NaOH 5N, para regular pH del fermentador.

### **3.3.3 Preparación de tubérculos de papas para su posterior plantación.**

- Agua destilada estéril, escobilla suave, hipoclorito de sodio al 5%, cloro, agua destilada, toalla nova estéril, horno Pasteur y autoclave.

### **3.3.4 Materiales para las evaluaciones en papas.**

- Bolsas de polietileno de 1 litro de capacidad usadas como macetas.
- Suelo arcilloso esterilizado
- 72 tubérculos de papas (*Solanum tuberosum*) del cultivar Desiree
- Cámara de crecimiento con condiciones controladas de temperatura y fotoperíodo.
- Invernadero.

**3.3.5 Cepa antagonista para controlar *R. solani*.** Se utilizó la cepa BC2, correspondiente a un tipo de *B. subtilis* aislado de raíces de calas proveniente del vivero BOPAR. Esta cepa presenta un antagonismo comprobado frente al hongo *R. solani* en estudios realizados ‘*in vitro*’. (BARRIA, 2005)

**3.3.6 Cepa control.** La cepa control para verificar la capacidad antagónica de la cepa BC2, corresponderá a *R. solani*, aislada de esclerocios de papas.

**3.4 Método usado para el ensayo de papas.** A continuación se describirá la metodología a emplear para el aislamiento y propagación de la cepa patógena (*R. solani*), preparación y propagación de la cepa antagonista (*B. subtilis*), preparación del sustrato y la plantación de los tubérculos.

**3.4.1 Preparación del inóculo en papas.** Para cultivar *R. solani* se debió utilizar unos 60 g de granos de centeno, que se depositaron en un matraz con unos 400 mL de agua y

estos se dejaron a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente, con la ayuda de un colador se sacó toda el agua, para luego esterilizar el matraz, con los granos de centeno por 3 días consecutivos, a 100° C.

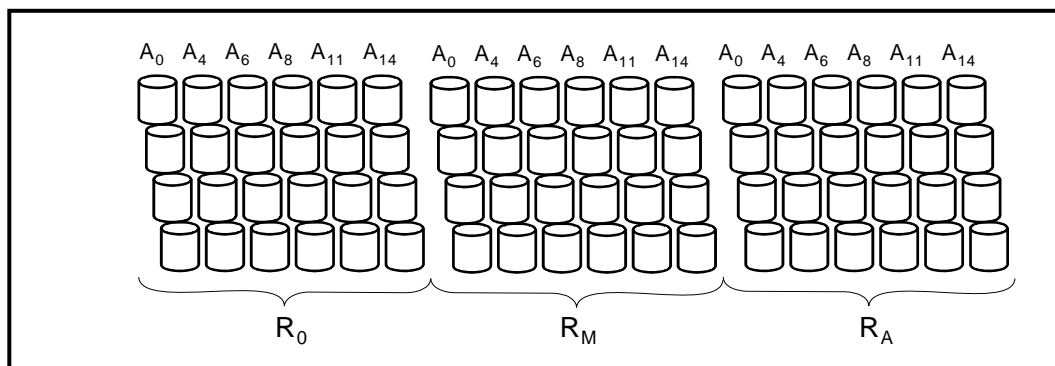
Paralelamente desde un cultivo de *R. solani* se procedió a sacar esclerocios con un bisturí desde la periferia, con el objetivo de sacar micelio del frente activo. A continuación, estos se introdujeron en el matraz con los granos de centeno ya esterilizados, estos se incubaron por unas 3 semanas aproximadamente a 23 / 25 ° C. Pasado las 3 semanas, se comprobó la presencia de *R. solani* en los granos de centeno, mediante microscopia óptica, la cual correspondió al grupo de anastomosis AG3 el más virulento en papa.

Posteriormente, se deshidrataron los granos por 5 días aproximadamente en una cámara de acrílico estéril, de la siguiente manera, se abrió el matraz, y se colocó los granos en una bandeja de aluminio previamente esterilizada, se cubrió con una bolsa de papel esterilizada, y se realizó un cuello de cisne en el extremo abierto de la bolsa de papel para mantener la esterilidad. Pasado el período de deshidratación de los granos se procedió a molerlos, con una picadora Moulinex para producir así el inóculo en polvo. De esto se tomaron 2 gramos, lo que constituyó el nivel medio de *Rhizoctonia* ( $R_M$ ) y 10 gramos para el nivel alto de *Rhizoctonia* ( $R_A$ ); y ( $R_0$ ) nivel en el cual no existió inóculo en polvo del patógeno. (Figura 2).

**3.4.2 Preparación de la cepa antagonista.** También se debió preparar el inóculo de la cepa antagonista líquida *Bacillus* BC2. Para esto se procedió de la misma forma que en el cultivo de la cepa BC10 (3.2.2), debido a que se trata de un mismo género de microorganismo. Las concentraciones aplicadas al suelo fueron las mismas que en el caso de calas, siendo previamente diluidas en agua destilada. Por lo tanto, las concentraciones del antagonista fueron las siguientes:

$$A^0 = 0 \text{ ufc/mL} , A^4 = 10^4 \text{ ufc/mL} , A^6 = 10^6 \text{ ufc/mL} , A^8 = 10^8 \text{ ufc/mL} , A^{11} = 10^{11} \text{ ufc/mL} \text{ y } A^{14} = 10^{14} \text{ ufc/mL}$$

En resumen el ensayo consistió en 3 niveles de inóculo del patógeno por 6 dosis de la cepa antagonista, con cuatro repeticiones. Por lo tanto el total de macetas que se ocuparon en el ensayo fueron 72. Como se muestra en la Figura 4.



**FIGURA 4** Esquema representativo de los 18 tratamientos correspondientes a 3 niveles de patógeno ( $R_0$ ,  $R_M$ ,  $R_A$ ) y 6 de la cepa antagonista ( $A_0$ ,  $A_4$ ... $A_{14}$ ), ensayo en papas.

**3.4.3 Preparación del sustrato y tubérculos de papa.** Para proceder a plantar los tubérculos, primero se debieron lavar con abundante agua potable y con la ayuda de escobilla para extraer todo el suelo que cubría al tubérculo; luego se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 5%, para posteriormente lavarlos con agua destilada y secarlos con toallas nova estéril para retirar exceso de humedad.

El sustrato a utilizar fue un suelo rojo arcilloso que se debió esterilizar en sacos de harina, para finalmente ser conservados a 15 ° C hasta el momento de la plantación.

**3.4.4 Preparación de las bolsas de polietileno con sustrato y tubérculos.** A cada maceta, se le introdujo un 1kg de sustrato, y se inoculó con 2 o 10 gramos del patógeno (*R. solani*) mezclándose homogéneamente en los primeros 5 cm del suelo (correspondientes a 200 gramos de suelo estéril). Luego, se plantó un tubérculo de papa desinfectada por bolsa de polietileno, en los primeros 5 cm donde fue infectado el sustrato con *R. solani*. Después de 5 días se agregó los 200 mL de la cepa antagonista en los distintos niveles (Figura 2). Estas macetas fueron mantenidas en una cámara de frío



por ocho semanas, con una óptima humedad y a un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, en el caso de la temperatura no debió superar los 15° C, con el objetivo de facilitar el crecimiento del patógeno sobre la planta. Después de esto las plantas de papa fueron trasladados a un invernadero por cinco semanas, facilitando así el desarrollo de las plantas para dar origen a los tubérculos hijos. El riego por maceta fue efectuado cada 5 días con 50 mL de H<sub>2</sub>O destilada no estéril. Cantidad óptima de agua para que no se produjera percolación de la cepa antagonista o el patógeno.

**3.4.5 Parámetros a medir en el ensayo de papas.** Los parámetros a evaluar en este ensayo serán los siguientes:

-Para observar el crecimiento y la incidencia de la enfermedad se midió, cada 10 días la altura de las plantas desde el cuello hasta el último folíolo, y periódicamente la cantidad de brotes por bolsa de polietileno para obtener finalmente el % de sobrevivencia.

-En la cosecha (20 de enero 2006) se midió:

- Biomasa seca de cada planta (raíz más el follaje) cosechada en cada maceta o bolsa al final del ensayo, posterior a la eliminación de agua de los tejidos a una estufa por 48 h dentro de un sobre de papel. Siendo posteriormente pesados y restado el peso del sobre.

- El largo de la planta incluyendo la raíz y follaje.

-Peso materia verde de toda la planta (raíz y follaje) cosechada en cada maceta.

-Número y producción de tubérculos por maceta, que consistió en contar el número de tubérculos cosechados de cada maceta y pesarlos.

- Porcentaje de sobrevivencia de las plantas, donde se hizo una relación entre la cantidad máxima de brotes o tallos de plantas con la cantidad final, medidas en una misma maceta.

- Se hizo una evaluación visual de los tubérculos hijos para ver la presencia de esclerocios según la escala del MANUAL OF PLANT GROWTH STAGES AND DISEASE ASSESMENT KEYS (1976), Ministry of Agriculture Fisheries and Food (Figura 5). Esta escala se presenta a continuación con los distintos porcentajes 5%,10% y 25% de esclerocios en los tejidos de los tubérculos hijos.



**FIGURA 5.** Escala de evaluación para el porcentaje de esclerocios sobre tubérculos hijos. FUENTE: MINISTRY OF AGRICULTURE GREAT BRITAIN, FISHERIES AND FOOD (1976).

**3.4.6 Diseño estadístico del ensayo de papas.** Los tratamientos ensayados correspondieron a un diseño experimental enteramente al azar, con un arreglo factorial de 6 niveles de la cepa antagonista *B. subtilis*, 3 niveles de la cepa patógena *R. solani* con 4 repeticiones. Se practicó un análisis de varianza en un diseño enteramente al azar en el programa Statgraphics 5.1. Cuando se presentaron diferencias estadísticas se realizó un Test de Tuckey. También se hizo un análisis no paramétrico con el Test de Kruskall- Wallis y el Test de Dunn que involucró solamente la evaluación visual de los tubérculos hijos que presentaban esclerocios.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Pruebas de antagonismo contra *E.carotovora* en cultivo de calas bajo cámara de ambiente controlada.

A continuación se presentan los resultados obtenidos de los parámetros evaluados en el primer ensayo de calas.

**4.1.1 Altura de plantas de calas.** El análisis de varianza realizado en relación a la altura de plantas de calas del ensayo hecho en cámara (Anexo 1), muestra que existen diferencias significativas al 0,05% y al 0,01% en el factor dosis de *E.carotovora*. También existen diferencias significativas al 0,05% en el factor dosis de antagonista y en la interacción.

**CUADRO 4** Altura promedio de plantas de calas del primer ensayo según las distintas variables medidas (cm).

Erwinia	Fechas de medición				
	11-10-2005	21-10-2005	31-10-2005	10-11-2005	20-11-2005
EA (10 <sup>8</sup> UFC/mL)	1,049 b	2,262 b	7,815 b	11,395 b	15,76 b
EM (10 <sup>4</sup> UFC/mL)	3,242 a	7,379 a	23,46 a	36,32 a	44,72 a
E0 (0 UFC/mL)	3,545 a	8,254 a	27,078 a	50,14 a	59,49 a
Antagonista					
A0 (0 UFC/mL)	2,2 a b	6,325 a b	19,613 a b	33,67 a b	42,72 a
A4 (10 <sup>4</sup> UFC/mL)	3,07 a b	7,949 a	25,085 a	44,16 a	59,98 a
A6 (10 <sup>6</sup> UFC/mL)	2,587 a b	5,108 a b	20,525 a b	32,65 a b	40,2 a
A8 (10 <sup>8</sup> UFC/mL)	2,85 a b	4,9 a b	17,24 a b	25,43 a b	32,14 a
A11 (10 <sup>11</sup> UFC/mL)	3,311 a	7,235 a	23,985 a	35,59 a b	34,58 a
A14 (10 <sup>14</sup> UFC/mL)	1,646 b	4,275 b	10,257 b	19,24 b	30,34 a

Nota : Los valores con letras distintas en las columnas indican diferencias estadística significativa al 5% (Tuckey).

En el Cuadro 4 se puede observar que hay diferencias entre las dosis de *E. carotovora* aplicada al sustrato en todas las variables medidas. De esto se puede inferir

que hay una correcta infestación del sustrato con el patógeno, ya que al comparar EA (dosis de *Erwinia* alta) con E0 (sustrato no infectado con *E. carotovora*) o con EM (dosis con *Erwinia* medio), hay una disminución en el crecimiento de la planta a medida que se incrementa la dosis del patógeno. Sin embargo, no se detectaron diferencias entre el nivel de infestación EM y EO. En relación a las dosis de antagonista, es posible observar diferencias en las primeras cuatro fechas de medición; el 11-10-2005 la mayor altura de la planta de cala se observó con la dosis de antagonista A11 y la menor altura se observó con la dosis más alta de antagonista A14. Una posible explicación a esto sería que altas poblaciones de *B. subtilis* causan una menor eficacia como antagonista, ya que esta bacteria deja de producir los metabolitos (antibióticos), que reducen el crecimiento de *E. carotovora*. En las fechas de medición 21-10-2005 y 31-10-2005, las plantas que presentaron una mayor altura fueron las que se les aplicó la dosis de antagonista A4 y A11. En contraste, con la dosis de antagonista más alta A14, donde las plantas crecieron menos. En la fecha 10-11-2005 sólo se observan diferencias entre la dosis A4 con un mayor crecimiento de la planta y A14 con menor crecimiento. En la última fecha medida 20-11-2005 no se observaron diferencias entre las dosis de antagonistas.

Se encontraron diferencias en la interacción de la fecha 31-10-2005 en el nivel de *Erwinia* medio, donde las plantas presentaron un mayor crecimiento sin la dosis de antagonista; en cambio donde se observa una menor altura de las plantas de calas fue en la dosis más alta de antagonista, como se puede observar en el Cuadro 5.

**CUADRO 5 Promedio de la altura de plantas de calas, según los distintos tratamientos en la fecha 31-10-2005.**

Antagonista	<i>Erwinia carotovora</i>		
	EO	EM	EA
A0 (0 UFC/mL)	16,44 a	36,83 a	5,56 a
A4 (10 <sup>4</sup> UFC/mL)	26,65 a	29,23 a b	19,4 a
A6 (10 <sup>6</sup> UFC/mL)	27,9 a	28,42 a b	5,25 a
A8 (10 <sup>8</sup> UFC/mL)	31,53 a	17,69 a b	2,5 a
A11 (10 <sup>11</sup> UFC/mL)	39,41 a	24,33 a b	8,2 a
A14 (10 <sup>14</sup> UFC/mL)	20,52 a	4,25 b	6 a

Nota : Los valores con letras distintas en las columnas indican diferencias estadística significativa al 5% (Tuckey).

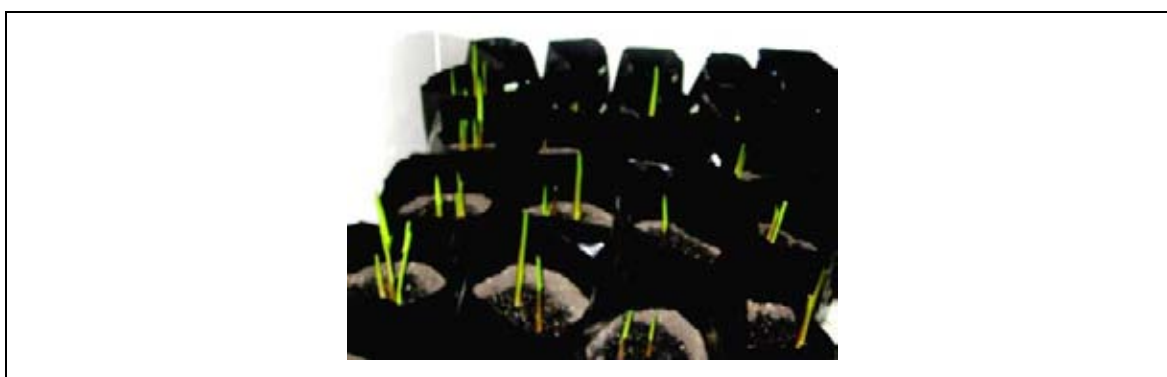
Esta diferencia demuestra que dosis muy elevadas de antagonista disminuyen el crecimiento de la planta. Por lo tanto, la dosis o concentración límite que puede ser usada en las plantas de calas para obtener un buen desarrollo, es del orden de  $10^4$  UFC/mL de la cepa antagonista en el nivel alto de infestación y de  $10^{11}$  UFC/mL de *B. subtilis* en el nivel E0.

