

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



INFORME DE PRÁCTICA PROFESIONAL
LABORATORIO DE FITOPATOLOGÍA
INSTITUTO AGROINDUSTRIA
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

Informe de Práctica Profesional presentado a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera, como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

CRISTOBAL FRANCISCO GUERRERO VARGAS

TEMUCO- CHILE
2014

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



INFORME DE PRÁCTICA PROFESIONAL

LABORATORIO DE FITOPATOLOGÍA
INSTITUTO AGROINDUSTRIA
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

Informe de Práctica Profesional presentado a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera, como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

CRISTOBAL FRANCISCO GUERRERO VARGAS

PROFESOR GUÍA: Dr. JAIME GUERRERO CONTRERAS

TEMUCO – CHILE

2014

**INFORME DE PRÁCTICA PROFESIONAL
REALIZADA EN EL LABORATORIO DE FITOPATOLOGÍA
INSTITUTO AGROINDUSTRIA. UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA**

PROFESOR GUÍA

: _____
Jaime Guerrero Contreras.
Ingeniero Agrónomo. Mg. Cs. Dr.
Departamento de Producción Agropecuarias.

PROFESOR CONSEJERO

: _____
Emma Bensch Tapia
Ingeniero Agrónomo. Mg. Cs.
Departamento de Ciencias Agronómicas y
Recursos Naturales.

CALIFICACIÓN PROMEDIO

: _____

AGRADECIMIENTOS

Los más sinceros agradecimientos para mis padres Magaly y José Humberto por ser el ejemplo vivo del amor, del esfuerzo, de la dedicación y de la perseverancia; también, sin lugar a duda, por darme la posibilidad de experimentar el paso maravilloso por esta vida. A mi madre amada por ser incondicional, por su inteligencia y comprensión, por su lucha y alegría de salir adelante pese a las dificultades que con valentía y entereza hubo de superar. A mis hermanos queridos Manuel y Karen, por comprenderme e integrarme en sus vidas hermosas. Agradezco a mí profesor Don Jaime Guerrero Contreras, por sus enseñanzas, por su empatía, por cuestionarme y corregirme, por sus consejos y percepciones, también a Doña Emma Bensch Tapia, por los valiosos aportes brindados durante mis estudios y en la realización de mi práctica profesional. Asimismo, a todas las personas que se han conjugado en mi camino, a mis más cercanos amigos y compañeros de Universidad, a todos ellos, muchas gracias.

*Dedicada a
Mis padres Magaly y José Humberto.
A mis hermanos.*

ÍNDICE

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Las enfermedades de las plantas y su importancia.	3
2.2	Definición de enfermedad	3
2.3	Hongos fitopatógenos	4
2.3.1	Naturaleza de los hongos	4
2.3.2	Técnica para la identificación de hongos	5
2.3.3	Estructuras vegetativas	5
2.3.4	Estructuras reproductivas de hongos ficomicetes	6
2.3.5	Estructuras reproductivas de hongos superiores	6
2.3.6	Antecedentes generales de los hongos aislados	7
2.3.7	Control de hongos fitopatógenos	9
2.3.8	Fungicida evaluado	9
2.4	Bacterias fitopatógenas	9
2.4.1	Naturaleza de las bacterias	9
2.4.2	Características morfológicas y bioquímicas de <i>Pseudomonas syringae</i>	10
2.4.3	Hospederos de <i>Pseudomonas syringae</i>	11
2.4.4	Hipersensibilidad en tabaco	11
2.4.5	Fuentes de inóculo y diseminación	12
2.4.6	Control de <i>Pseudomonas syringae</i>	12
2.4.7	Bactericidas evaluados	13
3	MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1	Ubicación y duración de la práctica	14
3.2	Materiales	14
3.2.1	Equipos	14
3.2.2	Material vegetal	14
3.2.3	Otros materiales	14
3.2.4	Medios de cultivo	14
3.3	Métodos	15
3.3.1	Aislamiento de hongos	15
3.3.2	Cultivo de hongos	16
3.3.3	Pruebas de identificación morfológica de hongos	16
3.3.4	Aislamiento de bacterias	16
3.3.5	Pruebas de identificación morfológica y bioquímica de <i>Pseudomona syringae</i>	18
3.3.6	Capacidad de nucleación del hielo de <i>Pseudomona syringae</i>	18
3.3.7	Diagnóstico de <i>Pseudomona syringae</i> en ramillas de arándano	18

3.3.8	Susceptibilidad <i>in vitro</i> de <i>Pseudomona syringae</i> a bactericidas cúpricos	20
3.3.9	Efecto de 3Tac® en germinación de conidias de <i>Botrytis cinerea</i>	21
3.3.10	Prueba de bioantagonismo	22
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	23
4.1	Caracterización morfológica de los distintos hongos aislados	23
4.2	Caracterización morfológica y bioquímica de <i>Pseudomonas syringae</i> aislada de cerezo	27
4.3	Diagnóstico fitosanitario de <i>Pseudomona syringae</i> en ramillas de arándano	29
4.3.1	Antibiosis entre bacterias aisladas de las yemas de arándano	30
4.4	Evaluación de susceptibilidad de <i>Xanthomonas corylina</i> a bactericidas cúpricos	31
4.5	Susceptibilidad de bactericidas cúpricos sobre <i>Pseudomona syringae</i> de cerezo	33
4.6	Dosis efectiva media de Cupratec sobre <i>X. corylina</i> de avellano y <i>Pseudomona syringae</i> de cerezo	34
4.7	Efecto de 3Tac® en germinación de conidios de <i>Botrytis cinerea</i>	36
4.8	Prueba de bioantagonismo	37
4.8.1	<i>Pseudomonas Syringae</i>	37
4.8.2	<i>Xanthomonas corylina</i>	40
5	CONCLUSIONES	43
6	RESUMEN	44
7	LITERATURA CITADA	45
9	ANEXOS	49

1. INTRODUCCION

La observación en plantas de síntomas y signos de enfermedad, implica determinar la causalidad y factores que interactúan e influyen negativamente en el normal crecimiento y desarrollo de éstas. La causalidad puede estar relacionada con factores bióticos y abióticos que interaccionan con las plantas; entre los bióticos: bacterias, hongos, virus, protozoos, y entre los abióticos exceso o déficit de nutrientes, temperatura, luz y humedad. La patología vegetal nace como una ciencia que se encarga del diagnóstico y control de enfermedades bióticas, desordenes abióticos o enfermedades fisiológicas, no incluyendo el estudio de daños causados por herbívoros como insectos o mamíferos.

El cultivo de frutales, hortalizas y plantas ornamentales, puede ser afectado por enfermedades que provocan pérdidas significativas de producción a nivel mundial, tanto en gastos de prevención como cuidado de los cultivos, y pueden generar alteración en la salud de las personas tras consumir alimentos contaminados. La investigación relacionada con fitopatología es importante para un adecuado diagnóstico y el desarrollo de acciones de control integrado de las plantas, para reducir pérdidas ocasionadas por agentes fitopatológicos y a su vez intensificar la producción de los cultivares. Las opciones de control de estas patologías son fundamentalmente preventivas, basadas en aplicación de fungicidas de ingredientes activos diferentes, particularmente en base a cobre, por ejemplo oxiclورو de cobre, óxido cuproso, hidróxido de cobre y sulfato de cobre pentahidratado, gluconato de cobre.

En el laboratorio de Fitopatología de la Universidad de La Frontera, se realizó práctica profesional controlada en el período entre septiembre del 2013 y enero del 2014, siendo el profesor guía don Jaime Guerrero Contreras, Ingeniero Agrónomo, Mg. Cs., Dr. adscrito al Departamento de Producción Agropecuaria. Este laboratorio entrega servicios de diagnóstico de fitopatógenos para diferentes especies cultivadas, así como también investigación relacionada con aspectos fitosanitarios y de mecanismos de defensa de las plantas.

Las actividades realizadas, se resumen en el acápite objetivos específicos. Las especies vegetales en las que se estudió algunos aspectos fitopatológicos fueron copihue (*Lapageria rosea*), arándano (*Vaccinium corymbosum*), avellano europeo (*Corylus avellana*) y cerezo (*Prunus avium*). Se enfatizó el trabajo en identificación de hongos y bacterias, ensayos de antibiosis desde bacterias aisladas de yemas florales y apicales de arándano, y se evaluó efecto de algunos fungicidas y bactericidas en el crecimiento *in vitro* de bacterias y hongos fitopatógenos, aislados de copihue, arándano y avellano europeo.

El **Objetivo general** fue el siguiente: **Integrar** la metodología de trabajo de laboratorio especializado para el diagnóstico y procesamiento de enfermedades en plantas cultivadas; también se considera relevante la aplicación del Método Científico, la comprensión de interacciones biológicas entre las plantas y el entorno y aspectos de epistemología.

Los objetivos específicos, se resumen a continuación:

Reconocer sintomatologías de enfermedades bióticas y abióticas.

Realizar aislamientos *in vitro* de fitopatógenos.

Identificar hongos y bacterias fitopatógenas.

Desarrollar ensayos de inhibición *in vitro*, de hongos y bacterias, fitopatógenos.

Elaborar informes de diagnóstico fitosanitario emitidos por el laboratorio.

Análisis estadísticos básicos (ANDEVA, comparación media, análisis clúster y regresión).

Diseñar y analizar experimentos simples de laboratorio.

Recopilar información bibliográfica actualizada, según temática.

Redactar escritos utilizando normas estilo de relación científica.

Elaborar presentaciones electrónicas.

Comprender la interacción planta patógeno (mecanismos de defensa de las plantas).

Valorar la interacción entre ciencia y arte.

Interactuar con otras personas en un contexto de trabajo cooperativo multidisciplinario.

Potenciar la conciencia de respetar y conservar la naturaleza y la biodiversidad.

Analizar los conceptos de ética y moral, y filosofía de la ciencia (epistemología).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Las enfermedades de las plantas y su importancia.

Tanto en ecosistemas agrícolas como naturales, las plantas son afectadas por patógenos que reducen su productividad, su fecundidad y su sobrevivencia. En sistemas agrícolas estas enfermedades a menudo se traducen en pérdidas económicas para los agricultores, precios más elevados para los consumidores, y en no pocos casos han resultado en hambrunas en regiones concretas (Gould, 1991). Enfermedades como el tizón tardío de la papa, el amarillamiento letal del cocotero, la moniliasis del cacao, el cancro bacteriano de los cítricos y muchas otras, han tenido consecuencias sociales y económicas desastrosas en regiones enteras en todo el mundo (Oerke, 2006).

2.2 Definición de enfermedad.

En las enfermedades de las plantas varias definiciones han sido propuestas para definir enfermedad. Algunos consideran enfermedad a cualquier desviación del funcionamiento fisiológico normal de una planta. Otros indican que debe diferenciarse las enfermedades de los eventos dañinos puntuales tales como el daño mecánico. Una de las definiciones más utilizadas es la propuesta por Bateman (1978), según la cual una enfermedad es “una alteración fisiológica dañina a la planta, causada por la irritación continua de un agente extraño”. Se propone ampliar la definición de Bateman, y considerar una enfermedad como “una alteración fisiológica o morfológica negativa causada por acción continuada de un agente extraño o por la carencia prolongada de algún factor ambiental esencial para el funcionamiento adecuado del organismo”. Esta definición amplia incluye enfermedades de origen biótico, llamadas enfermedades infecciosas, y enfermedades de tipo abiótico.

2.3 Hongos fitopatógenos.

2.3.1 Naturaleza de los hongos. Los hongos constituyen el grupo más numeroso de fitopatógenos. Atacan la mayoría de las especies cultivadas y todas las partes de la planta, provocando pérdidas económicas considerables tanto por el daño que causan como por el costo en que se incurre para combatirlos (Lewis *et al.*, 1997). Los hongos constituyen un grupo polifilético de organismos, es decir, no provienen del mismo tronco evolutivo. Estudios recientes basados en el análisis del ARN ribosomal demuestran que, por ejemplo, los Oomicetes se encuentran filogenéticamente más relacionados con las algas doradas que con los hongos no flagelados o los Quitridiomycetes. Por tanto, el grupo de organismos conocido como tradicionalmente como hongos constituye una clasificación artificial que no necesariamente responde a criterios filogenéticos (Schlegel, 2003).

Es difícil dar una definición precisa de lo que es un hongo, ya que la única característica en común de todos los organismos que el hombre ha clasificado como hongos es la de ser eucariontes sin clorofila, con pared celular que se alimentan por absorción de moléculas orgánicas (Blair, 2009). Así se diferencian de las plantas que no pueden sintetizar, y de los animales en que no pueden ingerir partículas. Las demás características que los definen tienen sus excepciones. La mayoría de los hongos son pluricelulares, a excepción de algunas levaduras. Los hongos producen esporas para su reproducción y la mayoría de ellos posee una estructura somática filamentosa. Las enfermedades causadas por hongos producen en sus hospederos una amplia variedad de tipos diferentes de síntomas. Entre otros los hongos fitopatógenos pueden producir síntomas muy diversos, tales como manchas cloróticas y necróticas, cribados, canchales, tizones, podredumbres húmedas o secas, momificaciones, agallas, abolladuras, costras, ahogamientos, marchitamientos y pústulas (Agrios, 1988).

2.3.2 Técnica para la identificación de hongos. Para la identificación de hongos fitopatógenos es necesario la observación de sus estructuras somáticas y reproductivas. Mediante la técnica de cámara húmeda y/o aislamiento microbiano es posible inducir la aparición de estas estructuras. La observación de las características de las estructuras producidas y el uso de claves taxonómicas son necesarios para determinar el género y la especie del hongo patógeno (Bridge y Spooner, 2001). La cámara húmeda consiste en colocar la muestra enferma en una bolsa de nylon o un recipiente con un trozo de papel embebido en agua. Es necesario mantener el recipiente cerrado a temperatura ambiente, hasta que se visualice el signo del hongo. La muestra a colocar en el recipiente debe estar limpia para que los resultados no se vean alterados por posibles contaminantes.

2.3.3 Estructuras vegetativas. Las estructuras vegetativas de los hongos corresponden a todos los tejidos encargados de funciones vitales, menos de la reproducción, entre los cuales podemos encontrar:

a) Hifas: La mayoría de los hongos poseen cuerpo filamentosos provisto de pared celular. A los filamentos que constituyen el cuerpo o soma vegetativo se les denomina hifas. Al conjunto de hifas se le denomina micelio. Cuando las hifas no presentan septos, el micelio es denominado cenocítico o no tabicado y cuando las presenta el micelio se dice que es tabicado.

b) Plasmodio: Se refiere al cuerpo o soma vegetativo de algunos hongos inferiores, el cual está constituido por una masa multinucleada, sin pared celular. Son escasos los hongos fitopatógenos que poseen soma vegetativo de tipo plasmodial.

c) Esclerocios: Son estructuras de resistencia formados por compactación de hifas. Estos esclerocios pueden tener diferentes formas y tamaños.

2.3.4 Estructuras reproductivas de hongos ficomicetes. Los hongos ficomicetes se caracterizan por poseer micelio cenocítico. Según reproducción sexual se clasifican como:

Oomycetes: Esta clase de hongos sexualmente producen oosporas esféricas y de pared gruesa, que se originan por la unión de dos gametos diferentes, el oogonio y el anteridio. Se reproducen asexualmente mediante conidias flageladas denominadas zoosporas. Estas zoosporas se encuentran contenidas en cuerpos fructíferos denominados zoosporangios.

Zigomycetes: Esta clase de hongos produce esporas asexuales no móviles contenidas en cuerpos fructíferos denominados esporangios. Sexualmente producen esporas denominadas zigosporas

2.3.5. Estructuras reproductivas de hongos superiores. Según Kimati, *et al.*, 1995, las estructuras reproductivas de hongos superiores no poseen células móviles, son los hongos terrestres más evolucionados, se adaptan y colonizan sustratos diversos.

Ascomycetes: La clase ascomycetes se caracteriza por poseer micelio tabicado y producir esporas de origen sexual denominadas Ascosporas. Estas ascosporas se producen dentro de sacos llamados ascas. Las ascas pueden encontrarse en forma libre o contenida en cuerpos fructíferos. Los cuerpos fructíferos pueden ser de dos tipos: Apotecios y Cleistotecios.

Basidiomycetes: La clase basidiomycetes se caracteriza por tener micelio tabicado y reproducirse sexualmente mediante la producción de basidioesporas. Estas son producidas exógenamente sobre una estructura llamada basidio. Los basidios pueden ser septados o no.

Deuteromycetes: Esta clase incluye a los hongos superiores (micelio tabicado) a los que no se les conoce la reproducción sexual. En algunos casos por no tener reproducción sexual, o si la tienen esta se produce rara vez, o simplemente porque no se le conoce aún. Estos hongos se reproducen de forma asexual formando esporas denominadas conidios. Los conidios se forman libremente o en cuerpos fructíferos. Los conidios pueden unicelular o multicelular pueden tener forma, tamaño y color muy diferente; ejemplo: obscuro o hialino, sueltos o agrupados.

2.3.6 Antecedentes generales de los hongos aislados.

Botrytis cinerea. Este hongo también conocido como " hongo del moho gris ", es un patógeno que causa graves enfermedades pre y post cosecha en al menos doscientas especies de plantas (Mirzaei y Goltapeh, 2007) , incluidos los cultivos de importancia agrícola y productos cosechados, como uvas, tomates, fresas, pepinos, flores del bulbo, flores cortadas y plantas ornamentales. La gama amplia de hospedantes de *B. cinerea* causa pérdidas económicas, no sólo durante el crecimiento, sino también durante el almacenamiento y transporte de los productos vegetales (Elad *et al.*, 2004). También, las cepas de *B. cinerea* han demostrado ser muy variable genética y fisiológicamente (Swartzberg *et al.*, 2008). Varias cepas han desarrollado resistencia a los fungicidas que los combaten (Latorre, 1984). La sobrevivencia de este hongo tiene lugar bajo la forma de micelio y esclerocios; esta última, muy resistente a condiciones climáticas, desfavorables, luego en primavera surgen un nuevo micelio o más raramente a apotecios provistos de ascosporas. La diseminación del hongo está asegurada por las conidias que se diferencian de manera abundante a partir del micelio, y desde la primavera hasta el otoño.

