



Universidad Austral de Chile

Escuela de Agronomía

Efecto de dos formulaciones biológicas sobre poblaciones de *Erwinia carotovora* (Dye) Hall en un cultivo de calas (*Zantedeschia* spp.)

Memoria presentada como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo

Eva Maria Möller-Holtkamp Schumacher

Valdivia – Chile

2009

PROFESOR PATROCINANTE:

Luigi Ciampi P.
Ing. Agr., M.Sc, Ph. D.
Instituto de Sanidad y Producción Vegetal

PROFESORES INFORMANTES:

Ricardo Fuentes P.
Ing. Agr., M.Sc.
Instituto de Sanidad y Producción Vegetal

Juan Nissen M.
Ing. Agr., Dr.rer.hort.
Instituto de Ingeniería Agraria y Suelos

INSTITUTO DE PRODUCCIÓN Y SANIDAD VEGETAL

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer por medio de este trabajo todo el apoyo, consejos y amor que me han brindado a lo largo de estos años de estudio a mis padres Carlos y Verónica, a mis hermanos Margit y Claus, a mis abuelos, tíos y primos. A todos ustedes, gracias!

A Marcelo, por estar a mi lado siempre, a mi inseparable amiga Consuelo y a todos (as) mis amigos (as) que estuvieron cerca, dándome su apoyo y cariño para finalizar esta investigación.

Gracias Mädchenschaft Amankay por haberme entregado junto a todas las chicas los mejores recuerdos de la "U". Es lebe die Amankay!

Finalmente, quisiera darle mis más sinceros agradecimientos a mi profesor patrocinante Luigi Ciampi, no solo por su ayuda sino también por sus sabios consejos y alegría.

Este trabajo de investigación fue financiado por el proyecto FONDEF DO3i 1140: "Formulaciones y estrategias para mejorar el biocontrol de enfermedades en cultivos de elevada importancia socioeconómica en Chile. Modelos: *Rhizoctonia solani* en papas y *Erwinia carotovora* en calas".

*A mi familia,
con todo cariño.*

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
	RESUMEN	1
	SUMMARY	3
1	INTRODUCCIÓN	5
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1	El cultivo de cala (<i>Zantedeschia</i> spp.) en Chile y el mundo	6
2.1.1	Clasificación botánica	8
2.1.2	Origen y distribución geográfica	8
2.1.3	Morfología de la planta de cala	8
2.2	Principales enfermedades que afectan a <i>Zantedeschia</i> spp.	9
2.3	El género <i>Erwinia</i>	9
2.3.1	Subespecies de <i>Erwinia carotovora</i> como responsables de inducir pudrición húmeda en calas	10
2.4	Sintomatología de pudrición blanda en calas	10
2.5	Medidas de control	11
2.5.1	Bacterias biocontroladoras	12
2.5.2	Género <i>Bacillus</i>	12
2.5.2.1	<i>Bacillus subtilis</i> como bioantagonista	13
3	MATERIAL Y MÉTODOS	15
3.1	Antecedentes generales	15
3.1.1	Ubicación y duración de los ensayos	15
3.1.2	Características del suelo	15
3.1.3	Manejo general del cultivo	15

3.2	Material	15
3.2.1	Material vegetal	15
3.2.2	Cepa antagonista	15
3.2.3	Materiales de laboratorio	16
3.3	Métodos	16
3.3.1	Método de la primera etapa (terreno)	16
3.3.1.1	Diseño experimental	16
3.3.1.2	Plantación	16
3.3.1.3	Dosis y método de aplicación de las formulaciones	17
3.3.1.4	Método de evaluación	19
3.3.1.5	Cosecha y curado de los túberos	19
3.3.2	Método de la segunda etapa (laboratorio)	19
3.3.2.1	Evaluación de la segunda etapa	20
3.4	Análisis estadístico	20
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	21
4.1	Evaluación de formulados para el control de <i>E. carotovora</i> bajo condiciones de invernadero	21
4.1.1	Emergencia de las plantas de cala	21
4.1.2	Incidencia de pudriciones húmedas en invernadero	22
4.1.3	Cosecha y curado de los túberos de cala	26
4.1.4	Evaluaciones realizadas en laboratorio	26
4.2	Evaluación de formulados bajo condiciones de campo	28
4.2.1	Emergencia de las plantas de cala	28
4.2.2	Incidencia de pudriciones húmedas en campo	28
4.2.3	Cosecha y curado de túberos de campo	30

4.2.4	Presencia de <i>E. carotovora</i> latente en túberos aparentemente sanos	31
4.3	La importancia de factores ambientales en la producción de calas bajo plástico	34
4.3.1	Exceso de temperatura y humedad en el aire	35
4.3.2	Altas temperaturas no toleradas por el cultivo	35
4.3.3	Temperatura óptima para el desarrollo de pudriciones húmedas	35
4.3.4	Exceso de agua de riego	35
4.3.5	Manejo integrado del cultivo	37
5	CONCLUSIONES	38
6	BIBLIOGRAFÍA	39
7	ANEXOS	43

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Número de túberos de cala plantados por tratamiento bajo condiciones de invernadero y campo	17
2	Formulación y dosis de <i>Bacillus subtilis</i> aplicado a las parcelas con cuatro repeticiones cada una en seis tratamientos y un testigo	18
3	Emergencia de plantas de cala en invernadero en seis tratamientos y un testigo para la evaluación de <i>Bacillus subtilis</i> como controlador biológico de <i>Erwinia carotovora</i>	22
4	Porcentaje (%) de plantas de cala sanas de seis mediciones realizadas en seis tratamientos y un testigo para la evaluación de <i>Bacillus subtilis</i> como controlador biológico de <i>Erwinia carotovora</i>	23
5	Número total, peso total y promedio del peso individual de túberos de cala cosechados al final del ensayo en invernadero en seis tratamientos y un testigo para la evaluación de <i>Bacillus subtilis</i> como controlador biológico de <i>Erwinia carotovora</i>	27
6	Promedio y porcentaje (%) de plantas de cala emergidas en campo de seis tratamientos y un testigo para la evaluación de <i>Bacillus subtilis</i> como controlador biológico de <i>Erwinia carotovora</i>	28
7	Porcentaje (%) de plantas sanas de cala de cuatro mediciones realizadas en campo en seis tratamientos y un testigo para la evaluación de <i>Bacillus subtilis</i> como controlador biológico de <i>Erwinia carotovora</i>	29
8	Peso de túberos de cala cosechados de campo en seis tratamientos y un testigo para la evaluación de <i>Bacillus subtilis</i> como controlador biológico de <i>Erwinia carotovora</i>	32
9	Número de túberos sanos y brotados en seis tratamientos y un testigo posterior a la inducción de <i>Erwinia carotovora</i> latente en túberos de cala de campo aparentemente sanos	32

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Calas de colores (<i>Zantedeschia</i> spp.) De izquierda a derecha: Captain Amigo ®, Captain Medoc ®, Captain Volante, Treasure, Red Sox, Picasso, Mozart, Captain Miller ®, Schwarzwald ®, Pink Persuasion. FUENTE: www.captaincalla.nl	7
2	Síntomas de pudrición blanda causados por <i>Erwinia carotovora</i> en túberos de cala FUENTE: www.bioinsumos.cl	10
3	Cala de color (<i>Zantedeschia</i> spp.), cv. <i>Treasure</i> . FUENTE: www.captaincalla.nl	16
4	Diseño experimental de los ensayos. Disposición y superficie de las parcelas.	17
5	Evolución en seis tratamientos y el testigo de las seis mediciones realizadas en invernadero de plantas libres de <i>Erwinia carotovora</i>	24
6	Pudrición y colapso de tallos (A), follaje y flores (B) de <i>Zantedeschia</i> spp. producto de ataque de <i>Erwinia carotovora</i> bajo condiciones de invernadero	25
7	Evolución de plantas de cala sanas en los seis tratamientos y un testigo de las cuatro evaluaciones realizadas bajo condiciones de campo	30
8	Túbero de cala con completa degradación de sus tejidos, producto de la acción de las enzimas pectinolíticas de <i>Erwinia carotovora</i>	33
9	Túbero de cala sano con brotes (A) y túbero sin brotes con síntomas de pudrición blanda (B).	34
10	Formación de musgo en los camellones del ensayo de invernadero (A) y medición de tensión hídrica en el suelo por medio de un tensiómetro (B)	36

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Número de túberos plantados por parcela en invernadero y en campo	43
2	Fórmulas para llegar a las dosis necesarias de las formulaciones sólida y líquida	44
3	Número y porcentaje (%) de plantas de cala emergidas en invernadero y en campo en seis tratamientos y un testigo	45
4	Número de plantas sanas de ensayo en invernadero y campo para las cuatro repeticiones	57
5	Porcentaje de plantas de cala sanas de invernadero y campo por parcela	51
6	Peso (gr) de túberos de cala analizados en laboratorio de invernadero y campo	55
7	Test de homogeneidad de varianzas	57
8	Tablas ANDEVA para las variables dependientes	58

RESUMEN

El objetivo general de esta investigación fue evaluar el efecto antagónico de una cepa de *Bacillus subtilis* aplicada en seis diferentes dosis y en dos formulaciones, una líquida y otra en polvo. Este biocontrolador posee una acción inhibitoria comprobada hacia *Erwinia carotovora* agente causal de la pudrición húmeda en calas de colores (*Zantedeschia* spp.).

La hipótesis de esta investigación se sustenta en que: una cepa seleccionada de *B. subtilis* aplicada en dos formulaciones inhibe el desarrollo de *E. carotovora* en cala, bajo condiciones de invernadero y de campo.

Este estudio fue realizado en dos etapas. La primera, en la empresa BOPAR S.A., ubicada a 20 Km al norte de Valdivia, lugar donde se evaluó el biocontrolador bajo condiciones de invernadero y de campo. La segunda, tuvo lugar en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Universidad Austral de Chile.

Para alcanzar los objetivos propuestos, en la primera etapa del estudio, se realizaron mediciones en seis fechas secuenciales en las cuales se estableció el estado sanitario de las plantas de cala emergidas bajo condiciones de invernadero, y cuatro bajo condiciones de campo. Estas evaluaciones se realizaron una vez emergidas las plantas hasta el final de la floración y senescencia del follaje para establecer la dosis que tenga una mejor respuesta para el control de *E. carotovora*. Finalizado este periodo se procedió a la cosecha de los túberos para su respectivo curado y posterior evaluación.

El objetivo específico de la segunda etapa consistió en un análisis en laboratorio para establecer el estado sanitario y confirmar la latencia de *E. carotovora* en túberos obtenidos del ensayo de campo. Se utilizaron 20 túberos por cada tratamiento y 20 como testigo. Se contabilizaron los túberos podridos y aquellos que presentaron brotación.

Los siguientes datos fueron analizados estadísticamente: a) porcentaje de plantas emergidas en invernadero; b) porcentaje de plantas de cala sanas de invernadero para la segunda y última medición; c) promedio de peso de túberos individuales de invernadero; d) porcentaje de plantas emergidas en campo; e) porcentaje de plantas de cala sanas de campo para la segunda y última medición; f) promedio de peso de túberos individuales de campo; g) número de túberos de campo sanos (túberos brotados más los que no presentaron cambios luego de la inducción de *E. carotovora* latente; y h) número de túberos brotados luego de la inducción de la enfermedad.

Las conclusiones sobre los resultados obtenidos fueron las siguientes:

- No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al efecto que pueda producir la bacteria biocontroladora sobre el crecimiento de *E. carotovora*

en el momento de la emergencia de las plantas de cala bajo condiciones de invernadero y de campo.

- De la misma manera, no fue posible establecer diferencias estadísticas entre los tratamientos, para evaluar el efecto del biocontrolador para la variable número de plantas de cala sanas contabilizadas en seis mediciones en invernadero y cuatro bajo condiciones de campo.

- En cuanto a la variable peso promedio individual de túberos de cala cosechados en campo y bajo invernadero, no se detectaron diferencias significativas que demuestren un efecto positivo por parte de *B. subtilis*.

- En la segunda etapa, los datos obtenidos de la confirmación de la posible latencia de *E. carotovora* en túberos de cala cosechados en campo, no arrojaron resultados estadísticamente significativos tanto para la variable número de túberos sin pudrición blanda como para túberos brotados.

- Finalmente, dado los resultados del trabajo es recomendable realizar un manejo integrado del cultivo de *Zantedeschia* spp., de modo de prevenir los ataques de *E. carotovora*, los cuales son muy difíciles de controlar.

SUMMARY

The overall objective of this research was to assess the effect of an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* used in six different doses and in two formulations, a liquid one and a powder. This biocontroller has an approved inhibitory effect on *Erwinia carotovora* which causes soft rot in calla (*Zantedeschia* spp.).

The hypothesis of this research is based on the following: a selected strain of *B. subtilis* applied in two formulations inhibits the development of *E. carotovora* in calla, under greenhouse and field conditions.

This study was conducted in two stages. The first one was carried out in the company BOPAR S.A., located 20 Km north of Valdivia, where the biocontroller was evaluated under greenhouse and field conditions. The second one took place at the Laboratory of Phytopathology of the Institute of Plant Production and Health of the Universidad Austral de Chile.

To achieve said objectives, six sequential measurements concerning the state of health of the emerged plants were conducted under greenhouse conditions, four under field conditions, during the first stage of the study. These assessments were made after the plants emerged until the end of flowering and senescence of foliage in order to establish the dose that has the best response regarding the control of *E. carotovora*. After completing this period the tubers of the plants grown under greenhouse and field conditions were harvested to be cured and analyzed subsequently.

The specific objective of the second stage consisted in a laboratory analysis to establish the health status and to confirm the onset of *E. carotovora* in tubers obtained under field conditions. 20 tubers of each treatment were used and 20 as control. After this treatment the number of rotten tubers was counted as well as the number of tubers that sprouted.

The following data were statistically analyzed: a) percentage of plants emerged in the greenhouse; b) percentage of healthy plants in the greenhouse for second and the final measurement; c) average weight of individual tubers in the greenhouse; d) percentage of plants emerged in the field; e) percentage of healthy calla plants in the field for the second and the final measurement; f) average weight of individual tubers in the field; g) number of healthy tubers of the field (tubers that sprouted or stayed without change) after the treatment favoring the growth of *E. carotovora*; h) number of tubers sprouting after the treatment favoring the growth of *E. carotovora*.

The results permitted the following conclusions:

- No statistically significant differences were found regarding the negative effect that could be produced the biocontrolling bacterium on the growth of *E. carotovora* at the time of the emergence of plants under greenhouse and field conditions.

- Likewise, it was not possible to establish statistical differences among different treatments to assess the effect of the biocontroller regarding the variable “number of healthy plants counted in six measurements in the greenhouse and in four under field conditions.
- As for the variables “average weight of individual tubers harvested in the greenhouse and field conditions, no significant differences that could possibly show a positive effect on the part of *B. subtilis*.
- The data obtained confirming the possible latency of *E. carotovora* in tubers harvested in field conditions in the second stage of the study did not result in statistically significant findings for the variable “number of tubers without soft rot” and the variable “sprouting tubers”.
- Finally, given the results of the study we recommend an integrated management of the cultivation of *Zantedeschia* spp. in order to prevent attacks of *E. carotovora*, which are very difficult to control.

1 INTRODUCCIÓN

En Chile, en los últimos 10 años se ha incrementado tanto la superficie como la producción de varas de calas de colores (*Zantedeschia* spp.), llegando a alrededor de 100 ton de flores de corte exportadas durante el año 2005. Esto se debe principalmente a la gran demanda internacional de este tipo de producto.

A medida que la producción de calas ha ido aumentando a través del tiempo, se ha podido establecer la presencia de factores adversos por los cuales se ha visto disminuida tanto la cantidad como calidad del producto final. Las pérdidas de plantas de calas por efecto de enfermedades superan los 100 millones de dólares al año a nivel mundial.

La presencia de patologías que afectan gravemente al cultivo, es un tema que ha causado gran incertidumbre dentro de los productores de cala. La enfermedad que provoca serias pérdidas es la pudrición blanda o húmeda provocada por la bacteria *Erwinia carotovora* (Dye) Hall, la cual ha traído consecuencias letales en las plantaciones, debido a la baja eficacia de productos que permitan su control.

Guiados hacia los fundamentos de una agricultura sustentable que no provoque daños al medio ambiente, en Chile se ha generado una corriente de investigación orientada al desarrollo de productos biológicos. Esto último ha implicado elaborar formulaciones específicas para el control de enfermedades. Los biocontroladores permitirían la disminución en la utilización de productos biocidas, para lograr una producción sana y libre de sustancias nocivas y poder competir en un mundo globalizado.

Dentro de las posibles alternativas de control biológico para *E. carotovora*, se encuentra el efecto antagonista de especies del género *Bacillus*, en contra del crecimiento de poblaciones de *Erwinia*.

La hipótesis de este trabajo fue:

Bacillus subtilis en dos formulaciones inhibe el desarrollo de *E. carotovora* en cala, bajo condiciones de invernadero y de campo.