**4.1.2 Cantidad de brotes o tallos.** Al observar el análisis estadístico (Anexo 2) en relación a la cantidad de brotes en plantas de calas, se puede señalar que existen diferencias estadísticamente significativas al 0.05% y al 0.01% en el factor *E. carotovora* desde la fecha de medición 07-10-2005 al 02-12-2005. También existen diferencias significativas al 0,05% en el factor dosis de antagonista en las siguientes fechas de medición: 14-10-2005, 21-11-2005 y 02-12-2005. En el Cuadro 6, se puede apreciar que existieron diferencias entre las dosis de *E. carotovora*, ya que al haber dosis más altas de este patógeno en el sustrato se produce una disminución del número de brotes por planta en relación a la dosis de *Erwinia* medio y *Erwinia* cero. Asimismo el número de brotes es mayor en las variables o fechas de medición 07-10-2005, 14-10-2005, 21-10-2005 y 02-12-2005. A medida que transcurre el tiempo y la planta se desarrolla, las tres dosis del patógeno están bien demarcadas, ya que al disminuir la dosis de *E. carotovora* aumenta el número de brotes.

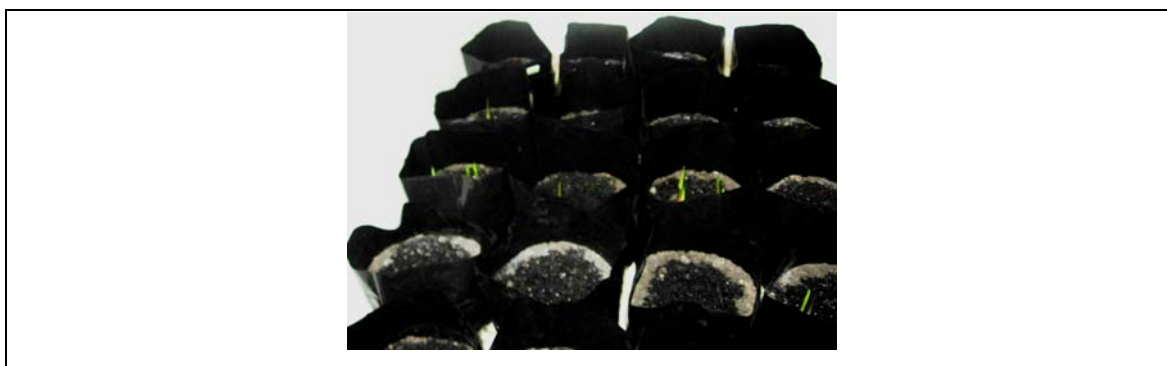
En relación a la dosis de antagonista se observan diferencias en la variable 14-10-2005, entre la concentración A4 que presenta un mayor número de brotes en relación a A14; también en las últimas dos fechas de medición 21-11-2005 y 02-12-2005 entre las dosis A4 y A6, que presentan un mayor número de brotes en contraste con las dosis A8, A11 y A14, donde se observa una menor cantidad de brotes en las plantas. En las Figuras 6, 7, 8, 9, 10 y 11 se puede observar el desarrollo de las plantas a las tres semanas de plantación y previo al momento de su cosecha. También es posible apreciar las diferencias entre los 3 niveles con *E. carotovora*, y la acción del antagonista en sus distintas concentraciones en plantas de calas, que permanecieron en cámara controlada.



**FIGURA 6** Plantas de calas del nivel E0 (*Erwinia* cero), con las distintas concentraciones de antagonistas a las tres semanas de plantación.



**FIGURA 7** Plantas de calas del nivel de infestación EM (*Erwinia* medio), con las distintas concentraciones de antagonistas a las tres semanas de plantación.



**FIGURA 8** Plantas de calas del nivel de infestación EA (*Erwinia* alto), con las distintas concentraciones de antagonistas a las tres semanas de plantación.



**FIGURA 9** Plantas de calas del nivel E0 (*Erwinia* cero), con las distintas concentraciones de antagonistas al momento de cosecha.



**FIGURA 10** Plantas de calas del nivel de infestación de EM (*Erwinia* medio), con las distintas concentraciones de antagonistas en el momento de cosecha.



**FIGURA 11** Plantas de calas del nivel de infestación de EA (*Erwinia* alto), con las distintas concentraciones de antagonistas en el momento de cosecha.

**CUADRO 6. Número promedio de brotes de plantas de calas del primer ensayo según las distintas variables medidas.**

Erwinia	FECHAS DE MEDICIÓN				
	30-09-2005	07-10-2005	14-10-2005	21-10-2005	28-10-2005
EA (10 <sup>8</sup> UFC/mL)	0,083 a	0,791 b	1,583 b	1,708 b	1,45 c
EM (10 <sup>4</sup> UFC/mL)	0,166 a	2,125 a	3,04 a	3,458 a	3,66 b
E0 (0 UFC /mL)	0,208 a	2,5 a	4,375 a	3,875 a	6,66 a
<b>Antagonista</b>					
A0 (0 UFC /mL)	0,166 a	1,583 a	2,916 a b	4 a	4,41 a
A4 (10 <sup>4</sup> UFC /mL)	0,166 a	2,333 a	3,75 a	4,5 a	4,58 a
A6 (10 <sup>6</sup> UFC /mL)	0,166 a	1,916 a	3 a b	4,25 a	4,41 a
A8 (10 <sup>8</sup> UFC /mL)	0,083 a	1,583 a	2,75 a b	3,41 a	3,83 a
A11 (10 <sup>11</sup> UFC /mL)	0,083 a	2,08 a	3,5 a b	3,5 a	3,58 a
A14 (10 <sup>14</sup> UFC /mL)	0,25 a	1,33 a	2,083 b	2,42 a	2,75 a

Nota : Los valores con letras distintas en las columnas indican diferencias estadística significativa al 5% (Tuckey).

#### CONTINUACIÓN DE CUADRO 6

Erwinia	FECHAS DE MEDICIÓN			
	04-11-2005	10-11-2005	21-11-2005	02-12-2005
EA (10 <sup>8</sup> UFC /mL)	0,875 c	0,66 c	0,5 c	0,5 c
EM (10 <sup>4</sup> UFC /mL)	3,5 b	3,75 b	3,16 b	2,5 b
E0 (0 UFC /mL)	6,5 a	5,87 a	5,5 a	4,7 a
<b>Antagonista</b>				
A0 (0 UFC /mL)	4 a	3,83 a	3,33 a b	2,25 a b
A4 (10 <sup>4</sup> UFC /mL)	4,33 a	4,16 a	4 a	3,91 a
A6 (10 <sup>6</sup> UFC /mL)	3,91 a	4,08 a	4,083 a	4,08 a
A8 (10 <sup>8</sup> UFC /mL)	3,41 a	2,41 a	2,25 b	1,33 b
A11 (10 <sup>11</sup> UFC /mL)	3,41 a	3,5 a	2,25 b	1,83 b
A14 (10 <sup>14</sup> UFC /mL)	2,66 a	2,58 a	2,416 b	2 b

Nota : Los valores con letras distintas en las columnas indican diferencias estadística significativa al 5% (Tuckey).

En relación a la interacción de los factores dosis de *E. carotovora* con dosis de antagonista, se encontraron diferencias significativas al 0.01% y al 0.05% en las variables 14-10-2005, 10-11-2005, 21-11-2005 y 02-12-2005 como se indica en los Cuadros 7, 8, 9 y 10.

En el Cuadro 7 se observan diferencias en los tratamientos con la dosis de *E. carotovora* alto, donde la dosis de antagonista A4 presenta un mayor número de brotes en contraste con la dosis A14, que presenta la menor cantidad de este parámetro.



**CUADRO 7. Promedio del número de brotes en plantas de calas del primer ensayo según los distintos tratamientos en la fecha de medición 14-10-2005.**

Antagonista	<i>Erwinia carotovora</i>					
	EO		EM		EA	
A0 (0 UFC/mL)	5,5	a	2,5	a	0,75	a b
A4 (10 <sup>4</sup> UFC/mL)	4,25	a	3,25	a	3,75	a
A6 (10 <sup>6</sup> UFC/mL)	3,75	a	4	a	1,25	a b
A8 (10 <sup>8</sup> UFC/mL)	3,5	a	4	a	0,75	a b
A11 (10 <sup>11</sup> UFC/mL)	4,75	a	3	a	2,75	a b
A14 (10 <sup>14</sup> UFC/mL)	4,5	a	1,5	a	0,25	b

Nota : Los valores con letras distintas en las columnas indican diferencias estadística significativa al 5% (Tuckey).

**CUADRO 8 Promedio del número de brotes en plantas de calas del primer ensayo según los distintos tratamientos en la fecha de medición 10-11-2005.**

Antagonista	<i>Erwinia carotovora</i>					
	EO		EM		EA	
A0 (0 UFC/mL)	7,25	a	3,5	a b	0,75	a
A4 (10 <sup>4</sup> UFC/mL)	6,5	a b	4,25	a b	1,75	a
A6 (10 <sup>6</sup> UFC/mL)	6	a b	6,25	a	0	a
A8 (10 <sup>8</sup> UFC/mL)	2,25	b	4,5	a b	0,5	a
A11 (10 <sup>11</sup> UFC/mL)	6	a b	3,75	a b	0,75	a
A14 (10 <sup>14</sup> UFC/mL)	7,25	a	0,25	b	0,25	a

Nota : Los valores con letras distintas en las columnas indican diferencias estadística significativa al 5% (Tuckey).

Según el Cuadro 8, en la dosis de *E. carotovora* media existieron diferencias con la dosis de antagonista A6 y A14, demostrando que dosis altas de *B. subtilis* como antagonista causan una disminución en el número de brotes de plantas de calas. En el nivel de E0, o sea sin dosis de *Erwinia*, hay un efecto contrario, ya que en la dosis de antagonista A0 y A14 son las que poseen mayor cantidad de brotes en comparación con la dosis de A8.

**CUADRO 9 Promedio del número de brotes en plantas de calas del primer ensayo, según los distintos tratamientos en la fecha de medición 21-11-2005.**

Antagonista	<i>Erwinia carotovora</i>					
	EO		EM		EA	
A0 (0 UFC/mL)	7,25	a	2	a b	0,75	a
A4 (10 <sup>4</sup> UFC/mL)	6,5	a b	4,25	a b	1,25	a
A6 (10 <sup>6</sup> UFC/mL)	6	a b	6,25	a	0	a
A8 (10 <sup>8</sup> UFC/mL)	2,25	b	4	a b	0,5	a
A11 (10 <sup>11</sup> UFC/mL)	4,25	a b	2,25	a b	0,25	a
A14 (10 <sup>14</sup> UFC/mL)	6,75	a	0,25	b	0,25	a

Nota : Los valores con letras distintas en las columnas indican diferencias estadística significativa al 5% (Tuckey).

En el Cuadro 9 se pueden observar las mismas diferencias que en el Cuadro 8 en el nivel de *Erwinia* cero con las dosis de antagonista A0 y A14, presentando un mayor número de brotes que con la dosis A8, y en el nivel EM entre las dosis de antagonista A6 y A14.

**CUADRO 10 Promedio del número de brotes en plantas de calas del primer ensayo según los distintos tratamientos en la variable 02-12-2005.**

Antagonista	<i>Erwinia carotovora</i>					
	EO		EM		EA	
A0 (0 UFC/mL)	5,75	a b	0,5	a b	0,5	a
A4 (10 <sup>4</sup> UFC/mL)	6,5	a	4,25	a b	1	a
A6 (10 <sup>6</sup> UFC/mL)	5,5	a b	6,25	a	0,5	a
A8 (10 <sup>8</sup> UFC/mL)	1,5	b	2	a b	0,5	a
A11 (10 <sup>11</sup> UFC/mL)	3,5	a b	1,75	a b	0,25	a
A14 (10 <sup>14</sup> UFC/mL)	5,5	a b	0,25	b	0,25	a

Nota : Los valores con letras distintas en las columnas indican diferencias estadística significativa al 5% (Tuckey)

Las diferencias que se observan en el Cuadro 10 se encuentran en el nivel EO, donde la dosis de A4 presenta la mayor cantidad de brotes de cala en contraste con la dosis de antagonista A8, que presenta la menor cantidad. En el nivel EM la dosis de *B. subtilis* que presenta la mayor cantidad de brotes es la A6, en cambio la dosis A14 es la

que presenta el menor número. Estos resultados pueden indicar que la acción de la bacteria antagonista sobre el patógeno, en relación a la cantidad de brote o tallos de las plantas, se podría ejercer después de 1 mes de haber aparecido el primer brote de la planta, estando en condiciones controladas de temperatura, luz y humedad.

**4.1.3 Porcentaje de sobrevivencia de plantas de calas del primer ensayo.** De acuerdo al análisis de varianza realizado (Anexo 3), se puede observar que existieron diferencias estadísticamente significativas en el factor dosis de *E. carotovora*, factor dosis de antagonista y en la interacción de estos dos factores.

**CUADRO 11 Porcentaje de sobrevivencia de plantas de calas.**

<i>E.CAROTOVORA</i>	% de sobrevivencia de calas	
EA (10 <sup>8</sup> UFC/mL)	14,2	c
EM (10 <sup>4</sup> UFC/mL)	47,08	b
E0 (0 UFC/mL)	71,57	a
DOSIS DE ANTAGONISTA		
A0 (0 UFC/mL)	36,758	b
A4 (10 <sup>4</sup> UFC/mL)	68,183	a
A6 (10 <sup>6</sup> UFC/mL)	64,1083	a
A8 (10 <sup>8</sup> UFC/mL)	28,891	b
A11 (10 <sup>11</sup> UFC/mL)	33,05	b
A14 (10 <sup>14</sup> UFC/mL)	34,71	b

Nota : Los valores con letras distintas en las columnas indican diferencias estadística significativa al 5% (Tuckey).

En el Cuadro 11, se puede observar que en el factor *E.carotovora* existen tres niveles del patógeno, y que al aumentar la dosis de *Erwinia* disminuye el % de sobrevivencia de las plantas. En el factor dosis de antagonista los niveles con el mayor % de sobrevivencia son el A4 y A6. En el Cuadro 12 se nota la interacción de la dosis de antagonista con la dosis de *E. carotovora*, en el cual no se puede apreciar diferencias entre los tratamientos, pero si se puede ver, según los porcentajes, que el sustrato que no poseía *Erwinia* al agregarle dosis de antagonista A4 y A6 eleva la sobrevivencia de las plantas. Lo mismo ocurre en el nivel de *Erwinia* medio. Por lo tanto, se puede ver un efecto antagonista de la cepa *B.subtilis* BC10 en concentraciones de 10<sup>4</sup> y 10<sup>6</sup> UFC/mL

contra *E.carotovora*, aumentando la sobrevivencia de las plantas de un 25 a un 90% en el nivel de infestación EM y de un 72.7 a un 100% en el nivel E0.

**CUADRO 12 Promedio del porcentaje de sobrevivencia de plantas de calas según los distintos tratamientos.**

Antagonista	Erwinia carotovora		
	EO	EM	EA
A0 (0 UFC/mL)	72,77 a	25 a	12,5 a
A4 (10 <sup>4</sup> UFC/mL)	100 a	90,18 a	14,4 a
A6 (10 <sup>6</sup> UFC/mL)	100 a	92,33 a	0 a
A8 (10 <sup>8</sup> UFC/mL)	29,175 a	32,5 a	25 a
A11 (10 <sup>11</sup> UFC/mL)	60,82 a	30 a	8,33 a
A14 (10 <sup>14</sup> UFC/mL)	66,65 a	12,5 a	25 a

Nota : Los valores con letras distintas en las columnas indican diferencias estadística significativa al 5% (Tuckey).

**CUADRO 13 Promedio del estado de túberos y plantas de calas en cosecha (según escala de valoración relativa, Cap. 3.2.5)**

ERWINIA	Mediana	Media	Dunn
EA (10 <sup>8</sup> UFC/mL)	1	2.16	b
EM (10 <sup>4</sup> UFC/mL)	2	1,33	b
E0 (0 UFC/mL)	4	3,66	a
ANTAGONISTA			
A0 (0 UFC/mL)	1,5	2,25	a
A4 (10 <sup>4</sup> UFC/mL)	2	2,916	a
A6 (10 <sup>6</sup> UFC/mL)	3,5	3	a
A8 (10 <sup>8</sup> UFC/mL)	1	1,75	a
A11 (10 <sup>11</sup> UFC/mL)	1,5	2,41	a
A14 (10 <sup>14</sup> UFC/mL)	1,5	2	a

Nota : Los valores con letras distintas en las columnas indican diferencias estadística significativa al 5% (Tuckey).

