

**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**Evaluación de Antibióticos, Productos Cúpricos y un
Controlador Biológico en el Control Preventivo de
Pseudomonas sp. en *Leucadendron* cv. Safari Sunset.**

Memoria de Título

Stephanie Danae López Saavedra

Talca – Chile

2005

**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**Evaluación de Antibióticos, Productos Cúpricos y un
Controlador Biológico en el Control Preventivo de
Pseudomonas sp. en *Leucadendron* cv. Safari Sunset.**

Por

Stephanie Danae López Saavedra

Memoria de Título

**Presentada a la
Universidad de Talca como
Parte de los requisitos para optar al título de**

INGENIERO AGRÓNOMO

Talca, 2005

APROBACIÓN:

Profesor Guía: Ing. Agr., M. Sc., Ph. D. Claudio Sandoval Briones
 Profesor Facultad de Ciencias Agrarias
 Universidad de Talca

Profesor Informante: Ing. Agr., M. Sc., Flavia Shiappacasse Canepa
 Profesor Facultad de Ciencias Agrarias
 Universidad de Talca

Fecha Presentación de Defensa de Memoria: 7 de Diciembre 2005.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer el apoyo de mis Padres y mi Familia, para poder completar este ciclo de mi vida.

Así como también a Don Claudio Sandoval Briones, por su comprensión y paciencia para la realización de esta memoria.

Dedicado con todo mi Amor a Hugo,
Angel y Maximiliano.

Gracias.

RESUMEN

Recientemente se ha identificado en Chile a *Pseudomonas syringae* como agente causal de manchas foliares en especies de flores de corte pertenecientes a la familia de las Proteáceas. Esta patología perjudica considerablemente la comercialización y exportación de éstas, ya que afecta la estética de las flores y el follaje e induce al rechazo en los puntos de inspección cuarentenaria en los países importadores. En este estudio se evaluó el efecto de cuatro alternativas de control preventivo de esta bacteria fitopatógena en *Leucadendron* cv. Safari Sunset. Los tratamientos evaluados fueron Sulfato de Estreptomicina más clorhidrato de oxitetraciclina, Sulfato de cobre pentahidratado, óxido cuproso y *Bacillus subtilis*. La variable evaluada fue el porcentaje de incidencia de la enfermedad a los 14, 28 y 42 días después de inoculación (DDI). Los resultados obtenidos demuestran que el ingrediente activo Sulfato de Estreptomicina más clorhidrato de oxitetraciclina en dosis comercial, corresponde al mejor tratamiento, no superando en éste el 40% de incidencia de la enfermedad a los 42 días después de inoculación (DDI).

ABSTRACT

Recently *Pseudomonas syringae* has been identified infecting Protea commercial fields in Chile. This bacteria produces leaf spots which affect the marketing and exportation of this flowers, and rejection at the custom inspection points in the importing countries. In this study it was evaluated the effect in the control of this disease in *Leucadendron cv. Safari sunset* of three different commercial products, and a antagonic microorganism was evaluated. The treatments included were: Streptomycine sulphate with oxitetraciclina clorhidrate, Pentahydrate copper sulphate, cuprose oxide, and *Bacillus subtilis*. The incidence of the disease was measured 14, 28 and 42 days after inoculation. The results obtained showed Streptomycine sulphate with oxitetraciclina clorhidrate as the best treatment, with incidence levels below 40% 42 days after inoculation.

ÍNDICE

1.	Introducción.....	1
	Objetivos Específicos.....	2
2.	Revisión Bibliográfica.....	3
2.1	Producción de Proteas.....	3
2.1.1	Descripción de <i>Leucadendron</i> cv. Safari Sunset.....	3
2.1.2	Patógenos del follaje en Proteáceas.....	4
2.1.3	<i>Pseudomonas</i> sp. y spp.....	5
2.1.4	Diseminación de <i>Pseudomonas</i> sp.....	5
2.1.5	Sintomatología.....	6
2.2	Alternativas de Control.....	7
2.2.1	Características de los Bactericidas para el control de <i>Pseudomonas</i> sp.....	8
2.2.2	Sulfato de Estreptomicina.....	8
2.2.3	Productos Cúpricos.....	8
2.2.4	<i>Bacillus subtilis</i>	9
3.	Materiales y Métodos.....	10
3.1	Ubicación del Ensayo.....	10
3.2	Material Vegetal.....	10
3.3	Obtención e identificación de <i>Pseudomonas</i> sp.....	10
3.4	Pruebas de Patogenicidad.....	11
3.5	Descripción del ensayo.....	11
3.6	Inoculación con <i>Pseudomonas</i> sp.....	13
3.7	Evaluaciones.....	13
3.8	Diseño Experimental.....	14
4.	Resultados y Discusión.....	15
4.1	Evaluación de antibióticos, productos cúpricos y un controlador biológico en el control preventivo de <i>Pseudomonas</i> sp. en <i>Leucadendron</i> cv. Safari Sunset.....	15
4.1.1	Incidencia de la enfermedad.....	15

5. Conclusiones..... 20

6. Bibliografía..... 21

1. INTRODUCCIÓN

El género bacteriano *Pseudomonas* es el causante de numerosas enfermedades en plantas de interés agrícola, provocando considerables pérdidas económicas. Una de las bacteriosis más importantes, es causada por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Braun-Kiewnick *et al.*, 1998, Latorre, 2004). Recientemente se ha identificado a *Pseudomonas syringae* como agente causal de manchas foliares en *Protea cynaroides* (Elgar, 1998) una de las más ampliamente reconocidas especies de flores de corte y follaje a nivel mundial, perteneciente a la familia de las Proteáceas (Leonhardt y Criley, 1999).