Monilinia sp. Es un hongo superior perteneciente al phylum ascomycota. Produce dos tipos de esporas: ascosporas de origen sexual, contenidas en ascas en cuerpos fructíferos denominados apotecios y conidios en cadenas, de origen asexual. Las ascosporas se producen en el suelo, en los apotecios que se forman en las momias que quedaron del año anterior semienterradas y protegidas por los pastos. Los conidios se producen sobre la planta en los órganos atacados (frutos momificados, canchales, pedúnculos donde hubo una momia). La enfermedad provocada por *Monilinia sp.* es conocida como podredumbre morena y afecta principalmente a cultivos de cerezo, ciruelo y duraznero. Las flores presentan manchas húmedas y luego, toman una coloración grisácea, marchitándose. *M. frutícola* penetra directamente en las hojas, a través de estomas o de la cutícula, si ésta no se ha engrosado. Los pétalos y sépalos se cubren de conidios cuando hay alta humedad relativa. Las ramas presentan manchas elípticas, pardas y canchales. Los brotes pueden manifestar canchales de forma oval. (Madia *et al.*, 2007).

Fusarium sp. *Fusarium oxysporum* es un hongo cosmopolita que existe en muchas formas patogénicas, parasitando más de 100 especies de plantas Gimnospermas y Angiospermas, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de muchas plantas (Bosland, 1988). Hongo perteneciente a la clase deuteromycete. Este presenta numerosas estructuras llamadas esporodocios o hifas no diferenciadas donde se agrupan las esporas. Existen dos tipos de conidios, los macroconidios que son hialinos, tabicados, generalmente con tres tabiques y microconidios más pequeños hialinos, unicelulares. Posee células de paredes engrosadas que actúan como estructuras de resistencias denominadas clamidiosporas pueden ser terminales o intercalares. Muchas de las especies de este género son sólo saprofitas o patógenos muy débiles. Entre los patógenos de importancia hay dos grupos generales: 1) los que producen pudriciones del tallo y la raíz, por ejemplo, *Fusarium solani* y *F. roseum*; 2) los que producen marchitez vascular, todos los variantes de la especie *Fusarium oxysporium*. Estos últimos viven en el suelo y, por lo general, una vez que se establecen en un terreno determinado persisten por muchos años. *F. oxysporium* consiste de diferentes formas, cada una de las cuales se especifica para una especie hospedante (Michielse y Rep, 2009).

Pestalotiopsis sp. Es un patógeno secundario, saprofito en tejidos muertos y es un parásito débil que infecta heridas bajo condiciones húmedas. La clasificación en el género se ha basado anteriormente en la morfología de los conidios y se están considerando como importante para distinguir las especies y géneros estrechamente relacionados. La enfermedad provocada por *Pestalotia sp.* se inicia como pequeñas áreas amarillas y translúcidas; con el tiempo se van ampliando y se tornan marrón oscuro con un halo clorótico alrededor (Langenheim, 1990). Luego la parte central de la lesión cambia a color gris, se vuelve quebradiza y produce puntos oscuros. Esas estructuras son acérvulos del hongo, los que tiene mucha importancia en el ciclo de vida del agente causal. Debido a que las nervaduras en cierta forma limitan el crecimiento de la enfermedad, esta toma generalmente una forma elíptica (Maharachchikumbura *et al.*, 2011).

2.3.7. Control de hongos fitopatógenos. Los métodos de control de hongos fitopatógenos se reducen principalmente al uso de fungicidas o agentes químicos que eliminan o inhiben el desarrollo de estos, junto con el uso integrado de buenas prácticas culturales, el conocimiento del patógeno, la biología de la enfermedad y la resistencia a las enfermedades. El uso de estos fungicidas, han generado en algunas zonas que los patógenos se hagan más resistentes (Bajkai y Kang, 2010). También existen organismos capaces de generar metabolitos y enzimas que pueden inhibir el crecimiento y desarrollo de hongos fitopatógenos, siendo esta una alternativa biológica al tratamiento de plantas afectadas por hongos.

2.3.8. Fungicida evaluado. En el desarrollo de esta práctica se evaluó germinación *in vitro* de conidias de *B. cinerea* frente a 3Tac®, un biofungicida que utiliza cepas de *Trichoderma spp.* como antagonista natural de ciertos hongos fitopatógenos que compite con estos por espacio y nutrientes. Presenta también acción como estimulante de crecimiento radical.

2.3 Bacterias fitopatógenas.

Las bacterias son organismos procariontes que no poseen membrana nuclear. Estas bacterias causan enfermedades en cultivos en todo el mundo (Gitaitis y Walcott, 2007). Por ejemplo, la marchitez bacteriana causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum* causa pérdidas severas en el banano, tomate y tabaco. Los síntomas, incluyendo clorosis, necrosis (lesiones discretas, tizón, pudrición, cancro y muerte descendente), marchitez y alteraciones del crecimiento (agallas).

2.4.1 Naturaleza de las bacterias. Las bacterias son procariontes unicelulares con pared celular. De forma esférica o bacilar (bacilos) o espiral (espirilos). los fitopatógenos casi todos son bacilos, de una longitud que va de 1 a 5 $\mu\text{m.}$, y un ancho de 0,5 a 1 $\mu\text{m.}$ En el citoplasma de la bacteria se encuentra el cromosoma bacteriano, que es un anillo relativamente grande de ADN, y otras estructuras más pequeñas de ADN, capaces de autor replicarse, llamadas plásmidos. El ADN cromosomal contiene los determinantes de la identidad y viabilidad de la bacteria, mientras que los plásmidos están más relacionados con la patogénesis y la resistencia a los factores de ambiente, incluyendo los antibióticos y fungicidas (Young *et al.*, 2001).

2.4.2 Características morfológicas y bioquímicas de *Pseudomonas syringae*. La bacteria posee forma de bastón, de 0,7-1,2 μm de ancho por 1,5-3,0 μm de largo, con uno o varios flagelos polares pudiendo presentarse sola, en pares o en pequeñas cadenas. Al ser sembrada en un medio de cultivo artificial, presenta colonias esféricas de bordes enteros, con un color verdoso claro brillante, de apariencia vidriosa al ser observada a la luz (Hirano y Upper, 2000).

En el caso de las bacterias fitopatógenas, la patogenicidad es considerada uno de los principales criterios de identificación, sin embargo muchos otros son importantes y deben ser atendidos, como pruebas bioquímicas, de morfología celular, de dimensiones de las células, aspectos de las colonias en determinados medios de cultivo, relación con el oxígeno libre, medios selectivos, técnicas especiales y métodos de coloración (Mullard, 2009), siendo esta última evaluación fundamentada en las propiedades metabólicas específicas de cada microorganismo y en la detección de la actividad de ciertas enzimas. Hildebrandt *et al.*, (2002), indica que este grupo bacteriano se divide en dos subgrupos: *Pseudomonas* fluorescentes y no fluorescentes. Esta bacteria está dentro del primer grupo, debido a que al crecer en un medio nutritivo con bajo contenido de hierro, produce pigmentos fluorescentes, de color verde amarillo, con capacidad de difundirse. Ogawa y Englis (1991), señalan que al sembrar la bacteria en el medio de cultivo artificial King B, se produce un pigmento verde fluorescente soluble en agua, en el cual se pueden identificar las colonias a la luz ultravioleta.

P. syringae puede ser diferenciada de otras *P. fluorescentes* en el denominado perfil LOPAT (+-- --+), clasificándola dentro de la sección Ia (Lelliott y Stead, 1987) (Cuadro 1). La mayor parte de las plantas están en esta sección (Smith *et al.*, 1992). Este grupo incluye sobre 50 patovares de *P. syringae* que causan un amplio rango de enfermedades en varias especies de plantas (Goszczyńska *et al.*, 2000).

Cuadro 1. Perfil pruebas LOPAT para la identificación de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Prueba	Reacción
Producción de Levan	+
Producción de citocromo c-oxidasa	-
Pudrición blanda de la papa	-
Producción Argenina- dihidrolasa	-
Hipersensibilidad en tabaco	+

Fuente. Lelliot *et al.*, 1987; Schaad, 1988; Goszczynska *et al.*, 2000.

2.4.3 Hospederos de *Pseudomonas syringae*. *Pseudomonas syringae* es la bacteria fitopatógena más polífaga y ubicua, capaz de causar infección en alrededor de 170 especies diferentes de plantas (Scortichini, 1998, citado por Oyarzún, 2005). Gran cantidad de especies de este patógeno han sido identificadas, la mayoría limitada a un solo género o familia de plantas.

2.4.4 Hipersensibilidad en tabaco. Antes de comenzar cualquier procedimiento con géneros bacterianos, se debe comprobar la patogenicidad del aislamiento obtenido. Esto se puede hacer de dos maneras, a través de la prueba de patogenicidad (hipersensibilidad) o mediante los postulados de Koch. La reacción de hipersensibilidad es un mecanismo de defensa de las plantas frente a la introducción de un patógeno, en el cual, si se produce una relación de hospedero-parásito incompatible, se produce una rápida necrosis y una desecación brusca en el parénquima de la zona inyectada, previniendo así el avance del patógeno (Klement y Goodman, 1967). Estos autores indican que esta prueba consiste en inyectar en forma subepidural una suspensión bacteriana de aproximadamente 1×10^8 ufc/ml en hojas de *Nicotiana tabacum* L. Con algunas especies de *Pseudomonas* se puede observar una de las tres siguientes reacciones:

- a) Combinación hospedero-patógeno compatible. No hay reacción de hipersensibilidad.
- b) No patógenas en tabaco, pero patógenas en otros hospederos. Produce una reacción hipersensitiva, necrosándose el tejido infiltrado en 24-48 horas.
- c) Saprófitos, solo se presenta una leve clorosis a los 3-4 días.

2.4.5 Fuentes de inóculo y diseminación. Las poblaciones epifíticas de *Pseudomonas syringae* se pueden distribuir ampliamente en las plantas aparentemente sanas y en tejidos de plantas hospederas como no hospederas (Hirano y Upper, 2000), siendo considerada por muchos autores como la principal fuente de inóculo (Dowler y Weaver, 1975; Latorre y Jones, 1979). Secundariamente, la bacteria puede sobrevivir en tejidos enfermos con canchros desarrollados en ramas o troncos (Latorre, 1984). Los canchros junto a las poblaciones epifíticas de la bacteria, constituyen la principal fuente de inóculo de la enfermedad. La diseminación de este patógeno se produce a través del agua que se arrastra en las estructuras de la planta después de una lluvia, desde donde la bacteria puede alcanzar y penetrar las cicatrices foliares en otoño durante la caída de las hojas o en primavera a través de las cicatrices dejadas por las yemas al abrir (Latorre, 1984). El injerto y porta injerto pueden traer el fitopatógeno desde vivero, siendo una importante fuente de diseminación (Azarenko, 1995). La diseminación de las bacterias ocurre a través del salpicado de las gotas de lluvia, acompañada de arrastre de gotas por viento; también hay posibilidad de transmisión bacteriana mediante aerosoles.

2.4.6 Control de *Pseudomonas syringae*. La necesidad de mayor producción de alimentos para satisfacer las necesidades de un mundo en crecimiento, ha estimulado una extensa investigación orientada a combatir las plagas y enfermedades de plantas y animales, intensificar los rendimientos y aumentar el valor nutritivo de los alimentos. En la actualidad, el empleo de los plaguicidas en la agricultura se incrementa cada día, como también lo hace la cantidad de productos que se expanden en el mercado bajo variadas presentaciones comerciales con características físicas, químicas y toxicológicas muy diversas (Guerrero, 1999). Latorre (1984) indica que los tratamientos químicos con compuestos cúpricos se han empleado como la única herramienta para reducir la incidencia y severidad de esta enfermedad. El mecanismo por el cual el cobre ejerce su acción bactericida a nivel celular es combinándose con la membrana plasmática por atracción electrostática y luego, penetrando por el medio de los canales iónicos, alterando la permeabilidad, lo que resulta en una fuga de iones y metabolitos de poco peso.

Dentro de la célula el ión Cu^{+2} se une a los aminoácidos que contienen sulfuros, resultando en la desnaturalización de proteínas. Cabe señalar que la continua aplicación de productos cúpricos para el control de patologías bacterianas ha provocado una selección de cepas resistentes, lo que explicaría por qué en algunos huertos no se logra un control eficiente. Debido a esta problemática, se han descubierto nuevas formas de control de esta patología, como lo señalado por Cooksey (1987), quién trabajando en plantas de tomate logró reducir significativamente la infección de *P. syringae* pv. *tomato* utilizando cepas no patógenas que compiten con cepas patógenas, produciéndose un control biológico de la enfermedad.

2.4.7 Bactericidas evaluados. A continuación se entregan antecedentes generales de los tres bactericidas evaluados en este trabajo.

Mastercop. Es un fungicida-bactericida preventivo de enfermedades en frutales, vides y hortalizas. Su ingrediente activo es el sulfato de cobre pentahidratado 25,63% p/v (256,3 g/L), el cual pertenece al grupo químico de los compuestos de cobre. Su modo de acción es de contacto. Este producto está formulado como suspensión concentrada, el cual se diluye en agua para ser aplicado en forma de aspersión directa.

Cupratec. Contiene cobre (Cu) al 5% en forma de Gluconato de Cu. Este producto principalmente corrige carencias de cobre, además de ejercer efecto bactericida, no produce fitotoxicidad y activa las enzimas vegetales del sistema de autodefensa de las plantas. Está especialmente diseñado para el tratamiento indicado de cítricos, hortalizas, frutales, vid, ornamentales e industriales. Su aplicación es de foliar con una concentración de 250cc/100 L.

Kocide. Es un fungicida cúprico que contiene Hidróxido de cobre al 53 % p/p. Tiene finalidad preventiva y de Contacto contra importantes enfermedades causadas por hongos y bacterias en almendros, damascos, cerezos, arándanos, limoneros, naranjos, duraznero, nectarino, frambueso, kiwi, manzano, nogal, peral y vides.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación y duración de la práctica.

Esta práctica profesional se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Agroindustria de la Universidad de La Frontera, durante septiembre de 2013 a enero del 2014.

3.2 Materiales.

3.2.1. Equipos. Cámara de flujo laminar ESCD 5096, micropipeta Eppendorf High Tech Lab., modelo V3, autoclave vertical Ortmann, destilador de agua Kotermann, modelo 1032, cámara de cultivo Kotermann, modelo 2737 – 122 L., vortex Labline, modelo 1291, agitador magnético Arquimed, modelo 752 A, estufa de esterilización Heraeus univ. s/8108801, modelo T-5042-2, microscopio óptico Olympus, modelo CX21, lupa estereoscópica Carl Zeiss, modelo Stemi DRC, refrigeradores marca Sindelen, modelo 360, termómetro digital Hanna Instrumentos, modelo HI98501-1, balanza Arquimed, modelo Acculab V-600, estándar 0,5 McFarland.

3.2.2. Material vegetal. Ramillas, yemas y flores de arándano, ramillas y frutos de cerezo, raíces y hojas de copihue.

3.2.3. Otros materiales. Agua destilada, alcohol, algodón hidrófobo, bandejas plásticas, bolsas de papel y plástico, papel absorbente, papel aluminio, para film, papel de envolver, pinzas metálicas y puntas de micropipeta.

3.2.4. Medios de cultivo. Se utilizó medio de cultivo selectivo King B para *P. syringae* y el medio de cultivo semi selectivo YDC para *X. corylina* (agar 15 g., glucosa 20 g., extracto de levadura 10 g., y carbonato de calcio 20 g.). También se utilizó medio de cultivo APD para el aislamiento de hongos.

3.3 Métodos.

3.3.1 Aislamiento de hongos. Las distintas muestras con las cuales se realizaron los procedimientos, eran provenientes de cultivos de arándano, copihue y cerezo. Entre los tejidos encontramos principalmente hojas, tallos, frutos y raíces. Las muestras fueron separadas por sintomatología aparente a enfermedades producidas por fitopatógenos y se almacenaron a una temperatura de entre de $7^{\circ}\text{C} \pm 2$ en un refrigerador hasta su próximo uso.

Para el aislamiento de los hongos que presentaban estas especies, se realizó un reconocimiento visual de las estructuras fúngicas, como cirros, picnidios y micelios que presentaban los tejidos vegetales examinados: hojas, raíz, fruto, tallo y pistilo de la flor de arándano (Figura 1). Los distintos tejidos fueron llevados a cámara húmeda preparados con papel y agua estéril dentro de una bandeja o placa Petri y dejados tapados a temperatura ambiente. Posterior a 4 días se realizó un primer acercamiento a la morfología celular de los hongos, realizando frotis fresco con el micelio de los hongos.



Figura 1. a) Hoja de copihue con cirros de *Pestalotia* sp. b) Ramilla de arándano con síntomas y signos de *Fusarium* sp. c) Pistilo de flor de arándano con signos de *B. cinerea*.
Fuente. Material propio.

3.3.2 Cultivo de hongos. Los micelios, cirros, picnidios de los distintos hongos fueron sembrados bajo campana de flujo laminar en Agar papa dextrosa (APD) y cultivados a $24^{\circ}\text{C} \pm 2$ en una cámara de cultivo. Con crecimiento del micelio en la placa Petri (4 días aprox.), se procedió a observar bajo lupa estereoscópica y microscopio óptico con aumento de 40x y 100x la forma de las hifas y conidios de los distintos hongos.

3.3.3 Pruebas de identificación morfológica de hongos. La identificación de los distintos hongos se realizó a través de un frotis fresco en portaobjetos y visualizados en un microscopio óptico con aumento de 40x., luego fueron fotografiados con una cámara integrada en el microscopio, y visualizados con el software computacional MShot Digital Imaging System, para obtener el registro de las estructuras observadas. Estos hongos fueron identificados en base a claves dicotómicas de hongos imperfectos (Barnett, 1960). No se realizó pruebas de identificación bioquímicas para ninguno de los hongos estudiados.

