

BIOCONTROL DE *Erwinia carotovora* EN CALA (*Zantedeschia* sp)

Juan Nissen M.³, Jessica Carrión S.³, Luigi Ciampi P.¹, Marcia Costa L.², Ricardo Fuentes P.¹, y Renate Schöbitz T.²

¹Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. ²Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos,

³Instituto de Ingeniería Agraria y Suelos. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile. E-mail: <lciami@uach.cl>

ABSTRACT

Biocontrol of *Erwinia carotovora* on calla (*Zantedeschia* sp).

Key words: *Erwinia carotovora*, *Bacillus subtilis*, biocontrol, calla.

Two studies were carried out to evaluate the antagonistic capacity of a *B. subtilis* strain against *E. carotovora* on calla. In study one, one substrate was infested with two levels of *Erwinia* and another was without infestation. After 24 hours, tubers of *Zantedeschia* sp, var. Lady Lack were planted (scalpel incised) on the substrate. For the second study, one level of infestation was used. *Zantedeschia* sp were planted and inoculated with 5 concentrations of the antagonistic strains. The first study was carried out under controlled conditions and the second one under greenhouse conditions.

Results of the first study showed that concentrations of antagonistic BC10 strains of *B. subtilis* at levels of 10^4 , 10^6 and 10^8 CFU/mL in the medium pathogen level showed a positive but not significant inhibiting capacity against *E. carotovora*. Concentrations of BC10 strains of 10^{14} CFU/mL interacted positively with *E. carotovora* and increased the severity of the disease. Tubers were observed to be asymptomatic transmitters of the disease. In the second study, where wounds were not induced in the tubers, no differences between treatments were observed, with all plants showing normal development and a high percentage of survival.

RESUMEN

Palabras claves: *Erwinia carotovora*, *Bacillus subtilis*, biocontrol, cala.

Se realizaron dos ensayos con la finalidad de evaluar la capacidad antagonista de una cepa de *B. subtilis* frente a *E. carotovora*, en calas (*Zantedeschia* sp). En el primer ensayo, se infectó el sustrato con dos niveles del patógeno. Luego de 24 horas, se plantaron tuberos de calas de la variedad Lady Lack (con incisiones para facilitar la infestación con *Erwinia*). El ensayo presentó 3 niveles de patógeno, 6 concentraciones del antagonista y con cuatro repeticiones. En el segundo ensayo sólo hubo un nivel de infestación. En este ensayo se plantaron tuberos de cala en bolsas y al sustrato se le agregaron 5 concentraciones de la cepa antagonista. El primer ensayo se realizó bajo condiciones controladas, en tanto que el segundo se llevó a cabo bajo invernadero. Los resultados mostraron, en el caso del primer ensayo, que concentraciones de la cepa antagonista BC10 del orden de 10^4 , 10^6 y 10^8 UFC/mL en el nivel de infestación medio del patógeno, presentan una capacidad inhibitoria positiva, pero no significativa, frente a *E. carotovora*. Al existir interacción entre *E. carotovora* y altas concentraciones de la cepa BC10, del orden de 10^{14} UFC/mL, se incrementa la severidad de la enfermedad. También se pudo observar que los tuberos son transmisores asintomáticos de la enfermedad. En el segundo ensayo, donde a los tuberos no se les indujeron heridas, no hubieron diferencias entre los tratamientos, presentando todas las plantas un desarrollo normal y un alto % de sobrevivencia.

INTRODUCCION

En Chile, el cultivo comercial de calas (*Zantedeschia* sp) fue iniciado hace más de 10 años, cada vez con un mayor aumento, gracias a la incipiente exportación a los mercados de Holanda y Estados Unidos. Las principales Regiones de producción como flor para corte y producción de tuberos son la Metropolitana, Novena, Décima y Duodécima. En los últimos años se ha visto un gran aumento en la superficie cultivada con cala de color en la provincia de Valdivia, Región de los Lagos, donde las condiciones de agua, luz y temperatura son las adecuadas para esta planta. Su cosecha se realiza entre fines de noviembre y enero. Para avanzar con éxito en este negocio 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 (Molkenbuhr y Tapia, 2005).

La enfermedad más grave y aniquilante en este cultivo es una bacteria endógena de la cala, llamada *E. carotovora*, la que se reconoce por causar una pudrición blanda y maloliente. No existe control efectivo de este patógeno una vez que la enfermedad se ha establecido, sólo hay medidas preventivas; esto se logra a través de un cultivo sano, que crezca en condiciones óptimas, tanto de temperatura como de humedad y de un suelo limpio, libre de patógenos (Chain, 2001; Etcheverría, 2002). Esta bacteria pertenece a la familia Enterobacteriaceae, es de forma bacilar, Gram negativa y anaeróbica facultativa; se caracteriza por ser una bacteria oportunista, es decir, una infección latente en el tubero puede convertirse en activa cuando la planta se estresa bajo condiciones de temperatura y humedad. Las temperaturas mínimas, óptimas y máximas para que se desarrolle la enfermedad son de 5, 22 y 37 °C, respectivamente (Guss, 1999; Wright y Burge, 2000). Este patógeno no puede sobrevivir por sí mismo en el suelo, puede invernar en restos de cosecha o en la rizósfera de las malezas como hospedante. Esta bacteria se puede diseminar por insectos, agua de riego, maquinaria de cultivo, agua de lluvia y por utilización de material de propagación infectado. *E. carotovora* inverna en los órganos carnosos infectados, ya sea almacenados o en restos que contienen partes