El objetivo general de esta investigación fue evaluar el efecto de dos formulaciones biológicas sobre poblaciones de *E. carotovora*, agente causal de pudrición húmeda en tallos y túberos de calas.

Los objetivos específicos son:

- Evaluar el efecto de la aplicación de diferentes dosis de una formulación biológica líquida y otra en polvo bajo condiciones de invernadero y de campo.
- Analizar en laboratorio el efecto de las formulaciones sobre poblaciones latentes de *Erwinia* en túberos de campo aparentemente sanos.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 El cultivo de calas de colores (*Zantedeschia* spp.) en Chile y el mundo

Según LAVAL y TAPIA (2005), el cultivo de calas en Chile fue iniciado comercialmente hace más de 10 años, cada vez con un mayor aumento, gracias a la incipiente exportación a los mercados de los Países Bajos y Estados Unidos. Actualmente, hay medianos y grandes productores 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.

El volumen de las exportaciones de Chile de esta flor de corte entre enero y octubre del año 2005 alcanzó a los 96.078 kg (LAVAL y TAPIA, 2005). En el año 2006 disminuyó a 69.350 kg con un total de US\$ 743.511. Las calas representaron un 17,4% del volumen total y un 26,1% del monto total de las exportaciones realizadas, posicionándose entre los tres cultivos de flor de corte de exportación más importantes junto a lilium y peonías (ODEPA, 2007).

En 2007, se exportó un volumen de 57.000 kg con un monto de US\$ 791.000, sobrepasando el del año anterior con un menor volumen. Además, las calas, en el año 2007 representaron el segundo ítem de exportación después de los lilium, habiendo sobrepasado en valor a las peonías (REYES, 2008).

Los principales países de destino de *Zantedeschia* spp. como flor de corte son Europa, con un volumen total exportado en el año 2006 de 49.400 kg, siendo las calas el 17% del total de flores. Holanda representa el mercado más grande de Europa con un 46,6%. Hacia Estados Unidos se exportó en el año 2006 un volumen total de 26.200 kg representando las calas un 22,8% del total del volumen de flores. Actualmente, han crecido considerablemente las exportaciones de flores hacia Japón, aumentando del año 2005 al 2006 en un 1.300 %. Sin embargo, no se tienen datos exactos de las exportaciones hacia el país asiático (ODEPA, 2007).

En Chile las principales zonas en las cuales el cultivo de la cala se encuentra presente son: Concepción, Temuco, Panguipulli, Valdivia, Osorno y Coyhaique. Sin embargo, en los últimos años se ha visto un gran aumento en la superficie cultivada en la zona de Valdivia, Región de Los Ríos, donde las condiciones de agua, luz y temperatura son las adecuadas para esta planta (KUNSTMANN, 2004; LAVAL y TAPIA, 2005).

El material biológico con el cual se trabaja en el país proviene principalmente desde Nueva Zelanda y Holanda. Las variedades comerciales son en su gran mayoría híbridas. La cala de color es mucho más pequeña y liviana que la cala corriente y cuenta con una gran variedad de colores. Los colores que mayormente se utilizan son los fuertes, tales como rojo, amarillo o naranja. 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. Las variedades que se comercializan cambian constantemente según las exigencias del mercado (KUNSTMANN, 2004; LAVAL y TAPIA, 2005).

La competencia en los mercados internacionales es muy intensa. Por ello, tal vez la única forma de en que Chile puede continuar avanzando con éxito en éste negocio es ofreciendo productos de alta calidad y con un mayor valor agregado, lo que difiere de la competencia y le permite acceder a nicho de mercado más exigente. 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. 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 (LAVAL y TAPIA, 2005).



FIGURA 1 Calas de colores (*Zantedeschia* spp.) De izquierda a derecha : Captain Amigo ®, Captain Medoc ®, Captain Volante, Treasure, Red Sox, Picasso, Mozart, Captain Miller ®, Schwarzwaldler ®, Pink Persuasion.

FUENTE: www.captaincalla.nl

El mercado interno de esta flor de corte está poco desarrollado, debido a que es un bien suntuario, cuyo consumo está relacionado con el nivel de ingresos, tendencias de la moda, hábitos, gustos y preferencias de las personas; haciendo que la demanda sea inestable y variable en el tiempo. Además, Chile es un país en vías de desarrollo, dónde las personas destinan sus recursos hacia bienes necesarios. Sin embargo, esto no ocurre en el caso de la producción, en donde países latinoamericanos, e incluso africanos, se han posicionado como importantes productores de flores de corte, llevando sus productos a segmentos significativos del comercio mundial (ODEPA, 2007).

El líder mundial en la producción de calas es Nueva Zelanda, país que en los años 1992/1993 exportó más de 3 millones de varas florales y más de 1,4 millones de túberos. Holanda es el segundo país exportador de calas, tanto para flor cortada como

túberos, y le sigue en tercer lugar Estados Unidos. Existen industrias emergentes de flores de corte en Italia, Sudáfrica, Kenia, México, Colombia y Costa Rica (SEEMANN y HOFFENS, 1999).

2.1.1 Clasificación botánica. Según lo señalado por Strasburger 1960, citado por HOFFENS (1999), la clasificación botánica de *Zantedeschia* spp. es la siguiente:

Clase	<i>Monocotiledónea</i>
Orden	<i>Spadiciflorae</i>
Familia	<i>Araceae</i>
Subfamilia	<i>Philodendrae</i>
Tribu	<i>Zantedeschieae</i>
Género	<i>Zantedeschia</i>

La familia *Araceae* se desarrolla preferentemente en los países tropicales. Son plantas herbáceas, con rizomas o tubérculos como órganos perdurantes. Poseen hojas generalmente anchas con nervadura reticulada, por lo cual discrepan notablemente del tipo monocotiledóneo. Las flores de un gran polimorfismo, se insertan sin bráctea madre sobre un eje simple, a menudo engrosado en un espádice carnoso, y la inflorescencia se encuentra rodeada por una llamativa espata (Strasburger, 1960, citado por HOFFENS, 1999).

Funnell 1993, citado por WRIGHT (1998) describe que el género se divide en dos grupos basados en la morfología y hábito de crecimiento. Al grupo 1 pertenece la comúnmente llamada cala blanca o *Z. aethiopica*, cuyo órgano reproductivo es un rizoma y su follaje no senesce en invierno. Las calas de colores (*Zantedeschia* spp.) pertenecen al grupo 2, las cuales florecen en verano y que posteriormente mueren en invierno. Su órgano reproductivo es llamado túbero, el cual luego de la senescencia debe ser cosechado y almacenado hasta la próxima temporada de crecimiento.

Este género ha recibido a lo largo del tiempo otros nombres científicos como Arodes, Aroidea, Calla y Richardia, adoptando finalmente el nombre de su descubridor Erico Zantedeschi. Este género fue citado la primera vez por Sprengel el año 1826 y fue revisado posteriormente por diversos especialistas como Engler (1915), Traub (1948), Letty (1973) y últimamente por Perry (1984) (GONZALEZ *et al.*, 1997).

2.1.2 Origen y distribución geográfica. Mientras que otros miembros de las Aráceas son endémicos de Sudamérica, Asia y África, el género *Zantedeschia* está limitado al continente africano. Su presencia es mayoritaria en el entorno de Sudáfrica, como en la provincia de El Cabo, Estados Libres De Orange, Natal, Lesotho, etc., aunque también se encuentra según Letty (1973), en Zimbabwe, Malawi, Zambia, Angola, Nigeria, etc. (Esher, 1983, citado por HOFFENS, 1999).

Las especies de *Zantedeschia* cultivadas actualmente han sido en gran parte seleccionadas en Nueva Zelanda, produciendo flores de una amplia gama de colores, que son solicitadas en ultramar como flores de corte, plantas en maceta u ornamentales de invernadero (SALINGER, 1987).

2.1.3 Morfología de la planta. La cala posee un sistema radicular fuerte con crecimiento diferente según el desarrollo de ésta. Las raíces blancas y carnosas

cuando son adultas, pueden alcanzar en algunas especies más de 50 cm de longitud con espesores de 3 a 5 mm (GONZALEZ *et al.*, 1997). Según lo señalado por ARMITAGE (1993), posee raíces contráctiles y poco ramificadas.

A continuación de las raíces se encuentra un tallo modificado, que puede ser un rizoma en *Z. aethiopica* (comúnmente llamada cala blanca) o un túbero en las demás especies de *Zantedeschia* (GONZALEZ *et al.*, 1997).

Cuando se trata de un túbero, SEEMANN y HOFFENS (1999) señalan que éste es de forma globosa y redondeado, en general achatado, con diámetros que pueden llegar por individuo a los 8 o 9 cm y a una altura aproximada de 5 cm o más. Su textura recuerda a la de una papa, con una epidermis que se desprende del órgano recuperado y que deja al exterior una formación de apariencia lisa y coloración blancuzca.

De los tallos subterráneos articulados se desarrollan los brotes vegetativos que se caracterizan porque todas sus hojas parten de la base. En general, el género *Zantedeschia* posee hojas reticuladas, discrepando notablemente del tipo foliar de las monocotiledóneas, que en su mayoría presentan nervadura paralela. Además, señalan que la inflorescencia de este género se llama espádice y está compuesta por un eje simple, a menudo engrosado, en el cual se encuentran insertas sin una bráctea madre las flores verdaderas. La inflorescencia entera se haya rodeada por una llamativa hoja modificada llamada espata, cuya función es proteger al espádice, el cual generalmente no sobresale de la espata. (SEEMANN y HOFFENS, 1999).

2.2 Principales enfermedades que afectan al cultivo

En general no son muchas las que afectan al género *Zantedeschia* (SEEMANN y HOFFENS, 1999).

El cultivo de cala está siendo severamente afectado de manera habitual por la enfermedad conocida comúnmente como “pudrición húmeda” o “pudrición blanda” causada por *Erwinia carotovora*. A nivel mundial causa serias pérdidas sobre numerosas especies de plantas en crecimiento, productos cosechados en tránsito o almacenamiento, provocando deterioros totales superiores a cualquier otra enfermedad bacteriana (AGRIOS, 1996). Según PIZANO (1999), la pudrición blanda de los rizomas y túberos, es la amenaza más grave para la producción comercial de calas. Provoca pérdidas de consideración al afectar zonas de producción y dispersarse rápidamente a otras áreas. La bacteria tiene distribución mundial y un amplio rango de hospederos que incluye principalmente hortalizas y plantas ornamentales con órganos carnosos y suculentos.

2.3 El género *Erwinia*

Según AGRIOS (1996), el género *Erwinia* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, presentando forma de bacilos rectos con flagelos peritricos. Estos microorganismos se caracterizan por carecer de endosporas y por ser anaerobios facultativos. Son Gram negativos y su tamaño varía entre 0,5 µm x 1,0-1,3 µm, sus colonias presentan una coloración blanca a amarilla. La taxonomía del género *Erwinia* es compleja y está constituida por varios grupos. El más relevante es el grupo *carotovora* que se

caracteriza por incluir la especie *E. chrysanthemi* (Ech) y las subespecies *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) y *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca).

2.3.1 Subespecies de *Erwinia carotovora* como responsables de inducir pudrición húmeda en calas. Según el estudio realizado por KUNSTMANN (2004), la mayoría de los aislamientos realizados en laboratorio, corresponden a las subespecies de Ecc y Eca, lo que confirma que estas bacterias son las responsables del desarrollo de pudrición blanda en plantas de cala.

Es patógeno de un amplio rango de hospederos tales como frutos carnosos, hortalizas y plantas ornamentales. En términos generales, este patógeno no puede sobrevivir por sí mismo en el suelo. Puede invernar en restos de cosechas o en rebrotes y en la rizósfera de malezas, probablemente como parte de la flora natural de ésta, no obstante no es considerada como bacteria del suelo, ya que depende del hospedero. *E. carotovora* se dispersa por insectos, por el agua de riego, por la maquinaria de cultivo, por el agua de lluvia al ser llevada por el viento y por la utilización de material orgánico de propagación contaminado con el patógeno. (PÉROMBELON, 2002).

2.4 Sintomatología de la pudrición blanda en el cultivo de cala

Los síntomas causados por los representantes de *E. carotovora* son la pudrición húmeda o blanda en túberos y en la base del tallo, 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).

Según lo señalado por CIAMPI (2002) y WRIGHT *et al.* (2002), *E. carotovora* no puede penetrar directamente los tejidos, por ende, utiliza aberturas naturales (por ejemplo lenticelas) o heridas para la penetración. El daño a los tallos y hojas constituyen un medio fundamental para el ingreso del patógeno y el posterior inicio de la enfermedad. Eca y Ecc al multiplicarse, inician la maceración de los tejidos, degradando la lámina media de las células de su hospedero (CIAMPI, 2002).

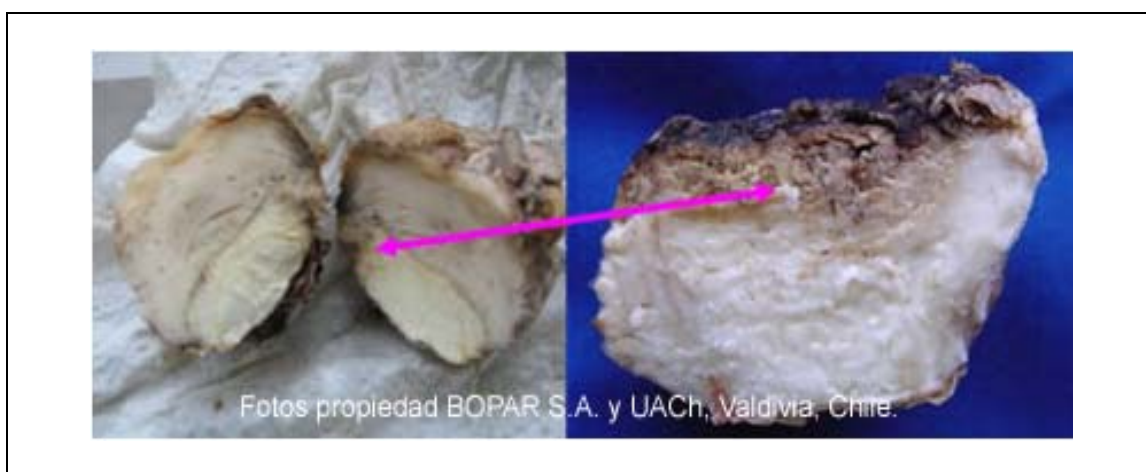


FIGURA 2 Síntomas de pudrición blanda causados por *Erwinia carotovora* en túberos de cala.

FUENTE: www.bioinsumos.cl

Según lo señalado por FUNNELL (1993) un olor característico acompaña a la descomposición de los tejidos. La principal fuente de inóculo es la infección latente de los túberos, los cuales por lo general se ven firmes y saludables externamente pero, una vez plantados, manifiestan la enfermedad. Aún no se ha encontrado un tratamiento químico que pueda controlar a esta bacteria.

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 túbero o al tallo por completo. Al estar infectado el túbero, las plantas presentan hojas amarillentas y decaimiento en general. Según sea la severidad del ataque puede incluso producirse la muerte de la planta (WRIGHT, 1994). En los túberos de cala, 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 lámela media de las células afectadas, provocando la maceración de los tejidos (AGRIOS, 1996).

La pudrición es más frecuente en suelos mal drenados, que además predisponen a las plantas a la infección por hongos del suelo como *Pythium* o *Rhizoctonia*, cuyo ataque también predispone a la infección bacteriana (PIZANO, 1999).

2.5 Medidas de control

Elphinstone, 1988, citado por KUNSTMANN (2004), señala que no hay productos eficaces para el control de la enfermedad denominada “pudrición blanda”.

Lo más recomendable es llevar a cabo un plan de manejo basado en el control preventivo de la patología y la utilización de variedades resistentes o menos susceptibles (WRIGHT, 1994). Para prevenir el ataque de organismos causantes de pudrición en túberos en terreno, se deben considerar los siguientes factores: realizar rotación de cultivos, el suelo debe tener una 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 túberos en su manipulación, realizar el curado y almacenamiento de rizomas bajo condiciones adecuadas, desechar túberos enfermos, y en el caso de túberos que provengan de partidas de propágulos en los que se encuentran algunos de éstos infectados con *Erwinia*, se deben desinfectar aquellos que aparentemente no están enfermos (CHAHIN, 2001).

GRACIA-GARZA *et al.* (2005) y Beckman y Lukens, (1997), citados por WRIGHT *et al.* (2005), señalan que el control químico no es eficaz contra *Ecc* una vez que se haya producido la infección en la planta o el túbero, ya que son incapaces de penetrar en la capa exterior del túbero cuando se trata de productos aplicados en forma de vaporizador.