3.3.4 Aislamiento de bacterias. El aislamiento del género *P. syringae* se realizó por medio cortes realizados entre tejido enfermo y sano en hojas de copihue y ramillas de cerezo de aproximadamente 5 mm^2 (figura 2 y 3). Posteriormente este se dispuso en placas Petri con medio de cultivo King B para presenciar el crecimiento de colonias bacterias después de 48 horas de cultivo a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$. *P. syringae*, fue aislada tras una siembra por agotamiento en medio de cultivo King B desde la proliferación bacteriana de los tejidos vegetales de copihue sembrados.

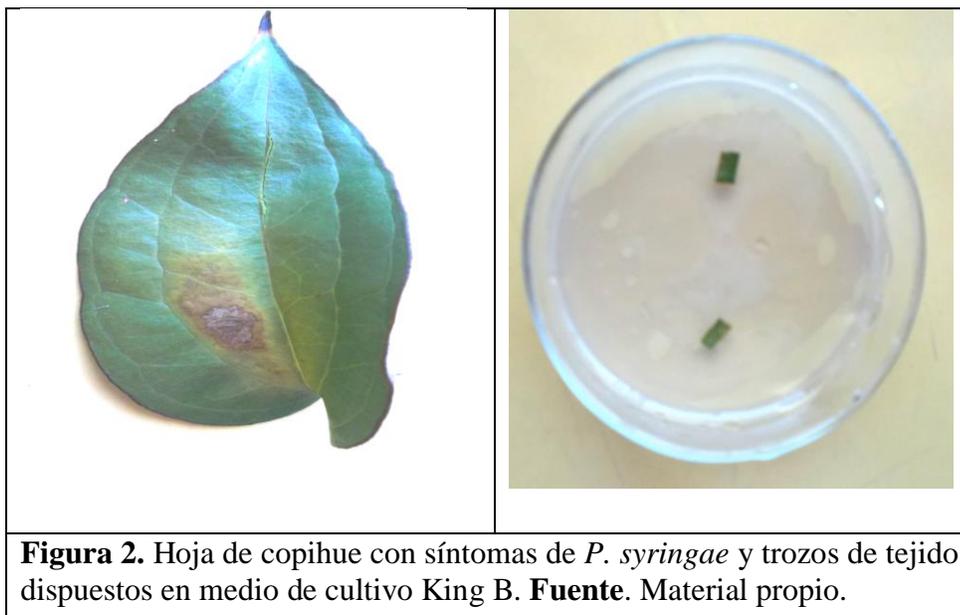


Figura 2. Hoja de copihue con síntomas de *P. syringae* y trozos de tejido dispuestos en medio de cultivo King B. **Fuente.** Material propio.

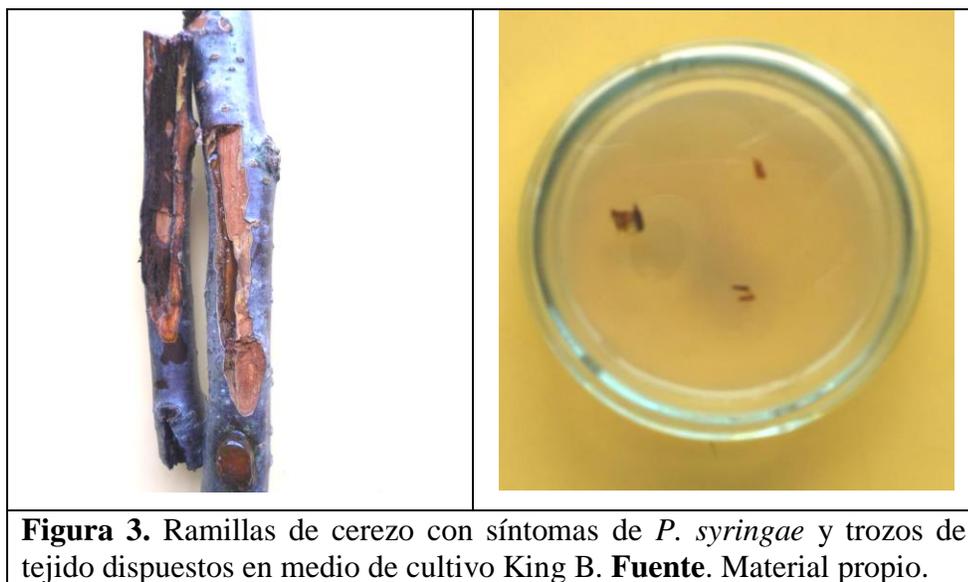


Figura 3. Ramillas de cerezo con síntomas de *P. syringae* y trozos de tejido dispuestos en medio de cultivo King B. **Fuente.** Material propio.

3.3.5 Pruebas de identificación morfológica y bioquímica de *Pseudomonas syringae*. Una vez aisladas las bacterias desde las hojas enfermas de copihue, se procedió a observar morfológicamente las colonias bacterianas que pudiesen pertenecer al género *Pseudomonas*, esto según forma, color, tipo de bordes, elevación y consistencia en medio YDC. Las cepas bacterianas escogidas, fueron colocadas bajo luz ultravioleta para verificar la detección de pigmentos fluorescentes en medio King B y clasificarlas como probables *P. syringae*.

Luego se procedió a realizar el perfil LOPAT según Lelliot y Stead, (1987), el cual consta de las siguientes pruebas; producción de levan, presencia de citocromo oxidasa, pudrición de la papa, presencia de argenina dihidrolasa e hipersensibilidad en tabaco, para determinar el patovar correspondiente. También se realizó las pruebas de tinción de Gram y producción de catalasa.

3.3.6 Capacidad de nucleación del hielo de *Pseudomonas syringae*. La capacidad de nucleación del hielo se evaluó según la metodología descrita por Cazorla *et al.*, (1998). Con un asa, se tomó cultivos de 24 h. de las 2 cepas bacterianas de las cuales de preparo una suspensión a una concentración de 30×10^8 ufc/ml., en 5 ml. De agua destilada estéril en tubos de ensayo. El control solo contenía agua destilada estéril con el mismo volumen de agua. Posteriormente los tubos se sumergieron por diez minutos en un vaso precipitado con una solución anticongelante de alcohol- agua en proporción 1:1 y a temperatura estable de -5°C . Se registró un resultado positivo, cuando el líquido contenido en el tubo el cual contenía la suspensión bacteriana, se congeló claramente y que el tubo no presentara congelación.

3.3.7 Diagnóstico de *Pseudomonas syringae* en ramillas de arándano.

a) Recepción de la muestra. Las ramillas de arándano fueron recibidas en el Laboratorio de Fitopatología y ordenadas según tratamientos (Figura 4). Cada una de las ramillas fue examinada visualmente para evaluar síntomas de la enfermedad, en el tejido su epidérmico en la zona del nudo de la rama y en yemas florales apicales de las ramillas.

b) Cámara húmeda. Se dispuso en cámara húmeda 30 yemas florales por repetición en cada tratamiento (90 yemas); sumando en total 810 yemas examinadas (9 tratamientos) (Figura 4).

c) **Siembra de yemas apicales y florales de ramillas de arándano.** Para la identificación de *P.syringae* en yemas apicales y florales de ramillas de arándano fue necesario extraer por separado 70 yemas apicales y florales en placas Petri con 3 repeticiones cada tratamiento en medio de cultivo King B y cultivadas a 25°C por 48 horas.

d) **Pruebas de identificación.** La identificación morfológica de *P. syringae*, se realizó siguiendo el protocolo de tinción de Gram con una posterior visualización de las células microbianas en un microscopio óptico con aumento de 100x con aceite de inmersión.

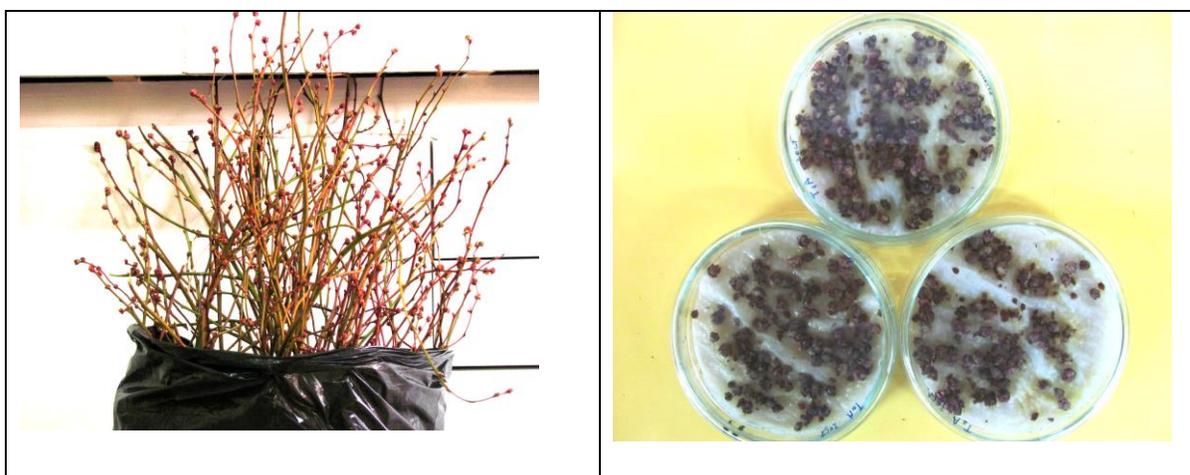


Figura 4. Ramillas de arándano y cámara húmeda en placa Petri para la proliferación de hongos. **Fuente.** Material propio.

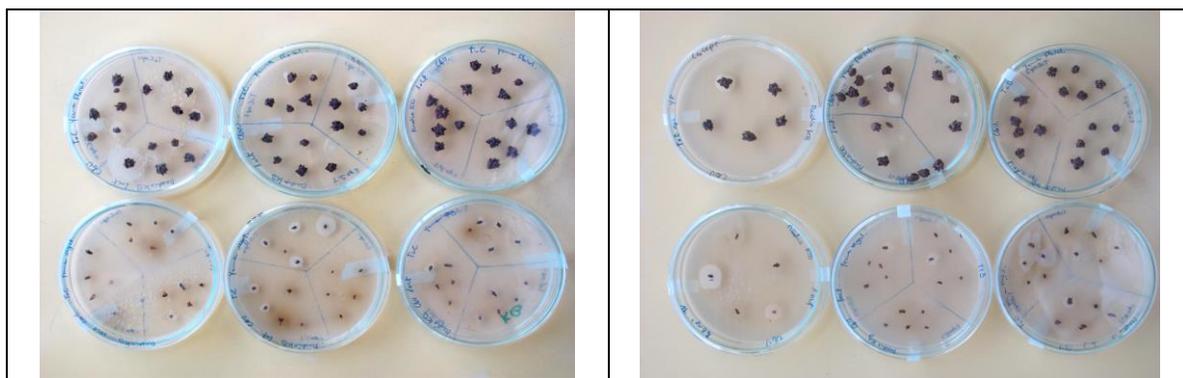


Figura 5. Siembra de yemas apicales y florales de arándano en medio King B.

3.3.8 Susceptibilidad *in vitro* de *P. syringae* a bactericidas cúpricos.

a) Material biológico. Las cepas bacteriana de *X. corylina* (avellano) y *P. syringae* (copihue y cerezo) fueron cultivadas en el Laboratorio de Fitopatología, de la Universidad de La Frontera. Se repicó mediante siembra por agotamiento tanto para *X. corylina* (avellano) como para *P. syringae* en placas Petri con medio YDC y en medio King B respectivamente, con el propósito de obtener colonias puras y aisladas.

b) Tratamientos. Se evaluó 7 concentraciones de bactericidas cúpricos más el control, cada una con 3 repeticiones. Las concentraciones para todos los productos fueron de 0 ppm, 100 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm (dosis comercial), 5.000 ppm y 10000 ppm.

c) Preparación medios de cultivo. Los medios de cultivos fueron preparados usando la formula $C1*V1=C2*V2$ para cada una de las concentraciones en evaluación se utilizo 50 ml. de agua destilada, desde una solución madre e 100.000 ppm.

d) Siembra bacteriana. Se sembró en estrías con las cepas de *P. syringae* (aislada de cerezo) y *P. syringae* (aislada de copihue) y *X. corylina* (aislada de avellano europeo).

e) Diseño experimental y análisis estadístico. Los datos obtenidos fueron analizados en base a un diseño completamente aleatorizado, con 3 repeticiones por tratamiento, considerando cada placa Petri como una unidad experimental. El análisis estadístico de los datos paramétricos consideró ANDEVA y el promedio de los tratamientos fue calculado a través de la prueba de Tukey al 5%. Los datos fueron analizados por el programa STAT statistics.

3.3.9 Efecto de 3Tac® en germinación de conidios de *Botrytis .cinerea*.

a) Preparación medio de cultivo. Para poder visualizar el efecto inhibitorio que tiene 3Tac® frente al crecimiento y formación del tubo germinativo de los conidios de *B. cinerea*, se procedió a generar un medio de germinación de conidios en base a agar agua autoclavado. Las concentraciones utilizadas para la realización del ensayo fueron: 0 ppm (control negativo), 1000 ppm, 2000 ppm, 4000 ppm y 10000 ppm de 3Tac®. Cada concentración con 3 repeticiones para ambos cultivares. El cálculo de concentraciones se realizó para un volumen final de 100 ml en agua destilada estéril en matraces Erlenmeyer de 250ml.

b) Inoculación de conidios en medio Agar agua. Los conidios de *B. cinerea* fueron cultivados desde el micelio del hongo aislado en agar papa dextrosa. Utilizando lupa estereoscópica y pinza, se esparcieron los conidios sobre agar agua. Estos se incubaron a 24°C en cámara de cultivo, siendo fueron examinados a las 48 horas de crecimiento.

c) Aspersión de 3Tac® sobre conidios de *B. cinerea*. Las concentraciones de 3Tac® fueron asperjadas sobre las placas Petri que contenían las conidias. Se cuantifico (%) la cantidad de conidias germinadas en las concentraciones en estudio, a las 24 y 48 horas de cultivo en cámara a $26 \pm 2^\circ \text{C}$.

d) Diseño experimental y análisis estadístico. Los datos obtenidos fueron analizados en base a un diseño completamente aleatorizado, con 3 repeticiones por tratamiento, considerando cada placa Petri como una unidad experimental. El análisis estadístico de los datos paramétricos consideró ANDEVA y el promedio de los tratamientos fue calculado a través de la prueba de Tukey con una probabilidad del 5%. Los datos fueron procesados en el programa STAT statistics.

3.3.10 Prueba de bioantagonismo. Se evaluó efecto inhibitorio *in vitro* del bactericida biológico *Nacillus* sobre *Pseudomonas syringae* y sobre *Xanthomonas corylina*.

a) Aislamiento bacteriano. Las colonias de *X. corylina* se aislaron en medio YDC desde tejido sintomático de avellano europeo cv. Barcelona proveniente de plantación comercial ubicada en Allipen, Región de La Araucanía. *P. syringae*, se aisló en medio King B desde tejido sintomático de arándano cv. Brigitta, de plantación comercial ubicada en Freire, Región de La Araucanía.

b) Multiplicación del inóculo. Las cepas bacterianas de *Nacillus*, fueron multiplicadas en matraz con caldo Nutritivo líquido, manteniendo en agitación por 24 horas a 20°C.

c) Concentraciones evaluadas de *Nacillus*. 100-200-500-1000-2000-4000-8000 ppm.

d) Cultivo bacteriano de bacterias fitopatógenas. Cada aislado puro de *X. corylina* y *P. syringae*, fueron multiplicados en matraz con 200cc de medio de cultivo Nutritivo Líquido, manteniendo en agitación por 24 horas a 20°C, para su multiplicación.

e) Antibiosis. Siembra en césped sobre Agar Nutritivo en placa de Petri, se esparció 1 ml del cultivo de la bacteria fitopatógena, el exceso de líquido bacteriano fue retirado. Inoculación de *Nacillus*: en 4 orificios, realizados con sacabocado de 0,5cm en medio de cultivo, se agregó 100 ul del cultivo líquido del *Nacillus* en Agar nutritivo. Las placas fueron mantenidas en refrigerador por 2 horas, luego se incubaron en estufa de cultivo a 25°C. Evaluación: halos de inhibición (mm) medidos con regla en 4 posiciones equidistantes, a las 24 y 48 horas de incubado, promedio de 3 mediciones por halo, 3 halos por placa, 3 placas por tratamiento, total 27 por tratamiento. Diseño experimental completamente al azar, cuatro repeticiones, cada placa fue la unidad experimental; testigo placas con las bacterias patógenas y otras con *Nacillus*.

f) Inhibición por competencia. Siembra de bacteria fitopatógena (*X. corylina* o *P. syringae*) en placa de Petri con Agar Nutritivo, en forma de líneas paralelas (3) equidistantes y a continuación se sembró extracto de *Nacillus* en línea perpendicular a las realizadas; luego se incubaron a 25°C por 5 días. Se cuantificó la cantidad (%) de crecimiento de la bacteria fitopatógena invadida por colonias bacterianas de *Nacillus*; promedio de 3 mediciones por placa y 12 por tratamiento. Diseño completamente al azar, cuatro repeticiones, cada placa Petri fue la unidad experimental.

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Caracterización morfológica de los distintos hongos aislados.

Botrytis cinerea. El crecimiento micelial del hongo fue moderado y de color gris, con formación de abundantes esclerocios (Figura 6). Se distingue inicialmente micelio de color blanco y a medida que va envejeciendo se tornan gris pardo con abundantes esclerocios de color negro distribuidos irregularmente en el medio, estas características coinciden con las señaladas por Ávila (1993) y Millán (1996).