de plantas infectadas, asociadas a las raíces en terreno (Smith *et al.*, 1992). La enfermedad puede aparecer primeramente en el campo a través de heridas en los tuberos. La inoculación por bacterias de órganos carnosos y su diseminación posterior son facilitadas por insectos (Agrios, 1996). Los síntomas causados por esta bacteria son la pudrición húmeda en tuberos y raíces, una errática emergencia de las plántulas, caída de las mismas y el colapso del pedúnculo de la flor cortada en poscosecha (Welsh, 1991; Dole y Wilkins, 1999; Pizano, 1999).

Para prevenir el ataque de organismos causantes de pudrición de tuberos en terreno, se deben considerar los siguientes factores: realizar rotación de cultivos, el suelo alrededor del tubero debe tener buena aireación y buen drenaje, utilizar material vegetal libre de enfermedades, idealmente debe provenir de cultivo de tejido y no tener más de dos ciclos de crecimiento. Además, desinfectar el equipo de trabajo, evitar dañar tuberos durante su manipulación, realizar el curado y almacenamiento de rizomas bajo condiciones adecuadas, desechar tuberos enfermos y, en el caso de tuberos que provengan de partidas de propágulos en los que se encuentran algunos de éstos infectados por *Erwinia*, se deben desinfectar aquellos que aparentemente no están enfermos (Chain, 2001). Los plaguicidas biológicos están teniendo un gran auge, debido a la creciente preocupación mundial de mantener o disminuir la contaminación medioambiental y de aminorar los daños a la salud de las personas. Lo anterior también está sustentado, por el hecho de que algunos plaguicidas químicos, usados para controlar enfermedades, ya poseen un casi nulo control sobre algunos patógenos que afectan a cultivos de importancia económica. Por lo anterior, en los últimos años se han acentuado las investigaciones en el campo del uso de microorganismos para fines agrícolas. Uno de estos es *B. subtilis*, que se utiliza y se acepta mundialmente como parte de varios biopesticidas, ya que presenta la característica de producir una serie de metabolitos de constitución polipéptido como iturinas, subtilina, bacitrina y surfactinas entre otras, capaces de inhibir o reducir el crecimiento de patógenos de tipo bacterianos y fúngicos (Salle, 1968; Sinclair, 1992; Schmiedeknecht *et al.*, 2001; Mc Spadden,

2002). De esta forma, es posible inferir que mediante cepas seleccionadas de *B. subtilis* proveniente de aislamientos obtenidos de fuentes naturales se podría ejercer un control sobre agentes fitopatógenos.

En base a todos estos antecedentes, la presente investigación tiene como objetivo general evaluar la capacidad inhibitoria de una cepa de *B. subtilis*, utilizada frente a *E. carotovora* (pudrición húmeda) en calas, bajo condiciones controladas. Por otra parte, los objetivos específicos son los siguientes: 1.) Evaluar la cepa BC 10 de *B. subtilis* frente a *E. carotovora* en calas, bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperíodo. 2.) Determinar la inocuidad de la cepa antagonista en calas. 3.) Obtener dosis óptimas de la cepa antagonista en calas, que controle la enfermedad y que contribuya con el normal desarrollo de la planta.

MATERIALES Y MÉTODO

La presente investigación, que forma parte del Proyecto Fondef DO3I-1140, se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile. El estudio, en su fase práctica, se realizó en el período comprendido entre octubre de 2005 y enero de 2006.

Material. Como cepa antagonista se utilizó la cepa BC10, correspondiente a la especie de *B. subtilis*, aislada de suelo proveniente de un cultivo de las calas del vivero BOPAR, Valdivia, Chile. Esta cepa presenta un antagonismo comprobado frente a *E. carotovora* en estudios realizados *in vitro* (Mendez, 2005).

La cepa control para verificar la capacidad antagonica de la cepa BC10 correspondió a *E. carotovora* LC-37, disponible en el Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Universidad Austral de Chile. Esta cepa fue aislada de túberos de calas, los cuales presentaban síntomas propios de la enfermedad.

Método. A continuación se describe la metodología a empleada para el aislamiento y propagación de la cepa patógena, preparación y propagación de la cepa antagonista, preparación de los sustratos y la plantación de los túberos en

las bolsas.

Propagación de la cepa patógena en calas. *Erwinia* LC-37 se disponía almacenada en placas con agar peptona y repicadas frecuentemente para obtener así cultivos frescos. Para la propagación de la cepa, esta fue inoculada mediante azadas de las colonias típicas en caldos peptona, contenidos en dos tubos Falcon estériles con 40 mL cada uno. Estos fueron agitados por 24 h a 25°C y 100 rpm en un agitador orbital. Posteriormente, se retiraron para volver a inocular en caldo peptonado, esta vez 2 L de caldo peptona estéril divididos en 4 matraces de 1 L de capacidad, los cuales contenían 500 mL de medio de cultivo cada uno. El inóculo fue preparado al 4 %, siendo sometido a las mismas condiciones de agitación, tiempo y temperatura de la primera etapa. Posterior a este tiempo se verificó el crecimiento bacteriano mediante lectura de la densidad óptica del cultivo a 600 nanómetros ($D.O_{600}$), porque estudios previos muestran que para un cultivo de *E. carotovora* cultivada en caldo peptona y cuya $D.O_{600}$ es cercana a 1, su población es de 1×10^8 UFC/mL (Kunstmann, 2006). A partir de los 2 L de cultivo de *Erwinia* de concentración 1×10^8 UFC/mL, se efectuaron diluciones en agua destilada para evaluar tres niveles de infestación, como se muestra a continuación:

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

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

$E_A = 10^8$ UFC/mL (Alto). Tratamiento que aseguraría la enfermedad (pudrición blanda en los túberos plantados).