**4.1.4 Estado de túberos y plantas de calas medidas al momento de cosecha.** Como se observa en el Cuadro 13, el estado de túberos y plantas de calas en el factor dosis de *Erwinia* no presenta diferencias en los niveles de EM y EA, en contraste con los resultados del control. Pero en el factor dosis de antagonista no existieron diferencias entre los distintos niveles con respecto al estado de túberos y plantas.

En el Cuadro 14, no es posible observar diferencias entre los tratamientos en el nivel de *Erwinia* medio, entre las dosis de antagonista A0 y A14, que presenta un estado en que los túberos están completamente afectados por el patógeno. En cambio la dosis A6, presenta un estado en el cual los túberos están ligeramente dañados por síntomas de pudrición y la planta se encuentra completamente desarrollada, como se puede indicar en el capítulo 3.2.5, donde se encuentra la escala del estado de túberos y plantas de calas al momento de cosecha. En la Figura 12, se puede apreciar los distintos estados de túberos y plantas de la escala indicada en el Capítulo 3.2.5 (se debe tener en consideración que el estado 2 y 3 están indicados en la misma figura, la única diferencia entre estos dos valores relativos es el largo de la planta)

**CUADRO 14 Promedio del estado de túberos y estado de plantas de calas al momento de cosecha según los distintos tratamientos (según escala relativa indicada en el Cap 3.2.5)**

Antagonista	<i>Erwinia carotovora</i>		
	EO	EM	EA
A0 (0 UFC/mL)	4,3 a	1,25 a	1,25 a
A4 (10 <sup>4</sup> UFC/mL)	4,3 a	2,75 a b	1,75 a
A6 (10 <sup>6</sup> UFC/mL)	4 a	4 b	1 a
A8 (10 <sup>8</sup> UFC/mL)	2,3 a	1,5 a b	1,5 a
A11 (10 <sup>11</sup> UFC/mL)	3,8 a	2,25 a b	1,25 a
A14 (10 <sup>14</sup> UFC/mL)	3,5 a	1,25 a	1,25 a

Nota : Los valores con letras distintas en las columnas indican diferencias estadística significativa al 5% (Tuckey).



**FIGURA 12 Escala relativa del estado de los túberos y plantas al momento de cosecha.**

## 4.2 Pruebas de antagonismo contra *E.carotovora* en invernadero.

A continuación se presentarán los resultados de los parámetros medidos durante y después de realizado el segundo ensayo de calas.

**4.2.1 Altura de las plantas.** Los resultados obtenidos en relación a la altura de plantas de calas del ensayo realizado en el invernadero muestran que, según el análisis de varianza (Cuadro 15), no existen diferencias significativas en el factor de variación con respecto a las fechas de medición de este parámetro para el nivel de *Erwinia* Medio.

**CUADRO 15 Análisis de varianza del parámetro altura de plantas de cala del segundo ensayo.**

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fcal	P value
Variable 05-12-2005					
Antagonista	4	213,3	53,28	1,16	0,368
Error	15	690,33	46,023		
Total	19	903,47			
Variable 15-12-2005					
Antagonista	4	714,218	178,55	0,96	0,459
Error	15	2798,26	186,55		
Total	19	3512,48			
Variable 25-12-2005					
Antagonista	4	1815,76	453,94	1,46	0,263
Error	15	4657,59	310,51		
Total	19	6473,53			
Variable 04-01-2006					
Antagonista	4	1778,1	444,53	1,46	0,264
Error	15	4571,4	304,76		
Total	19	6349,5			
Variable 14-01-2006					
Antagonista	4	841,07	210,27	0,75	0,57
Error	15	4220,9	281,4		
Total	19	5061,9			

**4.2.2 Cantidad de brotes de plantas de calas del segundo ensayo.** En el Cuadro 16, se presentan los resultados del análisis estadístico en relación a la cantidad de brotes en plantas de calas que permanecieron en invernadero.

**CUADRO 16 Análisis de varianza del parámetro cantidad de brotes de cala en el segundo ensayo.**

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fcal	P value
Variable 25-11-2005					
Antagonista	4	3,2	0,8	0,36	0,836
Error	15	33,75	2,25		
Total	19	36,95			
Variable 05-12-2005					
Antagonista	4	21,8	5,45	1,07	0,408
Error	15	76,75	5,116		
Total	19	98,55			
Variable 15-12-2005					
Antagonista	4	21,2	5,3	1,14	0,375
Error	15	69,75	4,65		
Total	19	90,95			
Variable 25-12-2005					
Antagonista	4	14,8	3,7	0,71	0,595
Error	15	77,75	5,183		
Total	19	92,55			
Variable 04-01-2006					
Antagonista	4	18,2	4,55	0,98	0,45
Error	15	70	4,66		
Total	19	88,2			
Variable 14-01-2006					
Antagonista	4	31,5	7,87	1,24	0,33
Error	15	95,5	6,36		
Total	19	127			

Del análisis de varianza en relación a la cantidad de brotes se observa, que no existen diferencias estadísticamente significativas en el factor dosis de antagonista con

el nivel de EM (*Erwinia* medio), en ninguna de las fechas en que se midió el parámetro ya indicado.

En relación a la altura de plantas de calas y la cantidad de brotes del segundo ensayo no se encontraron diferencias en ninguna de las fechas de medición; esto se debe a que los túberos utilizados en este ensayo no se les indujeron heridas, por lo tanto la vía de entrada del patógeno fue más lenta y la bacteria antagonista tuvo más tiempo para lograr el control de la enfermedad, dando como resultado un crecimiento normal de las plantas durante este ensayo. En las Figuras 13, 14 y 15 se muestra, el crecimiento de las plantas de calas en invernadero en el nivel de infestación medio con cinco concentraciones de antagonistas.

Por lo tanto, es posible indicar que *B. subtilis*, puede ser usado en plantas de calas sin afectar el desarrollo de esta, e impidiendo que se desarrolle la pudrición húmeda en la planta, en presencia de túberos sin heridas.



**FIGURA 13 Plantas de calas en el nivel medio de infestación con *Erwinia* y con las cinco concentraciones de antagonistas a las tres semanas de plantación.**





**FIGURA 14** Plantas de calas en el nivel medio de infestación con *Erwinia* y con las cinco concentraciones de antagonistas tres semanas antes de la cosecha.



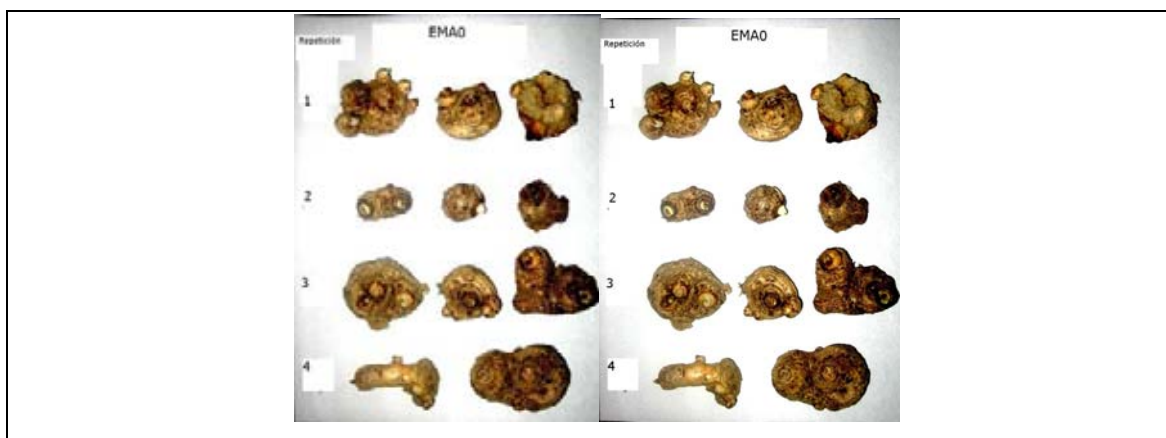
**FIGURA 15** Plantas de calas en el nivel medio de infestación con *Erwinia* y con las cinco concentraciones de antagonistas antes de la cosecha o cortes de los tallos.

**4.2.3 Porcentaje de pudrición de túberos de calas después de realizada la inducción de *E. carotovora* en el segundo ensayo.** En el Cuadro 17, se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el factor antagonista y el nivel EM con respecto a este parámetro, por lo tanto no hay variación entre las dosis de antagonista con el % de pudrición de túberos, que fue inducida artificialmente después del momento de cosecha de las plantas.

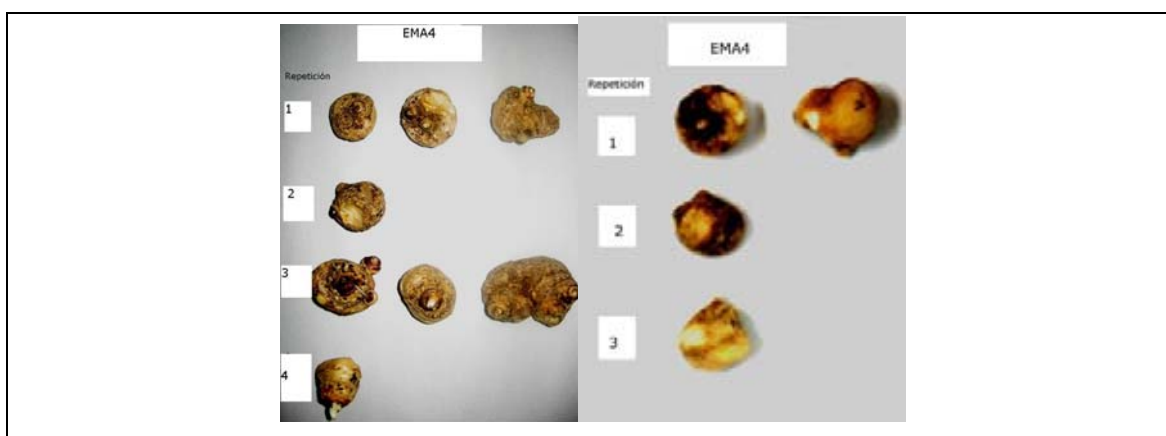
**CUADRO 17** Análisis de varianza del parámetro porcentaje de pudrición de tuberos después de inducción en el segundo ensayo de calas.

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fcal	P value
% de pudrición Antagonista	4	0,239	0,0598	0,58	0,679
Error	15	1,537	0,1024		
Total	19	1,776			

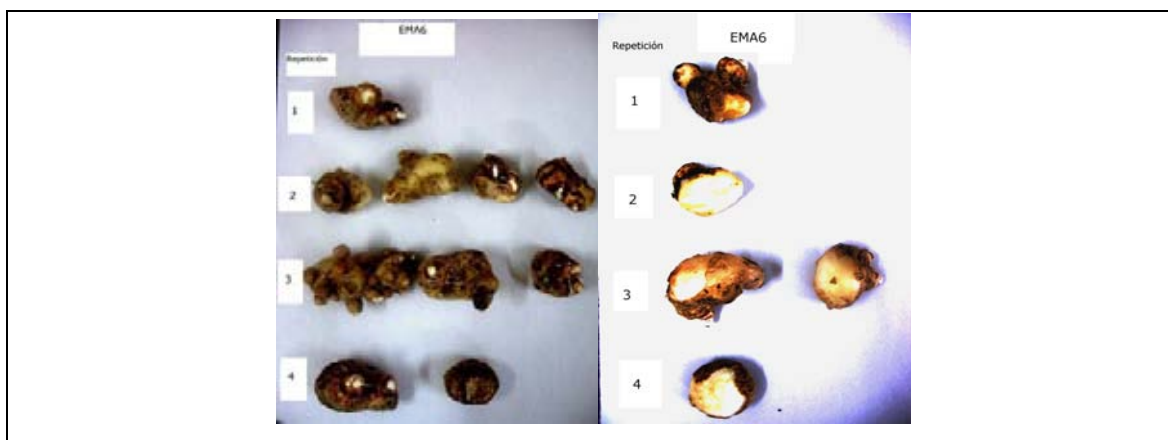
En las Figuras 16, 17, 18, 19 y 20 se puede observar el estado de los tuberos, que resultaron con pudrición después de la inducción de *Erwinia carotovora* en los distintos tratamientos.



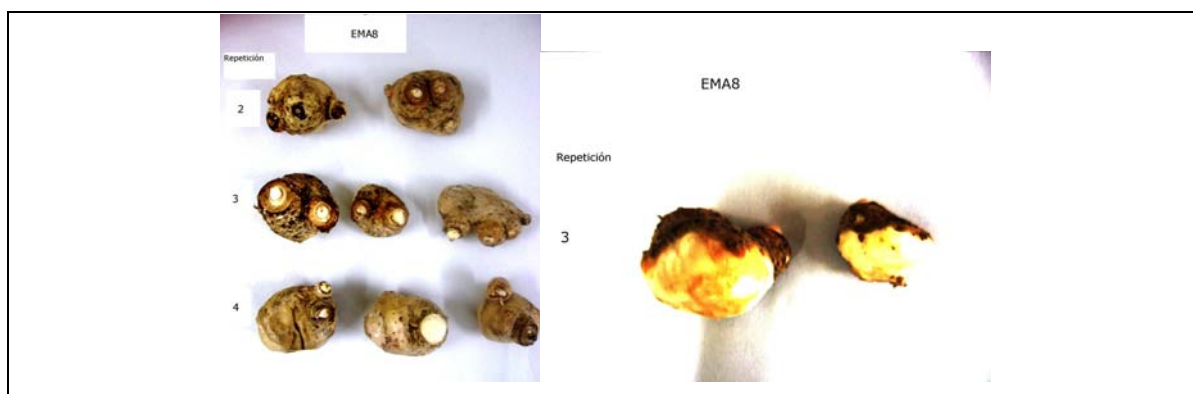
**FIGURA 16** Tuberos del tratamiento EM-A0, en la izquierda antes de inducción y a la derecha después de la inducción ( sin pudrición después de la inducción)



**FIGURA 17** Tuberos del tratamiento EM-A4, en la izquierda antes de inducción y a la derecha tuberos que resultaron con algún porcentaje de pudrición después de la inducción.



**FIGURA 18** Túberos del tratamiento EM-A6, en la izquierda antes de inducción y a la derecha túberos que resultaron con algún porcentaje de pudrición después de la inducción.



**FIGURA 19** Túberos del tratamiento EMA8, en la izquierda antes de inducción y a la derecha túberos que resultaron con algún porcentaje de pudrición después de la inducción.



**FIGURA 20** Túberos del tratamiento EMA11, en la izquierda antes de inducción y a la derecha túberos que resultaron con algún porcentaje de pudrición después de la inducción.

De acuerdo a estos resultados es posible indicar que a la cosecha muy pocos túberos presentaban signos de pudrición, pero después de ser inducidos en cámara a temperatura y humedad adecuada, hubo algunos que manifestaron la enfermedad (pudrición húmeda), sin embargo todos los tratamientos fueron afectados por igual.

**4.2.4 Porcentaje de sobrevivencia de plantas de calas del segundo ensayo.** En el Anexo 4, se puede observar que existen diferencias al 0,05% en el porcentaje de sobrevivencia de las plantas de calas entre los distintos tratamientos. Esto queda demostrado en el Cuadro 18, en el cual existen diferencias entre los tratamientos EM-A6 (en el cual no hubo pérdidas de plantas en el desarrollo del ensayo) y el tratamiento EM-A8, con un porcentaje de sobrevivencia de 78,92%.

**CUADRO 18 Promedio del porcentaje de sobrevivencia de plantas de calas del segundo ensayo en los distintos tratamientos.**

ANTAGONISTA	<i>E.CAROTOVORA</i>	
	EM	
A0 (0 UFC/mL)	84,37	a b
A4 (10 <sup>4</sup> UFC/mL)	90	a b
A6 (10 <sup>6</sup> UFC/mL)	100	a
A8 (10 <sup>8</sup> UFC/mL)	78,92	b
A11 (10 <sup>11</sup> UFC/mL)	94,44	a b

Nota : Los valores con letras distintas en las columnas indican diferencias estadística significativa al 5% (Tuckey).

### 4.3 Pruebas de antagonismo hacia *R. solani* en plantas de papas.

A continuación se presentaran los resultados de los parámetros medidos durante y después de realizado el ensayo de papas.

**4.3.1 Altura del follaje.** En el Cuadro 19, se observa que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los factores dosis de antagonista y de *R. solani*, ni en la interacción con respecto a este parámetro. Esto indica que la altura del follaje en plantas de papas, experimentaron un similar crecimiento en los distintos tratamientos.