Microscópicamente *B. cinerea*, presento los extremos de las hifas ramificados, al comienzo de su formación se ven hialinas, con el tiempo se tornan pardas o negras (Piñeros y Rivera, 1988). La célula terminal de cada ramificación tiene forma de ampolla a partir de la cual se forma en un denticulo, conidia hialina, esférica o elipsoide y ligeramente pigmentada. Poseen doble membrana (Jarvis, 1997) y su tamaño aproximadamente es de 10 x 8.5 μm .



Figura 6. *Botrytis cinerea*: conidióforo (10x lupa estereoscópica), esclerocios y conidias 40x.

Pestalotiopsis sp. Macroscópicamente este hongo presentó acérvulos de color negro, discoideos o en forma de cojín, la colonia es de color blanco y forma círculos concéntricos (Figura 7), también este presentó conidióforos cortos con conidias oscuras, unicelulares hialinas, células con extremos puntiagudos, elipsoides, con apéndice apical. Esta descripción morfológica estuvo basada en libro de claves dicotómicas de Barnett (1960). Para precisar la especie se necesita de mayores estudios morfológicos y genéticos, ya que el hongo está asociado a una especie endémica chilena, de la cual no hay referencias publicadas de los fitopatógenos que le afectan.



Figura 7. Cirros en hojas de copihue y aislamiento en placa con medio APD.

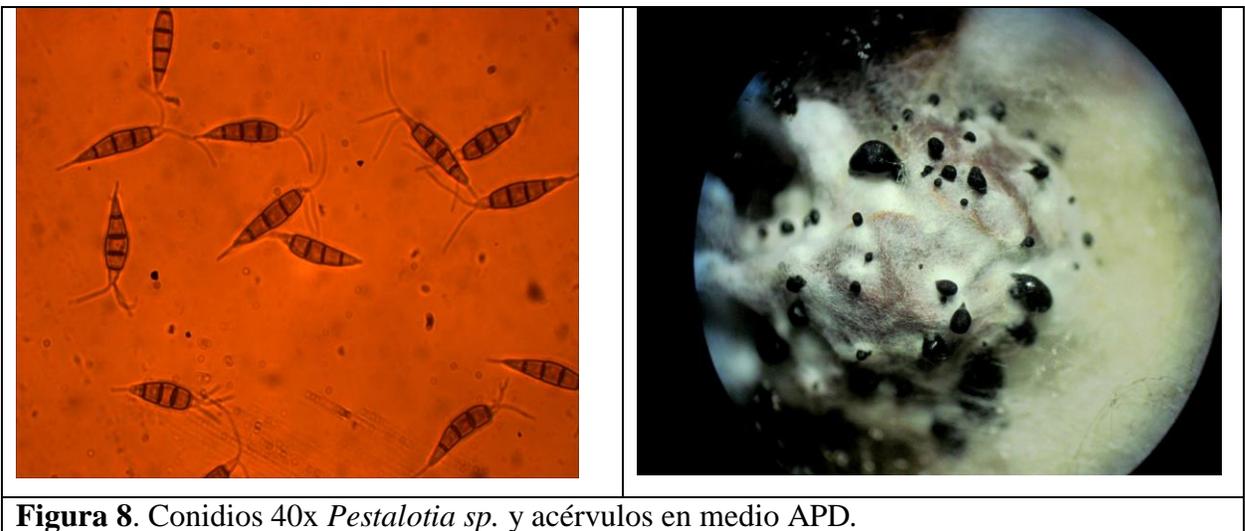


Figura 8. Conidios 40x *Pestalotia sp.* y acérvulos en medio APD.

Fusarium oxysporum. Las características macroscópicas de las colonias en agar PDA tienen un aspecto aterciopelado de color blanco amarillento con tono rosado. Reverso amarillo o con colores púrpura. Microscópicamente las macroconidias de *F. oxysporum* eran de paredes delgadas, fusiformes, largas, moderadamente curvadas en forma de hoz, con varias células y de 3 a 5 septos transversales, con la célula basal elongada y la célula apical atenuada; las macroconidias de tamaño de 27 a 46 μm de largo por 3.0 a 4.5 μm de ancho (Nelson *et al.*, 1964).



Figura 9. Ramillas de arándano, aislamiento de *Fusarium oxysporum* en APD y Macroconidios de *Fusarium sp.*

Monilia sp. El micelio de este organismo es de color blanco y abundante en medio de cultivo, las conidias de presentan un color rosado, de una célula, corta y redondeada, catenulada acropetalmente (forma de conidiación en la cual se forman cadenas de conidios), los conidióforos son ramificados, estas células difieren de las células conidiales mayores (Barnett, 1960).



Figura 10. Frutos de cerezo parasitado con *Moniliasis sp.* Aislamiento en APD de *Moniliasis sp.* y conidios de *Moniliasis sp.* **Fuente.** Material propio.

4.2 Caracterización morfológica y bioquímica de *Pseudomonas syringae* aislada de cerezo.

De los aislamientos realizados se evidenció diferentes tipos de colonias en el medio de cultivo YDC, producto de la contaminación bacteriana procedente del lugar de recolección. Este medio de cultivo según Schaad (1998), permite discriminar entre bacterias que producen colonias color amarillo correspondiente al género *Erwinia* y *Xanthomonas*, y blanco corresponde a *Pseudomonas*, constituyendo el primero criterio de clasificación para bacterias fitopatógenas. Aquellas colonias que presentaban forma circular, coloración blanco crema, bordes lisos con elevación convexa y consistencias mucilaginosas, fueron seleccionadas como *Pseudomonas*. Las colonias bacterianas tipificadas se repicaron sobre medio de cultivo King B a fin de purificar el aislamiento y obtener un nuevo inóculo, para posteriormente observarlas bajo luz ultravioleta de manera de confirmar la presencia de pigmentos fluorescentes. Todas las placas Petri con los aislamientos bacterianos puros de las 2 cepas, ubicados bajo luz ultravioleta mostraron fluorescencia (figura 12), clasificándolas como *Pseudomonas syringae*.

Cuadro 2. Pruebas usadas para la caracterización bioquímica de las cepas de *P. syringae*.

Prueba	Colonia A	Colonia B
Tinción Gram	Bacilos Gram negativos	Bacilos Gram negativos
Oxidasa	(-)	(+)
Catalasa	(+)	(+)
Argenina dihidrolasa	(+)	(-)
Pudrición de la papa	(+)	(+)
Hipersensibilidad en tabaco	(-)	(-)
Producción de Levan	(+)	(+)
Nucleación hielo	(+)	(-)
Crecimiento YDC	Colonia blanca cremosa	Colonia blanca cremosa

Este test fue establecido por Lelliot y Stead, (1987) con el propósito de reducir la incerteza al efectuar una caracterización bacteriana de *P. syringae* y establecer un sistema de clasificación estándar para las especies de *Pseudomonas* y sus respectivos patovares, ya que los métodos de identificación con los que se trabajaba en esa época, no permitían una diferenciación clara entre las especies patógenas y saprofitas.

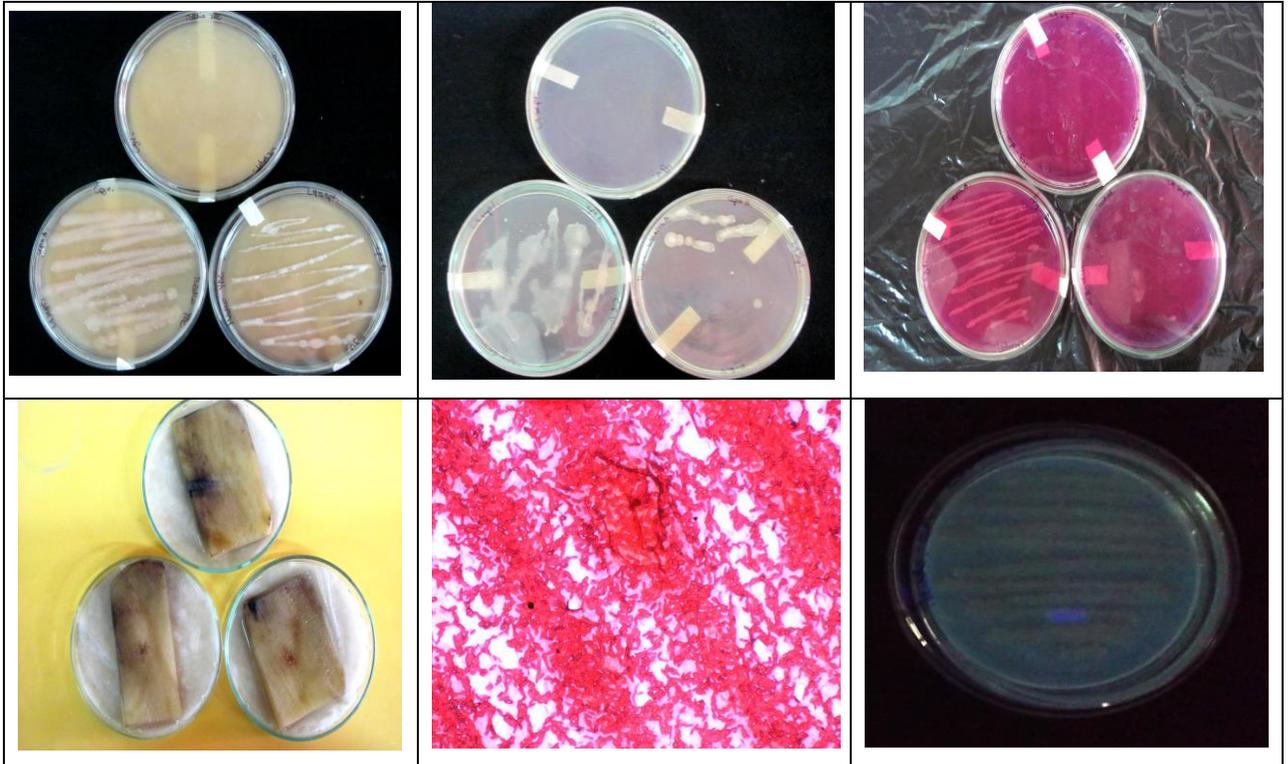


Figura 12. a) Cepas de *P. syringae* en medio YDC. b) Cepas de *P. syringae* en medio King B. c) Prueba Argenina dihidrolasa. d) Pudrición de la papa e) Tinción Gram. f) Fluorescencia.

4.3 Diagnóstico fitosanitario de *Pseudomona syringae* y otros fitopatógenos en ramillas de arándano.

No se detectó lesiones necróticas en las ramillas. En medio de cultivo King B se dispusieron 5 yemas vegetativas y 5 yemas florales por repetición (3), totalizando 15 yemas por tratamiento y 135 yemas en total (9 tratamientos), y mantenidas en cámara de cultivo a 28 grados Celsius. Transcurrido 3 días, no se detectó desarrollo de *P. syringae*; tipificadas en función de características morfológicas, medio de cultivo selectivo y fluorescencia en luz ultravioleta. No obstante es de consignar que se detectó en un 90 % de los casos examinados desarrollo bacteriano, con 3 tipos de colonias descritas a continuación:

- a) Colonias color blanco de forma irregular con bordes ondulados, de elevación plana con una superficie plegada y de consistencia membranosa.
- b) Colonias color crema de forma irregular con bordes enteros, de elevación convexa con una superficie lisa y de consistencia cremosa.
- c) Colonias color crema de forma irregular con bordes enteros de elevación plana con una superficie lisa y de consistencia cremosa. Se detectó los siguientes hongos: *Botrytis cinerea* (30%), *Penicillium* sp. (20%), *Fusarium* sp. 1%. No se detectó evidencias de *P. syringae*.

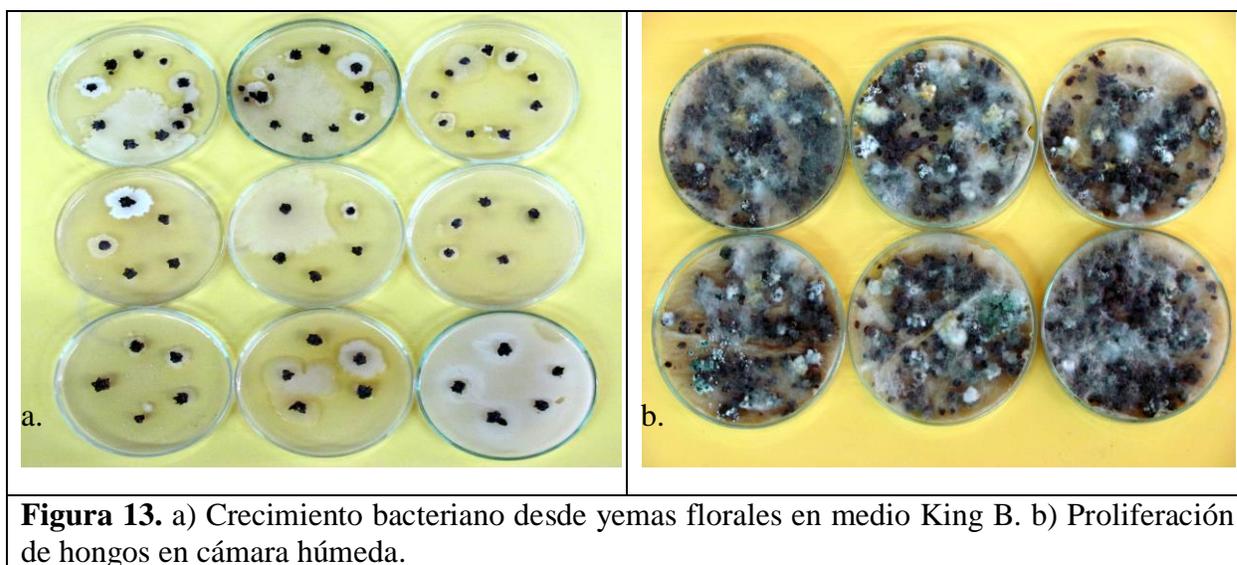


Figura 13. a) Crecimiento bacteriano desde yemas florales en medio King B. b) Proliferación de hongos en cámara húmeda.

4.3.1 Antibiosis entre bacterias aisladas de las yemas de arándano. Durante el desarrollo y observación de resultados del diagnóstico fitosanitario de *Pseudomona syringae* en ramillas de arándano, se apreció interacción microbiana inhibitoria de bacterias de especie del genero *Bacillus* spp, sobre *P. syringae*, las principales cepas bacterianas que inhibían (Figura 15) fueron aisladas para futuros estudios en la búsqueda de microorganismos de control biológico de fitopatógenos.



Figura 14. Antibiosis generada entre bacterias en el cultivo de yemas vegetativas y yemas florales de arándano.



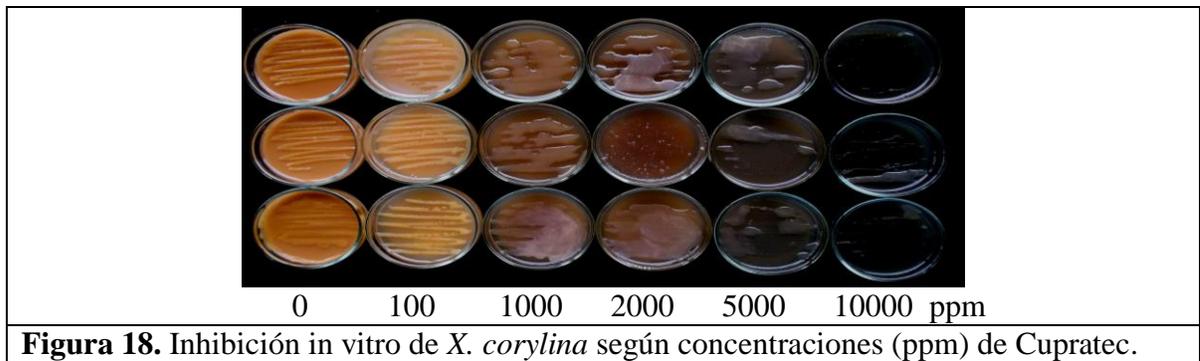
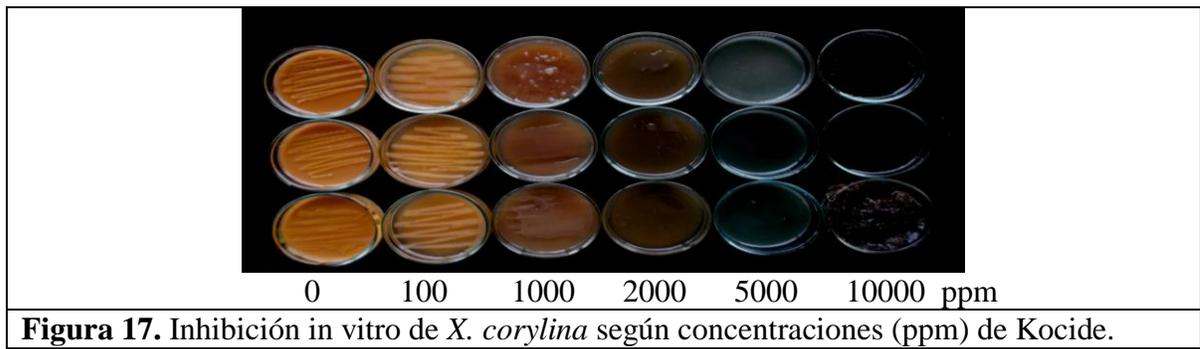
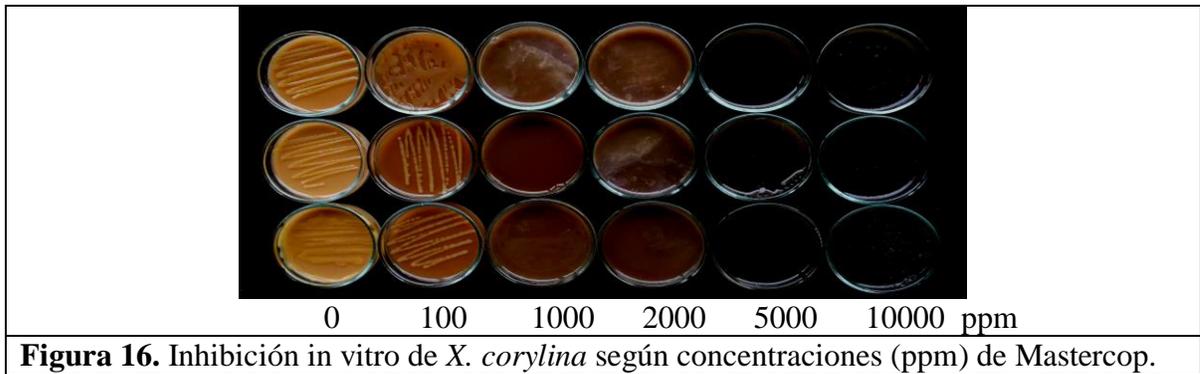
Figura 15. Colonias predominantes del cultivo de yemas de arándano

4.4 Evaluación de susceptibilidad de *Xanthomonas corylina* a bactericidas cúpricos.

Se evaluaron tres bactericidas cúpricos sobre *X. corylina* aislado de avellano europeo establecido en plantaciones comerciales en la Región de La Araucanía; los resultados se incluyen a continuación, para Mastercop (Figura 16), para Kocide (Figura 17) y para Cupratec (Figura 18).