A cada bolsa de polietileno con sustrato se agregaron 250 mL del patógeno por cada nivel de infestación, excepto en el nivel bajo, que sólo recibió agua destilada.

Preparación y propagación de la cepa antagonista en calas. La cepa antagonista

BC10 provenía de un cultivo líquido en medio base de melaza, cultivado en agitador orbital a 28 °C y 250 rpm por 24 horas. Posteriormente, se prepararon 10 L del mismo medio en fermentador, autoclavado a 121°C por 30 minutos, para concentrar el *Bacillus* y el volumen a inocular en las bolsas de polietileno. Los parámetros utilizados para fermentación fueron los siguientes: pH 5.5, temperatura de 28 °C, aireación de 1 v/vm, agitación constante y el tiempo de cultivo 40 horas.

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

$A_0 = 0$ UFC/mL, $A_4 = 10^4$ UFC/mL, $A_6 = 10^6$ UFC/mL, $A_8 = 10^8$ UFC/mL, $A_{11} = 10^{11}$ UFC/mL y $A_{14} = 10^{14}$ UFC/mL

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

Preparación del sustrato y túberos. Antes de plantar los túberos, primero se les realizó un lavado con abundante agua potable, utilizando una escobilla suave. Posteriormente, fueron desinfectados en una solución de hipoclorito de sodio al 5% por 5 minutos. Luego, se enjuagaron con agua destilada estéril durante 5 minutos, seguido de un secado con una toalla absorbente estéril y envueltos en un papel absorbente estéril. Los túberos fueron almacenados en cámara fría, previo al momento de ser plantados.

Como sustrato se usó una mezcla de turba y de humus vegetal en una proporción de (1:10), la cual se esterilizó a 121°C por 2 horas.

Preparación de las macetas con sustrato y túberos. A cada bolsa de polietileno se le colocó 2.5 kg de sustrato y se inoculó con 250 mL del patógeno (*E. carotovora*) en las dosis indicadas anteriormente. Luego de 24 horas se plantaron los túberos y para facilitar la infestación con *Erwinia* se le practicaron heridas mediante un bisturí estéril. Se plantaron 3 túberos por cada bolsa en forma aleatoria, a una profundidad de 5 cm. Después de 24 horas se agregaron los 250 mL de la cepa antagonista *Bacillus* BC10, según las dosis indicadas anteriormente. Las bolsas de polietileno fueron mantenidas en una cámara bajo

condiciones adecuadas de temperatura (25° C), humedad y fotoperíodo (16 horas luz y 8 horas oscuridad) y fueron regadas cada 3 días con 150 mL de H₂O destilada, sin que se produjera percolación.

Parámetros evaluados. En el presente estudio se evaluaron los siguientes parámetros:

-Para observar el crecimiento y la incidencia de la enfermedad, se midió la cantidad de brotes por maceta (cada 7 días), la altura de las plantas medida desde el cuello de cada planta hasta la última hoja (cada 10 días) y el porcentaje de sobrevivencia de las plantas.

-Al final del ensayo, se midió la altura de la planta desde el cuello hasta el final de la última hoja. También se realizó una observación visual de los túberos y las plantas de calas, clasificándolas según el grado de pudrición del túbero y el desarrollo de la planta al momento de cosecha. La pauta de evaluación relativa usada fue la siguiente (Figura 1): **1** Túbero no emergido. Túbero completamente podrido, por causas bacterianas o por otros agentes responsables de pudriciones. **2** Planta emergida parcialmente (hasta 5 cm). La planta logró emerger con un sólo tallo corto y ha dejado de crecer, a pesar de que el túbero se encuentra completamente podrido por causas bacterianas o por agentes responsables de pudriciones. **3** Planta emergida parcialmente (sobre 5 cm). La planta logró emerger con un sólo tallo y ha dejado de crecer, ya que el túbero se encuentra totalmente podrido por causas bacterianas o por agentes causantes de pudriciones. **4** Planta emergida totalmente y que ha dejado de crecer. Presenta hojas y tallos. Túbero ligeramente dañado y con pocas raíces. **5** Planta sana; presencia de hojas verdes, varios tallos y largos. Túbero intacto con abundante raíces.