**CUADRO 19 Análisis de varianza del parámetro altura del follaje en plantas de papas (cm).**

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fcal	P value
Variable 16-12-2005					
Antagonista	5	226,126	45,225	1,24	0,3041
<i>Rhizoctonia solani</i>	2	60,68	30,34	0,83	0,4410
Interacción	10	273,303	27,33	0,75	0,6762
Error	54	1971,97	36,51		
Total	71	2532,09			
Variable 26-12-2005					
Antagonista	5	198,252	39,65	0,72	0,6121
<i>Rhizoctonia solani</i>	2	150,273	75,13	1,36	0,2648
Interacción	10	324,931	32,49	0,59	0,8157
Error	54	2978,66	55,16		
Total	71	3652,12			
Variable 05-01-2005					
Antagonista	5	271,498	54,29	0,7	0,623
<i>Rhizoctonia solani</i>	2	285,169	142,5	1,85	0,167
Interacción	10	272,995	27,29	0,35	0,960
Error	54	4165,53	77,13		
Total	71	4995,19			
Variable 15-01-2005					
Antagonista	5	561,063	112,21	1,26	0,2931
<i>Rhizoctonia solani</i>	2	349,541	174,7	1,97	0,1497
Interacción	10	456,326	45,63	0,51	0,873
Error	54	4796,05	88,81		
Total	71	6162,98			

**4.3.2 Cantidad de brotes en plantas de papas.** Del análisis de varianza (Anexo 5), se observan diferencias estadísticamente significativas al 0.05% y 0.01% en el factor dosis de *R. solani* en tres fechas de medición, como se indica en el Cuadro 20. Estas ocurren en las fechas 28/10/2005; 28/11/2005 y 05/12/2005; en el caso del factor dosis de antagonista no se observaron diferencias. Es posible desprender de este análisis, que las diferencias que existieron fueron cuando las plantas se mantuvieron en la cámara de frío, donde estuvieron expuestas a condiciones adversas de crecimiento. Por el contrario, cuando fueron trasladadas a invernadero para favorecer su desarrollo, no existieron diferencias estadísticas significativas. De esto se puede deducir, que el efecto del hongo se manifiesta tempranamente en la planta de papa cuando se dan todas las condiciones para el desarrollo de este patógeno.

**CUADRO 20 Cantidad promedio de brotes en plantas de papas a través de todas las fechas de medición.**

R.solani	Fechas de medición							
	28-10-2005	08-11-2005	28-11-2005	05-12-2005	12-12-2005	26-12-2005	05-01-2006	20-01-2006
RA (10g/inóculo)	2,83 b	1,7 a	5,04 a	6,08 a	4,2 a	4,25 a	3,91 a	3,83 a
RM (4g/inóculo)	6,5 a	2,0 a	4,16 a b	5,0 a b	4,62 a	4,58 a	4,54 a	4,45 a
RO (0 g/inóculo)	8,16 a	2,12 a	3,96 b	4,45 b	4,75 a	3,87 a	4,62 a	4,7 a
Antagonista								
A0 (0 UFC/mL)	7,92 a	1,91 a	4,66 a	5,58 a	6,08 a	5,5 a	5,58 a	5,75 a
A4 (10 <sup>4</sup> UFC/mL)	5,58 a	2,25 a	5,0 a	6,33 a	4,41 a	4,16 a	4,41 a	4,33 a
A6 (10 <sup>6</sup> UFC/mL)	6,0 a	1,75 a	4,25 a	5,08 a	4,0 a	3,92 a	4,0 a	4,0 a
A8 (10 <sup>8</sup> UFC/mL)	5,58 a	1,66 a	4,16 a	4,66 a	4,16 a	3,92 a	4,16 a	4,25 a
A11 (10 <sup>11</sup> UFC/mL)	5,33 a	1,92 a	4,11 a	5,25 a	5,16 a	4,33 a	4,91 a	4,58 a
A14 (10 <sup>14</sup> UFC/mL)	4,58 a	2,16 a	4,08 a	4,16 a	3,33 a	3,58 a	3,08 a	3,08 a

Nota : Los valores con letras distintas en las columnas indican diferencias estadística significativa al 5% (Tuckey).

En la interacción de ambos factores dosis de antagonista y *R. solani* (Cuadro 21), se puede ver que las diferencias se presentan en el nivel de RA en la concentración de antagonista A0 (sin dosis de antagonista), donde el número de brotes es mayor que en la dosis de antagonista A14 e incluso mayor a todos los otros tratamientos. Esto nos indica que el suelo no fue infestado adecuadamente con el patógeno, ya que en este tratamiento (RA-A0) debiera haber existido el menor número de brotes con respecto a R0-A0 y RM-A0.

**CUADRO 21 Promedio de la cantidad de brotes de plantas de papas en la fecha de medición 28-11-2005 a través de los distintos tratamientos.**

Antagonista	<i>R.solani</i>					
	RO		RM		RA	
A0 (0 UFC/mL)	2,5	a	4,25	a	7,25	a
A4 (10 <sup>4</sup> UFC/mL)	5,25	a	4,0	a	5,75	ab
A6 (10 <sup>6</sup> UFC/mL)	4,0	a	4,0	a	4,75	ab
A8 (10 <sup>8</sup> UFC/mL)	4,0	a	3,25	a	5,25	ab
A11 (10 <sup>11</sup> UFC/mL)	4,0	a	4,5	a	4,0	ab
A14 (10 <sup>14</sup> UFC/mL)	4,0	a	5,0	a	3,25	b

Nota : Los valores con letras distintas en las columnas indican diferencias estadística significativa al 5% (Tuckey).

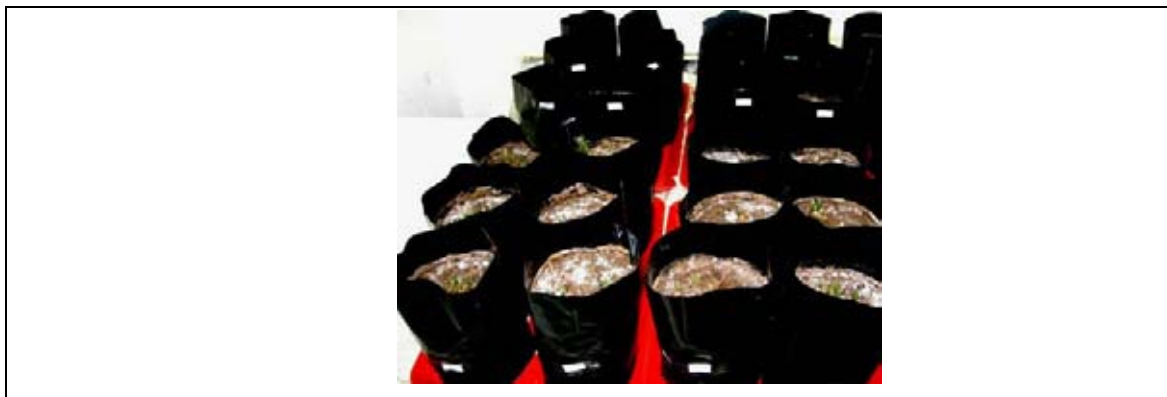
En las Figuras 21, 22 y 23 se puede apreciar los distintos niveles de *R. solani* en plantas de papas cuando permanecieron en cámara de frío.



**FIGURA 21 Plantas de papas del nivel R0 (*Rhizoctonia* cero), con las distintas concentraciones de antagonistas en cámara de frío.**



**FIGURA 22 Plantas de papas del nivel de infestación RM (*Rhizoctonia* medio), con las distintas concentraciones de antagonistas en cámara de frío.**



**FIGURA 23** Plantas de papas del nivel de infestación RA (*Rhizoctonia alto*), con las distintas concentraciones de antagonistas en cámara de frío.

**4.3.3 Materia seca total.** Los resultados obtenidos en relación a la materia seca total de las plantas de papa del ensayo en cámara muestran que, según el análisis de varianza (Cuadro 22), no existen diferencias significativas en los factores analizados. Por lo tanto, las materias secas obtenidas de todos los tratamientos fueron muy similares.

**CUADRO 22** Análisis de varianza del parámetro materia seca total en plantas de papas.

Fuente de variación		GL	SC	CM	Fcal	P value
Materia seca parte aérea						
Antagonista:	A	5	11,425	2,285	0,50	0,7742
<i>Rhizoctonia solani</i> :	R	2	4,861	2,43	0,53	0,5900
Interacción:	A x R	10	63,29	6,33	1,39	0,2112
Error		54	246,37	4,56		
Total		71	325,956			

**4.3.4 Número de tubérculos producidos por plantas de papas.** El análisis de varianza realizado a partir de la cantidad de tubérculos que produjeron las plantas se presenta en el Anexo 6, donde se pueden ver diferencias estadísticamente significativas al 0,05% en el factor A (dosis de antagonista). Este factor por si sólo no es relevante para este estudio.



**CUADRO 23 Promedio del número de tubérculos producidos por la papa madre de las plantas de papas.**

<i>R. solani</i>	Número de tubérculos	
RA (10 g/ inóculo)	3,83	a
RM (4 g /inóculo)	3,16	a
RO (0 g /inóculo)	3	a
<b>ANTAGONISTA</b>		
A0 (0 UFC/mL)	4,75	a
A4 (10 <sup>4</sup> UFC/mL)	3,83	a b
A6 (10 <sup>6</sup> UFC/mL)	2,75	a b
A8 (10 <sup>8</sup> UFC/mL)	1,91	b
A11 (10 <sup>11</sup> UFC/mL)	3,416	a b
A14 (10 <sup>14</sup> UFC/mL)	3,33	a b

Nota : Los valores con letras distintas en las columnas indican diferencias estadística significativa al 5% (Tuckey).

En el Cuadro 23, se observa el promedio de tubérculos de cada factor y las diferencias que se presentan entre la dosis A8 de antagonista (con un menor número de tubérculos hijos producidos por la planta) y A0 (sin dosis de antagonista), la cual produjo un mayor número de tubérculos.

**4.3.5 Peso de tubérculos producidos por plantas de papas.** En el Anexo 7, se observa que la dosis de *R. solani* es la que presenta diferencias significativas en relación a este parámetro, pero no se aprecian diferencias en las dosis de *B. subtilis*. En la interacción entre los factores dosis de *R. solani* y antagonista no se presentaron diferencias significativas. En el Cuadro 24, se pueden observar las diferencias que presentó *R. solani*, donde el mayor peso de los tubérculos se produjo en el nivel alto de infestación con el hongo.

**CUADRO 24** Peso promedio de tubérculos hijos producidos por las plantas de papas.

<i>R.solani</i>	Peso de tubérculos (g)	
RA (10 g inóculo)	25,34	a
RM (4 g inóculo)	24,6	b
RO (0 g del inóculo)	10,4	b
<b>ANTAGONISTA</b>		
A0 (0 UFC/mL)	26,02	a
A4 (10 <sup>4</sup> UFC/mL)	21,15	a
A6 (10 <sup>6</sup> UFC/mL)	23,18	a
A8 (10 <sup>8</sup> UFC/mL)	13,02	a
A11 (10 <sup>11</sup> UFC/mL)	22,99	a
A14 (10 <sup>14</sup> UFC/mL)	14,32	a

Nota : Los valores con letras distintas en las columnas indican diferencias estadística significativa al 5% (Tuckey).

**4.3.6 Largo de la raíz.** En el Anexo 8 se puede observar el análisis de varianza aplicado a los datos del largo de raíz. De estos resultados se desprende que existe diferencia estadísticamente significativa al 0,05% en el factor R (Dosis de *R. solani*). Esto se ve reflejado en el Cuadro 25, donde hay diferencias entre el nivel RA y RO en el largo de la raíz.

**CUADRO 25** Promedio del largo de raíz en la cosecha de plantas de papas (cm).

<i>R.solani</i>	Largo de raíz (cm)	
RA (10 g inóculo)	10,66	b
RM (4 g inóculo)	13,96	a b
RO (0 g del inóculo)	16,38	a
<b>Antagonista</b>		
A0 (0 UFC/mL)	16	a
A4 (10 <sup>4</sup> UFC/mL)	13	a
A6 (10 <sup>6</sup> UFC/mL)	12,08	a
A8 (10 <sup>8</sup> UFC/mL)	11,25	a
A11 (10 <sup>11</sup> UFC/mL)	17,91	a
A14 (10 <sup>14</sup> UFC/mL)	11,75	a

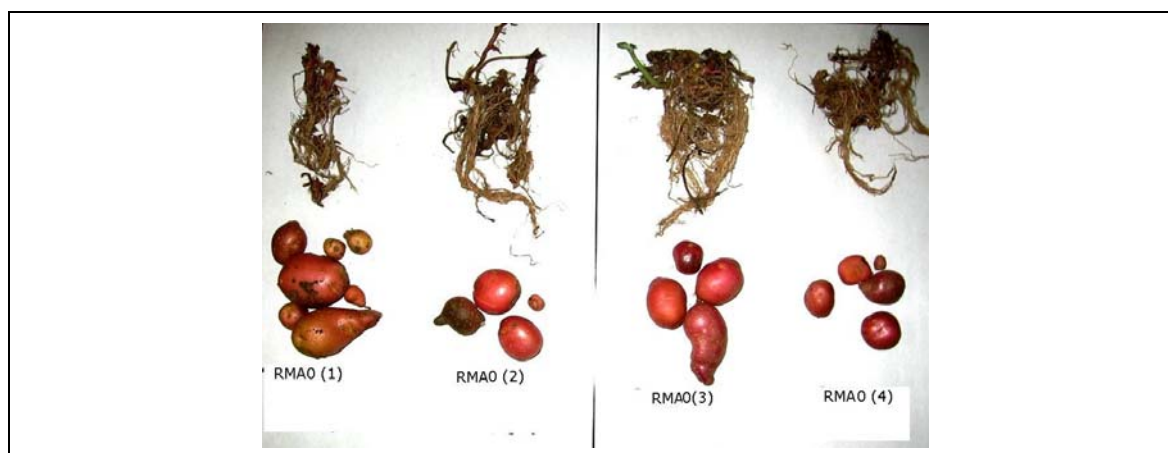
Nota : Los valores con letras distintas en las columnas indican diferencias estadística significativa al 5% (Tuckey).

En el Anexo 8, también se puede ver que existe interacción entre los factores dosis de antagonista y de *R. solani*, como se demuestra en el Cuadro 26. Aquí existen diferencias en el nivel de RM con la dosis de antagonista A11, donde las plantas de papas alcanzaron el mayor largo de sus raíces en contraste con la dosis A0 y A4, como se demuestra en la Figura 25 y 26. También se puede apreciar en este Cuadro que el tratamiento RA-A0 es el que presenta el mayor largo de la raíz, en comparación con los otros tratamientos como lo muestra la Figura 24. Esto vuelve a ratificar lo anteriormente expresado en relación a la inadecuada infestación del patógeno en el suelo.