Las plantas de proteas infectadas con *Pseudomonas syringae* presentan manchas foliares bien definidas de color café oscuro (Elgar, 1998). Estos daños perjudican considerablemente la comercialización y exportación de estos productos, ya que afectan la estética de las flores y el follaje e inducen a rechazo en los puntos de inspección cuarentenaria (Taylor, 2001).

La presencia de *Pseudomonas* sp. en proteas ha sido recientemente descrita en diferentes zonas productivas de Chile, lo que la señala como un problema potencial para el desarrollo del creciente mercado de las proteas en nuestro país (Herrera, 2004). La mayoría de las evaluaciones de productos para controlar *Pseudomonas* sp. han sido realizadas en tomate y cucurbitáceas, de esta forma se considera necesario realizar un estudio más exhaustivo de los controles convencionales de esta bacteria en proteas.

El objetivo de la presente memoria fue investigar el efecto de distintas alternativas de control de *Pseudomonas* sp. en una proteácea llamada *Leucadendron* cv. Safari Sunset, de tal forma de determinar el tratamiento más efectivo. Entre los productos evaluados están Óxido Cuproso (n.c. Cuprodul), Sulfato de Estreptomicina más Clorhidrato de oxitetraciclina (n.c. Streptoplus), sulfato de Cobre Pentahidratado (n.c. Phytón) y un biocontrolador, *Bacillus subtilis*. Se

determinó la incidencia del ataque del patógeno sobre plantas de protea del género *Leucadendron* cv. Safari Sunset.

El objetivo propuesto se basa sobre la evidencia de que los productos a utilizar han controlado *Pseudomonas* sp. en forma efectiva en otras especies cultivables de importancia agrícola. Por otra parte, *Bacillus subtilis* ha sido utilizado con buenos resultados en el control de bacterias fitopatógenas, por lo tanto podría controlar *Pseudomonas* sp. en proteáceas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Producción de Proteas

La exitosa comercialización de proteas en Sudáfrica ha logrado despertar el interés de otros países en este cultivo (Robyn y Littlejohn, 2001), entre los que se cuentan Israel, Australia, Nueva Zelanda y Chile, entre otros. Sin embargo el cultivo comercial de proteas sigue siendo un fenómeno reciente, con un tamaño de la industria pequeño y con escasos fondos para la investigación (Taylor, 2001). El evidente potencial para la producción de esta flor de corte, y la insuficiente información sobre enfermedades fungosas y bacterianas, las cuales asociadas a condiciones climáticas favorables pueden transformarse en un gran problema (Wright y Saunderson, 1995, citado por Taylor, 2001), ha llevado a la realización del presente estudio sobre distintos métodos de control de manchas foliares, causadas por *Pseudomonas* sp. en *Leucadendron* cv. Safari Sunset, el cual es uno de los cultivares más ampliamente cultivado para la obtención de flor de corte y follaje (Perez *et al.*, 2001).

2.1.1 Descripción de *Leucadendron* cv. Safari Sunset

Este híbrido altamente difundido para la obtención de flores de corte en España, Israel y Australia (Perez *et al.*, 2001) fue producido en Nueva Zelanda para adecuarse a las condiciones de suelo existentes en este país. Sus padres *Leucadendron salignum* y *Leucadendron lauroolum*, son especies nativas de Sudáfrica (Silber y Ben Jaacov, 2001). Es una planta hembra, muy vigorosa y de rápido desarrollo y hábito de crecimiento arbustivo. Presenta ramas que sobrepasan los 60 centímetros (Tjia, 1987 citado por Obreque, 2004) e incluso pueden llegar a medir entre dos y tres metros de altura (Mathews, 2002). El color rojo intenso de sus

brácteas, la longitud de sus tallos y su prolongada vida post cosecha, hacen que este híbrido sea muy demandado por los productores de flores de corte (Mathews, 2002).

Se cultiva en suelos profundos, pobres en nutrientes, livianos, con buen drenaje y un pH entre 5.0 y 6.5. Con respecto al clima, es moderadamente resistente a las heladas, tolerando alrededor de -6°C (Mathews, 2002) y el cultivo a pleno sol es esencial para obtener el máximo colorido de las brácteas.

2.1.2 Patógenos del follaje en Proteáceas

Las enfermedades que afectan el follaje por lo general son muy importantes y económicamente significativas en flores de corte, no sólo por razones monetarias sino también fitosanitarias desde el punto de vista de la exportación.

Se han descrito patógenos del follaje que afectan distintos órganos de las plantas. Estos patógenos son *Mycosphaerella proteae*, *Leptosphaeria protearum* y *Batcheloromyces proteae* (Knox-Davies, 1989).