Este primer estudio tuvo un diseño estadístico enteramente al azar, con 18 tratamientos y con un arreglo factorial de 3 por 6, con 4 repeticiones. En forma complementaria, se realizó un segundo ensayo con calas, usando sólo el nivel de *Erwinia* que mostró los mejores resultados. La metodología usada fue muy similar, con la diferencia que a los túberos no se les indujeron heridas y que este ensayo se realizó bajo condiciones de invernadero, para observar los efectos en un sistema menos controlado en

relación a temperatura y luz. En este segundo ensayo también se utilizó un diseño enteramente al azar con un arreglo factorial de 5 dosis de la cepa antagonista y 4 repeticiones.

Los parámetros a medidos fueron: Número de brotes, altura de la planta (cada 20 días) y porcentaje de sobrevivencia, al final del ensayo. Cuando se alcanzó el 25 % de la floración se cortaron los tallos a 3 cm del suelo y se suspendió por completo el riego por unas cuatro semanas. Después de esto se procedió a cosechar los tuberos de las plantas, para posteriormente observar y separar visualmente los tuberos enfermos de los sanos. Los tuberos que resultaron sanos se les trató de inducir la enfermedad (*E. carotovora*); esto se hizo porque es posible pensar que el tubero sea portador de *Erwinia*. Los pasos a seguir para realizar la inducción fueron los siguientes:

a) Los tuberos se lavaron con agua corriente y una escobilla suave, para extraer el sustrato adherido. b) Se pesaron todos los tuberos. c) Se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5 % por 5 minutos. d) Luego, se volvieron a lavar con agua destilada estéril. e) Después se envolvieron en toalla absorbente estéril humedecida y con plástico. f) Se incubaron por 5 días en estufa entre 25° a 30° C (condiciones propicias para que la bacteria se desarrolle, si se encontrase en el interior del tubero). g) Finalmente, se observó visualmente si se ha producido la enfermedad en los tuberos. Los que desarrollaron la pudrición húmeda fueron lavados nuevamente, para sacarle el tejido macerado y nuevamente pesados, para posteriormente sacar una relación entre el peso inicial y final del tubero (% de pudrición de tuberos inducidos).

Los resultados del estudio se sometieron a análisis de varianza y a la prueba de Tukey, cuando correspondía.

RESULTADOS Y DISCUSION

Primer estudio de antagonismo de *E. carotovora* bajo ambiente controlado. A continuación se presentan los resultados obtenidos de los parámetros evaluados en el primer ensayo de calas.

Altura de plantas de calas. En el Cuadro

1 se puede observar que hay diferencias estadísticamente significativas, entre las dosis de *E. carotovora* aplicadas al sustrato en todas las variables medidas. De esto se puede inferir que hubo una correcta infestación del sustrato con el patógeno, ya que al comparar EA (dosis de *Erwinia* alta) con E0 (sustrato no infectado con *E. carotovora*) o con EM (dosis con *Erwinia* medio), hay una disminución en el crecimiento de la planta a medida que se incrementa la dosis del patógeno. En relación a las dosis de antagonista, es posible observar diferencias en las primeras cuatro fechas de medición; en la fecha 11-10-2005 la mayor altura de la planta de cala se observó con la dosis de antagonista A11 y la menor altura se observó con la dosis más alta de antagonista A14. Que altas poblaciones de *B. subtilis* tengan una menor eficacia como antagonista, podría deberse al hecho que la bacteria, bajo estas condiciones, produciría menos metabolitos (antibióticos) para controlar a *E. carotovora*. Sin embargo, es necesario señalar que no existieron diferencias entre los tratamientos con el antagonista *B. subtilis* y el testigo sin antagonistas A0.

En las fechas de medición 21-10-2005 y 31-10-2005, las plantas que presentaron una mayor altura fueron las que se les aplicó la dosis de antagonista A4 y A11, en contraste con la dosis de antagonista más alta A14, donde las plantas crecieron menos. En la fecha 10-11-2005 sólo se observan diferencias entre la dosis A4 con un mayor crecimiento de la planta y A14 con menor crecimiento. En la última fecha medida (20-11-2005), no se observaron diferencias entre las dosis de antagonistas. Las diferencias demuestran que dosis muy elevadas de antagonista disminuyen el crecimiento de la planta. Por lo tanto, la dosis límite que puede ser usada en las plantas de calas para obtener un buen desarrollo, es del orden de 10^4 UFC/mL de la cepa antagonista en el nivel alto de infestación y de 10^{11} UFC/mL de *B. subtilis* en el nivel E0.

Cantidad de brotes o tallos. El Andeva en relación a la cantidad de brotes en plantas de calas, indicó que existen diferencias estadísticamente significativas al 0.05% y al 0.01% en el factor *E. carotovora* desde la fecha de medición 14-10-2005 al 18-11-2005. También existieron diferencias significativas al 0,05% en el factor

Cuadro 1. Altura promedio de plantas, según los distintos tratamientos (cm).

Table 1. Average height of plants in the different treatments (cm).