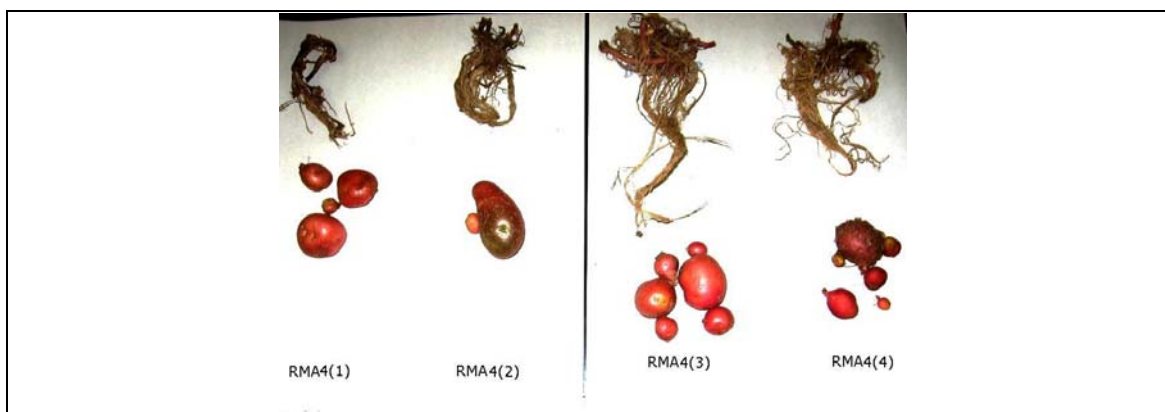
**CUADRO 26 Promedio del largo de la raíz en plantas de papas, según los distintos tratamientos (cm).**

Antagonista	<i>R.solani</i>			
	RO	RM		RA
A0 (0 UFC/mL)	16,5 a	10	b	21,5 a
A4 (10 <sup>4</sup> UFC/mL)	15 a	13,5	b	10,5 a
A6 (10 <sup>6</sup> UFC/mL)	12,5 a	15	a b	8,75 a
A8 (10 <sup>8</sup> UFC/mL)	9,75 a	15	a b	9,0 a
A11 (10 <sup>11</sup> UFC/mL)	15 a	30,25	a	8,5 a
A14 (10 <sup>14</sup> UFC/mL)	15 a	14,5	a b	5,75 a

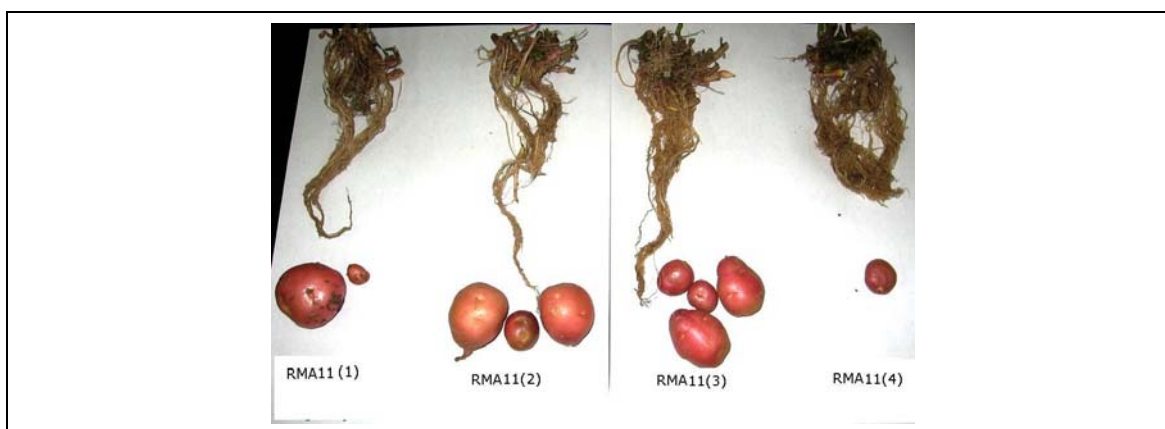
Nota : Los valores con letras distintas en las columnas indican diferencias estadística significativa al 5% (Tuckey).



**FIGURA 24 Raíces y tubérculos de papas del tratamiento RM-A0, que presentaron el menor promedio del largo de raíces, según interacción.**



**FIGURA 25** Raíces y tubérculos de papas del tratamiento RM-A4, que presentaron el menor promedio del largo de raíces según la interacción.



**FIGURA 26** Raíces y tubérculos de papas del tratamiento RM-A11, que presentaron mayor promedio del largo de raíces, según la interacción.

**4.3.7 Materia verde.** Como se observa en el Cuadro 27, el análisis de varianza realizado a partir del peso de la materia verde no presentó diferencias significativas entre los tratamientos.

**CUADRO 27** Análisis de varianza del peso de materia verde en plantas de papas

FL		GL	SC	CM	Fcal	P value
Materia verde						
Antagonista:	A	5	395,419	79,084	0,38	0,8602
<i>Rhizoctonia solani</i> :	R	2	15,219	7,609	0,04	0,9641
Interacción:	A x R	10	3403,83	340,38	1,64	0,1212
Error		54	11234,7	208,05		
Total		71	15049,2			

**4.3.8 Evaluaciones de esclerocios en los tubérculos.** En los tubérculos cosechados de este ensayo, se evaluó la presencia de esclerocios en la superficie de la piel.

**CUADRO 28. Promedio y diferencias entre los tratamientos en la evaluación de esclerocios en los tubérculos hijos.**

TRATAMIENTOS	Media	Mediana	Dunn
R0A0	0	0	b
R0A4	0	0	b
R0A6	0	0	b
R0A8	0	0	b
R0A11	1	0	b
R0A14	0	0	b
RMA0	4,7	5	a
RMA4	1,78	0	a b
RMA6	5,83	2,5	a
RMA8	1	0	a b
RMA11	3,5	0	a b
RMA14	0	0	b
RAA0	0	0	b
RAA4	2,66	0	a b
RAA6	0,714	0	a b
RAA8	1,11	0	a b
RAA11	3,15	0	a b
RAA14	0	0	b

Nota : Los valores con letras distintas en las columnas indican diferencias estadística significativa al 5% (Tuckey).

En el Cuadro 28, se puede apreciar las diferencias entre los distintos tratamientos, donde el mayor porcentaje de esclerocios se presenta en el nivel *R. solani* medio entre las dosis A0-A11 y en el nivel RA entre las dosis A4 y A11, en contraste con la dosis más alta de antagonista (A14), donde se observa que los tubérculos hijos no presentan esclerocios en estos dos niveles de infestación con el patógeno. También se puede ver en el mismo Cuadro, que en el tratamiento RA-A0 no hubo presencia de esclerocios, afirmando así que hubo una desuniformidad en la infestación del sustrato.

**4.3.9 Evaluaciones de esclerocios sobre los tubérculos en relación a las dosis de antagonista.** Como se observa en el Cuadro 29, existe una diferencia significativa entre la dosis de antagonista A11, con el mayor % de esclerocios sobre los tubérculos hijos,

con respecto a A14, donde no se observaron tubérculos con esclerocios (según escala relativa del Cap 3.4.5). De esto se puede deducir que hay una mayor presencia de la enfermedad entre la dosis de antagonista A0 y A11, y no se observa presencia de esclerocios con la dosis de antagonista, A14.

**CUADRO 29 Análisis de varianza sobre la evaluación de los esclerocios presentes en los tubérculos cosechados en relación al antagonista.**

ANTAGONISTA	Media	Mediana	Dunn
A0 (0 UFC/mL)	1,63	0	a b
A4 (10 <sup>4</sup> UFC/mL)	1,547	0	a b
A6 (10 <sup>6</sup> UFC/mL)	1,538	0	a b
A8 (10 <sup>8</sup> UFC/mL)	0,75	0	a b
A11 (10 <sup>11</sup> UFC/mL)	2,69	0	a
A14 (10 <sup>14</sup> UFC/mL)	0	0	b

Nota : Los valores con letras distintas en las columnas indican diferencias estadística significativa al 5% (Tuckey).

**4.3.10 Evaluaciones de los tubérculos en relación a las dosis de *R.solani*.** En el Cuadro 30, se observan las diferencias entre las dosis de *R solani*, donde el mayor porcentaje de esclerocios en los tubérculos hijos fue en el nivel medio.

**CUADRO 30 Promedio y diferencias entre las dosis de *R solani* en relación a la evaluación de esclerocios sobre tubérculos hijos (escala mencionada en el Cap 3.4.5).**

<i>R.solani</i>	Media	Mediana	Dunn
RA (10 g/ inóculo)	1,666	0	a c
RM (4 g /inóculo)	2,857	0	a
RO (0 g/ inóculo)	0,1408	0	b

Nota : Los valores con letras distintas en las columnas indican diferencias estadística significativa al 5% (Tuckey).

En relación a los resultados de evaluación de esclerocios sobre los tubérculos se puede decir, que dosis muy elevadas de antagonista (10<sup>14</sup> UFC/mL) son las que

presentaron el menor porcentaje de esclerocios sobre las papas cosechadas y también que el nivel de infestación RM, es el que presentó la mayor incidencia de la enfermedad en comparación a RA.

**4.3.11 Porcentaje de sobrevivencia en plantas de papas.** En el análisis de varianza del Cuadro 31, se aprecia que no existieron diferencias significativas entre los factores dosis de antagonista y *R.solani*, ni tampoco en la interacción del parámetro porcentaje de sobrevivencia.

**CUADRO 31 Análisis de varianza en el parámetro porcentaje de sobrevivencia en plantas de papas.**

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fcal	P value
% de sobrevivencia					
Antagonista: A	2	3113,07	1556,5	0,18	0,8336
<i>Rhizoctonia solani</i> : R	5	65070	13014	1,53	0,197
Interacción: A x R	10	81670,9	8167,1	0,96	0,4898
Error	54	4603,63	8525,2		
Total	71	610217			

## 5 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo se evaluó la capacidad antagonica por medio de cultivos en macetas de dos cepas de *B. subtilis* la BC10 y BC2. Este estudio es una continuación de trabajos anteriores, en las que se aislaron las cepas y después se propagaron. Una de estos trabajos realizados por MÉNDEZ (2005), demuestra que la cepa BC10, presentaba un antagonismo comprobado *in vitro* frente a *E. carotovora*. Después de esto, esta cepa antagonista fue propagada y formulada por Annesi Giacaman, (Tesis en curso, Bioquímica), usando en su trabajo un medio en base a melaza para la propagación y formulación de *B. subtilis*, de bajo costo y que permita un crecimiento rápido de esta cepa antagonista. La otra cepa usada en este estudio es la BC2, fue aislada por BARRÍA (2005) quien demostró una acción antagonista frente a *R. solani*. Posteriormente, fue propagada de manera similar a la BC10 por Patricia Águila (Tesis en curso, Bioquímica) en el Laboratorio de Icytal.

La formulación del medio para las cepas de *B. subtilis* fue líquido, donde su principal ingrediente es la melaza como se indica en el capítulo 3.2. Cabe señalar que aplicaciones líquidas similares a las utilizadas en este estudio son mencionadas por SOFFIA (2005), quien probó un producto comerciable llamado SERENADE en vides cuyo principal bioantagonista es la bacteria *B. subtilis*. El resultado de este ensayo demuestra una sustentable disminución de *Botrytis cinerea* en estos frutales de la zona Central. Otros biopesticidas a base de *B. subtilis* que están siendo comercializados son el Kodiak, Subtilex y Probacil, todos estos presentan una formulación líquida y en gránulos, que son dispersables en agua.

Existen muchos reportes extranjeros del uso de *B. subtilis* como bioantagonista, sobre diversas patógenos en cultivos como es el caso del control de *Fusarium spp* y *Rhizoctonia spp* en mani, soya, algodón y papa (BAYER CROP SCIENCE, 2006). Sin



embargo, en la literatura no hay precedentes de *B.subtilis* frente a *E. carotovora* subsp *carotovora* en calas de colores. Por lo tanto, esta experiencia en Chile ha sido pionera, pudiendo así favorecer un control más efectivo de esta enfermedad que afecta seriamente a los túberos de calas, causando su pudrición y ocasionando pérdidas millonarias de esta planta ornamental en Chile y sobre todo en el extranjero. Solamente en la literatura se pueden encontrar registros de *B. subtilis* frente a *E. carotovora* subsp *carotovora* y *E. carotovora* subsp *atroseptica* en papas, para el control de enfermedades como pie negro y pudrición blanda. Uno de estos estudios fue realizado por SHARGA (1998), el cual aisló sustancias antimicrobianas que fueron producidas por *B. subtilis* en un cultivo filtrado por precipitación, para después ser probadas *in vitro* e *in vivo*. El autor demostró una disminución de los síntomas de pie negro en plantas de papas, cuando fueron tratadas las raíces heridas con una suspensión de *B. subtilis*, previo a la inoculación con *E. carotovora*. También, se indica en este estudio, que la concentración de la cepa antagonista que logró una mejor supresión de esta enfermedad fue una suspensión de  $10^9$  UFC/mL, sobre una concentración de cepa patógena de  $10^5$  UFC/mL.

En relación al aislamiento de esta cepa bioantagonista, se puede ver que esta bacteria es posible encontrarla fuera de su nicho de sobrevivencia, constituido por la rizósfera, quedando demostrado por MENDEZ, (2005), que *B. subtilis* no solamente puede ser aislada del mismo cultivo, sino que por el contrario, puede estar asociada a diversas especies vegetales, en este caso hojas de árboles, ejerciendo un control efectivo *in vitro*.

En el primer ensayo de calas se trató de establecer bajo condiciones controladas en cámara, el grado de control biológico y dosis de la cepa BC10, la cual controle o reduzca la pudrición húmeda en *Zantedeschia* sp. Los resultados obtenidos establecen que las concentraciones de *B. subtilis* que lograron una reducción de la enfermedad en el nivel medio de infestación con respecto al control (EM-A0) es de  $10^4$ ;  $10^6$ ;  $10^8$  UFC/mL y en el nivel alto de infestación la concentración de *B. subtilis* que tuvo un mejor efecto en comparación al control fue de  $10^4$  UFC/mL. En estos tratamientos se pudo ver que las

plantas crecieron más vigorosas, obtuvieron un mayor porcentaje de sobrevivencia y al cosechar las plantas muy pocos túberos presentaban signos de pudrición húmeda.

Se debe resaltar que en este ensayo los túberos al momento de ser plantados en las macetas se les indujeron heridas con un bisturí estéril, para facilitar la infestación con *E. carotovora*. Por lo tanto los resultados apuntan a una disminución de la enfermedad en la planta con respecto al control. Al estar presente *E. carotovora* en el sustrato y presentar heridas en el túbero la infección con el patógeno será inevitable, ocasionando algún síntoma de esta enfermedad. Pero al introducir el antagonista al sustrato con condiciones adecuadas para su desarrollo, como temperatura, humedad, pH en el sustrato, este producirá una serie de antibióticos que actuarán sobre la pared celular de las células del enemigo, inhibiendo el crecimiento y la propagación de este patógeno, ocasionando un menor daño en la planta que se esta desarrollando.

Respecto al estado de los túberos en la cosecha de las plantas se pudo observar que el control (sin *Erwinia* y sin antagonista), evidenciaba signos notables de pudrición, por lo tanto se puede deducir que los túberos pueden ser portadores de la enfermedad. O sea el patógeno puede estar en estado de latencia en los tejidos del órgano de reserva y una vez dada las condiciones de estrés en la planta, la bacteria patógena puede activarse y atacar a su hospedero.

Cabe señalar que las macetas con plantas de calas del primer ensayo, se mantuvieron bajo cámara a temperatura (25°C) y con humedad adecuada, sin embargo la luminosidad existente dentro de la cámara no fue lo suficiente. La literatura indica que para un normal crecimiento de esta flor de corte necesita 32000 Lux, pero dentro de la cámara sólo existían 10.000 Lux. Por esta razón las plantas se etiolaron, provocando un stress en estas y dejándolas posiblemente más susceptibles al ataque de las bacterias patógenas.

En esta experiencia queda demostrado que los túberos de cala aparentemente sanos son capaces de ser portadores y mantener bacterias bajo sus tejidos. Por lo tanto, por más desinfección que se les haga a los túberos, si ya están infectados con *Erwinia* al interior de los tejidos, no habrá ningún tipo de control que pueda ser completamente efectivo contra el ataque de este patógeno. Es por esto, que se debe tener un especial cuidado en el manejo del cultivo desde la siembra hasta la cosecha de los túberos. Por lo tanto, estos no deben ser dañados mecánicamente, ya que cualquier herida que se le produzca será una vía de entrada para el patógeno.

En este estudio también se pudo observar que altas concentraciones de antagonista  $10^{14}$  UFC/mL, en relación al número de brotes, porcentaje de sobrevivencia y al estado de túberos en la cosecha, presentan valores similares con su testigo, en este caso EA-A0 y EM-A0. En la literatura no existen registros de fitotoxicidad por elevadas concentraciones aplicadas con *B. subtilis*, pero al ver algunas dosis usadas de biopesticidas que están siendo comercializados y que tienen como ingrediente activo a esta bacteria antagonista, las concentraciones aplicadas para el control de diversas enfermedades van desde  $10^6$  UFC/mL a  $10^9$  UFC/mL.

En el presente trabajo de investigación se puede obtener como conclusión que esta cepa es capaz de controlar a *E. carotovora*, reduciendo la enfermedad; esto se puede apreciar en los resultados mostrados, en donde a medida que la planta se fue desarrollando el control EM-AO disminuyó su cantidad de brotes, no así con los tratamientos EM-A4, EM-A6 y EM-A8, en los que se mantuvo el número de brotes hasta su cosecha. Lo mismo pasó con el tratamiento EA-A4, el cual presentó una mayor cantidad de brotes comparada al control EA-AO. En el caso del porcentaje de sobrevivencia esta fue superior, en contraste al control en un 30 % en E0-A4 y E0-A6 y en un 65% con el tratamiento EM-A4 y EM-A6 también con respecto a su control. En el caso del estado de túberos y plantas en la cosecha, no se presentaron diferencias entre las concentraciones de antagonista. Pero la tendencia indica que concentraciones del orden

de  $10^4$  UFC/mL y  $10^6$  UFC/mL de la cepa antagonista puede reducir la manifestación de *Erwinia* sobre los túberos con respecto a A0 (0 UFC/mL).