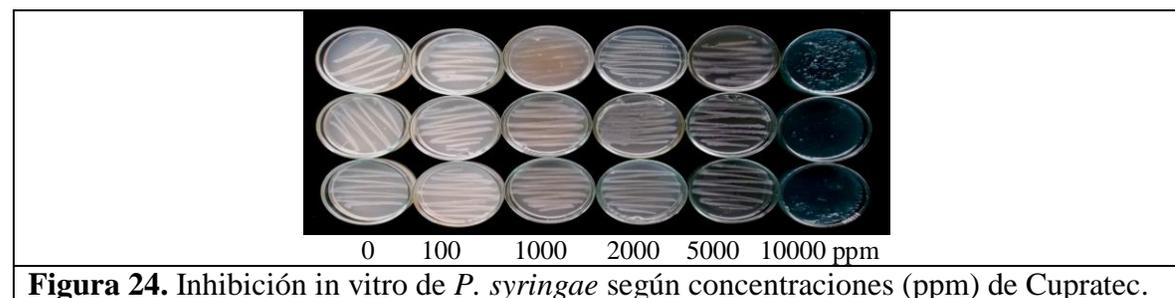
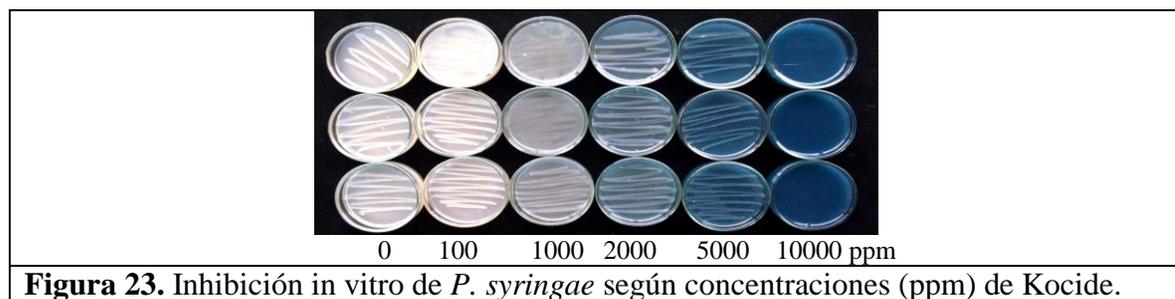
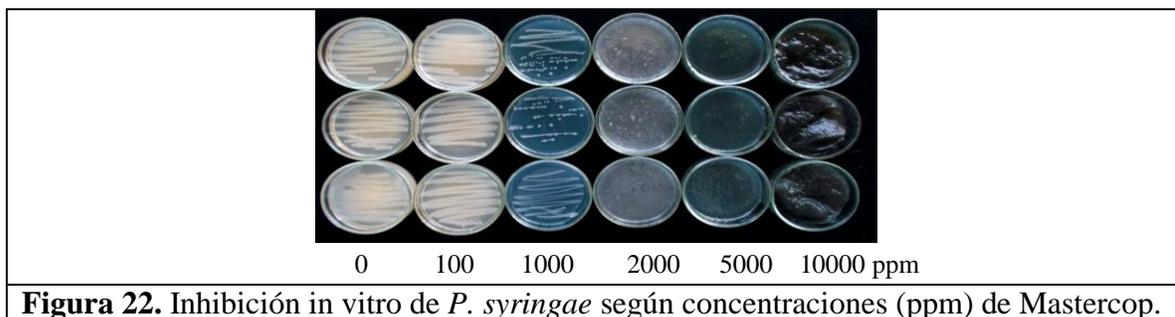
Tanto Mastercop como Kocide inhibieron el desarrollo de *X. corylina* desde 1000 ppm de producto comercial, consecuentemente la dosis efectiva media debiera situarse entre 100 y 1000 ppm. En el caso de Cupratec la eficacia de este bactericida fue menor, situándose la inhibición completa de *X. corylina*, a una concentración superior a 10000 ppm. Los activos de los productos evaluados son diferentes, Mastercop corresponde a un cobre pentahidratado a una concentración de 50%, Kocide a hidróxido de cobre a una concentración de 46% y para Cupratec el activo es glucanato de cobre al 5%. En parte el diferencial de eficacia que se obtuvo se explica por el activo y la concentración de este en el producto comercial evaluado. La Dosis Efectiva (DE50) media no fue calculada, ya que para determinar dicho parámetro se debe realizar mayor cantidad de pruebas entre las concentraciones de inhibición y no inhibición de la bacteria.

Los bactericidas evaluados son de uso habitual en avellano europeo, utilizándose una dosis comercial entre 200 g y 300 g por 100 litros de agua, lo que equivale entre 2000 ppm y 3000 ppm, en los tres casos evaluados las dosis comerciales, no ejercieron un control en el crecimiento bacteriano. Este resultado no era esperable ya que para que una molécula se considere potencialmente activa debe tener una alta eficacia a concentraciones inferiores a 100 ppm. Consecuentemente estos resultados tienen un carácter parcial y deben ser repetidos, para determinar las razones por las que la eficacia obtenida fue muy inferior a lo esperado. También es de consignar para que un activo sea comercializado se han realizado innumerables pruebas durante muchos años, para asegurar la efectividad de la dosis comercial. La resistencia de esta bacteria a los bactericidas evaluados, es una presunción poco válida, en tanto la presión e estos bactericidas cúpricos sobre esta bacteria ha sido mínima en condiciones de campo.



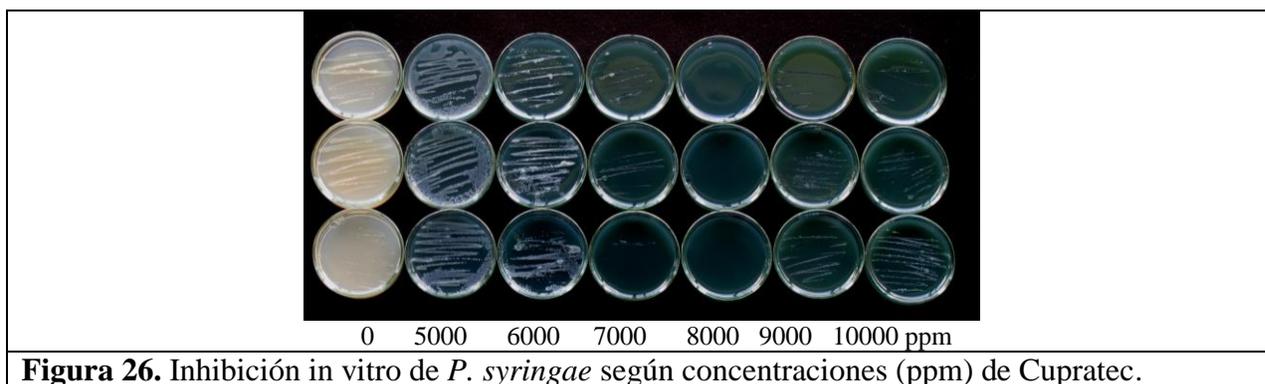
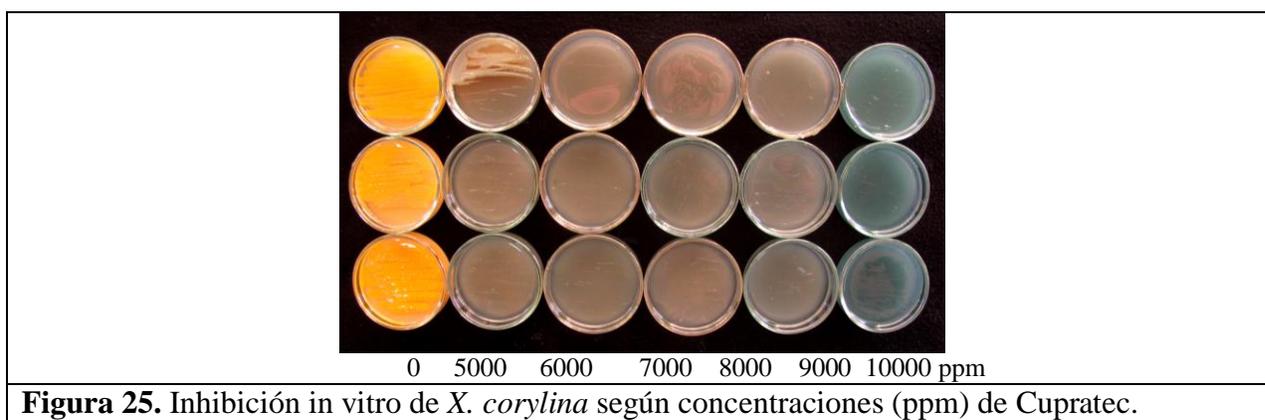
4.5 Susceptibilidad de bactericidas cúpricos sobre *Pseudomona syringae* de cerezo.

Se evaluaron 3 bactericidas cúpricos sobre *P. syringae* aislado de cerezo establecido en plantaciones comerciales en la Región de La Araucanía; los resultados se incluyen a continuación, para Mastercop (Figura 22), para Kocide (Figura 23) y para Cupratec (Figura 24). Para el caso de Mastercop la inhibición bacteriana se genera a partir de una concentración de 2000 ppm (dosis comercial). La dosis efectiva media (DE50) se encuentra entre 2000 y 5000 ppm. Kocide al igual que Cupratec, inhiben el crecimiento de *P. syringae* a una dosis efectiva media entre 5000 y 10000 ppm. Para precisar la DE50 se requiere realizar pruebas de inhibición *in vitro* entre los valores límites de inhibición para cada bactericida ocupado.

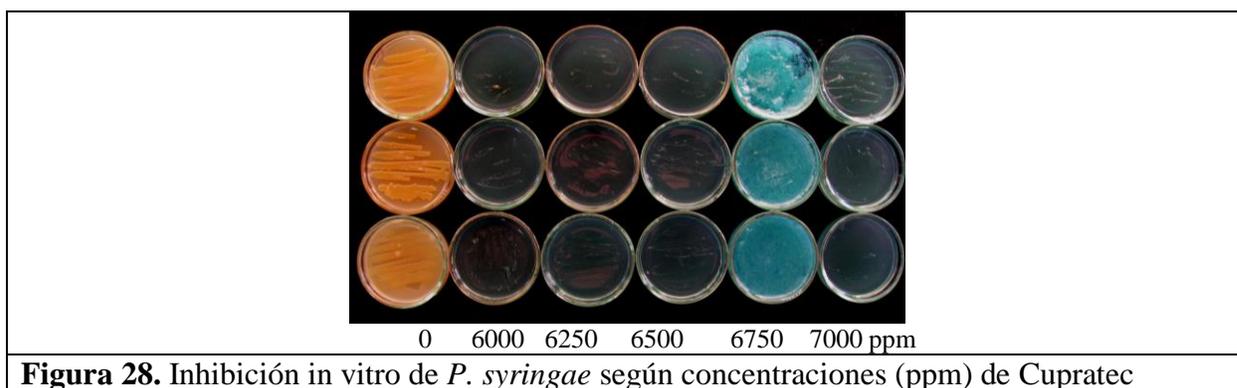
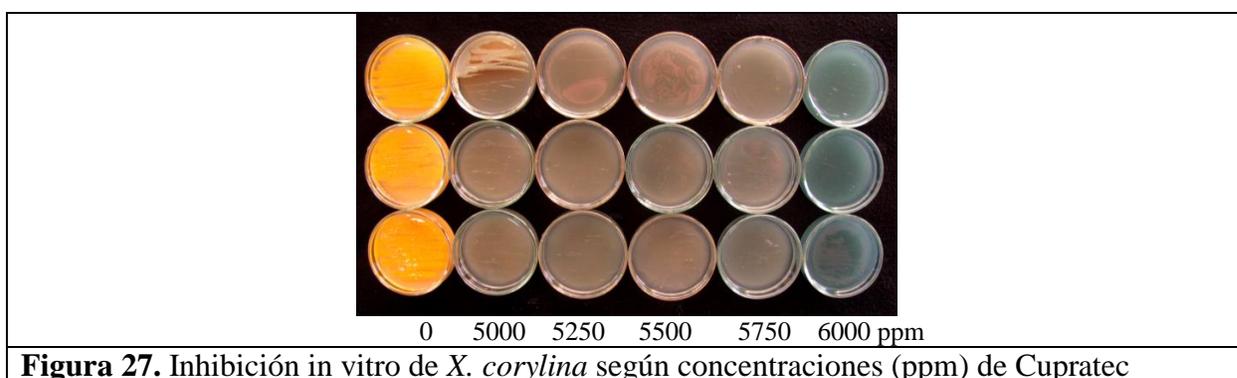


4.6 Dosis efectiva media de Cupratec sobre *X. corylina* de avellano y *P. syringae* de cerezo.

Tras definir el rango de susceptibilidad de las cepas bacterianas a este bactericida, se realizó el cálculo de nuevas concentraciones para definir la dosis efectiva media (DE) de inhibición. Para ambas cepas se realizó una nueva serie de concentraciones las cuales fueron 5000 ppm, 6000 ppm, 7000 ppm, 8000 ppm, 9000 ppm y 10000 ppm. Posteriormente se realizó el mismo procedimiento de siembra y cultivo descrito en la metodología.



Los límites inhibitorios de crecimiento para *X. corylina* están entre 5000 y 6000 ppm. de concentración de Cupratec (Figura 25), por otro lado, *P. syringae* se inhibe entre 6000 y 7000 ppm de concentración (Figura 26). Finalmente se realizó una serie de concentraciones en relación al resultado anterior de cada una de las cepas; para *X. corylina* se utilizaron concentraciones de 0 ppm, 5000 ppm, 5250 ppm, 5500 ppm, 5750 ppm y 6000 ppm y para *P. syringae* de 0 ppm, 6000 ppm, 6250 ppm, 6500 ppm, 6750 ppm, 7000 ppm. Podemos apreciar que para *X. corylina* la dosis efectiva media se encuentra entre 5000 y 5250 ppm (Figura 27) y para *P. syringae* entre 6000 y 6250 ppm (Figura 28).



4.7 Efecto de 3Tac® en germinación de conidios de *B. cinerea*.

Para cuantificar el porcentaje de conidias germinadas se observó con objetivo de 40x, luego de 48 horas y 30 días de cultivo. Los resultados se detallan en el Cuadro 4. El mayor porcentaje de conidias germinadas se detectó en placas con concentraciones de 0 ppm (93%) en el caso de y en 3Tac® hubo inhibición de conidias según la concentración evaluada; a 1000 ppm (24%) y 2000 ppm (23%) entre 2000 ppm y 4000 (0%) y 10000 (0%). (Figura 29).

Cuadro 4. Promedio de conidias germinadas de *Botrytis cinerea* en 48 horas y 30 días.

Concentración (ppm)	48 horas	30 días
0	9,3 c	7,2 c
1000	2,4 b	6,7 c
2000	2,3 b	5,5 b
4000	0,0 a	0,0 a
10000	0,0 a	0,0 a

*Las distintas letras en cada columna indican la diferencia significativa según Tukey ($p \leq 0,05$).