Por otra parte, se señala como agentes causales de manchas foliares los hongos *Coleroa senniana*, *Vizella interrupta* (Lubbe, 2001), *Alternaria alternata* y *Cladosporium* sp. (Herrera, 2003). Recientemente existe información de *Pseudomonas syringae* que afecta el follaje en *Protea cynaroides* (Elgar, 1998), causando manchas foliares que perjudican la exportación de este tipo de flor. En Chile *Pseudomonas* sp., fue descrita por Herrera 2003, afectando a los géneros *Protea*, *Leucospermum* y *Leucadendron* en muestras de plantas recolectadas en la localidad de Pichilemu y Licantén respectivamente.

2.1.3 *Pseudomonas* sp. y spp.

Constituyen bacterias Gram negativas (-), aeróbicas con un flagelo polar, que afectan a muchos cultivos. Especies de este género bacteriano causan enfermedades de importancia en cultivos de tomate y cucurbitáceas (Apablaza, 1999), al igual que en frutales de carozo. Entre estos se puede mencionar Peca bacteriana en tomate y Cáncer bacterial en cerezo (Latorre, 2004).

Por otra parte se ha descrito a *Pseudomonas syringae* como agente causal de manchas foliares en Lila (*Syringa vulgaris* L.), de donde procede su nombre. Este patógeno causa la desecación de los tejidos infectados, lo que se traduce en una fina lesión, que se agrieta una vez que la hoja se expande, y ocurre una posterior deformación de las mismas. Dentro de los bactericidas recomendados en Estados Unidos, para el control en plantas de maceta, están los productos derivados del cobre, como *Sulfato de cobre pentahidratado* e *Hidróxido de cobre*. Sin embargo deben ser complementados con controles culturales y sanitarios para un mejor resultado (Daughtrey *et al.*, 2001). La bacteria se ve favorecida en su desarrollo en la planta por una alta humedad (> 80%) y temperaturas frescas entre 18-19°C (Padilla, 1998).

2.1.4 Diseminación de *Pseudomonas* sp.

La forma de dispersión se refiere a la movilización desde la fuente de inóculo, hasta la zona infectable del hospedero (Trapero, 1996). Las bacterias fitopatógenas utilizan diferentes métodos de diseminación, los que se pueden modificar o sufrir ciertas adaptaciones, según las condiciones climáticas existentes, principalmente el viento y las precipitaciones (Trapero, 1996).

Las bacterias fitopatógenas y en particular *Pseudomonas* sp. utiliza el agua de lluvia como mecanismo de diseminación (Sandoval, 1998). En hortalizas los medios de diseminación lo constituyen el suelo contaminado y semillas infectadas. En proteas estos medios de

propagación podría ser un eficaz medio de transmisión de las bacterias, además de la forma de propagación que es través de estacas.

2.1.5 Sintomatología

Los síntomas de enfermedades causadas por especies de este género bacteriano en otros cultivos de interés agrícola, como tomate y cucurbitáceas principalmente, corresponden a manchas foliares de forma circular y tamaño variable de color café oscuro presentando a veces un halo clorótico rodeando estas manchas (Shert y Mac Wals, 1986, citado por Apablaza, 1989).

En proteas los síntomas observados, específicamente en *Protea Cardinal* en la localidad de Putú, fueron lesiones o manchas rojizas más o menos circulares, las que en algunos casos presentaban una coloración más parda (Herrera, 2003). Así mismo en la localidad de Pichilemu se recolectaron plantas de proteas *Leucadendron cv. Inca Gold*, con síntomas de manchas foliares causadas por *Pseudomonas sp.*



Figura 2.1 Mancha foliar causada por *Pseudomonas sp.* en *Leucadendron cv. Inca Gold*

Fuente: Herrera 2003.

2.2 Alternativas de Control

Según Lubbe (2001) no existe un control que sea efectivo una vez que el patógeno ha ingresado a la planta, por lo tanto éste debe basarse en la prevención.

El control de las enfermedades bacterianas de las plantas generalmente es muy difícil, por que requiere de una combinación de varios métodos tanto culturales como químicos para poder combatirlos (Agrios, 1996). El uso de pesticidas como Sulfato de cobre y óxido cuproso, entre otros, para el control de enfermedades bacterianas ha sido poco eficiente, en relación a los resultados obtenidos con enfermedades fungosas (Agrios, 1996). Esto debido principalmente a las condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad.

El ajuste de métodos para impedir el ingreso de bacterias fitopatógenas debe basarse en sistemas de prevención, como la utilización de semillas y plantas sanas, uso de plantas resistentes, desinfección de suelos complementado con aplicaciones de químicos (Agrios, 1996).

Otra medida es el empleo de biocontroladores, que constituye una alternativa viable para el control de bacterias fitopatógenas. Tal es el caso del organismo antagonista *Bacillus* sp., el cual recientemente ha demostrado ser efectivo en el control de hongos y bacterias (Agrios, 1996; citado por Toledo, 2004).

2.2.1 Características de los bactericidas para el control de *Pseudomonas* sp.

Los productos utilizados para el control de enfermedades bacterianas corresponden a productos cúpricos, sulfato de estreptomicina y, recientemente, el uso de organismos antagonistas.