Hoy en día, las investigaciones se han motivado fuertemente hacia el desarrollo de métodos biotecnológicos para el control de microorganismos. Esto es debido a la poca efectividad de las medidas tradicionales de control-exclusión, erradicación, protección, y reducción del impacto de la enfermedad mediante prácticas agronómicas (Elphinstone, 1988, citado por KUNSTMANN, 2004). El uso de controles biológicos,

entendiéndose como tal a cualquier condición o práctica por medio de la cual la sobrevivencia o actividad de un patógeno es reducida a través de la acción de otro organismo vivo (excepto el hombre mismo), se presenta como una posibilidad cada día más estudiada y probada (BAKER y SYNDER, 1970).

2.5.1 Bacterias biocontroladoras. 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 bacterias que tienen potencial para biocontrol se encuentran en muchos géneros, incluyendo *Actinoplanes*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Amorphosporangium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Hafnia*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Pasteuria*, *Rhizobium* y *Bradirhizobium*, *Serratia*, *Streptomyces* y *Xanthomonas*, según lo señalado por WELLER (1988).

2.5.2 Género *Bacillus*. La taxonomía de este género es la siguiente (MADIGAN y MARTINKO, 2005):

Reino	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Firmilicutes</i>
Clase	<i>Bacilli</i>
Orden	<i>Bacillales</i>
Familia	<i>Bacillaceae</i>
Género	<i>Bacillus</i>

Bacillus es un género de bacterias en forma de bastón y Gram positivas, aunque pueden perder la Gram positividad en cultivos. Son aerobios estrictos o anaerobios facultativos. En condiciones estresantes forman una endospora de situación central, que deforma la estructura de la célula. Dicha forma esporulada es resistente a las altas temperaturas y a los desinfectantes químicos corrientes (MADIGAN y MARTINKO, 2005).

La mayoría de especies dan positivo a la prueba de la catalasa y son saprófitas. Viven en el suelo, agua del mar y ríos, aparte de alimentos que contaminan con su presencia. Aunque generalmente son móviles, con flagelos peritricos, algunas especies de interés sanitario (*B. anthracis*, causante del carbunco) son inmóviles. Hay especies productoras de antibióticos (MADIGAN y MARTINKO, 2005).

Bacillus es una de las pocas bacterias capaces de controlar patógenos a nivel radicular junto a *Arthrobacter* y *Pseudomonas*. Estas bacterias fueron seleccionadas y reintroducidas al suelo para controlar patógenos, aún cuando son habitantes naturales de la rizósfera en plantas. Esto puede ser explicado por el mecanismo que usan estos microorganismos para control biológico, dónde fueron seleccionados por la capacidad

de producir antibióticos. Esta propiedad ocurre con mayor frecuencia en las especies de *Bacillus* (RODRIGUEZ y JULIA, 2006).

Según MADIGAN y MARTINKO (2005), algunas especies de *Bacillus* que son capaces de producir antibióticos son: *B. brevis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. subtilis*.

2.5.2.1 *Bacillus subtilis* como bioantagonista. Es una bacteria Gram positiva de forma bacilar, cuyo hábitat natural es el suelo (GONZALEZ y FRAGOSO, 2002). *B. subtilis* se desarrolla en el rango de temperaturas mesófilas, siendo la temperatura óptima de desarrollo de 25-35 °C (BANDOW *et al.*, 2002).

El estrés y las condiciones desfavorables son comunes en el entorno, por lo tanto, *B. subtilis* ha desarrollado un conjunto de estrategias que permiten la supervivencia en estas duras condiciones. Una estrategia, por ejemplo, es la formación de endosporas resistentes (BANDOW *et al.*, 2002; GONZALEZ y FRAGOSO, 2002).

La producción de endosporas por *B. subtilis* ocurre al finalizar la fase exponencial de crecimiento, destruyendo posibles agentes que interfieren en el normal desarrollo de éstos microorganismos. Asociado a la esporulación, la producción de un gran número de metabolitos secundarios o antibióticos son producidos por la bacteria perturbando el metabolismo de especies enemigas, al punto que mueran o sean incapaces de reproducirse (CARRILLO, 2003).

Según CARRILLO (2003), la producción de metabolitos de esta bacteria presenta propiedades antibacterianas y antifúngicas. En el caso de la actividad antibacteriana no existe mucha información, solo existen informes de control frente a *Xanthomonas campestris* y *E. carotovora*, donde el principal antibiótico producido es la surfactina, que posee un poder bactericida, modificando la superficie hidrófoba bacteriana.

Normalmente, este antibiótico es producido *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, en la cual las bacterias no pueden desarrollarse normalmente (CARRILLO, 2003).

Según lo señalado por BUTT *et al.* (1999) 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 exista 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 por las semillas, siendo la calidad de este sustrato alimenticio un factor determinante en la calidad y la cantidad del antibiótico producido.
- Además, esta bacteria ha demostrado inducir la resistencia sistemática natural de la planta contra patógenos bacterianos y fungos.

3 MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Antecedentes generales

A continuación se entregan los antecedentes generales de la investigación realizada.

3.1.1 Ubicación y duración de los ensayos. El ensayo se realizó en dos etapas. La primera, duró todo un periodo de producción, es decir, desde la plantación (Septiembre-Octubre del 2006) hasta la cosecha de los túberos finalizado el proceso de cosecha de flores (Marzo-Abril 2007). Esta etapa se realizó en el vivero BOPAR S.A. ubicado a 22 km hacia el norte de la ciudad de Valdivia.

La segunda parte del ensayo tuvo lugar en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Universidad Austral de Chile (Junio-Julio del 2007).

La parte experimental tuvo una duración de 6 meses en la primera etapa y de un mes en la segunda.

3.1.2 Características del suelo. Tanto en invernadero como en campo (primera etapa de los ensayos) se trabajó en suelo Serie Valdivia, textura franco limosa (CIREN, 2003). Éste no fue esterilizado.

3.1.3 Manejo general del cultivo. El manejo del cultivo se llevó a cabo normalmente, es decir, se realizaron las prácticas habituales de manejo del suelo, fertilización y riego.

Al finalizar con el periodo de cosecha de flores, se procedió a la engorda de los túberos. Luego se recolectaron y se secaron a temperatura ambiente por unos días. Posteriormente fueron trasladados a cámaras de frío con circulación de aire y control de temperatura y humedad por aproximadamente tres semanas para el adecuado curado de su piel. La cosecha de flores y el posterior curado de los túberos fueron realizados por la empresa sin afectar el normal desarrollo del estudio.

3.2 Material

En esta sección se describirán los materiales empleados en los ensayos.

3.2.1 Material vegetal. El tipo de cala utilizado fue aportado por la empresa BOPAR S.A. La variedad de cala de color que se utilizó es el cv. *Treasure* y es sensible a *E. carotovora* (ver Figura 3).

3.2.2 Cepa antagonista. El enemigo natural que se empleó en diferentes dosis y formulaciones en seis tratamientos corresponde a la cepa BC10, perteneciente al género *Bacillus* y relacionada taxonómicamente al grupo *subtilis*. Esta cepa de *B. subtilis* presenta antagonismo comprobado *in vitro* frente a *E. carotovora*, según estudios realizados en laboratorio (MENDEZ, 2005, GARAY, 2006 y GIACAMAN, 2006).

3.2.3 Materiales de laboratorio. Los materiales utilizados en laboratorio fueron los siguientes: bolsas de papel, hipoclorito de sodio al 2.5%, agua destilada, balanza, agujas, mechero Bunzen, talla absorbente estéril, agua estéril, matraces, *alusa plast* o film plástico, horno, guantes de látex y mascarilla.



FIGURA 3 Cala de color (*Zantedeschia* spp.), cv. *Treasure*.

FUENTE: www.captaincalla.nl

3.3 Métodos

A continuación se explicará la forma en que se montaron los ensayos tanto en terreno como en laboratorio.

3.3.1 Método de la primera etapa (terreno). En esta sección se describirán los pasos realizados en terreno, es decir, en la empresa BOPAR S.A..

3.3.1.1 Diseño experimental. A continuación, se puede observar en la figura anterior la forma en que se montaron los ensayos.

El ensayo se realizó en condiciones de invernadero y de campo. En ambos casos se procedió a utilizar el mismo diseño experimental, el cual constó de cuatro bloques o platabandas en siete tratamientos que se describen en el Cuadro 1 (ver Figura 4). En cada bloque había una repetición de cada tratamiento y el testigo. Una unidad experimental (parcela) tenía una superficie de 3 m².

En la Figura 4, los números corresponden a las 28 parcelas, cada una de una superficie de 3 m de longitud por 1 m de ancho.

3.3.1.2 Plantación. El ensayo se llevó a cabo primero en invernadero. Estos túberos fueron plantados en Septiembre del 2006 y la plantación en campo se realizó en Noviembre del mismo año, usando el mismo diseño experimental y plan de manejo que en invernadero.

La plantación se hizo manualmente y se utilizaron túberos sin pudrición blanda visible. La distancia de plantación sobrehilera y entrehilera fue de 18 cm.

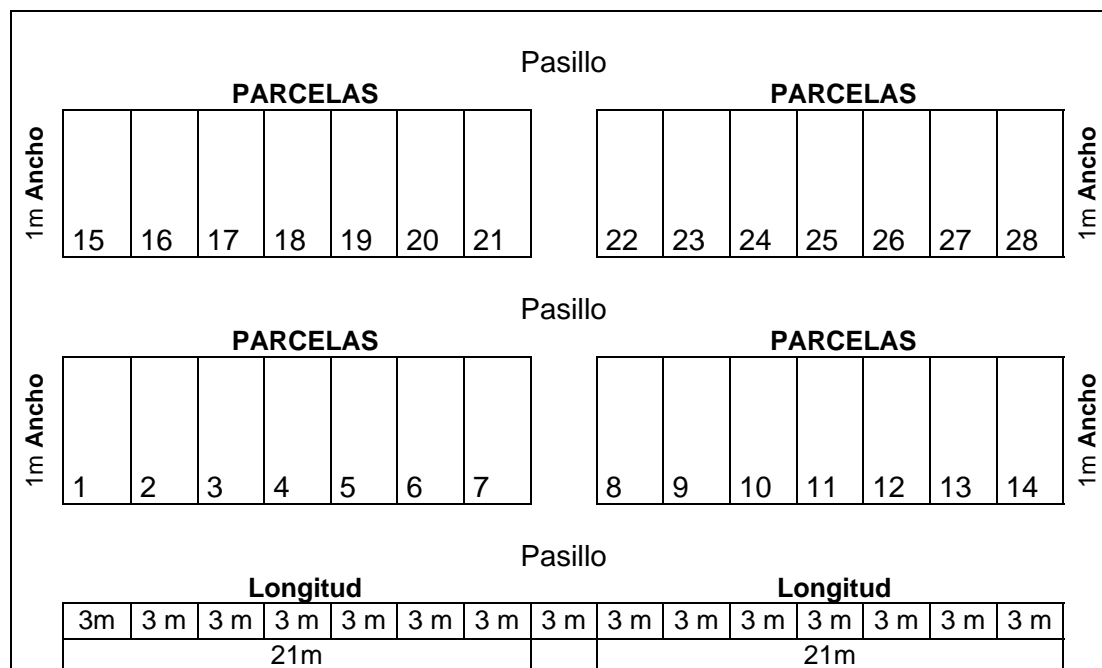


FIGURA 4 Diseño experimental de los ensayos. Disposición y superficie de las parcelas.

CUADRO 1 Número de túberos de cala plantados por tratamiento bajo condiciones de invernadero y campo.

Tratamientos		Nº de túberos plantados en invernadero	Nº de túberos plantados en campo
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)		
Polvo	10 ⁴	330	340
Polvo	10 ⁵	325	340
Polvo	10 ⁶	330	340
Líquido	10 ⁴	330	340
Líquido	10 ⁵	325	340
Líquido	10 ⁶	295	340
Testigo (sin antagonista)		300	340

Se puede apreciar en el cuadro anterior una diferencia entre los túberos plantados en invernadero y en campo. Esto se debe principalmente a problemas de espacio dentro del invernadero, en dónde las platabandas se construyeron un poco más cortas de lo diseñado anteriormente (para detalles ver Anexo 1). En cambio en campo, se plantaron 85 túberos por parcela.

3.3.1.3 Dosis y método de aplicación de las formulaciones. Tres tratamientos fueron en base sólida (polvo), con tres diferentes dosis de cepa antagonista (10⁴, 10⁵ y

10^6 ufc mL⁻¹). Otros tres tratamientos fueron en base líquida con las mismas dosis antes mencionadas. El último fue el testigo, el cual no recibió aplicación de la cepa antagonista.

La aplicación de las dosis correspondientes a cada parcela se realizó inmediatamente después de la plantación de los túberos. Las diluciones en agua de ambas formulaciones para llegar a las concentraciones deseadas de *B. subtilis* requeridas por el ensayo, se realizaron en bidones con agua de pozo en la empresa. La aplicación del bioantagonista se hizo mediante la ayuda de una regadera de acuerdo a las dosis correspondientes a cada parcela.

La formulación en polvo se obtuvo en una investigación anterior, mediante un proceso de secado *spray*, el cual se encontraba a una concentración de 10^8 ufc g⁻¹. Para llegar a las dosis necesarias para realizar el experimento, se debió mezclar 400, 40 y 4 g de polvo en 40 L cada una de agua para obtener las concentraciones de 10^6 , 10^5 y 10^4 respectivamente (ver Anexo 2). Esto se realizó en un bidón de 40L con agua de pozo. Posteriormente, con ayuda de una regadera de 5 L de capacidad se aplicaron 10 L de la dilución respectiva a cada una de las cuatro repeticiones de cada tratamiento (ver Cuadro 2).

La formulación líquida con la cepa antagonista estaba diluida en un medio a base de melaza y concentración de 10^8 ufc mL⁻¹. Se realizó el mismo proceso para calcular las concentraciones y llegar a las dosis necesarias para el ensayo (ver Anexo 2). Estas correspondieron a 400, 40 y 4 mL de *B. subtilis* (ver Anexo 3) diluidas en 40 L de agua cada una para obtener las dosis de 10^6 , 10^5 y 10^4 ufc mL⁻¹ respectivamente (ver Anexo 2). Luego se procedió a realizar la misma metodología de aplicación antes mencionada.

CUADRO 2 Formulación y dosis de *Bacillus subtilis* aplicado a las parcelas con cuatro repeticiones cada una en seis tratamientos y un testigo.

Tratamientos		Repeticiones			
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV
Polvo	10^4	1	12	17	22
Polvo	10^5	2	10	20	26
Polvo	10^6	3	9	18	27
Líquido	10^4	4	11	21	24
Líquido	10^5	5	8	19	25
Líquido	10^6	6	14	15	23
Testigo (sin antagonista)		7	13	16	28

Se puede observar en el Cuadro 2 que los tratamientos se dividieron en dos formulaciones (polvo y líquido) y un testigo sin antagonista. También se presentan las

repeticiones establecidas en el Cuadro 1, combinadas al azar para cada tratamiento y el control.

Por último, el testigo no recibió la aplicación del bioantagonista en las cuatro repeticiones.

3.3.1.4 Método de evaluación. La evaluación posterior a la aplicación de la cepa antagonista, tanto bajo condiciones de invernadero como campo, se realizó mediante la identificación de plantas libres de pudrición blanda una vez emergidas, contando todos los brotes de un túbero como un individuo. La evaluación final promedio de las cuatro repeticiones es para cada tratamiento por separado.

Las mediciones se realizaron aproximadamente cada 15 días bajo condiciones de invernadero: 13 de octubre del 2007, 30 de octubre del 2007, 15 de noviembre del 2007, 28 de noviembre del 2007, 12 de diciembre del 2007 y 27 de diciembre del 2007.

En el ensayo de campo, se hicieron cuatro mediciones, las cuales fueron: Medición 1: 13 de enero del 2007; Medición 2: 27 de enero del 2007; Medición 3: 24 de febrero del 2007; Medición 4: 19 de marzo del 2007.

3.3.1.5 Cosecha y curado de los túberos. Una vez finalizado el periodo de producción de flores se inició la senescencia del follaje y posteriormente, la engorda de los túberos por aproximadamente dos semanas. Luego se procedió a la recolección de éstos. Bajo condiciones de invernadero se realizó el 24 de marzo del 2007 y en campo el 26 de abril del 2007.

En condiciones de invernadero, se recolectaron todos los túberos sanos, sin síntomas de pudrición húmeda. La cosecha de éstos fue muy heterogénea, tanto en cantidad como en calibre. Esto se debió principalmente al desprendimiento de túberos hijos (sin calibre productivo) de los órganos madre.

En cambio en el ensayo de campo, dado al alto porcentaje de túberos sanos al final del ensayo, se procedió a cosechar al azar 20 túberos similares por parcela.

Finalmente en la empresa, se llevó a cabo el proceso de curado de los túberos por alrededor de tres semanas hasta el momento en que la piel de éstos se haya suberificado o endurecido.

3.3.2 Método de la segunda etapa (laboratorio). Una vez finalizado el proceso de curado de los túberos, estos fueron trasladados en Mayo del 2007 en bolsas de papel al laboratorio de Fitopatología del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal.