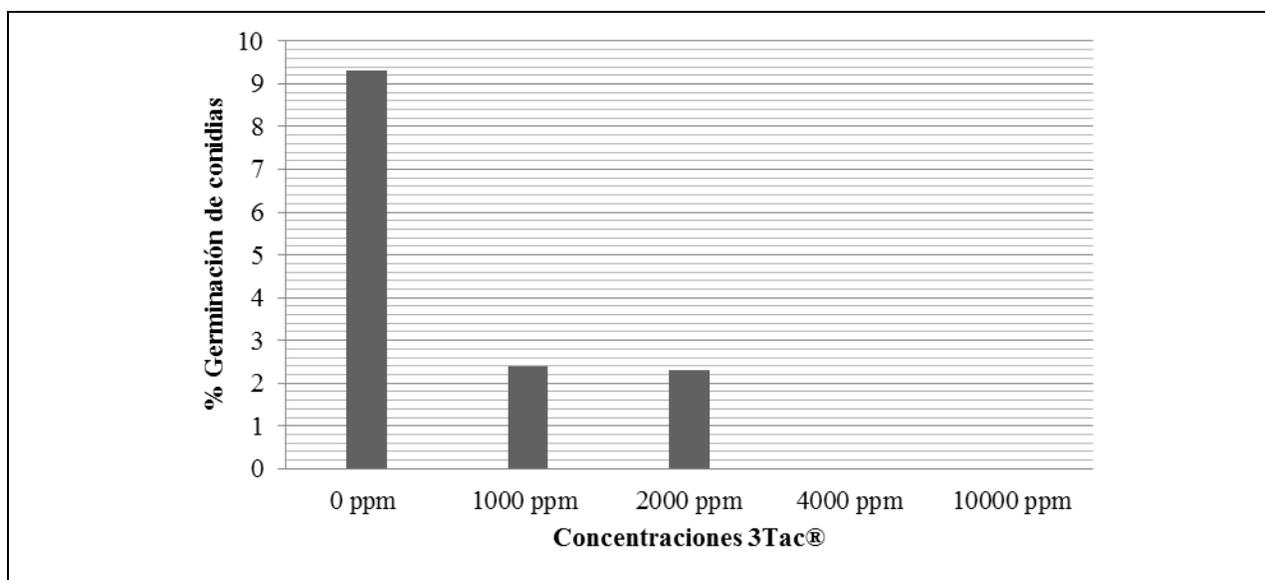
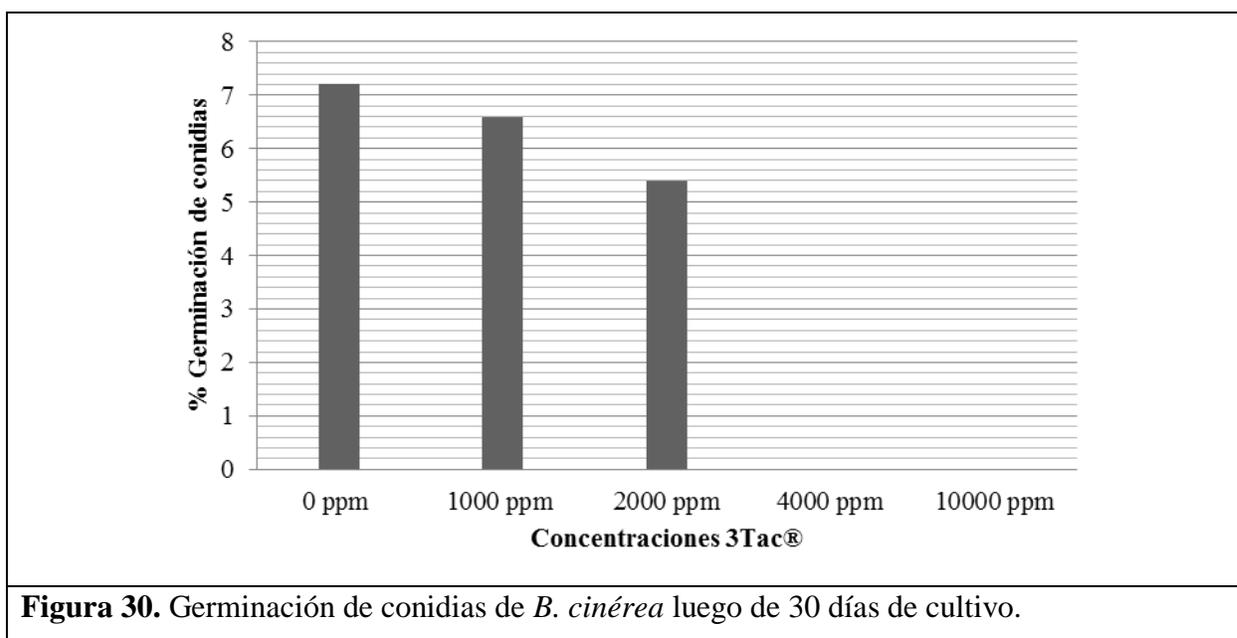


Figura 29. Germinación de conidias de *B. cinerea* tras 48 horas de cultivo.

La germinación de las conidias de *B. cinerea* tras 30 días de cultivo, aumentó comparadas con 48 horas de cultivo. Consecuentemente el fungicida tuvo efecto fungicida a una concentración mayor a 2000 ppm y a menor concentración pierde efectividad y aumenta la cantidad de conidias germinadas (Figura 30). La efectividad de este producto en relación a la concentración y tiempo de aplicación es importante dado las consecuencias económicas que trae a los distintos productores cosechar productos contaminados.



4.8 Prueba de bioantagonismo.

4.8.1 *Pseudomonas syringae*.

a) Antibiosis. Todas las concentraciones evaluadas de Nacillus inhibieron el desarrollo en medio de cultivo Agar Nutritivo; la intensidad de esta acción inhibitoria difirio entre las concentraciones y no fue directamente proporcional al aumento en la concentración evaluada. (Cuadro 5). A mayor concentración mejor eficacia, en la siguiente secuencia de significancia: 8000 ppm (15,8mm) mayor que 4000 ppm (10,3mm) y 2000 ppm (9,6 mm) este ultimo sin diferir de 1000 ppm (7,8mm) que fue similar a 500 ppm (6,1mm) y 200 ppm (5,4 mm), los que no difirieron entre sí; en el caso de 100 ppm (2,4 mm) fue similar estadísticamente al testigo. El halo de inhibición de Nacillus sobre *P. syringae* fue poco evidente (Figura 31).

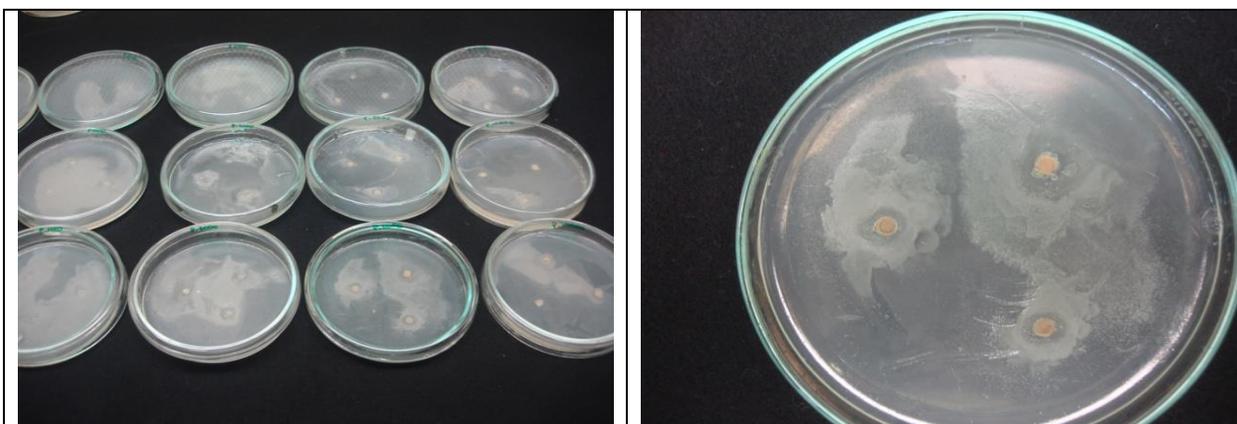


Figura 31. Antibiosis de *Bacillus* sobre *Pseudomonas syringae* a las 24 horas de incubado a 25°C; 100 ppm, 200ppm, 500ppm y 1000ppm.

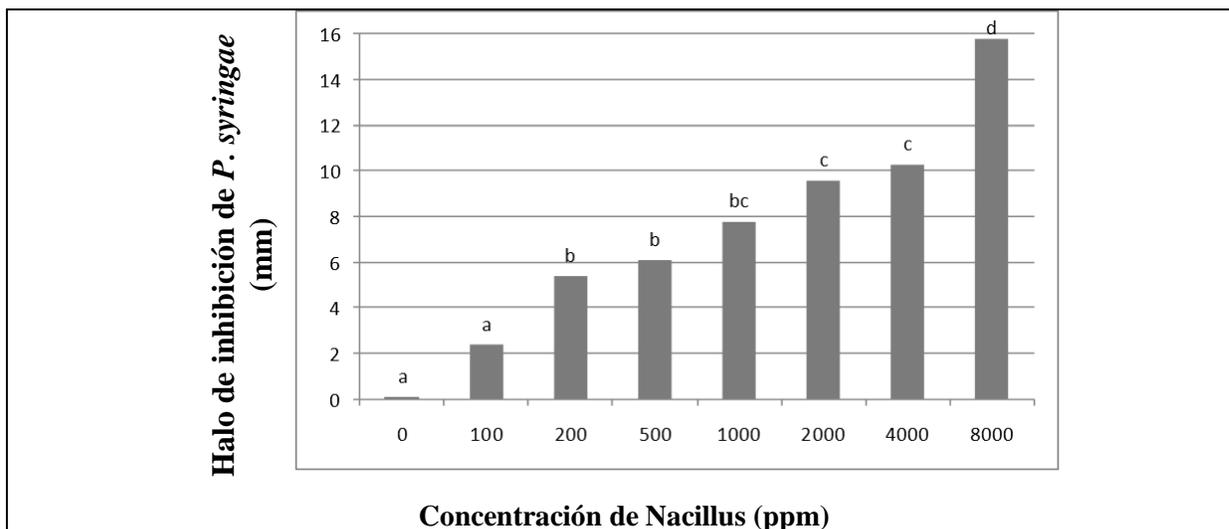


Figura 32. Inhibición por antibiosis de *Bacillus* sobre *Pseudomonas syringae* en medio de cultivo Agar Nutritivo, a las 24 horas de incubado a 25°C.

Cuadro 5. Inhibición por antibiosis de *Bacillus* sobre *P. syringae* en medio de cultivo Agar Nutritivo, según concentración (ppm) de *Bacillus*, a las 24 horas de incubado a 25°C.

Concentración (ppm)	0	100	200	500	1000	2000	4000	8000	Prom.
Halo inhibición (mm)	0,0 a	2,4 a	5,4 b	6,1 b	7,8 bc	9,6 c	10,3 c	15,8 d	8,2

Promedio de 27 mediciones por tratamiento. Letras distintas indica diferencia significativa. Tukey $P \leq 0,05$.

b) Inhibición por competencia de *Nacillus* sobre *Pseudomonas syringae*. En el Cuadro 6 y Figura 33, se incluye los resultados; la eficacia de inhibición por competencia de *Nacillus* sobre *P. syringae*, fue baja (promedio 8,18% rango 4,58-11,07), La significancia fue la siguiente: 8000 ppm no difirió significativamente de 4000 ppm y este de 1000 ppm, las 3 concentraciones fueron significativamente superiores a 500 ppm. La inhibición por competencia fue de poca intensidad.

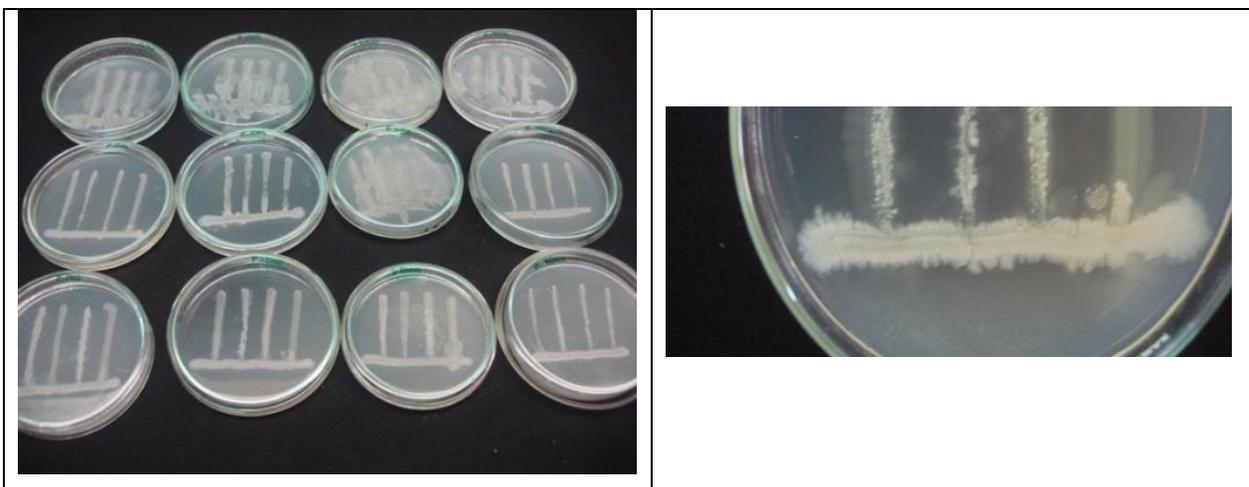
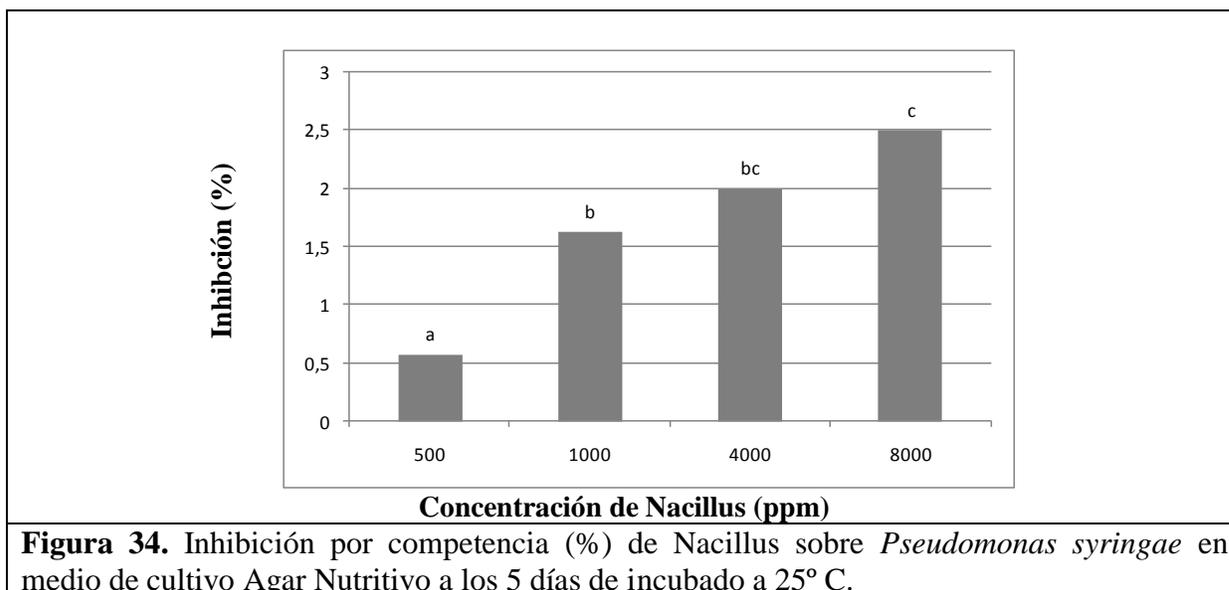


Figura 33. Inhibición por competencia de *Nacillus* sobre *Pseudomonas syringae* en medio Agar Nutritivo, a los 5 días de incubado a 25° C.

Cuadro 6. Inhibición por competencia(%) de *Nacillus* sobre *Pseudomonas syringae* en medio de cultivo Agar Nutritivo, a los 5 días de incubado a 25°C

Concentración (ppm)	500	1000	4000	8000	Prom.(%)
Capacidad competir (%)	4,58 a	8,23 b	9,40 b c	11,07 c	8,18

N=Letras distintas indica diferencia significativa, Tukey P $\leq 0,05$. N= 4,5cm.



4.8.2 *Xanthomonas corylina*.

a) Antibiosis. Todas las concentraciones evaluadas de Nacillus inhibieron el desarrollo de *X.corylina* en medio de cultivo Agar Nutritivo; la intensidad de esta acción inhibitoria difirió significativamente entre las concentraciones y no fue directamente proporcional al aumento en la concentración evaluada. A mayor concentración mayor eficacia, a saber: 8000 ppm (11,5mm) significativamente mayor que 4000 ppm (8,1mm) y 2000 ppm (7,9mm); los que no difirieron significativamente de 1000 ppm (7,3mm), 500 ppm (6,8mm) y 200 ppm (6,2mm), estos últimos a la vez estadísticamente similares entre sí y a 100 ppm (4,9mm); el mejor resultado se obtuvo con las tres concentraciones mayores 8000, 4000 y 2000 ppm. Cuadro 7 y Figura 35. Es de consignar que fue muy evidente la antibiosis de Nacillus sobre *X. corylina* (Figura 36).

Cuadro 7. Inhibición por antibiosis de Nacillus sobre *Xanthomonas corylina* en medio de cultivo Agar Nutritivo, según concentración (ppm) de Nacillus, a las 24 h de incubado a 25°C.

Concentración (ppm)	0	100	200	500	1000	2000	4000	8000	Pr.
Halo inhibición (mm)	0,0 a	4,9 b	6,2 bc	6,8 bc	7,3 bc	7,9 c	8,1 c	11,5 d	6,2

Promedio de 27 mediciones por tratamiento. Letras distintas indica diferencia significativa. Tukey $P \leq 0,05$.