2.2.2 Sulfato de Estreptomicina

Su modo de acción es sistémico, preventivo y curativo. La estreptomicina es producida por el actinomiceto *Streptomyces griseus*. Ésta se une a los ribosomas bacterianos e inhibe la síntesis de proteínas, el proceso de iniciación de las cadenas pépticas y el reconocimiento de los tripletes normales (Agrios, 1996). El bactericida **Streptoplus** corresponde a la combinación de dos antibióticos (**Sulfato de Estreptomicina** y **Clorhidrato de oxitetraciclina**), de modo que impide la aparición de razas resistentes. Se absorbe por hojas y tejido en crecimiento. Se utiliza ampliamente para el control de enfermedades bacterianas en forma de aspersiones (Agrios, 1996).

2.2.3 Productos cúpricos

Los productos cúpricos son productos que actúan por contacto y preventivamente sobre hongos y bacterias que atacan a frutales y cultivos. El **Óxido Cuproso** es una de las formas más activas del cobre como fungicida. Presenta una alta eficiencia en su concentración 50% p/p y el tamaño reducido de las partículas permiten cubrir una mayor superficie por contacto y por ende lograr una mayor actividad para impedir la germinación de las esporas del hongo (AFIPA, 1998). Con respecto a **Sulfato de Cobre Pentahidratado**, corresponde a un bactericida sistémico, de amplio espectro de acción, de acuerdo a sus fabricantes. Previene enfermedades en hortalizas, cultivos tradicionales y ornamentales. Está recomendado para aplicaciones en precosecha (AFIPA, 1998).

2.2.4 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis corresponde a una bacteria gram-positiva con forma de bastones, que presentan un flagelo lateral. Sus endosporas son de forma ovalada o cilíndrica las que se ubican en el centro de la célula. Es aeróbica estricta, y no requiere de ningún factor en particular para su crecimiento. Las colonias presentan forma circular o irregular (Cook y Baker, 1983; citados por Toledo, 2004),

Las especies de *Bacillus* spp. asociadas a plantas son reconocidas como agentes biocontroladores (Chun y Vidaver, 2001), ya que tienen la capacidad de producir un amplio espectro de antibióticos como péptidos, lipopéptidos y aminoglicósidos (Silo-Suh *et al.*, 1998, citados por Duffy *et al.*, 2003). Según Duffy *et al.*, (2003) la raza CL27 de *Bacillus subtilis* es capaz de producir al menos tres compuestos con capacidad antibiótica, siendo dos de ellos reconocidos como péptidos. Por otra parte Toledo (2004) describe que *Bacillus subtilis* libera compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas. Entre las enfermedades fúngicas controladas por *Bacillus subtilis* se encuentran *Rhizoctonia* sp., *Cercospora* sp., *Botrytis cinerea* y *Alternaria brassicola* (Agrios, 1996; Chun y Kidaver, 2001; Duffy *et al.*, 2003). Con respecto al control de bacterias fitopatógenas, se determinó que *Bacillus subtilis* cepa 102-2 presenta una acción inhibitoria sobre *Erwinia carotovora* en condiciones *in vitro* (Toledo, 2004). Otro antecedente sobre la acción controladora de *Bacillus subtilis* es el descrito por Agrios (2004), donde distintas variedades de duraznos, nectarines, damascos y ciruelos, fueron tratados después de haber sido cosechados con suspensiones de la bacteria antagonica *Bacillus subtilis*. Estos permanecieron libres de la pudrición café, que es causada por el hongo *Monilinia fruticola*, cuando menos durante nueve días.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del ensayo

Los ensayos para esta memoria se realizaron en el invernadero de floricultura, el cual se encuentra ubicado en el sector suroriente del Campus Lircay de la Universidad de Talca, Talca, Chile. El período de pruebas y evaluaciones abarcó desde diciembre de 2003 hasta febrero de 2004.

3.2 Material Vegetal

Para este ensayo se utilizaron plantas del híbrido *Leucadendron* cv. Safari Sunset, cuyas estacas se recolectaron en marzo de 2003 en la localidad de Putú, ubicada a 25 km de Constitución, provincia de Talca. Las estacas fueron posteriormente enraizadas en cama caliente en bandeja speedling de plástico a una temperatura basal promedio de 23°C, bajo nebulización. El enraizamiento se inició el 20 de marzo de 2003 y el transplante se realizó el 26 de mayo de 2003. Las plantas fueron transplantadas a bolsas de polietileno de 395 cm³ de capacidad que contenían tierra de la localidad de Putú. Dichas plantas al momento del transplante presentaban una altura de 9 cm y en promedio 2 brotes. El material fue mantenido en invernadero hasta el comienzo del ensayo y luego durante todo el periodo de evaluación.

3.3 Obtención e identificación de *Pseudomonas* sp.

Las muestras de tejido desde las que se aisló *Pseudomonas* sp., se obtuvieron de plantas de *Protea cynaroides* recolectadas en la localidad de Pichilemu, zona costera de la VI región, Provincia del Cardenal Caro. A partir de éstos se aisló la bacteria en medio de cultivo agar nutritivo. Para la identificación de *Pseudomonas* sp., se consideraron características de coloración de la colonia y fluorescencia en agar nutritivo, al igual que la reacción a la prueba de

solubilidad del Hidróxido de Potasio (KOH) y tinción en gram. Esto fue asociado a los síntomas observados en el material vegetal (plantas de *Protea cynaroides*) del cual se aisló la bacteria, el que presentaba manchas cloróticas (Herrera, 2004).