Inicialmente, se removieron los restos vegetales (tallos y raíces) de los túberos de los ensayos de campo e invernadero, para luego lavarlos con agua y quitarles la tierra. De esta manera, fue más fácil realizar el proceso de desinfección, el cual consistió en sumergirlos en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% por 5 minutos y dejarlos secar a temperatura ambiente por dos días. Esta labor se realizó para preferentemente eliminar hongos que pudieran interferir en los ensayos venideros.

Debido a las grandes diferencias en cuanto a número y tamaño de túberos cosechados entre las repeticiones del ensayo de invernadero se decidió seleccionar por repetición cuatro túberos (eventualmente de tamaño productivo) de mayor peso. De este modo se homogenizó el número de individuos para facilitar los análisis.

Por esta razón, el siguiente experimento fue realizado con túberos cosechados en campo (por su homogeneidad) y consistió en pinchar alrededor de 10 veces a cada túbero en las lenticelas, para después envolverlos primero con toalla absorbente (estéril) mojada en agua (estéril) y luego con *alusa plast* o film plástico. Finalmente se procedió a introducirlos por 7 días en un horno a 25-27 °C. Por lo tanto, este ensayo de laboratorio consistió en entregar las condiciones óptimas para el desarrollo de *E. carotovora* latente en túberos, provocando heridas y proporcionando humedad y temperatura.

3.3.2.1 Evaluación de la segunda etapa. Luego de retirar los túberos del horno, se revisaron individualmente y se contaron por repetición los órganos podridos y los sanos.

Adicionalmente, se contabilizaron los túberos que presentaron brotación.

3.4 Análisis estadístico

El modelo que se utilizó para realizar el análisis estadístico, correspondió al diseño de bloques completos al azar con siete tratamientos y cuatro repeticiones.

Además, las variables fueron sometidas a un Test de Levene, para determinar la homogeneidad de las varianzas. Finalmente, se realizó un ANDEVA (análisis de varianza) para establecer las diferencias existentes entre los tratamientos. Previo a realizar el ANDEVA, se procedió a transformar en $\arcsen\sqrt{\%}$ los valores expresados en porcentaje.

Se utilizó el programa computacional SPSS para la evaluación de los datos.

4 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En esta sección se describen y discuten los resultados obtenidos en las evaluaciones realizadas tanto bajo condiciones de invernadero como de campo, para establecer a través de diferentes dosis y formulaciones, la efectividad de *B. subtilis* (cepa BC10) para controlar *E. carotovora*.

4.1 Evaluación de formulados para el control de *E. carotovora* bajo condiciones de invernadero

Es posible apreciar en el Cuadro 3 los resultados obtenidos, los cuales se han tabulado al momento de emerger las plantas de cala. Las cepas aplicadas en forma líquida (diluidas en agua con su respectiva concentración del controlador biológico) fueron en base a formulados en polvo y líquido cuyas dosis correspondieron a 10^4 , 10^5 y 10^6 ufc mL^{-1} para cada uno. El testigo no recibió aplicación alguna del biocontrolador.

Según estudios realizados por OJEDA (2007), es factible aplicar un proceso de deshidratación mediante secado *Spray*, a un concentrado celular de *B. subtilis* manteniendo su viabilidad y capacidad antagonista frente a *E. carotovora*, obteniéndose de esta forma un biopesticida efectivo, de fácil transporte y aplicación.

4.1.1 Emergencia de las plantas de cala. Los valores de emergencia registrados se tabularon a partir de la tercera semana de plantación.

Se puede apreciar en el Cuadro 3 el promedio del número de plantas de cala emergidas bajo condiciones de invernadero y los respectivos porcentajes en seis tratamientos con control biológico y un testigo (ver Anexo 3). Cabe mencionar que estos valores fueron calculados en base a los túberos plantados, los cuales no fueron la misma cantidad por repetición (ver Anexo 1). Además, en cuanto al porcentaje emergido de plantas, este es mayor para el tratamiento de formulación líquida y dosis 10^4 ufc mL^{-1} con más de un 96%. El menor valor lo obtuvo el tratamiento de formulación en polvo de dosis 10^4 ufc mL^{-1} con un 88.18%. El testigo tan solo logró un 93.66% de emergencia.

No se realizó un análisis estadístico a la variable “promedio de número de plantas emergidas” ya que el número de túberos plantados no fue el mismo en todas las repeticiones. Aún así, no fue posible detectar diferencias estadísticamente significativas en cuanto al porcentaje de plantas de cala emergidas en invernadero (ver Anexo 8).

Estos resultados indican que la cepa biocontroladora parece no tener un efecto inhibitorio significativo bajo las condiciones reinantes en el desarrollo de *E. carotovora* al momento de la emergencia de plantas de cala en comparación con el testigo sin antagonista.

Existen muchas causas del por qué pueden existir dificultades en el momento de la emergencia de plantas de cala. Una de ellas, se debe a la presencia de *E. carotovora*

en forma latente en las lenticelas de los túberos. Esta bacteria es capaz de pasar de su estado de letargo y desarrollarse en el momento en que se den las condiciones favorables de humedad y temperatura para su crecimiento. Otra razón válida de la no emergencia de las plantas, sería el desarrollo de pudriciones húmedas que se desencadenan al momento en que los túberos inician su brotación. Esto, está relacionado con la presencia de *E. carotovora* en el suelo y la aplicación en exceso de agua de riego, lo que produce una baja concentración de oxígeno, que finalmente favorece el desarrollo de la patología.¹

CUADRO 3 Emergencia de plantas de cala en invernadero en seis tratamientos y un testigo para la evaluación de *Bacillus subtilis* como controlador biológico de *Erwinia carotovora*.

Tratamientos		Promedio de nº de plantas emergidas ¹	Porcentaje (%) de plantas emergidas ²	
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)			
Polvo	10 ⁴	72.75	88.18	a
Polvo	10 ⁵	76.25	93.84	a
Polvo	10 ⁶	77.75	94.24	a
Líquido	10 ⁴	79.25	96.06	a
Líquido	10 ⁵	77.75	95.69	a
Líquido	10 ⁶	69.75	94.57	a
Testigo (sin antagonista)		70.25	93.66	a

¹ Promedio de las cuatro repeticiones de cada tratamiento.

² Porcentaje en base a los túberos plantados en cada repetición.

a La misma letra entre los tratamientos indica que no hay diferencias estadísticamente significativas al 5%.

4.1.2 Incidencia de pudriciones húmedas en invernadero. Se efectuaron seis mediciones de número de plantas sanas, sin pudrición blanda visible.

Las mediciones se realizaron a partir de la emergencia de las plantas de cala. Para cada una se promediaron las plantas sanas de las cuatro repeticiones de cada tratamiento y luego se calculó el porcentaje en base a las plantas emergidas (ver Anexos 3 y 5).

Se puede observar en el Cuadro 4 la evolución de las mediciones, lo cual indica que se provocó una notable disminución de plantas sanas, producto del exceso de agua de riego y las altas temperaturas dentro del invernadero que desencadenarían el desarrollo de las pudriciones. Es posible ver en la última medición, un promedio de alrededor de 30% de plantas libres de *E. carotovora* en todos los tratamientos y el testigo.

¹ CIAMPI, L. (2009). Ing. Agr., Ph.D. Prof. Titular Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Comunicación Personal.

En la sexta recolección de datos en invernadero, como se puede apreciar, se obtuvo pérdidas de alrededor de un 70% del cultivo, lo que se ratifica con lo citado por ETCHEVERRÍA (2002), quien señala que en Chile la pudrición húmeda causada por *E. carotovora* en el cultivo de cala puede causar pérdidas de hasta un 100% de la plantación.

Es posible visualizar que el testigo presentó el mejor porcentaje de plantas sanas en la última evaluación realizada. Adicionalmente, se puede observar que a simple vista, los tratamientos de formulación en polvo, obtuvieron en promedio valores más altos que los tratamientos de formulación líquida.

CUADRO 4 Porcentaje (%) de plantas de cala sanas de seis mediciones realizadas en seis tratamientos y un testigo para la evaluación de *Bacillus subtilis* como controlador biológico de *Erwinia carotovora*.

Tratamientos		Fecha de las mediciones ¹					
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	13/10/06	30/10/06	15/11/06	28/11/06	12/12/06	27/12/06
Polvo	10 ⁴	92.44	89.69 a	75.60	44.67	37.11	32.30 a
Polvo	10 ⁵	91.80	90.49 a	77.70	46.56	34.10	27.54 a
Polvo	10 ⁶	93.89	86.50 a	76.53	43.73	37.62	30.55 a
Líquido	10 ⁴	89.59	88.33 a	67.51	52.05	40.06	26.18 a
Líquido	10 ⁵	93.89	85.85 a	71.70	48.23	41.16	24.44 a
Líquido	10 ⁶	96.42	88.17 a	69.53	47.31	36.20	21.15 a
Testigo (sin antagonista)		93.95	88.97 a	80.43	55.16	46.26	35.94 a

¹ Porcentajes en base a al promedio de plantas emergidas en cada repetición.

a La misma letra entre los tratamientos indica que no hay diferencias estadísticamente significativas al 5%.

Se optó por escoger dos mediciones que sean representativas (al principio y al final) para realizar un análisis estadístico, específicamente aquellos de la segunda y última medición realizada. Éstas determinaron que no fue posible encontrar diferencias estadísticamente significativas entre el testigo y los tratamientos con control biológico (ver Anexo 8).

Según los estudios realizados por CARRIÓN (2007), las concentraciones de *B. subtilis* del orden de 10⁴ ufc mL⁻¹, 10⁶ ufc mL⁻¹ y 10⁸ ufc mL⁻¹ reducen la incidencia de *E. carotovora* en comparación al control, en macetas de polietileno con plantas de cala, siempre y cuando la concentración del patógeno en el suelo sea de 10⁴ ufc mL⁻¹. Sin embargo, cuando los niveles de infestación con *E. carotovora* son más altos, como por ejemplo 10⁸ ufc mL⁻¹, solamente poblaciones del orden de 10⁴ ufc mL⁻¹ de la cepa antagonista podrían aminorar la severidad del ataque causado por *E. carotovora*.

En la Figura 5 es posible observar que en los seis tratamientos y el testigo, se obtuvo una evolución negativa de plantas sanas a través del tiempo, dado por el aumento de la enfermedad en el cultivo.

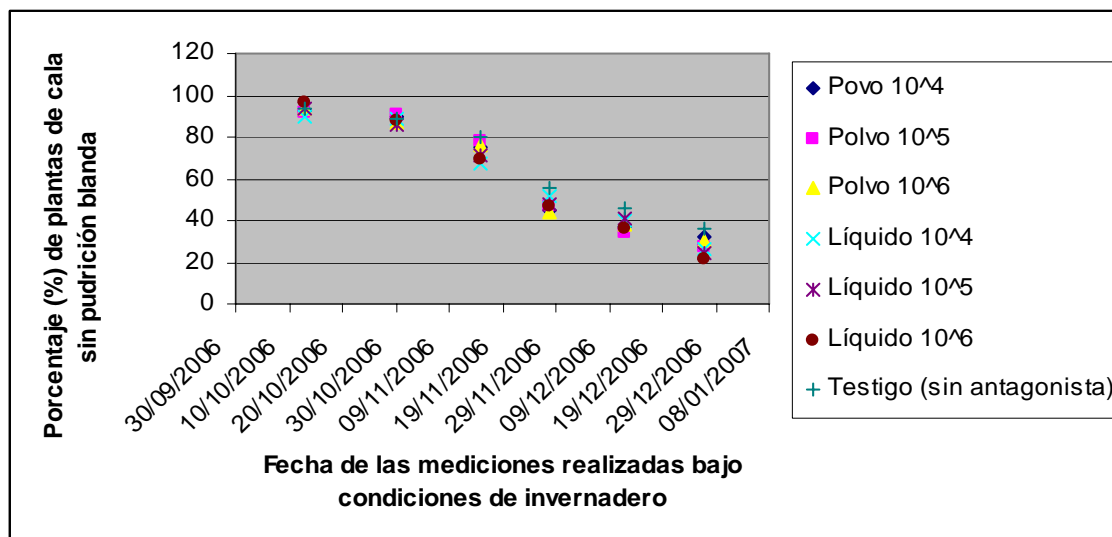


FIGURA 5 Evolución en seis tratamientos y un testigo de las seis mediciones realizadas en invernadero de plantas libres de *Erwinia carotovora*.

CARRIÓN (2007), indica también, que cuando se dan las condiciones óptimas para el desarrollo de la planta en cuanto a temperatura, luminosidad, humedad y también al usar 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 de *B. subtilis*.

Según Pérombelon, 1979, citado por MEJÍAS (1993) y KUNSTMANN (2004), el efecto del invernadero en que se desarrolló el ensayo, las condiciones de alta temperatura y humedad existentes, favorecen el desarrollo de *E. carotovora*, causante de pudrición húmeda en túberos de cala.

Asimismo, KUNSTMANN (2004) señala que se deben evitar las plantaciones tardías en invernadero, de manera de no entrar a las épocas primaverales con sustanciales incrementos de temperatura que estresan a las plantas y favorecen la expresión de *E. carotovora*.

HANDELSMAN y STABB (1996), señalan que el éxito del biocontrol de enfermedades de plantas requiere de una compleja serie de interacciones. Para un desarrollo racional se deben realizar estudios en análisis genéticos y ecológicos de los microorganismos implicados en el control biológico; se deben comprender y diseñar estrategias para minimizar resistencias de agentes patógenos hacia la acción antibiótica de los agentes antagonistas. También se deben realizar estudios de la diversidad genética tanto de los biocontroladores como de la planta huésped, de modo de explotar las variaciones genéticas que sean capaces de suprimir una enfermedad y proporcionar una solución sostenida en el tiempo. Otra interacción muy importante y la más compleja de

comprender, es la del bioantagonista con la ecología de la comunidad microbiana existente en la rizósfera, es decir, en la interacción suelo-raíz. Una mejor comprensión de esta interfase determinará el éxito a largo plazo del biocontrol.

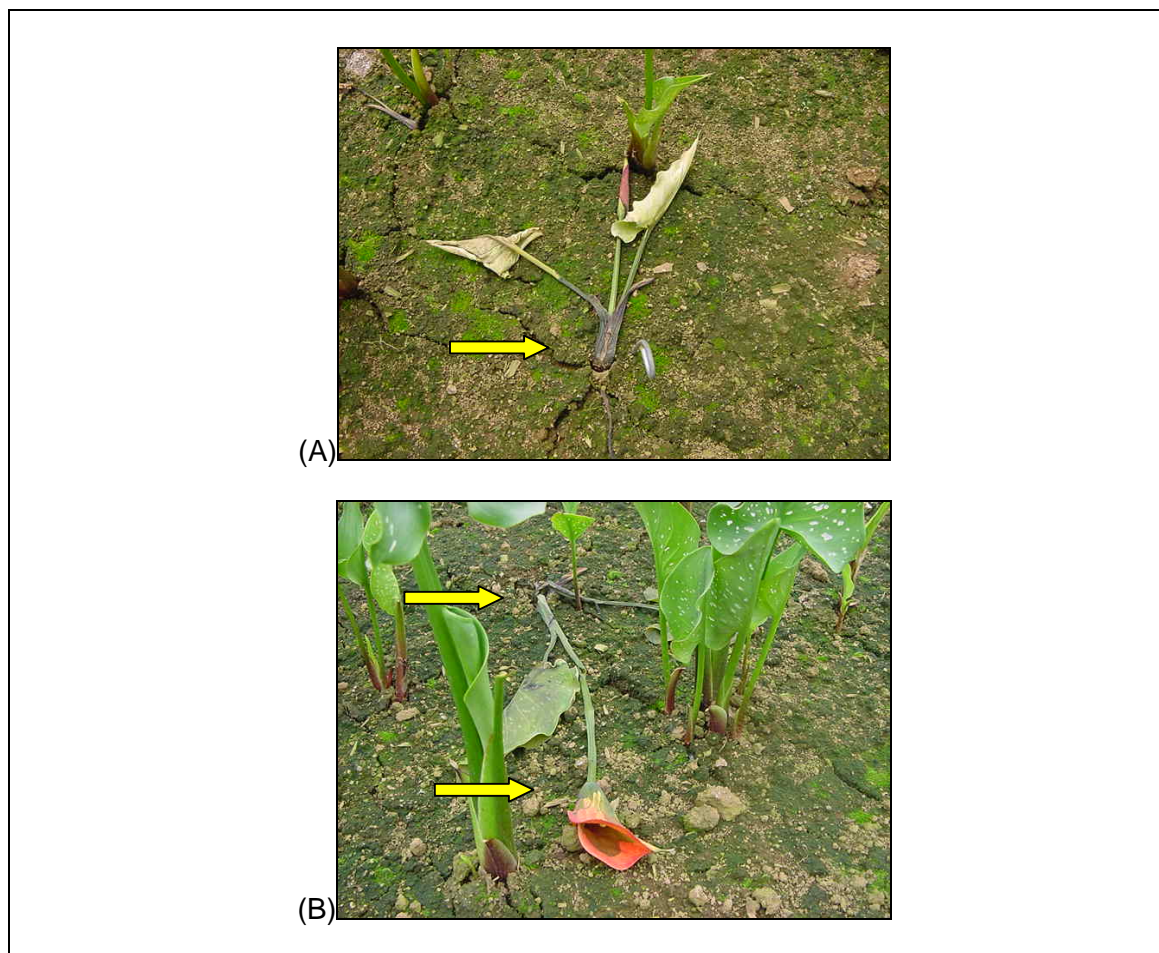


FIGURA 6 Pudrición y colapso de tallos (A), follaje y flores (B) de *Zantedeschia* spp. producto del ataque de *Erwinia carotovora* bajo condiciones de invernadero.