En relación a la cepa antagonista, se puede decir que esta no causa daño alguno en el crecimiento y desarrollo de la planta, como se demostró en este ensayo en los controles sin *Erwinia* y con distintas concentraciones de antagonista, por lo tanto será posible en un futuro próximo llevar este ensayo a condiciones de campo para comprobar estas concentraciones de antagonista ( $10^4$ ;  $10^6$ ;  $10^8$  UFC/mL) frente a este patógeno.

Con respecto a los distintos niveles de infestación del suelo con el patógeno se puede decir que, es muy complejo estimar las poblaciones de microorganismos en el suelo. Solamente se puede indicar según BUDDEHAGEN (1965), que cuando existe *E. carotovora* en el suelo es probable que este patógeno aumente su poblaciones dentro de sus hospederos, mientras que las poblaciones crecen gradualmente en el suelo. Sin embargo, si la población logra entrar en el suelo en un rango suficientemente alto como es el caso de monocultivos, podría haber aumento neto a partir de estación en estación. Es por esto que según prácticas de cultivo, podría haber un aumento gradual de la población del patógeno en el suelo, una disminución gradual, o la extinción eventual de este. Estas bacterias, en realidad, no serían bacterias del suelo, puesto que su presencia a largo plazo en el suelo es dependiente del hospedero. Podrían ser, sin embargo, saprófitos del suelo bajo ciertas prácticas del cultivo si la condición no fue dada en su sitio de origen.

Se realizó un segundo ensayo de calas, pero esta vez sólo con el nivel medio y con cinco concentraciones de la cepa antagonista. En este ensayo a los túberos no se les indujo heridas y las plantas permanecieron bajo invernadero; con esta metodología se trató de evaluar como la cepa antagonista podía reaccionar frente al patógeno, en condiciones menos controlada en lo que respecta a temperatura y luminosidad como también establecer una dosis óptima para el control de esta enfermedad.

Los resultados indican que durante el crecimiento bajo invernadero, en donde se midió cantidad de brotes, altura de plantas y número de plantas enfermas, no existieron diferencias. Por lo tanto todas presentaron un crecimiento y desarrollo normal, sin producirse diferencias con su control. La sobrevivencia de las plantas en todos los tratamientos fue alta, desde un 78% a 100%.

En este ensayo, cuando se llegó al 25 % de floración, se procedió a cortar los tallos a 3 cm del suelo y se suspendió el riego por 4 semanas. Posteriormente se procedió a cosechar los túberos, según los pasos indicados en el capítulo 3.2.7. Como la mayoría de los túberos no presentaron signos aparentes de la enfermedad, se les trató de promover el desarrollo del patógeno, ya que en los resultados del primer ensayo demostraron que estos órganos de propagación podrían ser portadores de *E. carotovora*. Para tal efecto a todos los túberos se les dieron las condiciones de humedad y temperatura adecuadas para que la bacteria patógena se pudiera desarrollar, siempre y cuando se encontrase en el interior de los tejidos de los túberos. Los resultados del análisis estadístico indican que no hubo diferencias, pero en todos los tratamientos hubo al menos 1 o más túberos con problemas de pudrición; esto ratifica que estos órganos de reserva pueden ser portadores de la enfermedad, o transmisores asintomáticos que al no tener las condiciones adecuadas para desarrollarse, como temperatura, humedad excesiva y stress en la planta, la bacteria no puede activarse y desarrollar la enfermedad. Esto también indica que la persistencia del bioantagonista no es extensible en el tiempo, por lo tanto una vez cosechados los túberos deben ser tratados nuevamente con estos antagonistas para evitar el desarrollo de la enfermedad.

Por lo tanto en este ensayo, al no existir diferencias estadísticas entre los datos obtenidos, sólo se puede hacer una aproximación en relación al control, concluyendo que al no existir daños en los túberos y al someter a las plantas a condiciones normales para su desarrollo, el antagonista es capaz de controlar mejor la enfermedad.

En el caso del ensayo de papas, uno de los objetivos a evaluar fue el establecer un ensayo en cámara para determinar la dosis de la cepa BC2 de *B. subtilis* en formulación líquida, bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperíodo, desde la siembra hasta que el cultivo alcanzara el 50% de desarrollo en el follaje; después de esto las plantas fueron trasladadas al invernadero, para el inicio de la tuberización o estolonización. Este ensayo se realizó primero infectando el suelo de cada maceta con *R. solani* en tres niveles (R0, RM, RA), por medio del método planteado por SCHNETTLER (1993). Posteriormente, después de 5 días se agregó la cepa antagonista; esta metodología fue realizada en base a que el crecimiento del hongo (1cm/día) es mucho más lento que el de las bacterias. Por lo tanto, se debió esperar que el patógeno creciera en el sustrato antes de aplicar la cepa antagonista. Con respecto a los resultados de los parámetros medidos se puede decir, que sólo existió interacción entre los distintos tratamientos de *R. solani* con *B. subtilis* en los parámetros largo de raíz, presencia de esclerocios en tubérculos hijos medidos en la cosecha y la cantidad de brotes medidos el 28-11-2005. Los otros parámetros evaluados, como altura de la planta, materia seca de la parte aérea y radical, número y peso de tubérculos hijos y porcentaje de sobrevivencia de las plantas, fueron poco consistentes, ya que en los análisis de varianza realizados demostraron que existieron factores donde no hubo diferencias estadísticamente significativas y en otros que si se presentaban, no existiendo una interacción entre los factores nivel de *R. solani* con nivel de antagonista.

En relación a la dosis de *R solani*, el análisis estadístico no mostró diferencias en algunos parámetros medidos (altura de plantas, materia seca, número tubérculos y porcentaje de sobrevivencia de plantas). También existieron discrepancias en los promedios de las interacciones del largo de la raíz, evaluación de esclerocios en los tubérculos hijos y cantidad de brotes entre los distintos tratamientos. En estos tres últimos parámetros medidos no existe un claro efecto de la dosis de RA (*Rhizoctonia* alto), por lo que se presume que puede haber existido una inadecuada inoculación con el patógeno.

Complementando lo anteriormente dicho, la inoculación con *R. solani* sólo afectó la cantidad de brotes en las primeras fechas de medición, en la cual las plantas estuvieron en cámara de frío a 15° C, con el fin de estresar a la planta y lograr el crecimiento y desarrollo del patógeno en el suelo. Después de trasladar las plantas a invernadero para su normal crecimiento, estas diferencias ya no existieron. Con la inoculación del patógeno también puede verse afectada el largo de la raíz y la presencia de esclerocios en los tubérculos cosechados. Sin embargo, al observar estas diferencias entre los tratamientos, el sustrato que poseía la mayor infestación con *R. solani* y sin tener dosis de antagonista (RA-A0) tenía el mayor largo de raíz con respecto al testigo y no presentaba esclerocios. Además, la cantidad de brotes en este tratamiento era mayor.

Con respecto al mayor número de brotes observado en las primeras etapas de crecimiento en el tratamiento RA-A0, estos resultados no concuerdan con lo expresado por BASAUL (2005), indicando que los brotes que son atacados por el hongo mueren antes de emerger; por lo tanto, el primer índice de un ataque en primavera es la emergencia desuniforme de las plantas y la disminución en el número de tallos. Fernández (1979), citado por BETANCOURT (1996), señala además que la presencia de necrosis en el extremo apical de los brotes del tubérculo es el más destructivo, debido a que el daño a nivel de brotes generalmente resulta en pérdidas de plantas.

En relación al resultado obtenido en el promedio de la interacción, donde el mayor largo de la raíz se obtuvo en el tratamiento RA-A0, con respecto al control no coincide con lo descrito por Van der Zaag (1996), citado por GONZALEZ (2001), señalando que las raíces que son atacadas y destruidas por *R. solani* dan como resultado plantas con un sistema radicular muy pobre. Por otra parte, en el caso de la evaluación de los tubérculos hijos, donde el tratamiento RA-A0 no presentó esclerocios, tampoco concuerda con lo expresado por diversos autores como SCHNETTLER (1993) y SILVA (1999), quienes demostraron en estudios que al infectar suelo con dosis altas de *R. solani* presentaban el signo más característico de esta enfermedad, que es la formación de esclerocios del hongo en la superficie del tubérculo. Algunas de los factores que pueden

explicar el hecho de que *R. solani* no expresó su capacidad de producir la enfermedad en la planta se señalan a continuación:

- Falta de humedad en el suelo. FRANK (1980), indica que el exceso de humedad y frío en el suelo favorecen al desarrollo de la enfermedad, atacando los brotes de la planta, pudiendo llegar a destruirlos cuando el ataque es fuerte y reduciendo así el número de tallos por hectárea. En este caso, las plantas se regaron con 50 mL de agua destilada cada 5 días. Esta cantidad de agua se determinó para que no exista una percolación de la cepa antagonista, pero puede que esto haya sido insuficiente para lograr el desarrollo del patógeno.

- Falta de tiempo para el desarrollo de *R. solani*. RODRIGUEZ (2006) estudió este inóculo producido en cascarilla de arroz, en base a una colonización previa para el crecimiento del patógeno, antes de infectar las raíces de la planta. Pero en este ensayo no se observaron síntomas de *R. solani* en ninguno de los tratamientos, lo que hace pensar que el patógeno, aún en micelio, requiere un tiempo de incubación para establecerse, colonizar el suelo y causar infección. Afirmando lo anteriormente expresado, SANTANDER (2003) indica que para una correcta inoculación con el patógeno se debe esperar la emergencia de todas las plantas para agregar la cepa antagonista, lo que aseguraría así el desarrollo del hongo en el suelo y la acción de la cepa antagonista frente al control del patógeno.

- Falta de nutrientes en el suelo. WEINHOLD y SINCLAIR (1996) demuestran un marcado efecto de la disponibilidad de nutrientes del suelo sobre la patogenicidad de esta especie; cuando el inóculo es deficiente en nutrientes, el micelio crece sobre la superficie de la planta, pero no se desarrollan estructuras de infección.

- Cosecha adelantada de tubérculos de papas. Fernández (1979), citado por SCHNETTLER (1993), indica que la presencia de esclerocios se observan al final del ciclo vegetativo de la planta o en la senescencia, por lo que se concluye que la cosecha de los tubérculos en este ensayo fue en una etapa muy adelantada, previo al período de floración, no expresándose así completamente la enfermedad sobre los tubérculos.

- Por último, mala inoculación del patógeno en el sustrato. La inoculación del suelo fue basada en los trabajos de NITSCHKE (1983) y SCHNETTLER (1993), los cuales



trasladaron cepas patógenas del hongo de *R. solani* a granos de avena, asegurando un importante y efectivo traslado del hongo en condiciones que le permiten desarrollarse e intentar infectar y producir daño a las plantas. Pero este último punto no fue posible establecer en cámara bajo las condiciones del presente trabajo. Una patogenicidad exitosa implica una compleja interacción de factores, que involucran tanto a la planta como al patógeno y el medio ambiente, en todo su desarrollo, desde la penetración hasta que se produce el síntoma característico, dependiendo de la confluencia de los factores óptimos en los tres niveles señalados.

Sin embargo, en vista de perfeccionar esta metodología, NAIKI y UI (1978) han demostrado que la constitución del inóculo de *R. solani* afecta la sobrevivencia de este, observándose que esclerocios más grandes originaron hifas más desarrolladas. Como la finalidad de esto es desarrollar un método para asegurar la sobrevivencia del inóculo del patógeno para producir realmente la enfermedad y ver el efecto de control del antagonista, al parecer el crecimiento del hongo se ve favorecido en granos con endosperma más grande, como lo es el de la avena o del trigo.

La cantidad de inóculo a utilizar de *R. solani* fue determinada en base a estudios de SCHNETTLER (1993), el cual con el propósito de estimar que cantidad de inóculo era el capaz de asegurar la presencia de la enfermedad, estableció que 6 g de inóculo eran suficientes para producir un elevado nivel de la enfermedad. En base a lo anterior, en este estudio la inoculación del suelo fue con 2 y 10 g de inóculo del patógeno en polvo, aplicándolo en los primeros 5 cm del suelo, para posteriormente plantar el tubérculo a esa misma profundidad. Pero esta técnica de inoculación en este ensayo no dio resultados visibles en la medición de los parámetros mencionados en el punto 3.4.5. Es por esto, que como conclusión se puede proponer que el patógeno debe ser distribuido en todo el suelo de forma homogénea, para obtener un mejor efecto en la infección de la planta y así poder observar o medir el control que ejerce la bacteria antagonista.

En relación al mayor porcentaje de esclerocios presentados en el nivel de infestación medio con *R. solani* se puede afirmar que, en la experiencia realizada por SCHNETTLER (1993), se pudo establecer que seis gramos de inóculo fueron suficientes para producir un elevado nivel de enfermedad, tanto en plantas como en plántulas de papa. Se observó que con seis y nueve gramos de inóculo el efecto era similar al de las tres unidades del inóculo. Con esto se puede observar que se alcanza un punto en que la cantidad de inóculo del patógeno tiende a estabilizarse, perdiéndose la linealidad de la relación inóculo/incidencia de la enfermedad, esto se puede ver reflejado en el ensayo con la dosis más alta de *R. solani*.

En el mismo sentido, las distintas dosis de la bacteria antagonista usada sólo presentaron efecto en el número de tubérculos hijos y presencia de esclerocios, pero este factor por sí sólo no es relevante para este estudio.

Cabe recordar que la cepa antagonista utilizada para biocontrolar *R. solani* fue aislada de raíces en túberos de calas del vivero Bopar; esto demuestra que *B. subtilis* puede ejercer un control efectivo *in vitro* sobre *R. solani* no solamente al ser aislada de la rizósfera o tejidos de planta de papa, sino también de otras especies vegetales.

En relación al antagonista biológico usado en este ensayo, estudios anteriores han demostrado según SCHMIEDEKNECHT *et al*, (1998), que las condiciones físicas del suelo pueden afectar de alguna manera el desarrollo y la expresión del antagonismo, como es el caso de una cepa de *B. subtilis* usada como bioantagonista sobre *R. solani*, en donde se demostró que la eficacia de esta bacteria es más beneficiosa en mezclas de arena y humus que en suelos solamente húmicos, arcillosos o limosos.

Según REYES (2000), quien desarrolló un estudio sobre el control biológico de *R. solani* a través de antagonistas bacterianos, indica que los rangos de temperatura para *B. subtilis* que presentaron el mayor porcentaje de inhibición fue entre los 37° y 28°C y con pH de 5 a 7, y los menores halos de inhibición observados fueron a los 22°C, donde

el hongo se desarrolla mejor. También, demuestra que la colonización de raíces de tomates por parte de *B. subtilis* es menor en un 10% de lo que inicialmente fueron depositadas en los ápices radicales (1 millón de UFC). Sin embargo, varios estudios demuestran que la habilidad de colonizar las raíces es altamente variable entre las distintas rizobacterias, siendo además esta característica un reflejo de la capacidad de las mismas para competir por nichos ecológicos en la competitiva rizósfera (MISAGHI, 1990).

Es probable que las experiencias en cámara de condiciones controladas no permitan concluir en forma certera el desempeño de los biocontroladores, como lo señala SZCZECH y SHODA (2005), los cuales evaluaron el efecto de una cepa de *B. subtilis* para el control de *Rhizoctonia* por medio de experimentos en macetas, no observando diferencias que muestren el efecto de la bacteria antagonista sobre el micelio del hongo. Esto se debe a que existen factores importantes en el desarrollo de los microorganismos (temperatura, humedad, luz), que se encuentran alejadas de las condiciones naturales, sobre todo el espacio que tienen las raíces en las macetas; este último es muy reducido en volumen de sustrato para el desarrollo de una rizósfera, que permita tener una interacción entre el suelo, las raíces de las plantas de papa, el patógeno y el antagonista. El bajo o nulo efecto de la cepa patógena y de la cepa antagonista puede deberse a que ambos microorganismos no encontraron el medio adecuado en la rizósfera, ya que por lo general para que estos actúen tienen que escapar del mecanismo de defensa de las plantas y encontrar condiciones adecuadas nutritivas y medioambientales para su crecimiento (BAREA y ASCON 1982).