Erwinia	FECHAS DE MEDICION				
	11-10-2005	21-10-2005	31-10-2005	10-11-2005	20-11-2005
EA (10 ⁸ ufc/mL)	1,05 b	2,26 b	7,82 b	11,4 b	15,76 b
EM (10 ⁴ ufc/mL)	3,24 a	7,38 a	23,5 a	36,32 a	44,72 a
E0 (0 ufc/mL)	3,55 a	8,25 a	27,1 a	50,14 a	59,49 a
Antagonista					
A0 (0 ufc/mL)	2,2 a b	6,33 a b	19,6 a b	33,67 a b	42,72 a
A4 (10 ⁴ ufc/mL)	3,07 a b	7,95 a	25,1 a	44,16 a	59,98 a
A6 (10 ⁶ ufc/mL)	2,59 a b	5,11 a b	20,5 a b	32,65 a b	40,2 a
A8 (10 ⁸ ufc/mL)	2,85 a b	4,9 a b	17,2 a b	25,43 a b	32,14 a
A11 (10 ¹¹ ufc/mL)	3,31 a	7,24 a	24 a	35,59 a b	34,58 a
A14 (10 ¹⁴ ufc/mL)	1,65 b	4,28 b	10,3 b	19,24 b	30,34 a

Nota: Valores con letra distinta en columnas indican diferencias estadísticas significativas al 5% (Tukey).

dosis de antagonista en las siguientes fechas de medición 14-10-2005, 18-11-2005.

De acuerdo a lo anterior, en el Cuadro 2 se puede apreciar que existen diferencias entre las dosis de *E.carotovora*, ya que al haber dosis más altas de este patógeno en el sustrato se produce una disminución del número de brotes por planta en relación a la dosis de *Erwinia* medio y *Erwinia* cero. A medida que transcurre el tiempo y la planta se desarrolla, las tres dosis del patógeno están bien demarcadas, ya que al disminuir la dosis de *E. carotovora* aumenta el número de brotes. En relación a la dosis de antagonista se observan diferencias en el número de brotes (14-10-2005), entre la concentración A4 que presenta un mayor número de brotes en relación a A14;

también en la última fecha de medición 18-11-2005 entre las dosis A4 y A6, que presentan un mayor número de brotes en contraste con las dosis A8, A11 y A14, donde se observa una menor cantidad de brotes en las plantas.

En relación a la interacción de los factores dosis de *E. carotovora* con dosis de antagonista, se encontraron diferencias significativas al 0.01% y al 0.05% en las variables 14-10-2005, 11-11-2005 y 18-11-2005 como se indica en el Cuadro 3.

En la primera fecha de medición se observan diferencias en los tratamientos con la dosis de *E.carotovora* alto, donde la dosis de antagonista A4 presenta un mayor número de brotes en contraste con la dosis A14, que presenta una

Cuadro 2. Promedios de número de brotes/planta, según las variables medidas.

Table 2. Average numbers of buds per plant over time.

Erwinia	Fechas de medición					
	14-10-2005	21-10-2005	28-10-2005	04-11-2005	11-11-2005	18-11-
EA (10 ⁸ ufc/mL)	1,58 b	1,71 b	1,45 c	0,875 c	0,66 c	0,5
EM (10 ⁴ ufc/mL)	3,04 a	3,46 a	3,66 b	3,5 b	3,75 b	3,16
E0 (0 ufc/mL)	4,38 a	3,88 a	6,66 a	6,5 a	5,87 a	5,5
Antagonista						
A0 (0 ufc/mL)	2,92 a b	4 a	4,41 a	4 a	3,83 a	3,33
A4 (10 ⁴ ufc/mL)	3,75 a	4,5 a	4,58 a	4,33 a	4,16 a	4
A6 (10 ⁶ ufc/mL)	3 a b	4,25 a	4,41 a	3,91 a	4,08 a	4,08
A8 (10 ⁸ ufc/mL)	2,75 a b	3,41 a	3,83 a	3,41 a	2,41 a	2,25
A11 (10 ¹¹ ufc/mL)	3,5 a b	3,5 a	3,58 a	3,41 a	3,5 a	2,25

Nota: Valores con letra distinta en columna indican diferencia estadística significativa al 5% (Tukey).

Cuadro 3. Promedio de número de brotes/planta, según tratamientos y fechas de medición.
Table 3. Average number of buds per plant in each treatment at each measurement date.

Fecha medición: 14-10-2005		<i>Erwinia carotovora</i>		
Antagonista	EO	EM	EA	
A0 (0 UFC/mL)	5,5 a	2,5 a	0,75 a b	
A4 (10 ⁴ UFC/mL)	4,25 a	3,25 a	3,75 a	
A6 (10 ⁶ UFC/mL)	3,75 a	4 a	1,25 a b	
A8 (10 ⁸ UFC/mL)	3,5 a	4 a	0,75 a b	
A11 (10 ¹¹ UFC/mL)	4,75 a	3 a	2,75 a b	
A14 (10 ¹⁴ UFC/mL)	4,5 a	1,5 a	0,25 b	

Fecha medición: 11-11-2005				
Antagonista	EO	EM	EA	
A0 (0 UFC/mL)	7,25 a	3,5 a b	0,75 a	
A4 (10 ⁴ UFC/mL)	6,5 a b	4,25 a b	1,75 a	
A6 (10 ⁶ UFC/mL)	6 a b	6,25 a	0 a	
A8 (10 ⁸ UFC/mL)	2,25 b	4,5 a b	0,5 a	
A11 (10 ¹¹ UFC/mL)	6 a b	3,75 a b	0,75 a	
A14 (10 ¹⁴ UFC/mL)	7,25 a	0,25 b	0,25 a	