3.4 Pruebas de patogenicidad

Con la finalidad de comprobar si la bacteria *aislada* en cultivo puro se encontraba en estado patogénico, y si las plantas de *Leucadendron cv. Safari Sunset* eran susceptibles a dicha bacteria, se realizaron pruebas de patogenicidad, inoculando cinco plantas del mismo cultivar con el patógeno. El inóculo se obtuvo de una placa petri, mantenida en cámara de frío a 4°C con presencia de colonias de *Pseudomonas sp.* Con un asa de platino se extrajeron colonias de la misma y se incorporaron a un matraz erlenmeyer con agua destilada estéril, agitándose por un período prolongado para lograr la obtención de una suspensión homogénea de las bacterias. Posteriormente con una jeringa estéril se aplicó la bacteria en ambos lados de la hoja (haz y envés) de *Leucadendron cv. Safari Sunset*. Luego las plantas se cubrieron con bolsas de polietileno transparente, a las que se le realizaron orificios para facilitar el intercambio gaseoso. Estas fueron dejadas durante 3 semanas a temperatura ambiente, observándose presencia de síntomas visibles a los 15 días post inoculación.

3.5 Descripción del ensayo

La aplicación de los tratamientos más el biocontrolador *Bacillus subtilis*, se efectuó 6 días antes de la inoculación con *Pseudomonas sp.* el 6 de enero de 2004 mediante la técnica de aspersión. La cantidad de suspensión aplicada para cada producto fue 50 ml por planta, siendo cada producto diluido previamente en 2000 ml de agua destilada utilizando la dosis comercial recomendada para cada uno de ellos. Los tratamientos evaluados para determinar su efectividad en el control de *Pseudomonas sp.*, se presentan en el Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1. Tratamientos evaluados en el control preventivo de *Pseudomonas* sp. en *Leucadendron* cv. Safari Sunset .Talca, Temporada 2003/2004.

Tratamientos		Dosis Aplicada (producto comercial)
T0	Testigo	0
T1	Sulfato de Estreptomicina-Clorhidrato de Oxitetraciclina ¹	1g/L
T2	Sulfato de Cobre Pentahidratado ²	1ml/L
T3	Oxido Cuproso ³	3 g/L
T4	<i>Bacillus subtilis</i>	1x10 ¹² UFC ⁴ /L

Producto comercial

¹ Strepto Plus

² Phyton

³ Cuprodul WG

⁴ UFC: Unidades Formadoras de Colonia

3.6 Inoculación con *Pseudomonas* sp.

La inoculación se realizó el día 12 de enero de 2004. El patógeno fue reaislado en agar nutritivo desde las plantas utilizadas en las pruebas de patogenicidad y a partir de éste se preparó el inóculo de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 3.4. Cada planta de *Leucadendron* cv. Safari Sunset, fue inoculada con 50 ml de suspensión de la bacteria, con una concentración de 1×10^9 UFC/ml con ayuda de una jeringa estéril en ambos lados de las hojas. Para determinar la concentración de las bacterias aplicada se utilizó la cámara de Neubauer, y de acuerdo al conteo obtenido se ajustó el valor deseado realizando diluciones. La fórmula empleada corresponde a:

$$\text{Partículas}/\mu\text{l} = \frac{\text{Partículas contadas}}{\text{Profundidad cámara de dilución} * \text{Dilución} * \text{Superficie contada}}$$

Donde:

Profundidad de cámara = 0,100 mm

Dilución = 1

Superficie contada = 0,0025 mm²

Partículas / μl = Bacterias por microlitros (b/ μl)

3.7 Evaluaciones

Se midió la incidencia de la enfermedad sobre plantas de *Leucadendron* cv. Safari Sunset (que corresponde al porcentaje (%) de plantas enfermas por tratamiento). Para esto se realizaron evaluaciones a los 7, 14, 28 y 42 días después de inocular (DDI) el patógeno.

La incidencia de la enfermedad se expresó en porcentaje (%) empleando la fórmula.

$$\text{Incidencia (I)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de individuos afectados}}{\text{Total individuos (Plantas)}} * 100$$

3.8 Diseño experimental

Para este ensayo se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA) con 5 tratamientos y cuatro repeticiones. La unidad experimental estuvo constituida por 10 plantas de *Leucadendron* cv. Safari Sunset.

Finalmente, los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa estadístico Statgraphics Plus, realizando un análisis de varianza y transformación de las variables utilizando $\sqrt{x/100}$, y en caso de existir diferencias significativas entre los tratamientos, éstos fueron sometidos a la prueba de separación de medias LSD, con un nivel de significancia de un 5%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación de antibióticos, productos cúpricos y un controlador biológico en el control preventivo de *Pseudomonas* sp en *Leucadendron* cv Safari Sunset.

Los resultados que se muestran en la figura 4.1 muestran los niveles de incidencia obtenidos por los distintos tratamientos preventivos evaluados en el control de *Pseudomonas* sp.