Al observar algunos promedios de las interacciones que existieron en relación al largo de la raíz, presencia de esclerocios y cantidad de brotes, se puede ver que la dosis de antagonista A11 y A14 en el nivel medio de *R. solani* y la dosis de *Bacillus* A4 en el nivel alto de *R. solani*, presentan los mejores resultados. Según SCHMIEDEKNECHT (1998), la cantidad de  $10^{11}$  endosporas por gramo de *B. subtilis* es recomendable para reducir *R. solani* en un 63 % en condiciones de invernadero y en un 50% en condiciones

de campo. En cambio SZCZECH y SHODA (2005), indica que la densidad de bacteria de *B. subtilis* RB14-C puede de ser cercana a los  $10^9$  UFC/mL para que esta bacteria produzca una cantidad suficiente de antibióticos, principalmente iturinas, para entrar en contacto con el hongo y controlar o disminuir el efecto de la *R. solani*.

En relación al tipo de ensayo realizado en cámara, es probable que este tipo de experiencia permita tener una aproximación relativa para conocer el comportamiento de la cepa *B. subtilis* en formulación líquida sobre el control de *R. solani*.

Se puede observar también en los resultados, que esta cepa antagonista BC2 es inocua para las plantas de papas, por lo tanto puede ser usada para este tipo de cultivo sin afectar su crecimiento y desarrollo.

En el mercado ya existen muchas formulaciones comercializables a base de *B. subtilis* que controlan *R. solani*, como Probacil, Kodiak y Subtilex, como se indicó anteriormente. El modo de acción de estos productos es la liberación de compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las iturinas por parte de esta bacteria; actúan sobre la pared celular de los hongos, observándose una vacuolización y deformación de las hifas de *R. solani* provocadas por la formación de un compuesto volátil con propiedades fungicidas.

Como se muestra previamente, el efecto antagonista de esta bacteria sobre *R. solani* ha podido ser probada en numerosos estudios, por lo tanto será necesario repetir este ensayo, teniendo en cuenta diversos factores que apunten a una correcta inoculación y sobrevivencia del patógeno en el suelo.

## 6 CONCLUSIONES

Según el análisis de los resultados obtenidos durante el desarrollo de estos tres ensayos es posible concluir que:

De acuerdo a las condiciones en las que el primer ensayo de calas fue realizado es posible deducir que, cuando existen heridas en los túberos de calas será posible reducir la incidencia de *Erwinia carotovora* con poblaciones  $10^4$  UFC/mL,  $10^6$  UFC/mL y  $10^8$  UFC/mL de la cepa antagonista BC 10, cuando existen niveles de infestación con el patógeno en el suelo de  $10^4$  UFC/mL. Cuando los niveles de infestación son más altos como  $10^8$ UFC/mL, solamente poblaciones del orden de  $10^4$  UFC/mL de la cepa BC10 podrían aminorar la severidad del ataque causado por *E. carotovora*.

En relación a las condiciones en las que fue realizado el segundo ensayo de cala es posible concluir que, cuando se dan las condiciones naturales para el desarrollo de la planta en cuanto a temperatura, luminosidad, humedad y también a la existencia de túberos aparentemente sanos al momento de la plantación, la sobrevivencia de las plantas será alta, sin encontrar diferencias entre las concentraciones aplicadas al sustrato con la cepa antagonista BC10.

La aplicación de concentraciones altas de la cepa BC10, del orden de  $10^{14}$ UFC/mL y cuando existe interacción con *E.carotovora*, no logra controlar la enfermedad, manifestando signos de la patología similares al control, anulándose el efecto antagonista de la cepa.

En relación al control de la cepa BC2 frente a *R. solani*, no se pudo llegar a establecer que concentración es la adecuada para la disminución o control de la sarna negra, ya que hubo una desuniformidad en la infestación del sustrato con el patógeno.

Es necesario tener más información sobre *R. solani*, antes de poder estandarizar una metodología de cuantificación del potencial de inóculo de este patógeno en el suelo.

Será necesario en un futuro próximo repetir este ensayo con condiciones adecuadas para la expresión del patógeno en el suelo, para poder apreciar en que concentración puede ser usada la cepa BC2 para el control de *R.solani*.

En este estudio se pudo apreciar que las dos cepas de *B.subtilis* usadas en las respectivas plantas, no ocasionaron disminución en su crecimiento ni daño en los túberos o tubérculos, por lo que se concluye que son adecuadas para el uso en estos cultivos.

## 7 RESUMEN

Se realizaron tres ensayos entre octubre de 2005 y marzo de 2006, con la finalidad de evaluar la capacidad antagonista de dos cepas de *B. subtilis*, frente a *E. carotovora* y *R. solani* causantes de pudrición húmeda en calas y sarna negra en papas, respectivamente, y también con el propósito de determinar una o más concentraciones adecuadas de las cepas antagonistas que logren controlar o aminorar el ataque de los patógenos anteriormente mencionados. En dos de los ensayos (uno de papa y otro de cala), se infectó el sustrato en dos niveles con el patógeno, un nivel alto, medio y uno sin el inóculo. Luego de 24 horas se plantaron tres túberos de calas (con incisiones hechas con un bisturí estéril para facilitar la infestación con *Erwinia*) y un tubérculo de papa por maceta en cada uno de los dos estudios. Después de 24 y 120 horas se agregaron al sustrato las dos cepas antagonistas a cada cultivo respectivamente, en 6 concentraciones por nivel de inoculación con los patógenos. Así, cada ensayo presentó un diseño enteramente al azar con un arreglo factorial 3 niveles de *Erwinia*, (EO, EM, EA), 6 concentraciones del antagonista y con cuatro repeticiones. En el caso del tercer ensayo que se realizó sólo hubo un nivel de infestación (medio). En este se plantaron tres túberos de cala por maceta y al sustrato se le agregaron 5 concentraciones de la cepa antagonista, usándose un diseño enteramente al azar con arreglo factorial de 5 tratamientos por 4 repeticiones. El primer ensayo de calas comenzó en octubre de 2005 y el de papas a principios de noviembre, ambos bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperíodo. El segundo ensayo de cala realizado comenzó a fines de noviembre de 2005 bajo invernadero. Para evaluar la capacidad inhibitoria de estas cepas frente a las enfermedades expuestas anteriormente, se evaluaron los siguientes parámetros durante el ensayo: número de brotes, altura de planta, cantidad de plantas enfermas, periódicamente. Al final del estudio se evaluaron los siguientes parámetros: observación y clasificación de tubérculos y túberos cosechados. En el caso de papa se midió materia seca, largo de la raíz, peso y número de tubérculos.

Los resultados mostraron, en el caso del primer ensayo de calas, que concentraciones de la cepa antagonista BC10 del orden de  $10^4$ ,  $10^6$  y  $10^8$  UFC/mL en el nivel de infestación medio con el patógeno y concentraciones de la cepa antagonista de  $10^4$  UFC/mL para el nivel alto de infestación, manifiestan una mayor capacidad inhibitoria frente a *E. carotovora*, presentando un mejor estado de los túberos en la cosecha, mayor cantidad de brotes y sobrevivencia de las plantas. Al existir interacción entre *E. carotovora* y altas concentraciones de la cepa BC10 del orden de  $10^{14}$  UFC/mL, se anula el efecto antagonista de esta. También se pudo observar que los túberos son transmisores asintomáticos de esta enfermedad. En el segundo ensayo de cala, donde a los túberos no se les indujeron heridas, no hubieron diferencias entre los tratamientos, presentando todas las plantas un desarrollo normal y un alto porcentaje de sobrevivencia, demostrando un mejor efecto inhibitorio de la cepa BC10 frente a *E. carotovora*.

En el ensayo de papas, no se encontró una capacidad inhibitoria de la cepa antagonista BC2 frente a *R. solani*, ya que el método usado para la infestación del sustrato con el patógeno no dio los resultados esperados.



## SUMMARY

Between October 2005 and March 2006 three studies were carried out, with the purpose of evaluate the antagonistic capacity of two strains of *Bacillus subtilis* against *E. carotovora* and *Rhizoctonia solani*, which causes soft rot in *Zantedeschia* sp and black scurf in *Solanum tuberosum*, respectively. These studies had also the purpose to determine proper concentrations of the antagonistic cells that reduce the attack of both pathogens. In two different studies (one with *Solanum tuberosum* and the other with *Zantedeschia* sp), pots substrate were infested in two levels with the pathogen: a high, medium level and one without infestation. After 24 hours, three tubers per pot of *Zantedeschia* sp var. Lady Lack , and one potato tuber per pot were planted in each of the studies. After the next 24 and 120 hours, antagonistic cells were added to *Zantedeschia* sp and potato pots, respectively, in 6 concentrations levels. Thus, each study presented an entirely random design, with factorial adjustment: 3 levels of pathogen, 6 concentrations of the antagonist and four replicas. The third test was done considered only the medium infestation level with *Erwinia* (which was very effective in the first study). Three tubers per pot of *Zantedeschia* sp were planted on the substrate, inoculating with 5 concentrations of the antagonistic strains and using an entirely random design, with factorial adjustment: 5 treatments each with 4 replicas. The first test with *Zantedeschia* sp began in October 2005 and the one with potatoes at the beginning of november, both under controlled conditions of temperature, humidity and photoperiod. The second study with *Zantedeschia* sp began in november 2005 under greenhouse conditions. In order to evaluate the inhibiting capacity of the antagonistic strains, the following parameters were periodically evaluated during the studies: number of buds, plant height and amount of damaged plants. At the end of the studies, the following parameters were considered: observation and classification and tubers and in the case of potatoes: dry matter, root length, root weight and number of tubercles were considered.

The results showed, in the case of the first test with *Zantedeschia* sp., that concentrations of antagonistic strain BC10 of *B. subtilis* at levels of  $10^4$ ,  $10^6$  and  $10^8$  CFU/mL and in the medium level of the pathogen, concentrations of  $10^4$  CFU/mL of the antagonistic strain in the high infestation level, presented a greater inhibiting capacity against *E. carotovora*, showing a better state of tubers at harvest, greater amount of buds and a high survival percentage of plants. When interaction between *E. carotovora* and high concentrations of stock BC10 existed, in order of  $10^{14}$  CFU/mL, the antagonistic effect is annulled. It was also possible to observe, that tubers are asymptomatic transmitters of the disease. In the second test with *Zantedeschia* sp, where wounds were not induced to tubers, no differences between treatments were observed, presenting all plants a normal development and a high survival percentage, demonstrating that strain BC10 of *B. subtilis* had a better inhibiting effect against *E. carotovora*.

In the study with potatoes, no inhibiting capacity of antagonistic stock BC2 against *R. solani* was found, due to a failed infestation method of the substrate with the pathogen.

## 8 BIBLIOGRAFIA

- ACUÑA, I., BRAVO, R. y VARGAS, M. 2004. Cultivo de la papa. Tratamiento de semilla para disminuir la incidencia de Rhizoctoniasis. INIA. Tierra Adentro. Chile. pp 36-39
- ASOCIACION NACIONAL DE FABRICANTES E IMPORTADORES DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS AGRICOLAS. 2002 y 2003. Manual Fitosanitario. . Santiago, Chile. Laser S.A. 1214 p.
- AGRIOS, G. 1996. Fitopatología. México. Limusa 838 p.
- BAKER, K. y COOK, J. 1974. Biological control of plant pathogens. Freeman. San Francisco, U.S.A. 433 p.
- BAKER, R. y MARTINSON, C. 1970. Epidemiology of diseases caused by *Rhizoctonia solani*. **In:** Parmenter, J. *Rhizoctonia solani*. Biology and pathology. Los Angeles. University of California Press Berkeley. 255p
- BAREA, J. y AZCÓN-AGUILAR, C. 1982. La rizósfera: interacciones microbio-planta. An. Edaf y Agrobiol. XLI (7-8): 1517-1532.
- BARRIA, M. 2005. Antagonismo biológico en contra de hongos de importancia ambiental. Tesis Tecnología médica. Valdivia, Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile. 65 p.
- BASAUL, J. 2005. Determinación de la virulencia de aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kuhn obtenidos de micelio sobre plantas y de esclerocios de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) y su relación con la liberación de ácido en medio líquido.

Tesis Lic. Agr. Valdivia, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 90 p.

BAYER CROPSCIENCE, 2006. Cotton, Kodiak, product information. <http://www.bayercropscienceus.com/crops/view/cotton/product/kodiak/> (30 sept, 2006)

BETANCOURT, O. 1996. Evaluación del daño tisular en germoplasma de papa (*Solanum tuberosum* L.) mediante el uso de filtrados fitotóxicos producidos por *Rhizoctonia solani* Kühn AG 3. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 167 p.

BUDDENHAGEN, I. 1965. The relation of plant-pathogenic bacteria soil. pp 269-284. **In:** Ecology of soil -borne plant pathogens .Prelude to biological control .Baker, K and Snyder, W (eds).University of California Press. 571 p

BUTT, T., HARRIS, J. y POWELL, A. 1999. Microbial biopesticides. The European scene. **In:** Biopesticides Use delivery. Eds. F. R. Hil l & J.J. Menn. Humana Press .NJ. Pp 23-44.

CALDERONI, A. 1978. Enfermedades de la papa y su control. Buenos Aires. Hemisferio Sur. 143p.

CARRILLO, L. 2003. Microbiología agrícola. Cap 2. <<http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap2.pdfsearch=%22mode%20de%20accion%20de%20antibioticos%20producidos%20por%20bacillus%20subtilis%22>> (25 jun 2006)

CHAIN, G. 2001. Producción comercial de calas. <<http://www.tattersall.cl/revista/rev167/plagas.htm>> (05 ene 2006).

- CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICAS (INE). 2006. Arroz, Papa y Maravilla Incrementaron su Producción en la Temporada Agrícola 2005-2006. <<http://www.ine.cl/ine/canales/actualidad/noticias/2006> > (14 febr 2006)
- DOLE, M. J. y WILKINS, H. F. 1999. Floriculture, principles and species. New Jersey, U.S.A. Prentice Hall. 613p.
- ENGELKES, C., NUCLO, L. y FRAVEL, D. 1997. Effect of carbon, nitrogen, and C: N ratio on growth, sporulation, and biocontrol efficacy of *Talaromyces flavus*. *Phytopathology* 87, 500-505.
- FERNANDEZ, C. 1980. Enfermedades fungosas. **In:** Primer curso nacional sobre la producción de semilla certificada de papa. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias . Osorno, Chile. Pp 96-113.
- FRANK, J. 1980. *Rhizoctoniasis*, costra negra. **In:** Hooker, W. J. Compendio de enfermedades de la papa. Centro Internac. de la Papa. Lima, Perú. pp: 73-75
- GONZALEZ, D.; CARLING, D.; KUNINAGA, S.; VILGALYS, R. y CUBETA, M. 2001. Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Tanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. *Mycologia*. 93: 1138-1150.
- GONZALEZ, V. y FRAGOSO, S. 2002. *Bacillus subtilis*. <<http://www2.cbm.vam.es/microali/pdfs/Bsubtilispdf>.> (20 de febr 2006).
- GUSS, A. 1999. *Erwinia carotovora*. <[http://web.umn.edu/~microbio/BIO221\\_1999/E\\_carotovora.html](http://web.umn.edu/~microbio/BIO221_1999/E_carotovora.html) > (5 de mar de 2006).

HOOKER, W 1980. Compendio de enfermedades de la papa. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. 166p.

IAÑEZ, E. 1998. Diferenciaciones de la célula procariótica. Curso de microbiología. [http://fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/micro-ianez/12\\_micro.htm](http://fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/micro-ianez/12_micro.htm) > (03 febr 2006).

JAGER, G., HIDE, G., VAN DEN BOOGERT, P., TERMORSHUIZEN, A. y VAN BAARLEN, P. 1996. Pathology and control of soil-borne fungal pathogens of potato. *Pot. Res.* 39: 437-469.

MINISTRY OF AGRICULTURE GREAT BRITAIN, FISHERIES AND FOOD. 1976. Manual of plant growth stages and disease assesment keys. Pinner, Middlesex. 58 p.

MENDEZ, P. 2005. Selección e identificación de antagonistas bacterianos en contra de *Erwinia carotovora*, agente causal de pudrición húmeda en plantas de importancia económica (papas y calas). Tesis Tecnología médica. Valdivia, Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile. 59 p.

MISHAGI, J. 1990. Screening bacteria for root colonizing ability by a rapid method. *Soil Biol. Biochem* 22:1085-1088.

MCSPADDEN, B. 2005. Commercial biocontrol products available in the U.S.A. for use against plant pathogens. Ohio State University.USA.< <http://www.oardc.ohio-state.edu/apsbcc/productlist2003USA.htm>> (22 de febr 2006).