Fecha medición: 18-11-2005				
Antagonista	EO	EM	EA	
A0 (0 UFC/mL)	7,25 a	2 a b	0,75 a	
A4 (10 ⁴ UFC/mL)	6,5 a b	4,25 a b	1,25 a	
A6 (10 ⁶ UFC/mL)	6 a b	6,25 a	0 a	
A8 (10 ⁸ UFC/mL)	2,25 b	4 a b	0,5 a	
A11 (10 ¹¹ UFC/mL)	4,25 a b	2,25 a b	0,25 a	
A14 (10 ¹⁴ UFC/mL)	6,75 a	0,25 b	0,25 a	

Nota: Valores con letra distinta en columna indican diferencia estadística significativa al 5% (Tukey).

menor cantidad. No se observan diferencias al testigo sin antagonista

En la segunda fecha de medición del mismo Cuadro 3, en la dosis de *E. carotovora* media existen diferencias con la dosis de antagonista A6 y A14, demostrando que dosis altas de *B. subtilis* como antagonista causan una reducción en el número de brotes de plantas de calas. En el nivel de E0, o sea sin dosis de *Erwinia*, hay un efecto contrario, ya que la dosis de antagonista A0 y A14 son las que poseen mayor cantidad de brotes en comparación con la dosis A8. En la tercera fecha de medición del Cuadro 3 se observan las mismas diferencias que en la fecha anterior en el nivel de *Erwinia* cero con las dosis de antagonista A0 y A14, presentando un mayor número de brotes que con la dosis A8 y en el nivel EM entre las dosis de antagonista A6 y A14.

Estos resultados pueden indicar que la acción de la bacteria antagonista sobre el patógeno, en relación a la cantidad de brotes o tallos de las plantas, se podría ejercer después de 1

mes de haber aparecido el primer brote de la planta, estando en condiciones controladas de temperatura, luz y humedad.

Si bien la cepa antagonista usada mostró diferencias favorables en el control de *E. carotovora* en el nivel de infestación medio, estas no fueron significativas. Esto se puede apreciar en los resultados mostrados, en donde a medida que la planta se fue desarrollando, el control EM-AO disminuyó su cantidad de brotes, no así con los tratamiento EM-A4, EM-A6 y EM-A8, en los que se mantuvo el número de brotes hasta su cosecha. Lo mismo pasó con el tratamiento EA-A4, el cual presentó una mayor cantidad de brotes comparada al control EA-AO.

Porcentaje de sobrevivencia de plantas de calas del primer ensayo. El análisis de varianza realizado indicó que existieron diferencias estadísticamente significativas en el factor dosis de *E. carotovora*, factor dosis de antagonista y en la interacción de estos dos factores. De acuerdo a

Cuadro 4. Porcentaje de sobrevivencia de plantas de calas.

Table 4. Percentage survival of calla plants in each treatment.

(10 ⁸ UFC/mL)	14,2
(10 ⁴ UFC/mL)	47,08
(0 UFC/mL)	71,57
S DE ANTAGONISTA	
(0 UFC/mL)	36,758
(10 ⁴ UFC/mL)	68,183
(10 ⁶ UFC/mL)	64,1083
(10 ⁸ UFC/mL)	28,891
(10 ¹¹ UFC/mL)	33,05

Nota: Valores con letra distinta en columna indican diferencia estadística significativa al 5% (Tukey).

Cuadro 5. Promedio de sobrevivencia de plantas en porcentaje, según tratamientos.

Table 5. Average percentage survival of plants, according to treatments.

Dosis de Antagonista	Dosis de <i>Erwinia carotovora</i>		
	EO	EM	EA
A0 (0 UFC/mL)	72,77 a	25 a	12,5 a
A4 (10 ⁴ UFC/mL)	100 a	90,18 a	14,4 a
A6 (10 ⁶ UFC/mL)	100 a	92,33 a	0 a
A8 (10 ⁸ UFC/mL)	29,18 a	32,5 a	25 a
A10 (10 ¹⁰ UFC/mL)	60,82 a	30 a	8,33 a
A14 (10 ¹⁴ UFC/mL)	66,65 a	12,5 a	25 a

Cuadro 6. Estado de túberos y plantas a la cosecha (Escala en cap. 3.2.5).

Table 6. Average values for tubers and plant state at harvesting (scale given in section 3.2.5).

DOSIS DE <i>Erwinia</i>	Mediana	Media	Dunn
E0 (0 UFC/mL)	4	3,66	a
EM (10 ⁴ UFC/mL)	2	1,33	b
EA (10 ⁸ UFC/mL)	1	2,16	b
DOSIS DE ANTAGONISTA			
A0 (0 UFC/mL)	1,5	2,25	a
A4 (10 ⁴ UFC/mL)	2	2,916	a
A6 (10 ⁶ UFC/mL)	3,5	3	a
A8 (10 ⁸ UFC/mL)	1	1,75	a
A11 (10 ¹⁰ UFC/mL)	1,5	2,41	a
A14 (10 ¹⁴ UFC/mL)	1,5	2	a

Cuadro 7. Promedios estado de túberos y plantas a la cosecha (escala cap. 3.2.5).

Table 7. Average values for tubers and plant state at harvesting (scale given in section 3.2.5).