FUENTE: MÖLLER-HOLTKAMP (2007)

La interacción del agente biocontrolador con la comunidad microbiana de la rizósfera pueden dar pistas para explicar el por qué muchos organismos pueden reprimir eficazmente una enfermedad en el laboratorio, pero no lo hacen en terreno (HANDELSMAN y STABB, 1996).

Es muy difícil poder explicar los factores que jugaron en contra de la acción de *B. subtilis* en el estudio, es por eso que hay que seguir investigando en esta materia, sin embargo, la combinación de altas temperaturas y excesiva humedad dentro del invernadero serían la principal razón de la incidencia de pudriciones blandas, ya que son condiciones favorables para el estrés de las plantas de cala (ver Cuadro 6).

4.1.3 Cosecha y curado de los túberos de cala. Una vez que comenzó la senescencia del follaje, se suspendió el riego y se inició la engorda de los túberos durante 15 días.

Se debió tener especial cuidado de no dañar los órganos ya que éstos poseían un tejido muy sensible a heridas; el túbero se extrajo junto a gran parte del sistema radicular que aún estaba presente. Se recolectaron todos los túberos que no presentaron signos visibles de pudrición blanda. El Cuadro 5 indica el número de túberos de cala cosechados por tratamientos al final del ensayo. Se tomaron todos los túberos, independiente del calibre de éstos. Es posible apreciar, que nuevamente los formulados en polvo obtuvieron en promedio un mayor número de túberos cosechados que los formulados en líquido y el testigo.

Posteriormente, en esta especie floral es indispensable realizar un correcto curado y almacenaje de los túberos; sino se pueden dañar y perder todo el material reproductivo. Esta labor se complementa con lo señalado por WRIGHT *et al.*, (2005), quienes afirman que cuando las plantas hayan finalizado la etapa de senescencia, se deben recolectar los túberos del suelo y realizarles un adecuado curado. Luego deben ser almacenados.

Para comenzar, el curado debe ser rápido y a una temperatura de 20 a 25 °C durante 3 a 7 días, siempre con una buena ventilación y movimiento de aire, eliminando el exceso de humedad. Aquí comienza la suberización de los tejidos superficiales, lo cual lo protege de la deshidratación y entrada de agentes fitopatógenos. Luego se lleva a 12-15 °C durante 3 a 4 semanas; si se quiere prolongar el almacenaje se deben mantener entre 8 y 10 °C con un 70% de humedad relativa, manteniendo la temperatura uniforme y con buena circulación de aire (CHAHIN, 2001).

4.1.4 Evaluaciones realizadas en laboratorio. Una vez trasladados los túberos a la universidad, se procedió a quitarles los restos de raíces, lavarlos y desinfectarlos. Luego, los túberos cosechados de cada tratamiento y el testigo fueron contados y pesados.

En el Cuadro 5, es posible observar el número total de túberos cosechados y el peso total de cuatro túberos de cala seleccionados por tratamientos y testigo (ver Anexo 6). Estos parámetros no fueron considerados para una evaluación estadística, debido a que se cosecharon también túberos muy pequeños (hijuelos), los cuales no tenían ningún valor como órganos reproductivos para la siguiente temporada.

Posteriormente, se procedió a realizar un promedio de pesos de túberos individuales (ver Cuadro 5). Debido al número heterogéneo de túberos cosechados por repeticiones, se optó por promediar los cuatro pesos de mayor valor de cada una. De esta manera, los pesos de los hijuelos pudieron ser descartados.

En cuanto a los resultados obtenidos, los tratamientos con el mayor valor en cuanto a promedio del peso individual corresponden a: formulación en polvo con dosis 10^4 ufc mL⁻¹ y formulación líquida con dosis 10^4 ufc mL⁻¹, con más de 50 g por túbero.

CUADRO 5 Número total, peso total y promedio del peso individual de túberos de cala cosechados al final del ensayo en invernadero en seis tratamientos y un testigo para la evaluación de *Bacillus subtilis* como controlador biológico de *Erwinia carotovora*.

Tratamientos		Número	Peso (kg)	Promedio
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	total de túberos cosechados ¹	total de túberos seleccionados ¹	de peso (g) de túberos individuales ²
Polvo	10 ⁴	86	0.84	52.74 a
Polvo	10 ⁵	83	0.63	39.34 a
Polvo	10 ⁶	94	0.48	29.96 a
Líquido	10 ⁴	63	0.82	50.95 a
Líquido	10 ⁵	69	0.63	39.66 a
Líquido	10 ⁶	70	0.67	43.21 a
Testigo (sin antagonista)		70	0.59	38.52 a

¹ Suma de las cuatro repeticiones de cada tratamiento y un testigo (incluye túberos hijos).

² Suma de los cuatro pesos más altos seleccionados de cada repetición en seis tratamientos y un testigo.

a La misma letra entre los tratamientos indica que no hay diferencias estadísticamente significativas al 5%.

Túberos pequeños producen flores más pequeñas en tallos cortos. Al incrementar los túberos en tamaño, el ancho del tallo y el tamaño de la flor también incrementan. Sin embargo, túberos más grandes o más longevos presentan una mayor carga latente de *Erwinia* en sus lenticelas.¹

Se descartó realizar un estudio estadístico para la variable “peso de túberos seleccionados”, debido a las grandes diferencias de calibre entre los túberos cosechados. No obstante, no fue posible establecer diferencias significativas entre de los tratamientos y el control para la variable promedio de peso de túberos individuales (ver Anexo 8).

Túberos con tamaño de floración corresponden a aquellos con diámetro de 4-5 cm CHAHIN (2001).

El calibre de los túberos es importante para iniciar una actividad rentable en un cultivo de calas. Es por eso que antes del almacenaje se realiza una clasificación de éstos, de modo de seleccionar aquellos que cumplan con los estándares de tamaño y fitosanidad.²

¹ CIAMPI, L. (2009). Ing. Agr., Ph.D. Prof. Titular Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Comunicación Personal.

² CARRILLO, C. (2007) Ing. Agr., M. Sc. Empresa BOPAR S.A., Valdivia. Comunicación Personal.

Esto se ratifica con estudios realizados por Crino 1997, citado por CARRILLO (1999), quien indica que sí existe un efecto del peso inicial de los tuberos en relación al número final de hojas, y por ende en su productividad.

4.2 Evaluación de formulados bajo condiciones de campo

Se evaluaron al igual que en invernadero, seis tratamientos con control biológico y un testigo sin el antagonista con cuatro repeticiones. Se utilizó un formulado en polvo y otro líquido con tres diferentes dosis cada uno (10^4 , 10^5 , 10^6 ufc mL⁻¹). Luego, se realizó una serie de evaluaciones en laboratorio con el objetivo de verificar la eventual latencia de *E. carotovora* en tuberos de calas aparentemente sanos.

4.2.1 Emergencia de las plantas de cala. La emergencia en campo tardó aproximadamente entre dos y tres semanas, lo que concuerda con lo señalado por Funnel 1993, citado por CARRILLO (1999), quien indica que los tuberos almacenados a una temperatura constante de 25 °C tardaron 13 días en emerger, mientras que aquellos que permanecieron a 8 °C emergieron 27 días después de la plantación.

En el Cuadro 6, se visualiza el promedio de plantas emergidas y los porcentajes de emergencia de las plantas de cala para todos los tratamientos y el control (ver Anexo 3). Los porcentajes de emergencia sobrepasan el 98%, lo que indica, que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas para esa variable entre los tratamientos y el testigo (ver Anexo 8).

CUADRO 6 Promedio y porcentaje (%) de plantas de cala emergidas en campo en seis tratamientos y un testigo para la evaluación de *Bacillus subtilis* como controlador biológico de *Erwinia carotovora*.

Tratamientos		Promedio de	Porcentaje (%)
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	nº de plantas emergidas ¹	de plantas emergidas ²
Polvo	10 ⁴	85.00	100 a
Polvo	10 ⁵	84.50	99.41 a
Polvo	10 ⁶	84.50	99.41 a
Líquido	10 ⁴	83.75	98.53 a
Líquido	10 ⁵	84.25	99.12 a
Líquido	10 ⁶	84.25	99.12 a
Testigo (sin antagonista)		84.25	99.12 a

¹ Promedio de las cuatro repeticiones de cada tratamiento y un testigo.

² Porcentaje en base a los tuberos plantados en cada repetición.

a La misma letra entre los tratamientos indica que no hay diferencias estadísticamente significativas al 5%.

4.2.2 Incidencia de pudriciones húmedas en campo. Las mediciones se ejecutaron a partir de la emergencia de las plantas de cala y consistieron en contar el

número de plantas que no mostraron síntomas de *E. carotovora* a nivel de tallo, hojas y flores (ver Anexo 4 y 5).

Se identificaron aquellas plantas que no presentaron los síntomas de pudrición blanda citados por WRIGHT (1994), quien indica que 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 túbero o al tallo por completo. Al estar infectado el túbero las plantas presentan hojas amarillentas y decaimiento en general. Según sea la severidad del ataque puede incluso producirse la muerte de la planta.

Se puede apreciar en el Cuadro 7, que no se presentó un ataque importante de *E. carotovora* en las plantas de cala en campo. Esto, podría deberse a las favorables condiciones atmosféricas que se presentaron durante el periodo del ensayo, así como también las condiciones de humedad del suelo.

También se observa en el siguiente cuadro que en la última evaluación realizada se presentaron pérdidas de menos de un 10% en los seis tratamientos y el control. A pesar de los buenos resultados obtenidos en el ensayo de campo en cuanto a la baja presencia de plantas con pudrición blanda, es posible detectar una disminución de plantas libres del patógeno producto de un aumento de plantas infectadas al transcurrir las semanas del ensayo. En la Figura 7, es factible ver las curvas con una evolución negativa, sin embargo, estas cifras fluctúan entre los rangos de 92-94% de plantas sin *E. carotovora*, lo que podría considerarse como aceptable.

CUADRO 7 Porcentaje (%) de plantas sanas de cala de cuatro mediciones realizadas en campo en seis tratamientos y un testigo para la evaluación de *Bacillus subtilis* como controlador biológico de *Erwinia carotovora*.

Tratamientos		Fecha de las mediciones ¹			
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	13/01/07	27/01/07	24/02/07	19/03/07
Polvo	10 ⁴	99.41	99.41 a	97.35	93.24 a
Polvo	10 ⁵	99.41	99.41 a	98.52	94.97 a
Polvo	10 ⁶	99.41	98.82 a	97.63	91.72 a
Líquido	10 ⁴	99.4	98.81 a	97.01	93.13 a
Líquido	10 ⁵	99.7	99.41 a	97.92	94.36 a
Líquido	10 ⁶	100	99.41 a	97.03	94.07 a
Testigo (sin antagonista)		99.7	99.11 a	97.92	94.36 a

¹ Porcentajes en base al promedio de plantas emergidas en cada tratamiento y un testigo.

a La misma letra entre los tratamientos indica que no hay diferencias estadísticamente significativas al 5%.

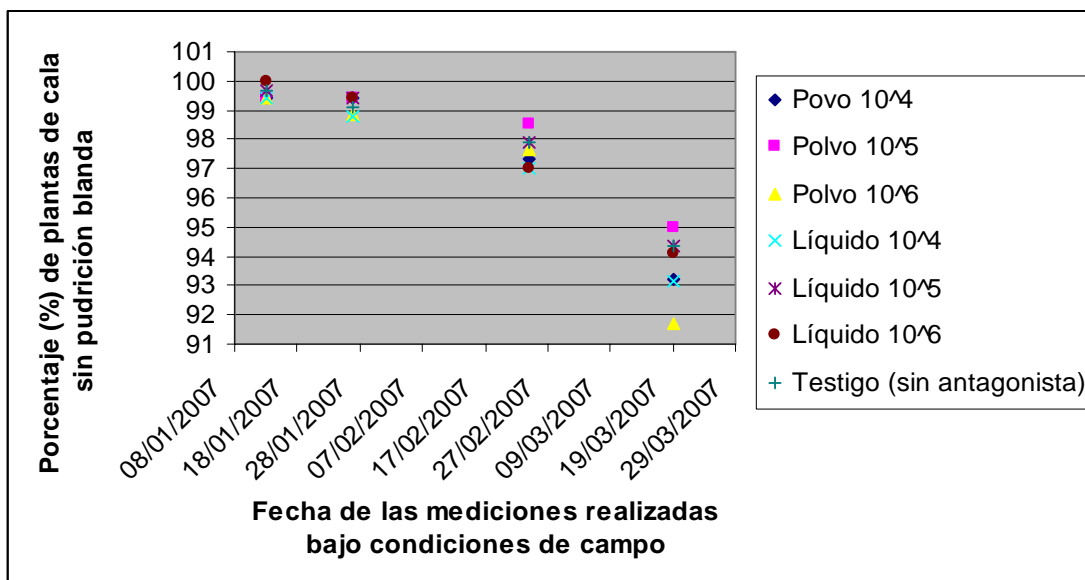


FIGURA 7 Evolución de plantas de cala sanas en los seis tratamientos y un testigo de las cuatro evaluaciones realizadas bajo condiciones de campo.

Al igual que bajo condiciones de invernadero se determinó analizar solo dos mediciones (al principio y al final) de modo que sean representativas. Por lo tanto se puede concluir que, el efecto del controlador biológico no permitió detectar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el testigo para la variable “porcentaje de plantas de cala sanas bajo condiciones de campo” realizadas en la segunda y última medición (ver Anexo 8).

Es muy difícil, poder precisar las razones de por qué *B. subtilis*, no fue capaz de controlar la pudrición blanda en *Zantedeschia* spp. bajo las condiciones evaluadas. Además, Kloepper *et al.*, 1980, citados por MEJÍAS (1993), señalan que varios factores tales como la naturaleza del inóculo, tipo de suelo y la humedad podrían afectar seriamente la sobrevivencia, colonización de las raíces y persistencia de un antagonista.

Se debe tener en cuenta que no es posible tener una relación estable entre la efectividad de la bacteria antagonista *in vitro* con la supresión de la enfermedad *in situ* y se explica según lo citado por WELLER (1988), quien indica que se ha denominado *pérdida de la competencia ecológica* a la capacidad de la bacteria antagonista para competir y sobrevivir en la naturaleza.

4.2.3 Cosecha y curado de túberos de campo. Luego de la senescencia del follaje, al igual que en el ensayo bajo condiciones de invernadero, se dejaron engordar los túberos y posteriormente se recolectaron. Debido a los buenos resultados obtenidos en las cuatro mediciones realizadas de “número de plantas de cala sanas”, se optó por cosechar 20 túberos al azar por parcela, es decir, 80 por tratamiento para seguir con los experimentos en laboratorio.

Según estudios realizados por WRIGHT *et al.* (2002), la recolección muy temprana de los túberos demostró que pueden reducir notablemente su tamaño y rendimiento. Sin embargo, Funnell 1993, citado por WRIGHT *et al.*, (2002), indica que los túberos de cala alcanzan su máximo tamaño cuando el follaje se ha secado completamente, sin embargo, la experiencia ha demostrado que si se dejan los túberos por más tiempo en el suelo, luego de finalizada la etapa de senescencia, es probable que aumente la aparición de pudrición blanda, especialmente si el suelo se mantiene húmedo y la carga bacteriana de éste es alta.

Por lo tanto, WRIGHT *et al.*, (2002) indican que la incidencia y la gravedad de la pudrición blanda bacteriana de los túberos de cala pueden ser notablemente influenciadas por el momento de cesación del riego y el momento en que los túberos son levantados de la tierra.

4.2.4 Presencia de *E. carotovora* latente en túberos aparentemente sanos. Los túberos cosechados en campo fueron pesados por tratamientos y el testigo y luego de manera individual. Estos datos se señalan en el siguiente cuadro, el cual indica el número total de túberos cosechados por tratamientos y el control. También, se observa el peso total y el promedio del peso individual de los túberos. Este último parámetro fue evaluado a partir de cinco túberos por cada repetición de los tratamientos y el testigo.