A pesar de que durante el desarrollo del ensayo se realizaron cuatro evaluaciones, sólo se presentan las tres últimas, puesto que a los siete días después de inoculación (primera evaluación) aún no se observaban síntomas del patógeno.

4.1.1 Incidencia de la enfermedad

Se detectaron diferencias altamente significativas ($p \leq 0,01$) entre las medias de los tratamientos a los 14 días después de inoculación (DDI) con el patógeno. Para cada una de las evaluaciones, las plantas tratadas con *Sulfato de estreptomicina más clorhidrato de oxitetraciclina* (StreptoPlus) presentaron una menor incidencia de la enfermedad, con respecto al testigo, cuyas plantas presentaron una incidencia que varió entre 0% a los 14 DDI, y 32,85% a 39.1% a los 28 y 42 DDI, respectivamente (figura 4.1). Por otra parte, las plantas tratadas con *Sulfato de cobre pentahidratado* presentaron un 4.6% de incidencia de la enfermedad a los 14 DDI, no siendo este valor significativamente distinto del tratamiento con *Sulfato de estreptomicina más clorhidrato de oxitetraciclina*. A los 28 DDI no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, siendo todos ellos estadísticamente similares. Finalmente, en la evaluación a los 42 DDI, sólo las plantas tratadas con *Sulfato de estreptomicina más clorhidrato de oxitetraciclina* presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al tratamiento testigo (Figura 4.1).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede afirmar que bajo las condiciones de este ensayo el tratamiento con *Sulfato de estreptomina más clorhidrato de oxitetraciclina* (StreptoPlus) en dosis comercial, sería el mejor tratamiento preventivo para el control de *Pseudomonas* sp. en plantas de *Leucadendron* cv. Safari Sunset, lo anterior en base a los resultados de incidencia (%) obtenidos.

Sin embargo el empleo de un sólo tipo de producto puede llevar al desarrollo de resistencia por parte de algunas poblaciones de bacterias, por lo tanto no sería recomendable basar todo el programa fitosanitario en la aplicación de este producto (n.c. Streptoplus).

Además a nivel mundial existe una tendencia a eliminar o disminuir el uso de este tipo de pesticidas, básicamente por el riesgo que su aplicación implica desde el punto de vista de la aparición de bacterias resistentes. Así mismo existe el inconveniente del costo de este producto, lo que aumenta los costos de producción.

Por otra parte, el método de inoculación empleado puede haber llevado a subestimar el real efecto de los productos evaluados. La bacteria fue aplicada de manera dirigida a las plantas, cosa que no ocurre en la naturaleza. Además la concentración del patógeno en la suspensión era elevada (1×10^9 UFC/ml). Todo lo anterior queda demostrado en los niveles de incidencia observados, los que son extremadamente altos al final del ensayo, alcanzando casi un 40% en el tratamiento que presentó el mejor comportamiento (fig 4.1).