Antagonista	<i>Erwinia carotovora</i>		
	EO	EM	EA
A0 (0 UFC/mL)	4,3 a	1,25 a	1,25 a
A4 (10 ⁴ UFC/mL)	4,3 a	2,75 a b	1,75 a
A6 (10 ⁶ UFC/mL)	4 a	4 b	1 a
A8 (10 ⁸ UFC/mL)	2,3 a	1,5 a b	1,5 a
A10 (10 ¹⁰ UFC/mL)	3,8 a	2,25 a b	1,25 a
A14 (10 ¹¹ UFC/mL)	3,5 a	1,25 a	1,25 a

Valores con letra distinta en columna indican diferencia significativa al 5% (Tukey).

Cuadro 8. Porcentaje de sobrevivencia de plantas, según tratamientos.

Table 8. Percentage survival of plants, according to treatments.

DOSIS DE <i>E. carotovora</i> DOSIS DE ANTAGONISTA	EM	
	A0 (0 UFC/mL)	84,37
A4 (10 ⁴ UFC/mL)	90	a b
A6 (10 ⁶ UFC/mL)	100	a
A8 (10 ⁸ UFC/mL)	78,92	b
A10 (10 ¹¹ UFC/mL)	94,44	a b

Nota : Valores con letra distinta en columna indican diferencia estadística significativa al 5% (Tukey).

lo anterior, en el Cuadro 4 se puede observar que en el factor *E. carotovora* existen tres niveles del patógeno, y que al aumentar la dosis de *Erwinia* disminuye significativamente el porcentaje de sobrevivencia de las plantas. En el factor dosis de antagonista los niveles con el mayor porcentaje de sobrevivencia son el A4 y A6, y que fueron estadísticamente significativos.

En el Cuadro 5, en relación a la interacción de la dosis de antagonista con la dosis de *E. carotovora*, no se pueden apreciar diferencias entre los tratamientos, pero sí tendencias.

Estado de túberos y plantas de calas medidas al momento de cosecha. Como se observa en el

Cuadro 6, el estado de túberos y plantas de calas en el factor dosis de *Erwinia* presenta diferencias en los niveles de EM y EA, en contraste con los resultados del control. Pero en el factor dosis de antagonista no existen diferencias entre los distintos niveles con respecto al estado de túberos y plantas en cosecha.

En el Cuadro 7, es posible observar diferencias entre los tratamientos en el nivel de *Erwinia* medio, en las dosis de antagonista A0 y A14, con respecto a A6, que presentan un estado en que los túberos están completamente afectados por el patógeno. En cambio la dosis A6, presenta un estado en el cual los túberos están ligeramente dañados por síntomas de pudrición y la planta

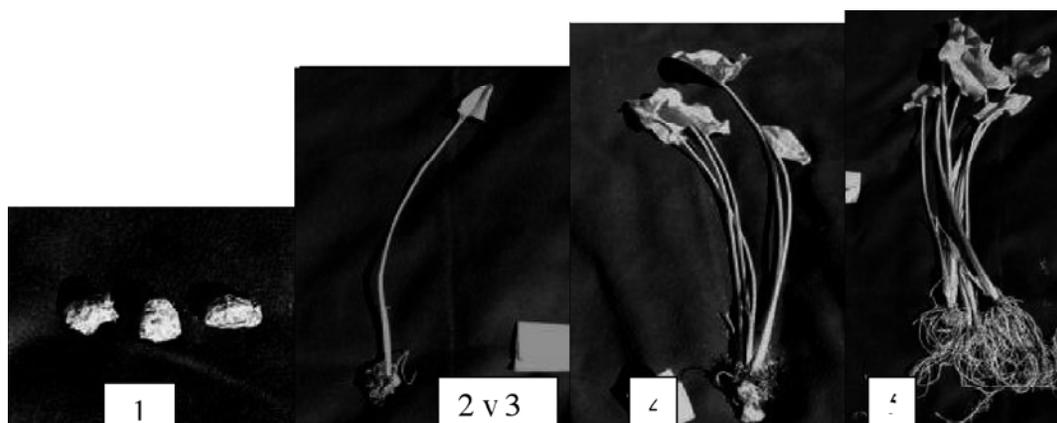


Figura 1. Valores escala relativa estado de túberos y plantas al momento de cosecha.

Figure 1. Relative scale values for tubers and plant state at harvesting.

se encuentra completamente desarrollada, como se puede indicar en la clasificación del estado de túberos y plantas de calas al momento de cosecha (escala que aparece en el capítulo 3.2.5 y Figura 1).

Segundo ensayo: Pruebas de antagonismo de *E.carotovora* en invernadero.

A continuación se presentan los resultados de los parámetros medidos durante y después de realizado el segundo ensayo de calas, con mediciones aproximadamente cada 20 días.

Altura de las plantas. Los resultados del análisis de varianza obtenidos en relación a la altura de plantas del ensayo realizado en invernadero muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas con respecto a las fechas de medición de este parámetro en el nivel de *Erwinia* Medio.

Cantidad de brotes de plantas de calas del segundo ensayo. El análisis de varianza en relación a la cantidad de brotes en plantas de calas que permanecieron en invernadero indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas en el factor dosis de antagonista con el nivel de EM (*Erwinia* medio), en ninguna de las fechas de medición.

En relación a la altura de plantas de calas y la cantidad de brotes del segundo ensayo no se encontraron diferencias en ninguna de las fechas de medición.