En el Cuadro 8 se observa que existen diferencias en cuanto al promedio del peso obtenido de los túberos de cala individuales (ver Anexo 6), presentando las cifras más altas los tratamientos de formulación en polvo con dosis de 10^4 ufc mL⁻¹ y 10^5 ufc mL⁻¹ y el tratamiento de formulación líquida con dosis de 10^6 ufc mL⁻¹. Éstos obtuvieron en promedio más de 70 g de peso individual. El testigo presentó un valor menor con 68 g.

No se realizó un análisis estadístico al peso de túberos cosechados, ya que no se cosecharon todos los túberos de las repeticiones y por lo tanto no serían representativos. Sin embargo, no fue factible encontrar diferencias estadísticamente significativas en cuanto al promedio del peso de los túberos individuales del ensayo de campo que pudieran entregar una respuesta por parte de la bacteria biocontroladora (ver Anexo 8).

Posteriormente se realizó una inducción de *E. carotovora* a cinco túberos por repetición aparentemente sanos. Esto se realizó sometiendo a los túberos a las condiciones óptimas de temperatura (25-27 °C) y humedad, además de entregar el mecanismo de entrada de *Erwinia*, lo que consistió en efectuar heridas en las lenticelas.

En el estudio realizado por CARRIÓN (2007), el testigo (sin *Erwinia* visible 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 (lenticelas) y una vez dadas las condiciones de estrés en la planta, la bacteria patógena puede activarse y atacar a su hospedero. Esto se puede corroborar mediante lo señalado por Blom y Brown 1999, citados por WRIGHT *et al.* (2005), quienes indican que “el agente patógeno puede residir en un estado inactivo dentro de los túberos de calas como infecciones latentes, hasta que se den las condiciones que favorezcan el crecimiento y la multiplicación de las bacterias, dando lugar a la pudrición blanda”.

CUADRO 8 Peso de túberos de cala cosechados en campo de seis tratamientos y un testigo para la evaluación de *Bacillus subtilis* como controlador biológico de *Erwinia carotovora*.

Tratamientos		Número total	Peso (kg) de	Promedio de peso (g)
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	de túberos cosechados ¹	túberos cosechados ²	de túberos individuales ³
Polvo	10 ⁴	80	1.45	72.39 a
Polvo	10 ⁵	80	1.46	72.79 a
Polvo	10 ⁶	80	1.17	58.44 a
Líquido	10 ⁴	80	1.31	65.42 a
Líquido	10 ⁵	80	1.36	68.09 a
Líquido	10 ⁶	80	1.47	73.70 a
Testigo (sin antagonista)		80	1.38	68.85 a

¹ Suma de las cuatro repeticiones de cada tratamiento y un testigo.

² Peso de 20 túberos elegidos al azar por tratamientos y control, posteriormente analizados.

³ Promedio del peso individual de cinco túberos por repetición de cada tratamiento y un testigo.

a La misma letra entre los tratamientos indica que no hay diferencias estadísticamente significativas al 5%.

CUADRO 9 Número de túberos sanos y brotados en seis tratamientos y un testigo posterior a la inducción de *Erwinia carotovora* latente en túberos de cala de campo aparentemente sanos.

Tratamientos		Nº de túberos sanos ¹	Nº de túberos brotados ¹
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)		
Polvo	10 ⁴	20 a	17 a
Polvo	10 ⁵	20 a	16 a
Polvo	10 ⁶	19 a	17 a
Líquido	10 ⁴	19 a	18 a
Líquido	10 ⁵	19 a	16 a
Líquido	10 ⁶	18 a	11 a
Testigo (sin antagonista)		16 a	15 a

¹ De un total de cinco túberos por cada repetición, 20 por tratamientos y un testigo.

a La misma letra entre los tratamientos indica que no hay diferencias estadísticamente significativas al 5%.

En el Cuadro 9 se presentan el número de túberos sanos posterior a la inducción del crecimiento de *E. carotovora* en laboratorio. Se observa una mejor respuesta por parte del testigo en comparación con los demás tratamientos.

Sin embargo, no fue posible establecer diferencias estadísticamente significativas dentro de la variable “número de túberos sanos posterior a la inducción de pudrición blanda latente en túberos aparentemente sanos” (ver Anexo 8).

En la Figura 8 es posible distinguir un túbero completamente infectado con *E. carotovora*. Éste, fue cosechado sin presentar signos visibles de la enfermedad, sin embargo, al realizar la inducción de pudrición blanda en laboratorio, se desencadenaron las condiciones para su desarrollo.

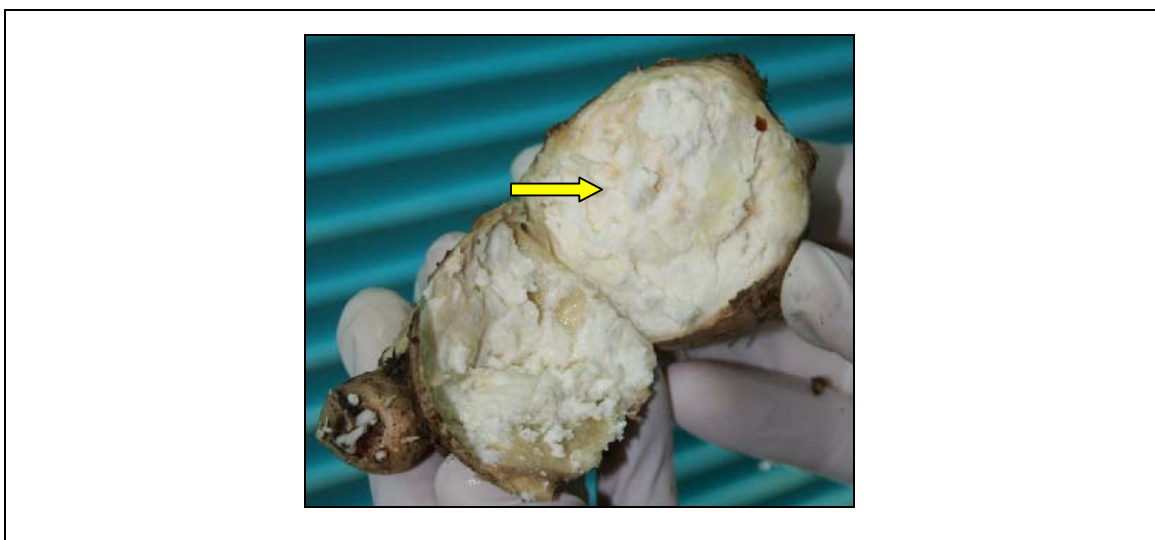


FIGURA 8 Túbero de papa con completa degradación de sus tejidos, producto de la acción de las enzimas pectinolíticas de *Erwinia carotovora*.

FUENTE: MÖLLER-HOLTKAMP (2008)

En el Cuadro 9, se establece además el número de túberos brotados luego de la inducción de *Erwinia* latente en túberos de papa aparentemente sanos. En la Figura 9 es posible distinguir un túbero de papa completamente sano de un túbero infectado. El primero poseía una evidente brotación, mientras que el segundo presentó los síntomas típicos de pudrición húmeda, es decir, mal olor, blando y con carencia de brotes.

Aún así, no fue posible establecer diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el testigo dentro de la variable “número de túberos brotados” (ver Anexo 8).

Luego del estudio realizado por CARRIÓN (2007) quedó demostrado que los túberos de papa aparentemente sanos son capaces de ser portadores y mantener bacterias bajo sus tejidos. Por lo tanto, aunque se le realice una desinfección adecuada 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 plantación hasta la cosecha de los túberos. Por lo tanto, estos no deben ser

dañados mecánicamente, ya que cualquier herida que se le produzca sería una vía de entrada para el patógeno.

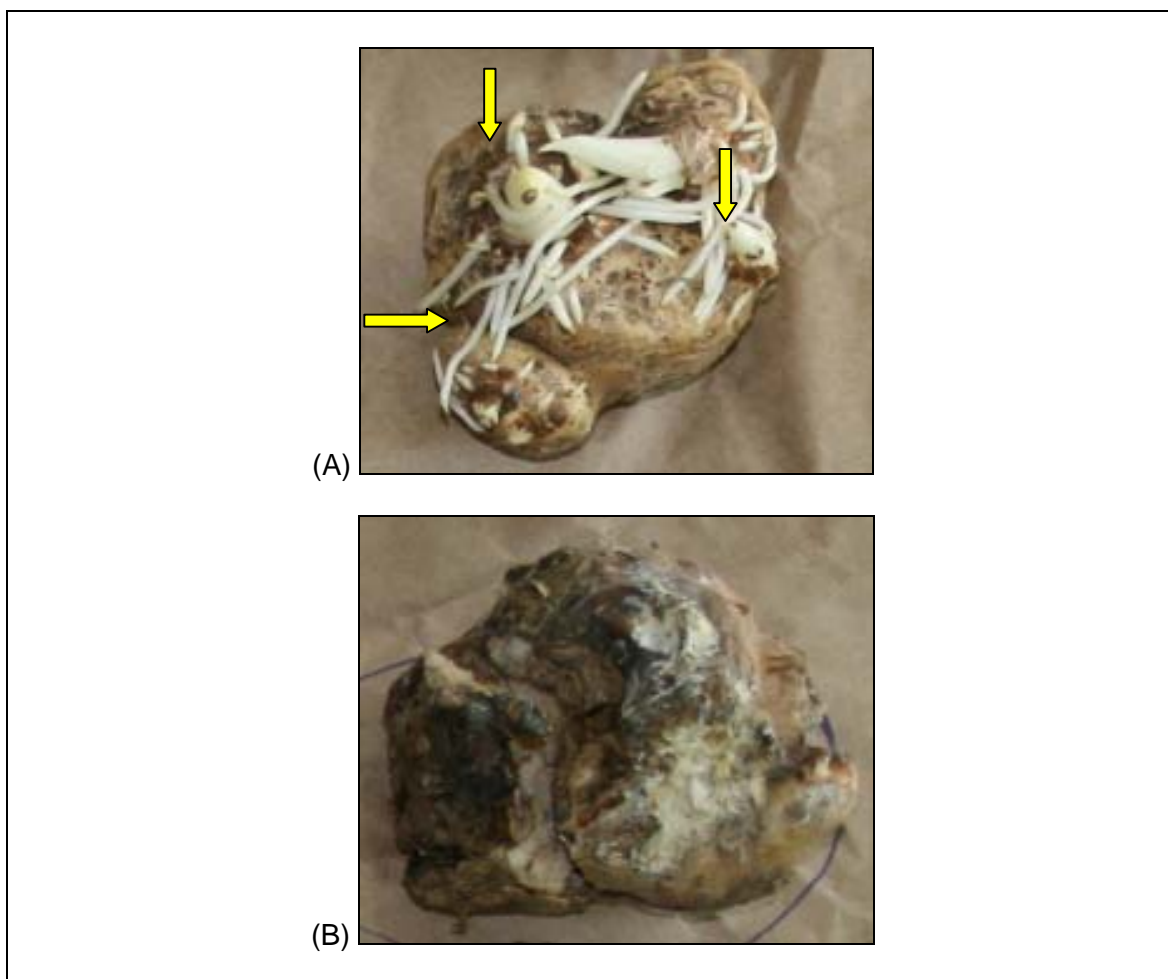


FIGURA 9 Túbero de cala sano con brotes (A) y túbero sin brotes con síntomas de pudrición blanda (B).

FUENTE: MÖLLER-HOLTKAMP (2008)

4.3 La importancia de factores ambientales en la producción de calas bajo plástico

Exceso de agua de riego, altas temperaturas, presencia del patógeno tanto en el suelo como en las lenticelas de los túberos de cala son entre otros, los principales problemas que afectan a las plantas y que desencadenan las pudriciones húmedas. A partir de la presencia de estos factores adversos durante el cultivo, es posible establecer que las condiciones no serían las deseadas para el crecimiento de la planta de cala, provocándoles un constante estrés, el cual las hace más sensibles al ataque de plagas y enfermedades.

A continuación se describirán y discutirán los factores clave en el desarrollo de pudriciones húmedas en túberos y plantas de cala, además de dar a conocer las ventajas de realizar un adecuado control y manejo integrado del cultivo.

4.3.1 Exceso de temperatura y humedad en el aire. Es muy importante realizar un apropiado control de la temperatura y humedad dentro de los invernaderos, y para esto es necesario contar con infraestructuras que permitan una adecuada ventilación y circulación de aire.

Galés y Clemens, 1992, citados por WRIGHT *et al.* (2002), indican que los invernaderos le permiten a los productores regular la temperatura y la humedad óptima para los niveles de crecimiento del cultivo, evitando al mismo tiempo, la temperatura y condiciones de humedad propicias para el desarrollo de pudrición húmeda. Además, las condiciones de estrés de la planta la hacen más susceptible a ataques de *E. carotovora*.

Otros autores señalan que temperaturas de sobre 27 °C y excesiva humedad del suelo, aceleran la infección de plantas de cala con Ecc (Kuehny *et al.*, 1998, citados por WRIGHT *et al.* 2002).

4.3.2 Altas temperaturas no toleradas por el cultivo. El máximo crecimiento de las plantas de cala ocurre en el rango de temperatura de 22 a 25 °C. El crecimiento mínimo ocurre bajo los 18 °C, y por encima de 30 °C, el crecimiento cesa. Temperaturas mayores a 35 °C pueden ser toleradas por la planta pero temperaturas más altas pueden causar estrés y provocar el desarrollo de pudrición blanda u otras enfermedades, las cuales dañarán a la planta o al túbero, resultando una raíz débil (CHAHÍN, 2001).

4.3.3 Temperatura óptima para el desarrollo de pudriciones húmedas. *E. carotovora* se caracteriza por ser un patógeno oportunista, es decir, una infección latente en el túbero 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 y 37 °C, respectivamente (Guss 1999, citado por CARRIÓN, 2007).

Por otro lado, PÉROMBELON (2002), señala que *E. carotovora* es una bacteria mesófila, la cual prospera en la mayoría de la gama de temperaturas entre 27 y 30 °C.

4.3.4 Exceso de agua de riego. Las calas deben ser regadas con moderación desde la plantación hasta la emergencia de la primera hoja y, a continuación, aumentar el riego cuando las plantas están en plena hoja. Finalmente, el riego debe ser reducido al término de la floración, cuando empieza la senescencia del follaje (Amos 1984, citado por WRIGHT *et al.*, 2002).

El agua es fundamental para el desarrollo de las bacterias patógenas, por lo que es importante realizar un eficaz plan de manejo del riego para reducir la exposición de las calas a los excesos de humedad (WRIGHT *et al.*, 2002).

Galés y Clemens, 1992 citados por WRIGHT *et al.* (2002), afirman que manteniendo un buen drenaje utilizando suelos con mezclas de materiales como corteza, piedra pómez y turba libres de *E. carotovora*, da a los productores un control de los niveles de humedad alrededor de los túberos y las raíces de las plantas, resultando mínimas las pérdidas causadas por pudrición blanda.



FIGURA 10 Formación de musgo en los camellones del ensayo de invernadero (A) y medición de tensión hídrica en el suelo por medio de un tensiómetro (B).

FUENTE: MÖLLER-HOLTKAMP (2007)

Con respecto al riego aplicado durante los ensayos bajo condiciones de invernadero, se comenzó a regar por aspersión, 10 minutos diarios (de acuerdo a las políticas de la empresa). Debido a que no se utilizó aserrín en el ensayo de invernadero, fue posible detectar una capa de musgo sobre el suelo de los camellones, producto del exceso de humedad y las altas temperaturas presentes dentro de éste. En la Figura 10 es posible observar el mantillo de musgo presente en el cultivo. Por esta razón, el tiempo de riego se disminuyó a cinco minutos diarios.

Para determinar las causas del desarrollo del musgo y el evidente ataque de *E. carotovora* en el cultivo, se instaló un tensiómetro a 15 cm de profundidad en medio de un camellón del ensayo bajo invernadero. Con la ayuda de este instrumento, es posible determinar la tensión con que el agua está adherida a las partículas del suelo. Las lecturas del tensiómetro pueden relacionarse con la fuerza con que es retenida el agua por parte del suelo, pero no puede utilizarse directamente para determinar el contenido de agua en el suelo. Por lo tanto es factible concluir que, de acuerdo a las mediciones realizadas con el tensiómetro en los ensayos, el suelo se mantuvo constantemente entre los rangos de 0-10 centibares (ver Figura 12), lo que indica claramente una saturación de agua en el suelo.

4.3.5 Manejo integrado del cultivo. El control de las pudriciones húmedas es muy difícil, por lo que debe enfocarse en forma de manejo integrado.

El método más adecuado de control, principalmente cuando el problema es la infección latente de los túberos, es usar material libre de *Erwinia*. Al existir túberos infectados en forma latente, se debe prevenir la expresión de la enfermedad (ACUÑA y ROJAS, 2006).

Por lo tanto, ésto se podría lograr:

- Utilizando variedades resistentes a las pudriciones blandas.
- Usando material libre de *Erwinia* latente.
- Plantando en suelos de buen drenaje y libre del patógeno.
- Realizando una correcta rotación de cultivos.
- Evitando daños mecánicos en la plantación.
- Descartando plantas infectadas para disminuir la fuente de inóculo.