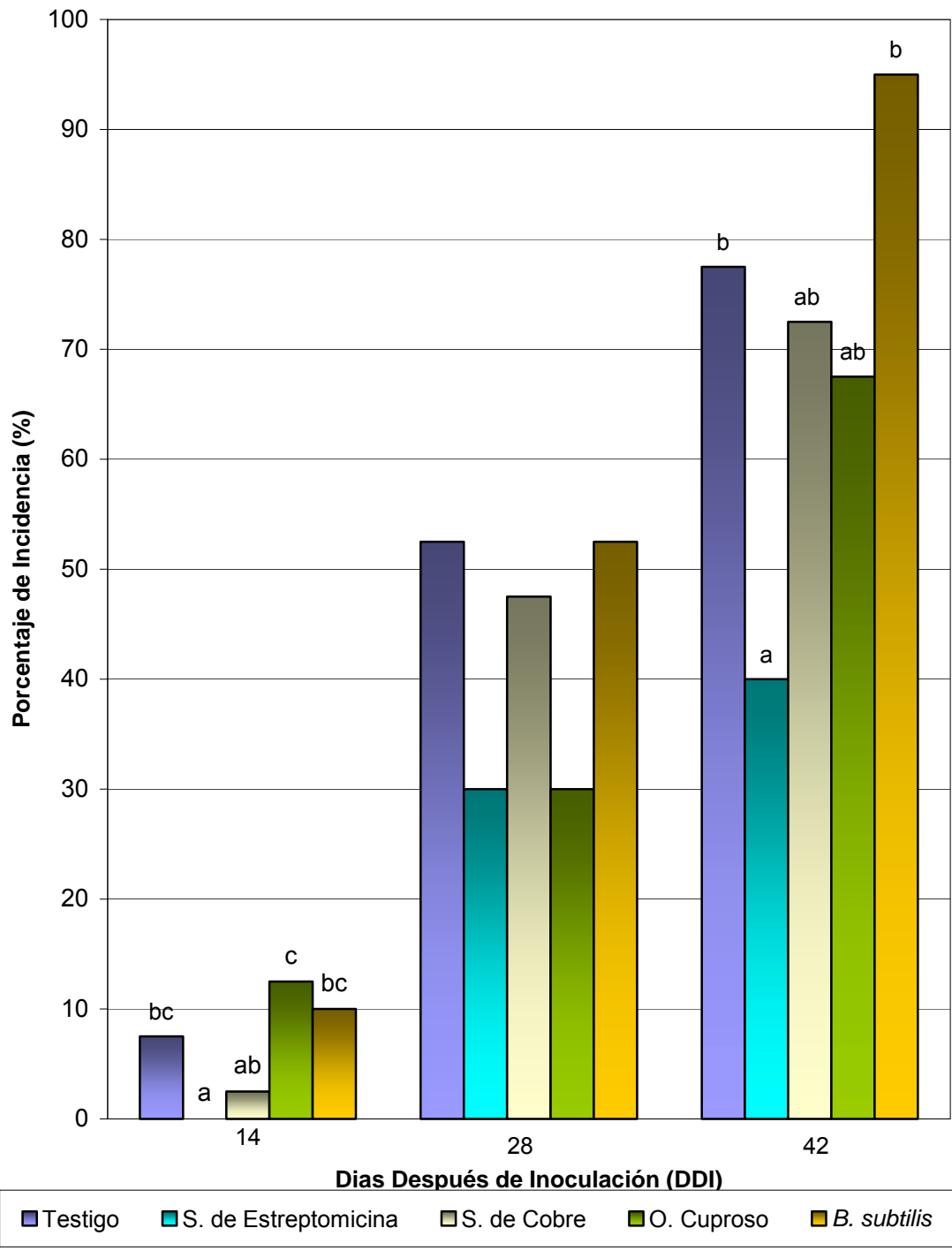


Figura 4.1 Efecto de cinco tratamientos, sobre el control preventivo de *Pseudomonas* sp. en plantas de *Leucadendron* cv. Safari Sunset. Temporada 2004, Talca.

Según Lee *et al.*, 1994, citado por Agurto *et al.*, 1998, el uso repetitivo de bactericidas cúpricos ha provocado la aparición de cepas resistentes, lo que explicaría el porqué en algunos huertos no se logra un control eficiente. Lo anterior justifica en parte la baja eficiencia de los productos utilizados en este ensayo (*óxido cuproso y sulfato de cobre pentahidratado*).

En Chile, la existencia de bacterias resistentes a productos cúpricos, se pudo corroborar en 1997 en *Xanthomonas campestris* pv *juglandis* en un nocedal ubicado en la VI Región, que fue sometido a un mayor número de aplicaciones de productos cúpricos y a bajas dosis durante la temporada de crecimiento (Agurto, 1998). Por otra parte el año 2000 lo mismo fue reportado para *Pseudomonas syringae* pv *syringae* afectando un huerto de perales ubicado en la VI Región.

Cabe mencionar que bajo las condiciones de este ensayo, pudieron existir otros factores que habrían influido en los resultados finales, como es el caso del sistema de riego de las plantas empleado. Este consistía en aplicar en forma de lluvia el agua, lo cuál podría haber provocado un lavado de la superficie de la hoja de los productos evaluados. Este es un punto importante a tener en cuenta al momento de analizar los resultados obtenidos. Por lo tanto en futuras evaluaciones sería recomendable aplicar el agua directamente sobre el sustrato de las macetas. Otro punto que se debe considerar es que en condiciones de campo llueve en la época invernal, que es el momento en que ocurre la colonización de la bacteria. Este ensayo fue realizado en enero de 2004, siendo las temperaturas altas desfavorables para el desarrollo del patógeno, pero la concentración del patógeno en la suspensión era elevada, siendo éste un factor favorable para el desarrollo de la enfermedad.

Con respecto a las técnicas utilizadas en este ensayo, se podrían mejorar en próximos estudios ciertos aspectos como concentración del patógeno a inocular, de tal forma de aplicar poblaciones lo más cercanos a lo que ocurre en la naturaleza, aplicar el riego como ya se ha

señalado de forma localizada, regular la humedad relativa y temperatura al interior del invernadero, así como la ventilación del mismo.

En el caso del biocontrolador *Bacillus subtilis*, existen antecedentes que mencionan a *Pseudomonas syringae* y otras especies del mismo género como productores de un antibiótico llamado *Syringomicina*, el cual tiene una alta actividad en contra de bacterias gram positiva. Estas toxinas bacterianas tienen un amplio espectro de actividad sobre posibles competidores epífitos. Así mismo, muchos patovares de *Pseudomonas syringae* producen toxinas que provocan el cierre estomático como estrategia para impedir el ingreso de potenciales antagonistas (Duffy *et al.*, 2003). De acuerdo a esto se puede explicar la baja acción observada de este biocontrolador sobre el patógeno, alcanzando el tratamiento con aplicación del biocontrolador valores de incidencia de la enfermedad de un 95% en la última fecha de evaluación (42 DDI).