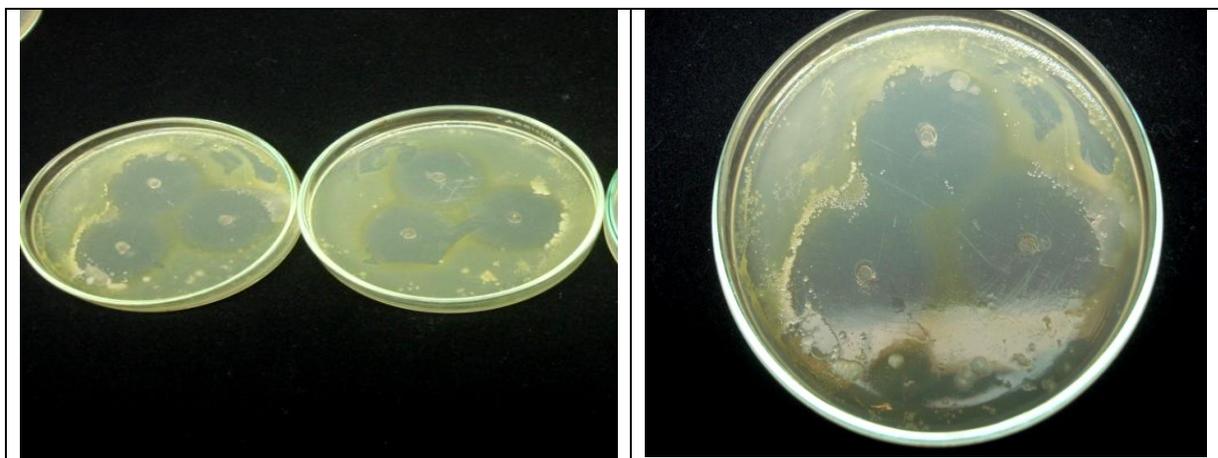
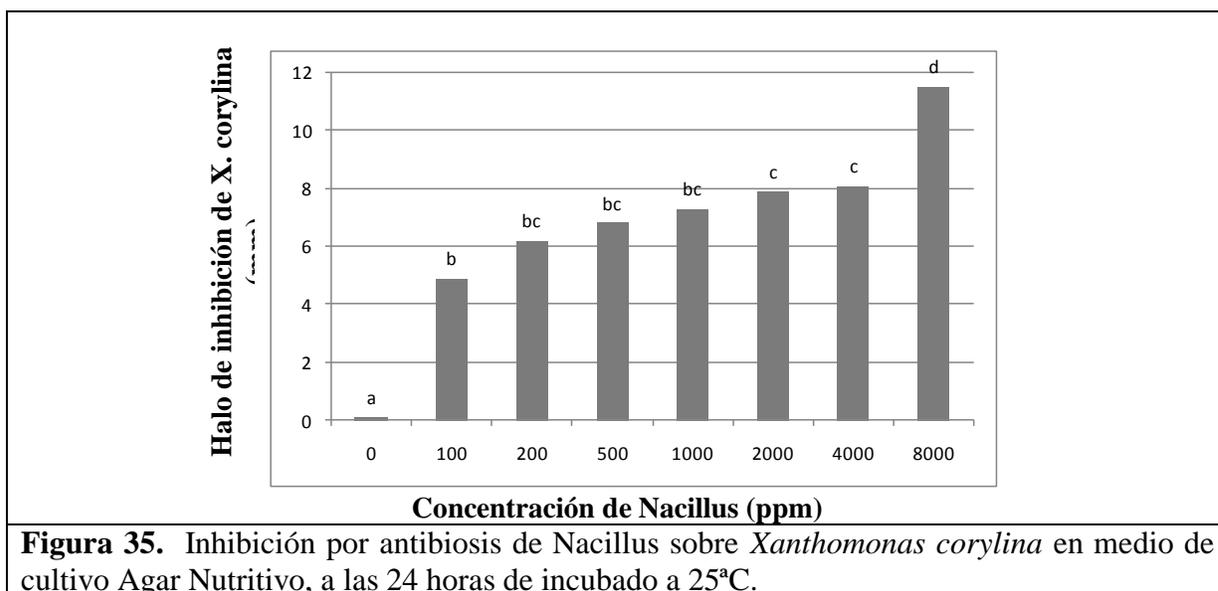


Figura 36. Antibiosis de *Nacillus* a 8000 ppm, sobre *Xanthomonas corylina* a las 48 horas de incubado a 25°C,

b) Inhibición por competencia de *Nacillus* sobre *Xanthomonas corylina*. La eficacia por competencia (Figura 37) de *Nacillus* sobre *X. corylina*, es de nivel medio, en promedio 22,88% (rango 11,55% - 31,38%); la secuencia de mayor a menor eficacia de *Nacillus* según las concentraciones fue la siguiente: significativamente similares 8000 ppm (31,4% %) y 4000 ppm (28,6 %), esta última lo fue de 1000 ppm (20,0%), todas fueron significativamente superiores a 500ppm (11,6%). Cuadro 8 y Figura 38. La inhibición por competencia de *Nacillus* sobre *X. corylina* ha sido muy consistente.

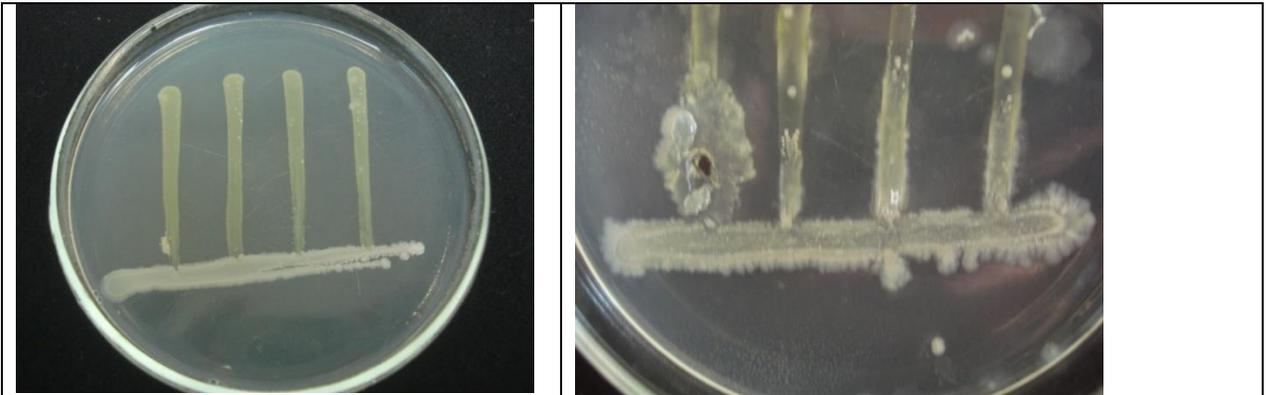


Figura 37. Inhibición por competencia de *Nacillus* a 8000 ppm, sobre *Xanthomonas corylina* en medio Agar Nutritivo, a las 24 horas y 5 días de incubado a 25° C.

Cuadro 8. Inhibición por competencia(%) de *Nacillus* sobre *Xanthomonas corylina* en medio de cultivo Agar Nutritivo, a los 5 días de incubado a 25°C.

Concentración (ppm)	500	1000	4000	8000	Prom.(%)
Capacidad competir (%)	11,55a	20,00b	28,60bc	31,38c	22,88

N=Letras distintas indica diferencia significativa, Tukey $P \leq 0,05$. N= 4,5cm.

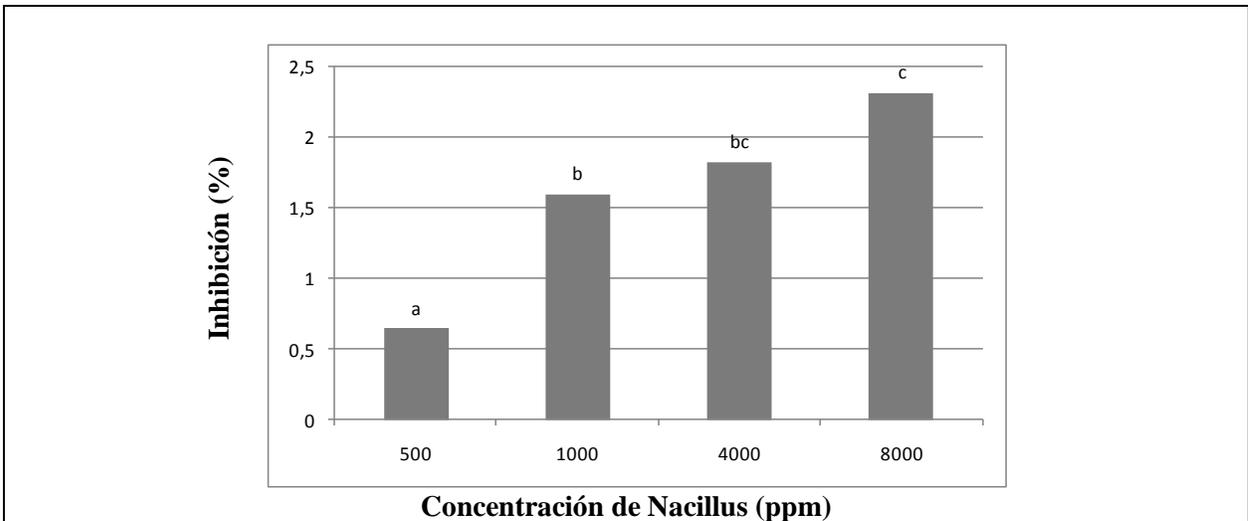


Figura 38. Inhibición por competencia(%) de *Nacillus* sobre *Xanthomonas corylina* en medio de cultivo Agar Nutritivo a los 5 días de incubado a 25° C.

5. CONCLUSIONES

1. Durante el periodo de práctica se logró integrar de manera conjunta diversos conceptos y técnicas de laboratorio relacionadas con el proceso de diagnóstico, aislamiento e identificación de hongos y bacterias fitopatógenos.
2. En lo específico se identificaron 4 hongos fitopatógenos (*Botrytis cinerea*, *Monilia laxa*, *Monilinia sp.*, *Pestalotiopsis funerea*, *Fusarium oxysporum*; y las bacterias *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas corylina*. Otros logros fueron determinar eficacia in vitro de fungicidas y bactericidas en cepas de *P. syringae* y
3. En lo formativo se cumplió el propósito de consolidar conocimientos biotecnológicos, aplicados en el área de la fitopatología aplicada.
4. La compilación de información bibliográfica, el análisis de información cuantitativa y cualitativa y la elaboración del escrito de las actividades realizadas, han constituido un factor importante en el desarrollo de capacidades investigativas, sustentada en el método científico.
5. La actividad práctica involucró también diversos aspectos valóricos que contribuyeron en la formación profesional y en potenciar la comprensión del entorno natural y social. Junto con reconocer la importancia de estos principios éticos científicos, en el desarrollo de las ciencias básicas y aplicadas.

6. RESUMEN

Se desarrolló una práctica profesional en el laboratorio de Fitopatología de la Universidad de La Frontera, entre septiembre del 2013 y enero del 2014, siendo el profesor guía don Jaime Guerrero Contreras, Ingeniero Agrónomo, Mg. Cs., Dr. Este laboratorio entrega servicios de diagnóstico de fitopatógenos para diferentes especies cultivadas, así como también investigación relacionada con aspectos fitosanitarios y de mecanismos de defensa de las plantas

Las actividades realizadas se resumen en el acápite objetivos específicos, las especies vegetales fueron copihue (*Lapageria rosea*), arándano (*Vaccinium corymbosum*), avellano europeo (*Corylus avellana*) y cerezo (*Prunus avium*). Se procedió a la identificación de hongos y bacterias, ensayos de antibiosis desde bacterias aisladas de yemas florales y apicales de arándano, y se evaluó el efecto de algunos fungicidas y bactericidas en el crecimiento in vitro de bacterias y hongos fitopatógenos, aislados de copihue, arándano y avellano europeo.

Durante el periodo de práctica se aprendió técnicas de laboratorio relacionadas con el proceso de diagnóstico, aislamiento e identificación de hongos y bacterias fitopatógenos. Los logros obtenidos fueron los siguientes: En lo específico se identificaron 4 hongos fitopatógenos (*Botrytis cinerea*, *Monilia laxa*, *Monilia sp.* *Pestalotipsis funérea*, *Fusarium oxysporum* y las bacterias *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas corylina*; conocer el proceso de diagnóstico de causalidad asociadas con enfermedades de plantas cultivadas; se determinó eficacia in vitro de fungicidas y bactericidas. En lo formativo profesional se cumplió el propósito de consolidar conocimientos biotecnológicos, aplicados en el área de la fitopatología aplicada.

La compilación de información bibliográfica, el análisis de información cuantitativa y cualitativa y la elaboración del escrito de las actividades realizadas, han constituido un factor importante en el desarrollo de capacidades investigativas, sustentada en el Método Científico. La actividad practica involucro también diversos aspectos valóricos que contribuyeron en la formación profesional y en potenciar la comprensión del entorno natural y social. Junto con reconocer la importancia de este en el desarrollo de las ciencias básicas y aplicadas.

7. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. (1988). Plant pathology. *Plant pathology*, Third edition. Academia Press, Inc. United States of America, 803 pp.
- Avila de Leal, L. (1993). Control con microorganismos antagónicos de *Botrytis cinerea* Pers. casuante del moho gris en *Eucaliptus globulus* Labill. Tesis programa de Postgrado Microbiología. Pontificia Universidad de Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombiam, 82 pp.
- Azarenko, A. (1995). Desarrollo de nuevos portainjertos de cerezo. Universidad de Talca. El cultivo del cerezo: Nuevas Variedades, Portainjertos y Sistemas de Conducción, 4-10 pp.
- Bajkai, V. K. & Kang, S. C. (2010). Antifungal Activity of Leaf Essential Oil and Extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 87:327-336 pp.
- Barnett, H. L. (1960). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 2nd ed. Minneapolis, Minn, Burgess Publishing Co., 1960, 225 pp.
- Bateman, D. F. (1978). The dynamic nature of disease. En. "Plant Disease: an advanced treatise". Vol. III, (J. G. Horsfall & E. B. Cowling. Eds.) 33 – 83 pp.
- Blair, J. E. (2009). Fungi. *The timetree of life*, 215-219 pp.
- Bosland, P. W. (1988). *Fusarium oxysporum* a pathogen of many plant species. *Advances in plant phatology*, 6: 281-289 pp.
- Bridge, P., & Spooner, B. (2001). Soil fungi: diversity and detection. *Plant and Soil*, 232: 147-154 pp.
- Cazorla, F., Torés, J., Olalla, L., Pérez-García, A., Farré, J. and de Vicente, A. (1998). Bacterial apical necrosis of mango in southern S´pain: A disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Phytopathology* 88 (7): 614-620.
- Cooksey, D.A. (1987). Characterization of a copper resistance plasmid conserved in copper-resistance strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Applied Environmental Microbiology*, 53: 454-456 pp.

- Dowler, W. M. and D. J. Weaver. (1975). Isolation and characterization of fluorescent pseudomonads from apparently healthy peach trees. *Phytopathology*, 65: 233-236 pp.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. (2004). Botrytis spp. and diseases they cause in agricultural systems- an introduction, 118 pp.
- Gitaitis, R., & Walcott, R. (2007). The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. *Annual review of phytopathology*, 371-397 pp.
- Goszczyńska, T., Sefonstein, J. and Serfontein, S. (2000). *Introduction to practical phytobacteriology*, 84pp.
- Gould, F. (1991). The evolutionary potential of crop pests. *American Scientist*, 79: 496-507 pp.
- Guerrero, J. (1999). Conocimiento, importancia y control de riesgos en el uso y manejo de pesticidas. Publicación docente N°18. Universidad de La Frontera, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Temuco, Chile. 97 pp.
- Hildebrandt, P., Musidłowska, A., Bornscheuer, U. T., & Altenbuchner, J. (2002). Cloning, functional expression and biochemical characterization of a stereoselective alcohol dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens* DSM50106. *Applied microbiology and biotechnology*, 59: 483-487 pp.
- Hirano, S. S., & Upper, C. D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and molecular biology reviews*, 653pp.
- Jarvis, W. R. (1997). Control de enfermedades en cultivos de invernadero. *The american phytopathological society*, 334 pp.
- Kimati, H., Bergamin Filho, A., Amorim, L.(1995). Manual de Fitopatología. Principios y conceptos. V.1.3ª ed. Sao Paulo, 919 pp.

- Klement, Z. and Goodman, R. N. (1967). The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 5: 17-44 pp.
- Langenheim, J. H. (1990). Infection processes of *Pestalotia subcuticularis* on leaves of *Hymenaea courbaril*. *Phytopathology*, 1259 pp.
- Latorre, B. A. and A. L. Jones. (1979). Evaluation of weeds and plant refuse as potential sources of inoculum of *Pseudomonas syringae* in bacterial canker of cherry. *Phytopathology*, 69: 1122-1125 pp.
- Latorre, B. A. (1984). Oídios de los árboles frutales y vides. Aconex (Chile), 7: 5-9 pp.
- Lelliott, R. A. and Stead, D. E. (1987). Methods for the diagnosis of bacterial disease of plants. *Blackwell Scientific Publications*, 216 pp.
- Lewis, W. J., van Lenteren, J. C., Phatak, S. C., & Tumlinson, J. H. (1997). A total system approach to sustainable pest management. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 12243–12248 pp.
- Madia, M. S. L.; Gaetán, S. A.; Moyano, M. I. (2007). Árboles Frutales. Ecofisiología, Cultivo y Aprovechamiento. *Capítulo 19: Manejo Integrado de Enfermedades de los Frutales de Carozo*. Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, 805 pp.
- Maharachchikumbura, S. S. N., Guo, L.-D., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H., & Hyde, K. D. (2011). *Pestalotiopsis*, morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal Diversity*, 50: 167–187 pp.
- Michielse, C. B., & Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology*, 311-324 pp.
- Millán, A. C. (1996). Evaluación del efecto inhibitorio de una mezcla química - biológica frente a *Botrytis cinerea* causante de la podredumbre gris en *Rosa Rosa* (L). Tesis Bacteriología. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, Bogotá, Colombia, 80 pp.
- Mirzaei, S., and Goltapeh, E. M. (2007). Taxonomical studies on the genus *Botrytis* in Iran, 65-76 pp.
- Mullard, A. (2009). Microbiology: Tinker, bacteria, eukaryote, spy. *Nature*. 459: 159-161 pp.

- Nelson, P. E., Tammen, R. and Baker, R. (1964). Carnation as a symptomless carrier of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Phytopathology*, 54: 323- 329 pp.
- Oerke, E.-C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*. 31-43 pp.
- Ogawa, J. M. and English, H. (1991). Disease of Temperate Zone Tree Fruit and Nut Crops. University of California. Direction of Agriculture and Natural Resources. 461 pp.
- Oyarzún, C. (2005). Principales virus asociados al cultivo de cerezo (*Prunus avium* L.) detectados mediante análisis serológicos y biológicos. Tesis Ing. Agrónomo. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. Valparaíso, Chile. 55pp.
- Piñeros, N. E. y Rivera, A. M. (1988). Evaluación de extractos vegetales para el control de *Botrytis cinerea* Pers en un cultivo de estaticé. Tesis Bacteriología. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia, 76pp.
- Schaad, N. W. (1988). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria 2nd Edition, 164 pp.
- Schlegel, M. (2003). Phylogeny of Eukaryotes recovered with molecular data: highlights and pitfalls. *European Journal of Protistology*, 39: 113–122.
- Scortichini, M., Dettori, M. T., Marchesi, U., Palombi, M. A, Rossi M. P. (1998). Differentiation of *Pseudomonas avellanae* Strains from Greece and Italy by rep-PCR Genomic Fingerprinting. *Journal of Phytopathology*, 417- 420 pp.
- Smith, I., Dunez, J., Lelliot, R. and Phillips, D. (1992). Manual de enfermedades de las plantas. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 675 pp.
- Swartzberg, D., Kirschner, B., Rav-David, D., Elad, Y., & Granot, D. (2008). *Botrytis cinerea* induces senescence and is inhibited by autoregulated expression of the IPT gene. *European Journal of Plant Pathology*. 120:289-297 pp.
- Young, J. M., Bull, C. T., De Boer, S. H., Firrao, G., Gardan, L., Saddler, G. E., Takikawa, Y.. (2001). Classification, nomenclature, and plant pathogenic bacteria a clarification. *Phytopathology*, 91: 617–620 pp.