Muchos problemas que se producen en el almacenamiento pueden prevenirse mediante algunas medidas de manejo tales como (ACUÑA y ROJAS, 2006):

- Prevenir daños mecánicos, heridas y contusiones de los túberos durante la cosecha y el transporte.
- Evitar que los túberos sean almacenados con exceso de humedad y tierra adherida.
- Realizar una correcta limpieza de la bodega de almacenamiento, eliminando restos de túberos y otros materiales.
- Verificar que exista una adecuada aireación durante el almacenamiento.

5 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos de acuerdo a los objetivos planteados en este trabajo, es posible mencionar las siguientes conclusiones:

- Bajo las condiciones de este ensayo no se observó un efecto en la emergencia de las plantas de cala tanto de campo como de invernadero por parte de la cepa de *Bacillus subtilis* que sea capaz de controlar la enfermedad bacteriana causada por *Erwinia carotovora*.
- No fue posible determinar la dosis de *Bacillus subtilis* que permitiera controlar la patología durante el periodo de cultivo bajo condiciones de invernadero y campo.
- En cuanto al promedio del peso de túberos individuales de campo e invernadero tampoco fue posible detectar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el testigo.
- El ensayo de análisis de la posible latencia de *E. carotovora* en los túberos cosechados en campo no arrojó resultados estadísticamente significativos.
- La brotación de los túberos de campo en el laboratorio no permitió hallar diferencias entre los tratamientos y el control.
- Las condiciones en que se desarrollaron los ensayos de la primera etapa en terreno no favorecieron el óptimo crecimiento de la cepa antagonista. Esto permitió que no se detectaran diferencias estadísticas entre los tratamientos y el testigo en contra del desarrollo de *E. carotovora* en el cultivo de calas de colores.
- Por lo tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, es posible concluir que se rechaza la hipótesis planteada entre los objetivos del trabajo realizado.
- Es importante tener los conocimientos previos acerca de los requerimientos de suelo, luminosidad, temperatura y riego del cultivo de *Zantedeschia* spp., de modo de evitar las condiciones desfavorables para el crecimiento de las plantas. Este mecanismo de estrés es la principal razón por la cual se ve afectado con pudrición blanda el cultivo de calas de colores en Chile y el mundo.
- Realizar un adecuado manejo integrado antes y durante una aplicación de la cepa de *B. subtilis* sería la forma más amigable de prevenir y/o controlar la patología producida por *E. carotovora* en un cultivo comercial de calas.

6 BIBLIOGRAFÍA

- ACUÑA, I. y ROJAS, J.S. 2006. Principales enfermedades del cultivo de papa. Manual de producción de papa para la Agricultura Familiar Campesina (A.F.C.). Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Boletín INIA N° 147. Rojas, J y Orena, S. (Eds). Osorno, Chile. 172 p.
- AGRIOS, G. 1996. Fitopatología. México. Limusa 838 p.
- ARMITAGE, A. 1993. *Zantedeschia*. In: Speciality Cut Flowers: The production of annuals, perennials, bulbs and woody plants for fresh and dried cut flowers Varsity. Portland, Oregon, USA. pp:316-323.
- BAHAMONDE, P., 2006. Efecto de la aplicación de reguladores de crecimiento sobre híbridos de calas (*Zantedeschia* spp.). Tesis Lic. Agr., Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 60 p.
- BAKER, K. y COOK, J. 1974. Biological control of plant pathogens. Freeman. San Francisco, Estados Unidos 433 p.
- _____, y SYNDER, W. 1970. Ecology of soil-borne plant pathogens. Prelude to biological control, University of California Press, Berkeley. 571 p.
- BANDOW J. E., BRÖTZ, H. y HECKER , M. 2002. *Bacillus subtilis* Tolerance of Moderate Concentrations of Rifampin Involves the ζ^B -Dependent General and Multiple Stress Response J. Bacteriol. 184(2): 459–467. (On line) <<http://www.pubmedcentral.nih.gov>> (15 de noviembre 2008)
- BUTT, T., HARRIS, J. y POWELL, A. 1999. Microbial biopesticides. The European scene. In: Biopesticides. Use delivery. Eds. F.R.Hill & J.J. Menn. Humana Press. NJ. pp:23-44.
- CARRILLO, C. 1999. Propagación rápida de híbridos de *Zantedeschia* Spreng., mediante trozos de tubérculos. Tesis Lic. Agr., Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 80 p.
- CARRILLO, L. 2003. Microbiología agrícola. Cap. 2. (On line) <<http://www.unsa.edu.ar>> (3 de octubre 2007).
- CARRIÓN, J. 2007. 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 Lic. Agr., Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 114 p.
- CHAHIN, G. 2001. Producción comercial de calas. (On line) <<http://www.tattersall.cl/revista/rev167/plagas.htm>> (2 de octubre 2007).

- CHILE, ODEPA, 2007. Estudio de evaluación del potencial del mercado interno de las flores. Oficina De Estudios y Políticas Agrarias ODEPA. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. Estudio elaborado para ODEPA por EMG Consultores S. A. Santiago, Chile. 84 p.
- CIAMPI, L., 2002. Introducción a la Patología Vegetal. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia, Chile. 232 p.
- CIREN, 2003. Centro de Información de Recursos Naturales (CIREN). Descripciones de suelos, materiales y símbolos. Estudio agrológico X Región. Tomo II. Publicación N° 123, Santiago, Chile. 412 p.
- DOLE, M.J. y WILKINS, H.F. 1999. Floriculture, principles and species. New Jersey, U.S.A. Prentice Hall. 613 p.
- ETCHEVERRIA, P. 2002. Efecto de la densidad de sombra y del mulch en la producción y calidad de las flores y túberos *Zantedeschia* híbrida cv. Mango. Tesis Ing. Agr., Temuco, Universidad de la Frontera. 67pp.
- FUNNEL, K. A. 1993. *Zantedeschia*. In: New Zealand Calla Council Growers Handbook. J. Clemens (Ed.). Auckland, New Zealand. pp:20-32.
- GARAY, Y. 2006. Aislamiento y caracterización de metabolitos con actividad antagonista de cepas de *Bacillus* sp. Hacia los agentes fitopatógenos *Erwinia carotovora* (Dye) Hall y *Rhizoctonia solani* Kühn. Tesis de Magíster, Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias. 109 p.
- GIACAMAN, A. 2006. Formulación de un biopesticida para combatir la pudrición húmeda en cala (*Zantedeschia* spp) producida por *Erwinia carotovora*. Tesis Lic. en Bioquímica, Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias. 180 p.
- GONZALEZ, A., FERNÁNDEZ, J., BAÑÓN, S. y GARCÍA, J. 1997. *Zantedeschia*. Plantflor, cultivo y comercio (España) 10(4): 53-57.
- GONZALEZ, V. y FRAGOSO, S. 2002. *Bacillus subtilis*. (On line) <<http://www2.cbm.vam.es/microali/pdfs/Bsubtilispdf>> (10 de septiembre 2007).
- GRACIA-GARZA, J. A., BLOM, T. J., BROWN, W. y ALLEN, W. 2002. Pre- and post-plant applications of copper-based compounds to control *Erwinia* soft rot of calla lilies. Can. J. Plant Pathol. (24): 274–280.
- HANDELSMAN, J. y STABB, E. 1996. Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. The Plant Cell (8):1855-1869.
- HOFFENS, K. 1999. Caracterización morfológica y fenológica de 28 genotipos de cala (*Zantedeschia* spp.) cultivadas en Valdivia. Tesis Lic. Agr., Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 117 p.

- JAMIL, B., HASAN, F., HAMEED, A. y AHMED, S., 2007. Isolation of *Bacillus subtilis* MH-4 from Soil and its Potential of Polypeptidic Antibiotic Production. *Pak J Pharm Sci.* 20(1):26-31.
- KUNSTMANN, J. P., 2004. Determinación de subespecies de *Erwinia carotovora* (Dye) Hall como agentes causantes de pudrición blanda en cala (*Zantedeschia* spp.). Tesis Lic. Agr., Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 92 p.
- LAVAL, E. y TAPIA, B. 2005. Mercado de las flores de corte. Oficina de estudios y políticas agrarias de Chile. (On line) <<http://www.odepa.cl>> (3 de octubre 2007)
- MADIGAN, M y MARTINKO, J. 2005. Brock Biology of Microorganisms. *Bacillus subtilis*. 11th ed., Prentice Hall. (On line) <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_subtilis> (12 de Sept 2008).
- MEJÍAS, J. 1993. Evaluación del control biológico ejercido por tres cepas de *Actinomyces* sobre dos subespecies de *Erwinia carotovora* en papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis Lic. Agr., Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 70 p.
- MÉNDEZ, 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, Universidad Austral de Chile, Facultad de Medicina. 59 p.
- OJEDA, C. 2007. Formulación de un biocontrolador de *Erwinia carotovora* en polvo, a partir de una cepa de *Bacillus subtilis* utilizando secado *spray*. Tesis Lic. Cs. Alim., Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 117 p.
- PÉROMBELON, M. 2002. Potato diseases caused by soft rot Erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology.* 51(1): 1-12.
- PIZANO, M. 1999. *Zantedeschia*, Calla Lily. Santa Fé de Bogotá, Colombia. Horticultura. 54 p.
- RODRIGUEZ, L. y JULIA, V. 2006. Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprófitos contra *Rhizoctonia solani*. (On line) <<http://sisbib.unmsm.edu.pe>> (3 de octubre de 2007)
- SALINGER, J. P. 1987. *Zantedeschia*. In: Commercial Flower Growing. Inkata Press. Melbourne and Sydney, Australia. pp:203-206.
- SEEMANN, P. y HOFFENS, K. 1999. Cultivo de calas (*Zantedeschia* spp.). In: Seemann, P. y Andrade, N. (Eds.) Cultivo y manejo de plantas bulbosas ornamentales. Universidad Austral de Chile. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. pp: 95-111.

- REYES, M. V. 2008. Situación del mercado de flores de corte en Chile en 2007. Oficina de estudios y políticas agrarias de Chile. (On line) <<https://www.odepa.gob.cl>> (12 septiembre 2008).
- WELLER, D. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* (26): 379-407.
- WRIGHT, P. J. 1994. Controlling soft rots in callas. (On line) <<http://www.crop.cri.nz>> (5 de octubre 2007).
- _____, 1998. A soft rot of calla (*Zantedeschia* spp.) caused by *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* (26): 331-334.
- _____, TRIGGS, C. M. y BURGE, G. K. 2002. Effects of cessation of irrigation and time of lifting of tubers on bacterial soft rot of calla (*Zantedeschia* spp.) tubers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* (30): 265–272.
- _____, TRIGGS, C. M. y BURGE, G. K. 2005. Control of bacterial soft rot of calla (*Zantedeschia* spp.) by pathogen exclusion, elimination and removal. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* (33): 117–123.

7 ANEXOS

ANEXO 1 Número de túberos plantados por parcela en invernadero y en campo.

Tratamientos Dosis Formulación (ufc mL ⁻¹)	Nº de túberos plantados en invernadero				Total
	RI	RII	RIII	RIV	
Polvo 10 ⁴	85	85	80	80	330
Polvo 10 ⁵	85	80	80	80	325
Polvo 10 ⁶	80	85	85	80	330
Líquido 10 ⁴	80	80	85	85	330
Líquido 10 ⁵	80	80	80	85	325
Líquido 10 ⁶	80	50	85	80	295
Testigo (sin antagonista)	80	80	85	55	300

Tratamientos Dosis Formulación (ufc mL ⁻¹)	Nº de túberos plantados en campo				Total
	RI	RII	RIII	RIV	
Polvo 10 ⁴	85	85	85	85	340
Polvo 10 ⁵	85	85	85	85	340
Polvo 10 ⁶	85	85	85	85	340
Líquido 10 ⁴	85	85	85	85	340
Líquido 10 ⁵	85	85	85	85	340
Líquido 10 ⁶	85	85	85	85	340
Testigo (sin antagonista)	85	85	85	85	340

ANEXO 2 Fórmulas para llegar a las dosis necesarias de las formulaciones sólida y líquida.

$$V1C1=V2C2$$

$$X \times 10^8 \text{ ufc mg}^{-1} = 40000 \text{ mL} \times 10^4 \text{ ufc mg}^{-1}$$

$$X = 4 \text{ mg}$$

$$V1C1=V2C2$$

$$X \times 10^8 \text{ ufc mg}^{-1} = 40000 \text{ mL} \times 10^5 \text{ ufc mg}^{-1}$$

$$X = 40 \text{ mg}$$

$$V1C1=V2C2$$

$$X \times 10^8 \text{ ufc mg}^{-1} = 40000 \text{ mL} \times 10^6 \text{ ufc mg}^{-1}$$

$$X = 400 \text{ mg}$$

$$V1C1=V2C2$$

$$X \times 10^8 \text{ ufc mL}^{-1} = 40000 \text{ mL} \times 10^4 \text{ ufc mL}^{-1}$$

$$X = 4 \text{ mL}$$

$$V1C1=V2C2$$

$$X \times 10^8 \text{ ufc mL}^{-1} = 40000 \text{ mL} \times 10^5 \text{ ufc mL}^{-1}$$

$$X = 40 \text{ mL}$$

$$V1C1=V2C2$$

$$X \times 10^8 \text{ ufc mL}^{-1} = 40000 \text{ mL} \times 10^6 \text{ ufc mL}^{-1}$$

$$X = 400 \text{ mL}$$

ANEXO 3 Número y porcentaje (%) de plantas de cala emergidas en invernadero y en campo en seis tratamientos y un testigo.

Invernadero

Número de plantas emergidas

Tratamientos		Repeticiones			
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV
Polvo	10 ⁴	68	75	74	74
Polvo	10 ⁵	72	80	78	75
Polvo	10 ⁶	73	78	84	76
Líquido	10 ⁴	75	79	79	84
Líquido	10 ⁵	76	76	76	83
Líquido	10 ⁶	75	49	81	74
Testigo (sin antagonista)		68	76	82	55

Porcentaje (%) de plantas emergidas

Tratamientos		Repeticiones			
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV
Polvo	10 ⁴	80.00	88.23	92.50	92.50
Polvo	10 ⁵	84.70	100	97.50	93.75
Polvo	10 ⁶	91.25	91.76	98.82	95.00
Líquido	10 ⁴	93.75	98.75	92.94	98.82
Líquido	10 ⁵	95.00	95.00	95.00	97.64
Líquido	10 ⁶	93.75	98.00	95.29	92.50
Testigo (sin antagonista)		85.00	95.00	96.47	100

Campo

Número de plantas emergidas

Tratamientos		Repeticiones			
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV
Polvo	10 ⁴	85	85	85	85
Polvo	10 ⁵	84	85	84	85
Polvo	10 ⁶	85	84	84	85
Líquido	10 ⁴	83	84	85	83
Líquido	10 ⁵	85	83	84	85
Líquido	10 ⁶	84	83	85	85
Testigo (sin antagonista)		83	85	84	85

Porcentaje (%) de plantas emergidas

Tratamientos		Repeticiones			
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV
Polvo	10 ⁴	100	100	100	100
Polvo	10 ⁵	98.82	100	98.82	100
Polvo	10 ⁶	100	98.82	98.82	100
Líquido	10 ⁴	97.65	98.82	100	97.65
Líquido	10 ⁵	100	97.65	98.82	100
Líquido	10 ⁶	98.82	97.65	100	100
Testigo (sin antagonista)		97.65	100	98.82	100

ANEXO 4 Número de plantas sanas de ensayo en invernadero y campo para las cuatro repeticiones.