5. CONCLUSIONES

- Bajo las condiciones de este ensayo el bactericida **Sulfato de Estreptomicina más Clorhidrato de oxitetraciclina** (n.c. Streptoplus) aplicado en dosis comercial en preinfección en plantas de *Leucadendron* cv. Safari Sunset, constituye la mejor alternativa de control de *Pseudomonas* sp., observándose una incidencia de la enfermedad de un 0% a los 14 DDI y no llegando a superar el 40% a los 42 DDI (última evaluación).
- Con respecto a los tratamientos con **Sulfato de Cobre Pentahidratado y Óxido Cuproso**, éstos no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo a los 28 y 42 días postinoculación del patógeno, excepto en la primera fecha de evaluación.
- **Bacillus subtilis**, de acuerdo a los resultados obtenidos no representa una alternativa viable para el control de *Pseudomonas* sp.
- Los síntomas asociados a la presencia de *Pseudomonas* sp. fueron leves manchas cloróticas en las hojas y posterior pardeamiento de las mismas, lo que concuerda con lo descrito por Herrera (2003).

6. BIBLIOGRAFIA

Agrios, G. 1996. Fitopatología. 2ª edición. Editorial Limusa, S.A. Mexico. 838 p.

Agurto, L., Esterio, M. y Auger, J. 1998. La resistencia al ión cobre en bacterias fitopatógenas en Chile. Aconex N° 69. 1998. p 8-14.

AFIPA. 1998. Manual Fitosanitario 1998-1999. 700 p.

Apablaza, G. 1999. Patología de cultivos, epidemiología y control holístico. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 347 p.

Braun-Kiewnick, A. y Sands, D.,2001. Pseudomonas, Capitulo II Gram-Negative Bacteria. In Plant Pathogenic Bacteria. p 85-117.

Daughtrey, M., Wick, R. y Peterson, J. 2001. Plagas y Enfermedades de las Plantas en Maceta con Flores. The American Phytopathological Society. Ediciones Mundi-Prensa. 90 p.

Duffy, B., Schouten, A. y Raaijmakers, J.M. 2003. PATHOGEN SELF-DEFENSE: Mechanisms to Counteract Microbial Antagonism. Annu. Rev. Phytopathol. 2003. 41:501–38.

Disponible en

<http://www.mykopat.slu.se/Newwebsite/kurser/SUMMER05/READING/de%20Boer/Duffy03.pdf>.

Consultado 30 de julio de 2005.

Elgar, J. 1998. Proteaceae - Flower and Foliage Production. HortResearch, Mt Albert HortFACT. <http://www.hortnet.co.nz/publications/hortfacts/hf308001.htm>. Consultado el 30 de Julio de 2005.

Herrera, R. 2004. Prospección de Enfermedades Asociadas a las Proteáceas cultivadas comercialmente en Chile. Memoria de título. Escuela de Agronomía Universidad de Talca. 49 p

Knox-Davies, P. 1989. Diseases of proteas and their control in the South Western Cape. *Acta Horticulturae*, 185: 189-200.

Latorre, B. 2004. Enfermedades de las Plantas Cultivadas. Sexta edición. Ediciones Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago. 638 p.

Leonhardt , K. y Criley, R. 1999. Proteaceae floral crops: cultivar development and underexploited uses. Disponible en www.hort.purdue.edu . Consultado el 30 de Julio de 2005.

Lubbe, K. 2001. Plant protection for fynbos crops. Disease Management. En: ARC-Fynbos Unit. Fynbos cultivation course, LNR ARC, Elsenburg, South Africa. (8) 1-7.

Mathews, L. 2002. The Protea book, a guide to cultivated proteaceae. New Zealand, Cantenbury University Press. 467p.

Padilla, C. 1998. Manual de Microbiología. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Talca, Talca, Chile.

Perez, J.F., Melian – Capote, M.N., y Martin, - Perez, R., 2001. An Anatomical Study of Adventitious Root Development in Wounded Cuttings of *Leucadendron discolor* and *Leucadendron Safari Sunset* (Proteaceae). Proceedings of the fifth International Protea Research Simposium. *Acta Horticulturae* 545: 191-194.

Ramos, R. 2002 .My Home Page – Cursos – Crecimiento Microbiano. Perú. Disponible en http://www.geocites.com/roberto_raul/crecimiento.html . Consultado el 30 de Julio de 2005.

Robyn, A. y Littlejohn, G.M. 2001. Hybridizing Leucadendron. Proceedings of the fifth International Protea Research Symposium. Acta Horticulturae 545: 73-76.

Sandoval, C. 1998. Apuntes de cátedra. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Talca.

Silber, A., y Ben Jaacov, J. 2001. Overcoming Soil Problems in Cultivating “Safari Sunset” In Israel. Proceedings of Fifth International Protea Research Symposium. Acta horticulturae. 545: 289-293.

Taylor, J. 2001. Proteaceae Pathogens: The significance of their distribution in relation to recent changes in phytosanitary regulations. Proceedings of the fifth international Protea research symposium, Puerto de la Cruz, España, 2000. p 253-263.

Toledo, D. 2004. Evaluación in vitro de cepas nativas de bacteria *Bacillus* sp. en el biocontrol de la bacteria *Erwinia carotovora*. Memoria de título. Escuela de Agronomía. Universidad de Talca. 32 p.

Trapero, A. 1996. Los Hongos Fitopatógenos. Patología Vegetal. Ediciones Phytoma-España. 1165 p.

Von Broembsen, S.L., 1989. Diseases of cut-flower *proteas*. Plant protection Research Institute. 43p