Porcentaje de pudrición de túberos de calas después de realizada la inducción de *Erwinia carotovora* en el segundo ensayo. El Andeva indicó que no se encontraron diferencias significativas entre el factor antagonista y el nivel EM con respecto a este parámetro, el cual fue inducido artificialmente después de la cosecha de las plantas.

Los resultados del análisis estadístico indican que no hubo diferencias, pero en todos los tratamientos hubo al menos 1 o más túberos con problemas de pudrición; esto ratifica que estos órganos de reserva pueden ser portadores de la enfermedad. También indica que la persistencia del bioantagonista no es extensible en el tiempo, por lo tanto una vez cosechados los túberos deben ser tratados nuevamente con estos antagonistas para evitar el desarrollo de la enfermedad.

Porcentaje de sobrevivencia de plantas de calas del segundo ensayo. Se encontraron diferencias al 0,05% en el porcentaje de sobrevivencia de las plantas entre tratamientos.

Esto queda demostrado en el Cuadro 8, en

el cual existe diferencia entre los tratamientos EM-A6 (en el cual no hubo pérdidas de plantas durante el desarrollo del ensayo) y el tratamiento EM-A8, con un porcentaje de sobrevivencia de 78,92%.

CONCLUSIONES

El análisis de los resultados permite concluir que:

- Bajo las condiciones en las que se realizó el primer ensayo de calas es posible concluir que, cuando existen heridas en los tuberos es posible reducir la incidencia de *E. carotovora* medida a través de la sobrevivencia de plantas, con poblaciones 10^4 UFC/mL, 10^6 UFC/mL y 10^8 UFC/mL de la cepa antagonista BC 10, cuando existen niveles de infestación del suelo de 10^4 UFC/mL.

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

- La aplicación de concentraciones altas de la cepa BC10, del orden de 10^{14} UFC/mL y en presencia de *E. carotovora*, incrementa la severidad de la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

- AGRIOS, G. 1996. Fitopatología. México. Limusa. 838 p.
- CHAIN, G. 2001. Producción comercial de calas. (05 Enero 2006). <<http://www.tattersall.cl/revista/rev167/plagas.htm>>
- DOLE, M. J.; WILKINS, H. F. 1999. Floriculture, principles and species. New Jersey, U.S.A. Prentice Hall. 613p.
- ETCHEVERRIA, P. 2002. Efecto de la densidad de sombra y del mulch en la producción y calidad de las flores y tuberos *Zantedeschia* híbrida cv. Mango. Tesis Ing. Agr. Universidad de la Frontera. Temuco. Chile. 67 p.
- GUSS, A. 1999. *Erwinia carotovora*. (5 de Marzo de 2006) <http://web.umr.edu/~microbio/BIO221_1999/E_carotovora.html>
- KUNSTMANN, J. P.; CIAMPI, L.; BÖHM, L. 2006. Determinación de especies de *Erwinia* (grupo *carotovora*) como agentes causales de “pudrición blanda” en cala (*Zantedeschia* sp). Agricultura Técnica 66 : 247-255.
- MC SPADDEN, B. 2002. Control biológico de los patógenos de la planta: Investigación, comercialización y uso en los E.E.U.U. Departamento de la Patología de Planta. Universidad-OARDC del Estado de Ohio, U.S.A. Wooster. (22 de febrero 2006). <http://www.apsnet.org/online/feature/biocontrol/top.html>
- MENDEZ, P. 2005. Selección e identificación de antagonistas bacterianos en contra de *Erwinia carotovora*, agente causal de pudrición húmeda en plantas de importancia económica (papas y calas). Tesis Tecnología Médica. Valdivia, Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile. 59 p.
- MOLKENBUHR, E. L. ; TAPIA, B. 2005. Mercado de las flores de corte. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias de Chile. <<http://odepa.cl>>. (04 de Enero 2006).
- SMITH, I. M.; DUNEZ J.; LELLIOTT, R. A.; PHILLIPS, D. H.; ARCHER, R. A. 1992. Manual de Enfermedades de las plantas. Traducido por Fernando García A. Bilbao, España. Mundi-Prensa. 671 p.
- PIZANO, M. 1999. *Zantedeschia*, Calla Lily. Santafé de Bogotá, Colombia. Horticultura. 54 p.
- SALLE, A. 1968. Asociaciones de bacterias. En Bacteriología. A.J. Salle (ed.). Editora Revolucionaria. La Habana. pp 492-509.
- SCHMIEDEKNECHT, G.; ISSOUFOU, I.; JUNGE, H.; BOCHOW, H. 2001. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent .V. Biological control of diseases on maize and sunflowers. Journal of Plant Disease and Protection 108: 500-512.
- SINCLAIR, J. 1992. *Bacillus subtilis* as an agent for the biocontrol of plant diseases. In: Sinclair (ed.). Perspectives in plant pathology; New Delhi, India pp: 367-374.
- WRIGHT, P.J.; BURGE, G. K. 2000. Irrigation, sawdust mulch, and enhanced biocide affects soft rot

incidence, and flower and tuber production of calla. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 28:225 - 231.

WELSH, T. 1991. The New Zealand calla. Combined Proceedings International. Propagators Society 41:478-484 .