Invernadero

Evaluación realizada el 13/10/06

Tratamientos		Repeticiones				Suma
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV	
Polvo	10 ⁴	69	67	71	62	269
Polvo	10 ⁵	66	74	73	67	280
Polvo	10 ⁶	67	72	81	72	292
Líquido	10 ⁴	69	79	64	72	284
Líquido	10 ⁵	74	71	75	72	292
Líquido	10 ⁶	70	48	78	73	269
Testigo (sin antagonista)		59	73	77	55	264

Evaluación realizada el 30/10/06

Tratamientos		Repeticiones				Suma
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV	
Polvo	10 ⁴	59	69	63	70	261
Polvo	10 ⁵	63	71	72	70	276
Polvo	10 ⁶	60	68	71	70	269
Líquido	10 ⁴	66	70	70	74	280
Líquido	10 ⁵	66	64	69	68	267
Líquido	10 ⁶	64	46	71	65	246
Testigo (sin antagonista)		61	66	72	51	250

Evaluación realizada el 15/11/06

Tratamientos		Repeticiones				Suma
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV	
Polvo	10 ⁴	47	57	56	60	220
Polvo	10 ⁵	53	58	63	63	237
Polvo	10 ⁶	48	58	66	66	238
Líquido	10 ⁴	53	52	50	59	214
Líquido	10 ⁵	52	53	62	56	223
Líquido	10 ⁶	43	44	62	45	194
Testigo (sin antagonista)		50	66	63	47	226

Evaluación realizada el 28/11/06

Tratamientos		Repeticiones				Suma
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV	
Polvo	10 ⁴	19	34	33	44	130
Polvo	10 ⁵	24	32	43	43	142
Polvo	10 ⁶	19	17	47	53	136
Líquido	10 ⁴	43	38	41	43	165
Líquido	10 ⁵	36	25	50	39	150
Líquido	10 ⁶	32	35	49	16	132
Testigo (sin antagonista)		29	44	44	38	155

Evaluación realizada el 12/12/06

Tratamientos		Repeticiones				Suma
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV	
Polvo	10 ⁴	17	31	24	36	108
Polvo	10 ⁵	19	23	28	34	104
Polvo	10 ⁶	19	16	40	42	117
Líquido	10 ⁴	32	32	31	32	127
Líquido	10 ⁵	34	18	46	30	128
Líquido	10 ⁶	26	25	35	15	101
Testigo (sin antagonista)		23	39	34	34	130

Evaluación realizada el 27/12/06

Tratamientos		Repeticiones				Suma
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV	
Polvo	10 ⁴	14	26	20	34	94
Polvo	10 ⁵	15	21	20	28	84
Polvo	10 ⁶	15	12	28	40	95
Líquido	10 ⁴	23	21	20	19	83
Líquido	10 ⁵	22	12	20	22	76
Líquido	10 ⁶	15	19	18	7	59
Testigo (sin antagonista)		22	30	23	26	101

Campo

Evaluación realizada el 13/01/07

Tratamientos		Repeticiones				Suma
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV	
Polvo	10 ⁴	84	85	84	85	338
Polvo	10 ⁵	83	84	84	85	336
Polvo	10 ⁶	85	83	83	85	336
Líquido	10 ⁴	83	83	84	83	333
Líquido	10 ⁵	84	83	84	85	336
Líquido	10 ⁶	84	83	85	85	337
Testigo (sin antagonista)		83	85	83	85	336

Evaluación realizada el 27/01/07

Tratamientos		Repeticiones				Suma
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV	
Polvo	10 ⁴	85	83	85	85	338
Polvo	10 ⁵	84	84	84	84	336
Polvo	10 ⁶	85	82	83	84	334
Líquido	10 ⁴	83	81	85	82	331
Líquido	10 ⁵	85	82	83	85	335
Líquido	10 ⁶	84	82	84	85	335
Testigo (sin antagonista)		82	84	84	84	334

Evaluación realizada el 24/02/07

Tratamientos		Repeticiones				Suma
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV	
Polvo	10 ⁴	82	82	84	83	331
Polvo	10 ⁵	82	83	84	84	333
Polvo	10 ⁶	80	83	83	84	330
Líquido	10 ⁴	79	79	85	82	325
Líquido	10 ⁵	83	80	83	84	330
Líquido	10 ⁶	83	81	81	82	327
Testigo (sin antagonista)		83	83	82	82	330

Evaluación realizada el 19/03/07

Tratamientos		Repeticiones				Suma
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV	
Polvo	10 ⁴	78	80	78	81	317
Polvo	10 ⁵	80	80	79	82	321
Polvo	10 ⁶	77	75	78	80	310
Líquido	10 ⁴	80	79	76	77	312
Líquido	10 ⁵	82	75	79	82	318
Líquido	10 ⁶	80	79	79	79	317
Testigo (sin antagonista)		80	79	78	81	318

ANEXO 5 Porcentaje de plantas de cala sanas de invernadero y campo por parcela.

Invernadero

Evaluación realizada el 13/10/06

Tratamientos		Repeticiones			
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV
Polvo	10 ⁴	101.47	89.33	95.95	83.78
Polvo	10 ⁵	91.67	92.50	93.59	89.33
Polvo	10 ⁶	91.78	92.31	96.43	94.74
Líquido	10 ⁴	92.00	100	81.01	85.71
Líquido	10 ⁵	97.37	93.42	98.68	86.75
Líquido	10 ⁶	93.33	97.96	96.30	98.65
Testigo (sin antagonista)		86.76	96.05	93.90	100

Evaluación realizada el 30/10/06

Tratamientos		Repeticiones			
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV
Polvo	10 ⁴	86.76	92.00	85.14	94.59
Polvo	10 ⁵	87.50	88.75	92.31	93.33
Polvo	10 ⁶	82.19	87.18	84.52	92.11
Líquido	10 ⁴	88.00	88.61	88.61	88.10
Líquido	10 ⁵	86.84	84.21	90.79	81.93
Líquido	10 ⁶	85.33	93.88	87.65	87.84
Testigo (sin antagonista)		89.71	86.84	87.80	92.73

Evaluación realizada el 15/11/06

Tratamientos		Repeticiones			
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV
Polvo	10 ⁴	69.12	76.00	75.68	81.08
Polvo	10 ⁵	73.61	72.50	80.77	84.00
Polvo	10 ⁶	65.75	74.36	78.57	86.84
Líquido	10 ⁴	70.67	65.82	63.29	70.24
Líquido	10 ⁵	68.42	69.74	81.58	67.47
Líquido	10 ⁶	57.33	89.80	76.54	60.81
Testigo (sin antagonista)		73.53	86.84	76.83	85.45

Evaluación realizada el 28/11/06

Tratamientos		Repeticiones			
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV
Polvo	10 ⁴	27.94	45.33	44.59	59.46
Polvo	10 ⁵	33.33	40.00	55.13	57.33
Polvo	10 ⁶	26.03	21.79	55.95	69.74
Líquido	10 ⁴	57.33	48.1	51.90	51.19
Líquido	10 ⁵	47.37	32.89	65.79	46.99
Líquido	10 ⁶	42.67	71.43	60.49	21.62
Testigo (sin antagonista)		42.65	57.89	53.66	69.09

Evaluación realizada el 12/12/06

Tratamientos		Repeticiones			
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV
Polvo	10 ⁴	25.00	41.33	32.43	48.65
Polvo	10 ⁵	26.39	28.75	35.90	45.33
Polvo	10 ⁶	26.03	20.51	47.62	55.26
Líquido	10 ⁴	42.67	40.51	39.24	38.10
Líquido	10 ⁵	44.74	23.68	60.53	36.14
Líquido	10 ⁶	34.67	51.02	43.21	20.27
Testigo (sin antagonista)		33.82	51.32	41.46	61.82

Evaluación realizada el 27/12/06

Tratamientos		Repeticiones			
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV
Polvo	10 ⁴	20.59	34.67	27.03	45.95
Polvo	10 ⁵	20.83	26.25	25.64	37.33
Polvo	10 ⁶	20.55	15.38	33.33	52.63
Líquido	10 ⁴	30.67	26.58	25.32	22.62
Líquido	10 ⁵	28.95	15.79	26.32	26.51
Líquido	10 ⁶	20	38.78	22.22	9.46
Testigo (sin antagonista)		32.35	39.47	28.05	47.27

Campo

Evaluación realizada el 13/01/07

Tratamientos		Repeticiones			
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV
Polvo	10 ⁴	98.82	100	98.82	100
Polvo	10 ⁵	98.81	98.82	100	100
Polvo	10 ⁶	100	98.81	98.81	100
Líquido	10 ⁴	100	98.81	98.82	100
Líquido	10 ⁵	98.82	100	100	100
Líquido	10 ⁶	100	100	100	100
Testigo (sin antagonista)		100	100	98.81	100

Evaluación realizada el 27/01/07

Tratamientos		Repeticiones			
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV
Polvo	10 ⁴	100	97.65	100	100
Polvo	10 ⁵	100	98.82	100	98.82
Polvo	10 ⁶	100	97.62	98.81	98.82
Líquido	10 ⁴	100	96.43	100	98.80
Líquido	10 ⁵	100	98.80	98.81	100
Líquido	10 ⁶	100	98.80	98.82	100
Testigo (sin antagonista)		98.80	98.82	100	98.82

Evaluación realizada el 24/02/07

Tratamientos		Repeticiones			
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV
Polvo	10 ⁴	96.47	96.47	98.82	97.65
Polvo	10 ⁵	97.62	97.65	100	98.82
Polvo	10 ⁶	94.12	98.81	98.81	98.82
Líquido	10 ⁴	95.18	94.05	100	98.80
Líquido	10 ⁵	97.65	96.39	98.81	98.82
Líquido	10 ⁶	98.81	97.59	95.29	96.47
Testigo (sin antagonista)		100	97.65	97.62	96.47

Evaluación realizada el 19/03/07

Tratamientos		Repeticiones			
Formulación	Dosis (ufc mL ⁻¹)	I	II	III	IV
Polvo	10 ⁴	91.76	94.12	91.76	95.29
Polvo	10 ⁵	95.24	94.12	94.05	96.47
Polvo	10 ⁶	90.59	89.29	92.86	94.12
Líquido	10 ⁴	96.39	94.05	89.41	92.77
Líquido	10 ⁵	96.47	90.36	94.05	96.47
Líquido	10 ⁶	95.24	95.18	92.94	92.94
Testigo (sin antagonista)		96.39	92.94	92.86	95.29

ANEXO 6 Peso (gr) de túberos de cala de invernadero y campo analizados en laboratorio.

Invernadero

Repeti- ciones	Túbero	Tratamientos						Testigo
		Polvo 10 ⁴ ufc/mL	Polvo 10 ⁵ ufc/mL	Polvo 10 ⁶ ufc/mL	Líquido 10 ⁴ ufc/mL	Líquido 10 ⁵ ufc/mL	Líquido 10 ⁶ ufc/mL	
RI	1	37.63	48.69	33.82	62.21	23.70	68.91	63.12
	2	4.30	46.43	15.97	45.44	22.41	55.19	16.01
	3	5.20	34.95	11.40	33.31	17.67	34.67	18.72
	4	4.30	16.22	8.91	34.24	18.00	43.53	14.51
Promedio		12.86	36.57	17.53	43.80	20.45	50.58	28.09
RII	1	65.90	60.72	32.57	82.50	85.51	22.92	46.70
	2	83.53	65.83	22.72	64.62	85.78	23.08	40.45
	3	31.47	43.77	19.15	49.25	42.20	7.67	39.18
	4	35.95	53.03	26.67	15.38	34.98	-	33.95
Promedio		54.21	55.84	25.28	52.94	62.12	17.89	40.07
RIII	1	118.13	48.27	56.09	82.50	66.71	89.50	81.16
	2	68.81	34.81	40.44	64.62	38.03	60.77	89.53
	3	50.75	29.50	30.17	49.25	17.60	53.44	62.18
	4	53.41	32.16	32.79	15.38	31.26	47.13	35.08
Promedio		72.78	36.19	39.87	52.94	38.40	62.71	66.99
RIV	1	52.91	40.79	41.83	137.28	45.84	97.04	28.78
	2	90.44	27.98	51.35	45.68	32.90	24.40	21.50
	3	84.61	30.52	31.62	22.02	36.81	25.23	6.53
	4	56.53	15.72	23.88	11.59	35.10	19.91	-
Promedio		71.12	28.75	37.17	54.14	37.66	41.65	18.94
Promedio peso individual por tratamiento		52.74	39.34	29.96	50.95	39.66	43.21	38.52
Suma peso total por tratamiento		843.87	629.39	479.38	815.27	634.50	673.39	597.40

Campo

Repeti- Ciones	Túbero	Tratamientos						Testigo
		Polvo 10 ⁴ ufc/mL	Polvo 10 ⁵ ufc/mL	Polvo 10 ⁶ ufc/mL	Líquido 10 ⁴ ufc/mL	Líquido 10 ⁵ ufc/mL	Líquido 10 ⁶ ufc/mL	
RI	1	93.14	124.70	41.64	112.26	112.26	93.02	78.37
	2	62.60	139.02	96.21	51.77	102.92	67.52	112.14
	3	55.99	70.85	62.14	66.48	52.06	109.49	75.22
	4	51.45	114.88	46.02	75.98	76.61	49.33	104.71
	5	62.20	73.40	48.04	67.51	45.63	89.19	64.11
Promedio		65.08	104.57	58.81	74.80	77.90	81.71	86.91
RII	1	55.31	60.32	49.13	52.59	111.07	16.31	70.36
	2	56.37	92.37	38.78	89.29	26.66	42.79	59.36
	3	73.10	42.90	58.63	72.60	121.12	37.07	91.46
	4	72.51	78.51	61.08	62.20	72.00	112.26	79.01
	5	86.81	58.71	65.54	57.06	57.07	33.37	42.65
Promedio		68.82	66.56	54.63	66.75	77.58	48.36	68.57
RIII	1	105.25	53.09	80.15	61.31	65.83	116.43	44.44
	2	87.84	53.68	44.24	50.36	53.71	139.57	56.11
	3	52.90	64.77	31.41	86.29	60.41	78.98	41.60
	4	65.46	36.06	64.56	82.50	42.06	43.58	34.12
	5	55.75	79.29	59.00	32.46	96.42	41.29	92.34
Promedio		73.44	57.38	55.87	62.58	63.69	83.97	53.72
RIV	1	118.95	49.96	67.24	58.24	69.24	57.99	59.84
	2	73.28	55.04	68.43	75.04	45.60	30.82	68.61
	3	86.82	80.05	81.78	52.36	60.45	82.58	63.67
	4	72.00	53.46	53.17	53.91	41.44	91.72	61.37
	5	59.99	74.81	51.51	48.10	49.16	140.71	77.59
Promedio		82.21	62.66	64.43	57.53	53.18	80.76	66.22
Promedio peso individual por tratamiento		72.39	72.79	58.44	65.42	68.09	73.70	68.86
Suma peso total por tratamiento		1447.72	1455.87	1168.70	1308.31	1361.72	1474.02	1377.08

ANEXO 7 Test de homogeneidad de varianzas.

Variable dependiente	Estadística de Levene	df1	df2	Sig.
Peso de túberos de campo	1,69	6	21	0,17
Peso de túberos de invernadero	1,05	6	21	0,42
arcs- Brotación de túberos de campo	0,45	6	21	0,84
arcs- Evaluación 4 de campo	0,88	6	21	0,52
arcs- Evaluación 2 de invernadero	1,64	6	21	0,19
arcs- Evaluación 6 de invernadero	1,45	6	21	0,24
arcs- Emergencia de invernadero	15,38	6	21	0,00
Túberos sanos de campo en laboratorio	4,20	2	25	0,27

ANEXO 8 Tablas ANDEVA para las variables dependientes.

Tabla ANDEVA para la variable “arcsen-emergencia de plantas de invernadero”.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
TRATAM	0,28	6	0,05	2,74	0,05
BLOQUES	0,20	3	0,07	3,82	0,03
Error	0,31	18	0,02		
Total (Corr)	0,79	27			

Tabla ANDEVA para la variable “peso de túberos de cala de invernadero”.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
TRATAM	1428.49	6	238.08	0.93	0.50
BLOQUES	1191.51	3	397.17	1.56	0.23
Error	4592.51	18	255.14		
Total (Corr)	7212.51	27			

Tabla ANDEVA para la variable “arcsen-evaluación 2 de invernadero”

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
TRATAM	0.02	6	0.00	0.94	0.49
BLOQUES	0.01	3	0.00	1.40	0.28
Error	0.05	18	0.00		
Total (Corr)	0.08	27			

Tabla ANDEVA para la variable “arcsen-evaluación 6 de invernadero”.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
TRATAM	0,07	6	0,01	0,92	0,50 NS
BLOQUES	0,04	3	0,01	0,92	0,45 NS
Error	0,23	18	0,01		
Total (Corr)	0,34	27			

Tabla ANDEVA para la variable “arcsen-brotación de túberos de campo”.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
TRATAM	0,48	6	0,08	0,81	0,58 NS
BLOQUES	0,45	3	0,15	1,54	0,24 NS
Error	1,77	18	0,10		
Total (Corr)	2,71	27			

Tabla ANDEVA para la variable “arcsen-evaluación 2 de campo”.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
TRATAM	0.01	6	0.00	0.55	0.76 NS
BLOQUES	0.05	3	0.02	6.49	0.00
Error	0.04	18	0.00		
Total (Corr)	0.10	27			

Tabla ANDEVA para la variable “arcsen-evaluación 4 de campo”.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
TRATAM	0.01	6	0.00	0.94	0.49 NS
BLOQUES	0.01	3	0.00	3.05	0.05
Error	0.02	18	0.00		
Total (Corr)	0.05	27			

Tabla ANDEVA para la variable “arcsen-emergencia de túberos de campo”.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
TRATAM	0.02	6	0.00	0.84	0.55 NS
BLOQUES	0.01	3	0.00	0.99	0.42 NS
Error	0.07	18	0.00		
Total (Corr)	0.10	27			

Tabla ANDEVA para la variable “peso de túberos de campo”.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
TRATAM	686.77	6	114.46	0.77	0.60 NS
BLOQUES	960.70	3	320.23	2.17	0.13 NS
Error	2660.72	18	147.82		
Total (Corr)	4308.19	27			