MOLKENBUHR, E. L. y TAPIA, B. 2005. Mercado de las flores de corte. Oficina de estudios y políticas agrarias de Chile. <<http://odepa.cl>>. (04 de ene2006).

- NAIKI, T. y UI, T. 1978. Ecological and morphological characteristics of the *Sclerotia* of *Rhizoctonia solani* Kuhn produced in soil. Soil Biol.Biochem.10:471-478.
- NITSCHKE, J.1983. Transmisión interna de hongos patógenos y efecto del daño mecánico sobre la calidad de la semilla de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L). Tesis Lic. de Agr. Santiago. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.117 p.
- OGOSHI, A, 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. Ann. Rev. Phytopath. 25: 125 – 143.
- OWNLEY, B.H., WELLER, L. y THOMASHOW, S. 1992. Influence of in situ and in vitro pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var tritici by *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathology 82,178-184
- PARMENTER. J. 1970. *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology. Press, Berkeley, Los Angeles, U.S.A. University of California. 255p
- REYES, R. 2000. Control biológico de *Rhizoctonia solani* (Kuhn) en tomate, mediante el empleo de antagonistas bacterianos. Tesis Lic. Agr. Santiago, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Chile. 152 p.
- RODRIGUES, M. 2004. La producción y el comercio de la papa en el contexto internacional y latinoamericano. Revista de la papa. Achipa. 6(20):8-9, septiembre 2004.
- RODRÍGUEZ, K.; MALDONADO, Y.; MURCIA, L.; HUERTAS, W.; VÁSQUEZ, M.; ZAMBRANO, A.; RIVERO, R. y GARCÍA, C. 2006 Evaluación de protocolos para la detección de patógenos del suelo en papa

<<http://www.redepapa.org/maldonado.pdf#search=%22inoculACION%20de%20R%20solani%20%22>>(25 de agosto2006).

RODRIGUEZ, L., JULIA, V. 2006. Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofitos contra *Rhizoctonia solani*. <[http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/Tesis/Salud/Rodriguez\\_LV/Introduc.PDF#search=%22antibiosis%20producida%20por%20bacillus%20Carthrobacter%20y%20pseudomonas%22](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/Tesis/Salud/Rodriguez_LV/Introduc.PDF#search=%22antibiosis%20producida%20por%20bacillus%20Carthrobacter%20y%20pseudomonas%22)> (15 de sept 2006).

ROHM AND HASS COMPANY, 1980. La papa. Control de sus enfermedades y plagas en América Latina. Industrias químicas Chile S.A. Santiago, Chile. 40 p.

ROLLINS, D. 2000. Basic mechanisms of antibiotic action and resistance. DM. Rollins. University of Maryland. <<http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424index.html>. 2000> (28 agost 2006)

SALLE, A. 1968. Asociaciones de bacterias En Bacteriología. / AJ Salle. Editora Revolucionaria. La Habana. 1968: 492-509.

SANTANDER, C., MONTEALEGRE, J y HERRERA, R. 2003. Control biológico de *Rhizoctonia solani* en tomate en suelos previamente sometidos a solarización y bromuro de metilo. Ciencia investigación agrícola. Chile. 30(2)107-112

SCHMIEDEKNECHT, G; ISSOUFOU, I; JUNGE, H. y BOCHOW, H. 2001. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent .V. Biological control of diseases on maize and sunflowers. Journal of Plant disease and Protection. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 108 (5)500 -512.

SCHMIEDEKNECHT, G; BIRGIT, K; BIRGIT, H; KUBART, S; WORKIE, A; GROSCH, R; BOCHOW, H. y HEVESI, M. 1998. Use of *Bacillus subtilis* as



control agent. I. Activities and characterization of *Bacillus* strains. Journal of Plant disease and Protection. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 105 (2)181-197.

SCHMIEDEKNECHT, G., BOCHW, H. y JUNGE, H. 1998. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. II. Biological control of potato diseases. Journal of Plant disease and Protection. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 105(4)376 -386.

SCHNETTLER, E. 1993. Efecto de bacterias antagonistas en la incidencia de *Rhizoctonia solani* Kühn AG 3 agente causal de la sarna negra en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis Lic. Agr. Valdivia, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 152 p.

SHARGA, B. 1998. *Bacillus subtilis* BS107 as an antagonist of potato blackleg and soft rot bacteria. Canadian Journal of Microbiology. 44(8)777-783.

SILVA, L. 1999. Control biológico de *Rhizoctonia solani* Kühn. AG3 en papa *Solanum tuberosum* L. mediante *Serratia liquefaciens* cepa S111 bioencapsulada, bajo condiciones controladas y de campo. Tesis Lic. Agr. Valdivia, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 107 p.

SINCLAIR, J. 1992. *Bacillus subtilis* as an agent for the biocontrol of plant diseases. / JB, Sinclair Perspectives in plant pathology; New Delhi 10005: 367-374.1992.

SMITH, M., DUNEZ, J., LELLIOTT, R. A., PHILLIPS, D. H y ARCHER, R. A. 1992. Manual de Enfermedades de las plantas. Traducido por Fernando García Arenal. Bilbao, España. Mundi - Prensa. 671 p.

- SOFFIA, V. 2005. Utilización de biofungicida Serenade en el control de enfermedades de importancia económica en frutales. Santiago, Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. <[http:// mazinger.sisib.uchile.cl](http://mazinger.sisib.uchile.cl) > (2 de mar 2005).
- SZCZECH, M y SHODA, M. 2005. The influence of *Bacillus subtilis* RB14-C on the development of *Rhizoctonia solani* and indigenous microorganisms in the soil. Canadian Journal of Microbiology. 51.405-411.
- TAPIA, B. 2005. Mercado de la papa. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. ODEPA. <[http:// odepa.cl](http://odepa.cl)> (11 de ene 2005).
- TAPIA, B. 2001. Mercado de la papa. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. ODEPA. <[http:// odepa.cl](http://odepa.cl)> (06 de ene 2006).
- UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA. 2005. Doctorado de la UFRO tiene primera egresada. <<http://www.ufro.cl/prensa/doc/2005>> (25 feb 2006)
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1998. Commercial biocontrol products for use against soilborne crop diseases. <http://www.oardc.ohio-state.edu/apsbcc/productlist.htm>>. (23 de ene 2006).
- VAN DRIESCHE, R. y BELLOWS, T. 1996. Biological control. Chapman & Hall. New York, U.S.A. 539 p.
- WALKER, J. 1965. Host resistance as it relates to root pathogens and soil microorganisms. pp 314-320. **In:** Ecology of soil –borne plant pathogens. Prelude to biological control .Baker, K and Snyder, W (eds).University of California Press. 571 p

WELLER, D. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 379-407.

WEINHOLD, A y SINCLAIR, J. 1996. *Rhizoctonia solani*: Penetration, colonization and host response. **In:** Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S. y Dijkstra, G. (eds.). *Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control*. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. pp: 163-174.

WRIGHT, P. J. 1994. Controlling soft rots in callas < [http:// www.crop.cri.nz](http://www.crop.cri.nz) > (6 de ene 2006).

**ANEXOS**

**ANEXO 1 Análisis de varianza del parámetro altura de plantas de calas con las distintas variables mediadas a través del ensayo.**

Fuente		GL	SC	CM	Fcal	P value
Variable 11-10-2005						
Antagonista:	A	5	22,246	4,449	2,67	0,0318*
<i>Erwinia carotovora</i> :	E	2	89,076	44,538	26,68	0,000**
Interacción:	A x E	10	28,037	2,8037	1,68	0,1097
Error		54	90,149	1,669		
Total		71	229,51			
Variable 21-10-2005						
Antagonista:	A	5	124,843	24,968	2,48	0,0429*
<i>Erwinia carotovora</i> :	E	2	502,814	251,40	24,97	0,000**
Interacción:	A x E	10	44,401	4,4401	0,44	0,9194
Error		54	543,646	10,067		
Total		71	1215,7			
Variable 31-10-2005						
Antagonista:	A	5	1714,84	342,96	2,65	0,0325*
<i>Erwinia carotovora</i> :	E	2	5031,09	2515,5	19,45	0,000**
Interacción:	A x E	10	2868,35	286,83	2,22	0,0303*
Error		54	6985,36	129,35		
Total		71	16599,6			
Variable 10-11-2005						
Antagonista:	A	5	4912,91	982,58	2,86	0,0231*
<i>Erwinia carotovora</i> :	E	2	18507,7	9253,8	26,95	0,000**
Interacción:	A x E	10	4465,2	446,52	1,30	0,2540
Error		54	18542,5	343,38		
Total		71	46428,4			
Variable 21-11-2005						
Antagonista:	A	5	7092,78	1418,5	2,13	0,0753
<i>Erwinia carotovora</i> :	E	2	23751,9	11876	17,86	0,000**
Interacción:	A x E	10	8470,74	847,07	1,27	0,2684
Error		54	35911,8	665,03		
Total		71	75227,2			

\*\* y \* indican diferencias estadísticas al 0,01% y 0,05%, respectivamente.

**ANEXO 2 Análisis de varianza del parámetro cantidad de brotes en el primer ensayo con plantas de calas, según las distintas variables medidas.**

Fuente		GL	SC	CM	Fcal	P value
Variable 30-09-2005						
Antagonista :	A	5	0,2361	0,04722	0,28	0,9245
<i>Erwinia carotovora</i> :	E	2	0,1944	0,09722	0,57	0,5702
Interacción:	A x E	10	1,6388	0,16388	0,96	0,4908
Error		54	9,25	0,1712		
Total		71	11,32			
Variable 07-10-2005						
Antagonista :	A	5	8,27	1,6555	1,55	0,000**
<i>Erwinia carotovora</i> :	E	2	38,69	19,3472	18,17	0,1886
Interacción:	A x E	10	14,80	1,480	1,39	0,2097
Error		54	57,5	1,064		
Total		71	119,278			
Variable 14-10-2005						
Antagonista :	A	5	20,666	4,133	2,36	0,052*
<i>Erwinia carotovora</i> :	E	2	93,583	46,79	26,74	0,000**
Interacción:	A x E	10	45,25	4,525	2,59	0,012**
Error		54	94,5	1,75		
Total		71	254			
Variable 21-10-2005						
Antagonista :	A	5	33,569	6,71	1,92	0,1068
<i>Erwinia carotovora</i> :	E	2	210,11	105,056	29,98	0,000**
Interacción:	A x E	10	40,72	4,072	1,16	0,3363
Error		54	189,25	3,50		
Total		71	473,65			
Variable 28-10-2005						
Antagonista :	A	5	29,069	5,813	1,27	0,2915
<i>Erwinia carotovora</i> :	E	2	328,028	164,014	35,75	0,000**
Interacción:	A x E	10	71,8056	7,180	1,57	0,1425
Error		54	247,75	4,58		
Total		71	676,653			
Variable 04-11-2005						
Antagonista :	A	5	20,79	4,158	1,03	0,4074
<i>Erwinia carotovora</i> :	E	2	380,25	190,125	47,26	0,000**
Interacción:	A x E	10	66,58	6,65	1,66	0,1161
Error		54	217,25	4,023		
Total		71	684,87			
Variable 10-11-2005						
Antagonista :	A	5	34,569	6,91	2,14	0,0742
<i>Erwinia carotovora</i> :	E	2	329,19	164,597	51,01	0,000**
Interacción:	A x E	10	119,639	11,96	3,71	0,000**
Error		54	174,25	3,22		

Total		71	657,65			
Variable 21-11-2005						
Antagonista :	A	5	44,77	8,955	3,0	0,018*
<i>Erwinia carotovora</i> :	E	2	300,44	150,22	50,39	0,000**
Interacción:	A x E	10	119,556	11,95	4,01	0,000**
Error		54	161	2,98		

\*\* y \* indican diferencias estadísticas al 0,01% y 0,05%, respectivamente.

### ANEXO 3 Análisis de varianza del porcentaje de sobrevivencia de plantas de calas del primer ensayo.

Fuente		GL	SC	CM	Fcal	P value
% de sobrevivencia						
Antagonista :	A	5	17705	3441	3,32	0,010**
<i>Erwinia carotovora</i> :	E	2	39778	19889	18,6	0,000**
Interacción:	A x E	10	22771	2277	2,14	0,0369*
Error		54	57544	1065		
Total		71	137801			

\*\* y \* indican diferencias estadísticas al 0,01% y 0,05%, respectivamente.

### ANEXO 4 Análisis de varianza del porcentaje de sobrevivencia del segundo ensayo de calas.

FL		GL	SC	CM	Fcal	P value	
EM X A	% sobrevivencia						
	Antagonista:	A	4	1091,82	272,96	3,2	0,043
Error			15	1278,12	85,208		
Total			19	2369,24			

**ANEXO 5 Análisis de varianza del parámetro cantidad de brotes del ensayo de papas.**

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fcal	P value
Variable 28-10-2005					
Antagonista: A	5	75,66	15,13	1,49	0,2071
<i>Rhizoctonia solani</i> : R	2	357,33	178,66	17,64	0,000**
Interacción: A x R	10	62	6,2	0,61	0,7968
Error	54	547	10,13		
Total	71	1042			
Variable 08-11-2005					
Antagonista: A	5	3,111	0,622	0,38	0,862
<i>Rhizoctonia solani</i> : R	2	2,194	1,097	0,67	0,5180
Interacción: A x R	10	7,472	0,747	0,45	0,912
Error	54	89	1,648		
Total	71	101,770			
Variable 28-11-2005					
Antagonista: A	5	7,94	1,588	0,83	0,53
<i>Rhizoctonia solani</i> : R	2	15,86	7,93	4,12	0,021*
Interacción: A x R	10	53,3	5,33	2,77	0,007**
Error	54	104	1,925		
Total	71	181,1			
Variable 05-12-2005					
Antagonista: A	5	33,57	6,71	1,58	0,18
<i>Rhizoctonia solani</i> : R	2	32,86	16,43	3,88	0,026*
Interacción: A x R	10	71,47	7,15	1,69	0,1077
Error	54	228,75	4,24		
Total	71	366,65			
Variable 12-12-2005					
Antagonista: A	5	56,11	11,22	1,63	0,168
<i>Rhizoctonia solani</i> : R	2	3,86	1,93	0,28	0,7560
Interacción: A x R	10	91,97	9,19	1,34	0,2361
Error	54	372	6,88		
Total	71	523,94			



## Continuación Anexo 5

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fcal	P value
Variable 26-12-2006					
Antagonista: A	5	26,9	5,38	0,94	0,463
<i>Rhizoctonia solani</i> : R	2	6,02	3,01	0,53	0,5940
Interacción: A x R	10	42,8	4,28	0,75	0,677
Error	54	309,25	5,73		
Total	71	384,98			
Variable 05-01-2006					
Antagonista: A	5	43,27	8,655	1,52	0,1975
<i>Rhizoctonia solani</i> : R	2	7,19	3,597	0,63	0,5345
Interacción: A x R	10	75,64	7,563	1,33	0,2373
Error	54	306,5	5,675		
Total	71	432,6			
Variable 20-01-2006					
Antagonista: A	5	45	9	1,49	0,207
<i>Rhizoctonia solani</i> : R	2	9,75	4,87	0,81	0,450
Interacción: A x R	10	93,75	9,37	1,56	0,145
Error	54	325,5	6,02		
Total	71	474			

**ANEXO 6 Análisis de varianza del parámetro número de tubérculos producidos por el tubérculo madre de las plantas de papas.**

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fcal	P value
Número de tubérculos					
Antagonista: A	5	55,33	11,06	2,45	0,044*
<i>Rhizoctonia solani</i> : R	2	9,33	4,66	1,03	0,3622
Interacción: A x R	10	35,83	3,58	0,79	0,634
Error	54	243,5	4,5		
Total	71	344			

**ANEXO 7 Análisis de varianza del parámetro peso de tubérculos hijos.**

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fcal	P value
Peso de tubérculos					
Antagonista: A	5	1650,45	330,09	1,77	0,1337
<i>Rhizoctonia solani</i> : R	2	3403,5	1701,8	9,15	0,000**
Interacción: A x R	10	1926,5	192,65	1,04	0,427
Error	54	10044,3	186,01		
Total	71	17024,8			

**ANEXO 8 Análisis de varianza del parámetro largo de raíz en plantas de papas.**

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fcal	P value
Largo de raíz					
Antagonista: A	2	431,667	86,333	2,09	0,0812
<i>Rhizoctonia solani</i> : R	5	394,085	197,04	4,76	0,0124**
Interacción: A x R	10	1292,25	129,23	3,12	0,0033**
Error	54	2234	41,37		
Total	71	4352			