8. ANEXOS

Anexo 1. Análisis fitopatológico ramillas florales y vegetativas de arándano.

ANÁLISIS FITOPATOLÓGICO	
-------------------------	--

MUESTRA	: 850
SOLICITUD	: 0694
FECHA DE INGRESO	: 27.09.13
FECHA DE INFORME	: 16.10.2013
PROCEDENCIA	: At: Sr. Guillermo Sotomayor Romero. Camino Santa Bárbara Km. 2,9. Los Ángeles. Fono: 77657217 Email: sotomayorgf@gmail.com .

TIPO DE MUESTRA: Ramillas (90) de arándano. Cultivar Liberty.

SÍNTOMAS Y DIAGNÓSTICO.

1. A simple vista y bajo lupa estereoscópica, no se observó síntomas de anormalidad, tanto en yemas vegetativas como yemas florales. No se detectó lesiones necróticas en las ramillas (Figura 1).
2. Se dispusieron en cámara húmeda 30 yemas florales por repetición para cada tratamiento (90 yemas); sumando en total 810 yemas examinadas (9 tratamientos). Se detectó los siguientes hongos: *Botrytis cinerea* (30%), *Penicillium* sp. (20%), *Fusarium* sp. 1% (Figura 2). No se detectó evidencias de *Pseudomonas syringae*.
3. En medio de cultivo King B se dispusieron 5 yemas vegetativas y 5 yemas florales por repetición (3), totalizando 15 yemas por tratamiento y 135 yemas en total (9 tratamientos), y mantenidas en cámara de cultivo a 28 grados Celsius. Transcurrido 3 días, no se detectó desarrollo de *Pseudomonas syringae*; tipificadas en función de características morfológicas, medio de cultivo selectivo y fluorescencia en luz ultravioleta. No obstante es de consignar que se detectó en un 90 % de los casos examinados desarrollo bacteriano; distinguiéndose 3 tipos de colonias (Figura 4):
 - a. Colonias color blanco de forma irregular con bordes ondulados, de elevación plana con una superficie plegada y de consistencia membranosa (Figura 4a).
 - b. Colonias color crema de forma irregular con bordes enteros, de elevación convexa con una superficie lisa y de consistencia cremosa (Figura 4b).
 - c. Colonias color crema de forma irregular con bordes enteros de elevación plana con una superficie lisa y de consistencia cremosa (Figura 4c.)

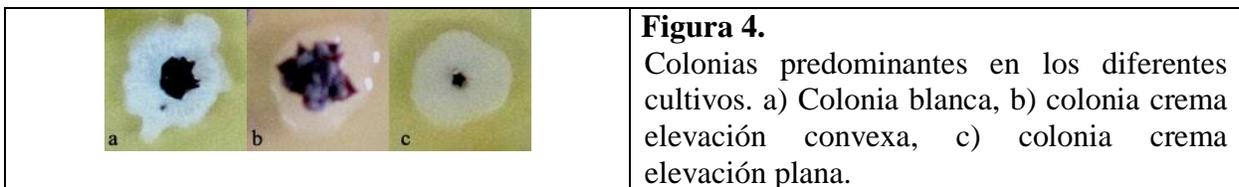
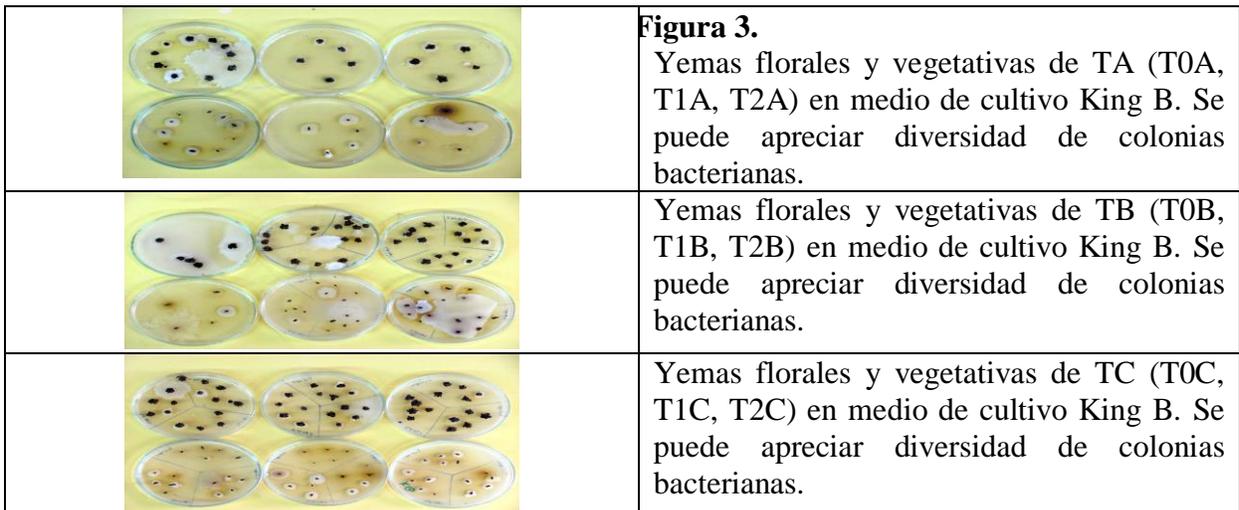
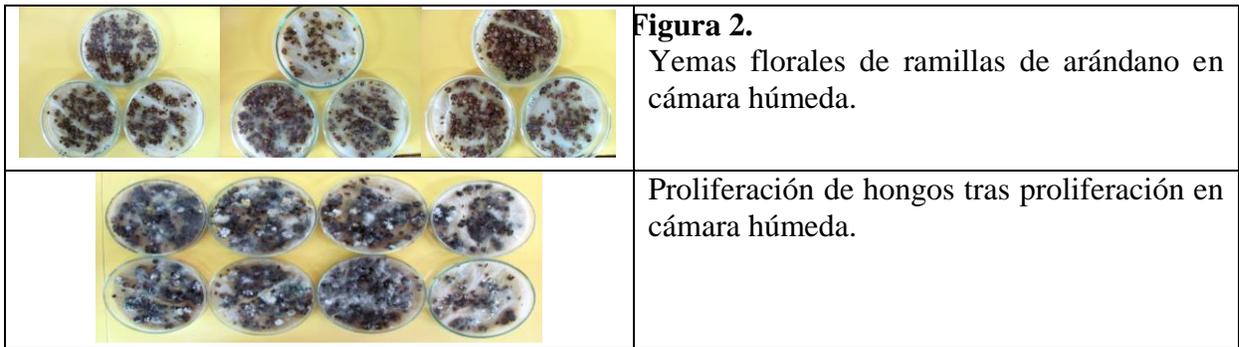
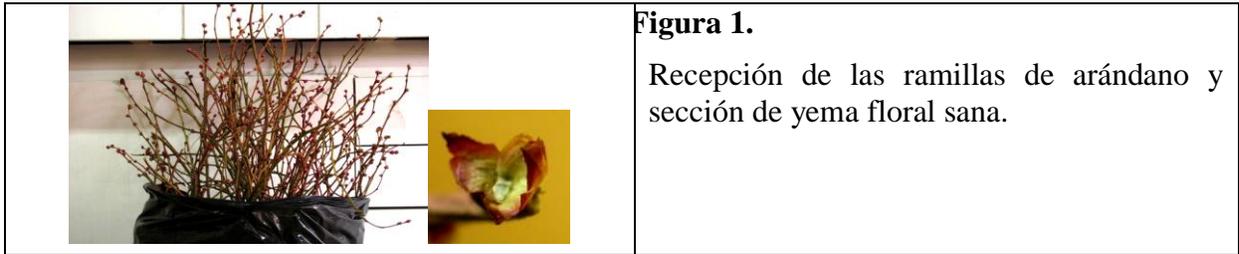
CONCLUSIÓN

En ninguna de las muestras analizadas se evidenció la presencia de *Pseudomonas Syringae*.

INVESTIGADOR RESPONSABLE

JAIME GUERRERO C.

Ingeniero Agrónomo. Mg. Dr.



Anexo 2. Resultados de germinación de conidias *Botrytis cinérea* con programa estadístico STAT statistics.

ANOVA Table for y 48 h by trt

Analysis of Variance			
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square
Between groups	175,02	4	
Within groups	2,02	10	
Total (Corr.)	177,04	14	

Multiple Range Tests for y 48 h by trt

Method: 95,0 percent Tukey HSD			
trt	Count	Mean	Homog
4	3	0,0	X
3	3	0,0	X
2	3	2,3	X
1	3	2,4	X
0	3	9,3	X

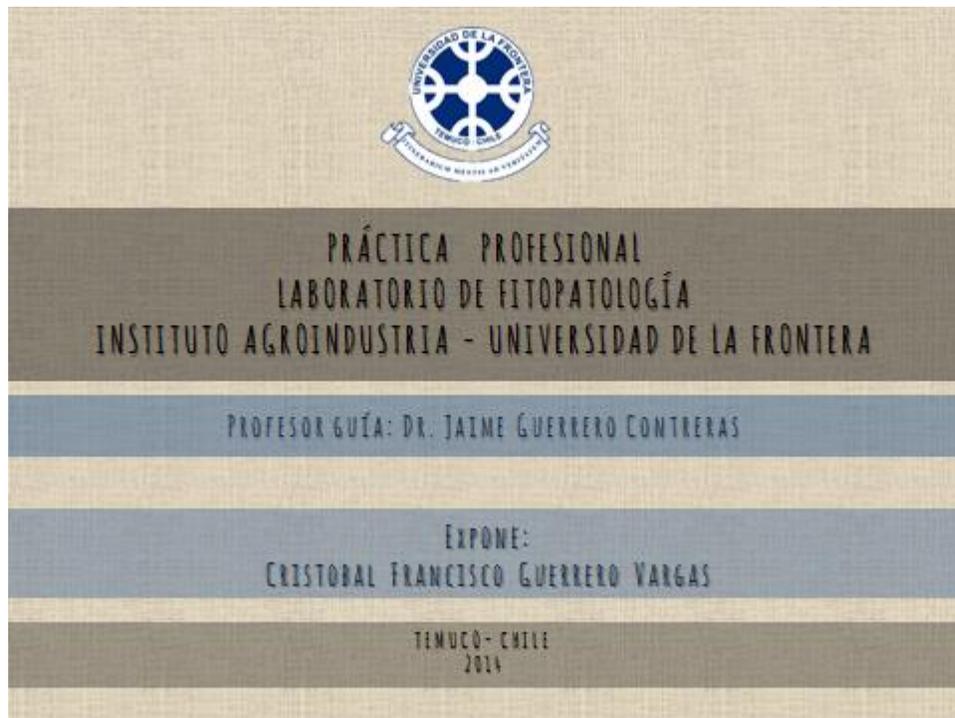
ANOVA Table for y 30 d by trt

Analysis of Variance			
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square
Between groups	154,563	4	38,64075
Within groups	1,20667	10	0,120667
Total (Corr.)	155,769	14	

Multiple Range Tests for y 30 d by trt

Method: 95,0 percent Tukey HSD			
trt	Count	Mean	Homogeneous
4	3	0,0	X
3	3	0,0	X
2	3	5,5	X
1	3	6,66667	X
0	3	7,2	X

PRESENTACIÓN POWER POINT



RESULTADOS



AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS

PROCEDIMIENTO



ASLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS

RESULTADOS

BOTRYTIS CINEREA (ARÁNDANO)

HONGO PERTENECIENTE A LA CLASE DEUTEROMYCETE. «EL MOHO GRES» AFECTA AL MENOS DOSCIENTAS ESPECIES DE PLANTAS EN PRE Y POST COSECHA. GRANDES PÉRDIDAS DURANTE ALMACENAJE Y TRANSPORTE



ASLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS

RESULTADOS

FUSARIUM OXYSPORUM (CEREZO)

HONGO PERTENECIENTE A LA CLASE DEUTEROMYCETE, ES COSMOPOLITA Y EXISTE EN MUCHAS FORMAS PATOGENICAS. PRODUCE MACROCONIDIOS Y MICROCONIDIOS



AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS

RESULTADOS

MONILIA LAXA (CEREZO)

HONGO SUPERIOR DE LA CLASE ASCOMYCOTA. PRODUCE ASCOESPORAS SEXUALES EN APOTECIOS Y CONIDIOS EN CADENA DE ORIGEN ASEJUAL



AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS

RESULTADOS

PESTALOTIA SP. (COPIHUE)

HONGO PERTENECIENTE A LA CLASE DEUTEROMYCETE. PATÓGENO SECUNDARIO, SAPROFITO Y PARASITO DÉBIL. PRESENTA CONIDIOS SEPTADOS



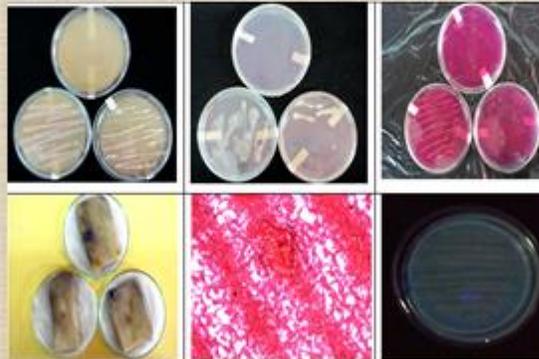
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS

PROCEDIMIENTO



AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS

PRUEBAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN



A) CEPAS DE *P. SYRINGAE* EN MEDIO YDC. B) CEPAS DE *P. SYRINGAE* EN MEDIO KING B. C) PRUEBA ARGENTINA A DIHIDROLASA. D) PUERCIÓN DE LA PAPA E) TINCIÓN (GRAM). F) FLUORESCENCIA.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS

RESULTADOS

CUADRO 1. PRUEBAS USADAS PARA LA CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS CEPAS DE *P. SYRINGAE*

PRUEBA	COLONIA A	COLONIA B
TINCIÓN GRAM	BACILOS GRAM NEGATIVOS	BACILOS GRAM NEGATIVOS
OXIDASA	(-)	(-)
CATALASA	(-)	(-)
ARGENINA DIXIDROLASA	(-)	(-)
PRODUCCIÓN DE LA PAPA	(-)	(-)
HIPERSENSIBILIDAD EN TABACO	(-)	(-)
PRODUCCIÓN DE LEVAM	(-)	(-)
NUCLEACIÓN HIELO	(-)	(-)
CRECIMIENTO YDC	COLONIA BLANCA CREMOSA	COLONIA BLANCA CREMOSA

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE BACTERICIDAS QUÍMICOS

CARACTERÍSTICAS GENERALES BACTERICIDAS

CUPRATEC



CONTIENE COBRE (Cu) AL 5% EN FORMA DE GLUCONATO DE Cu. CORRIJE CARENCIAS DE COBRE, EJERCE EFECTO BACTERICIDA, NO PRODUCE FITOTOXICIDAD Y ACTIVA LAS ENZIMAS VEGETALES

MASTERCOO



FUNGICIDA-BACTERICIDA PREVENTIVO DE ENFERMEDADES EN FRUTALES, VIDES Y HORTALIZAS. SU INGREDIENTE ACTIVO ES EL SULFATO DE COBRE PENTAHIDRATADO

KOCIDE



INGREDIENTE ACTIVO MONÓXIDO DE COBRE AL 53% P.P. FINALIDAD PREVENTIVA Y DE CONTACTO CONTRA ENFERMEDADES CAUSADAS POR HONGOS Y BACTERIAS

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE BACTERICIDAS QUÍMICOS

PROCEDIMIENTO EVALUACIÓN DE BACTERICIDAS CÚPRICOS

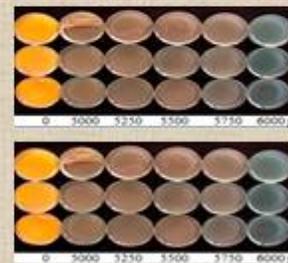


EVALUACIÓN *IN VITRO* DE BACTERICIDAS QUÍMICOS

RESULTADOS: EVALUACIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD DE *XANTHOMONAS CORYLINA* SOBRE BACTERICIDAS CÚPRICOS



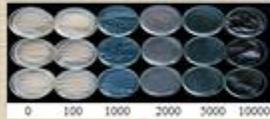
DOSIS EFECTIVA MEDIA DE CUPRATEC SOBRE *X. CORYLINA* DE



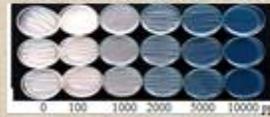
EVALUACIÓN *IN VITRO* DE BACTERICIDAS QUÍMICOS

RESULTADOS: EVALUACIÓN DE SUSEPTIBILIDAD DE *PSEUDOMONA SYRINGAE* SOBRE BACTERICIDAS CÚPRICOS

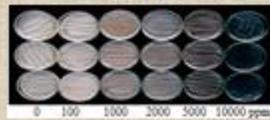
MASTER COP



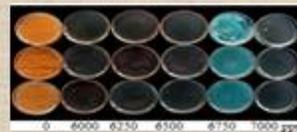
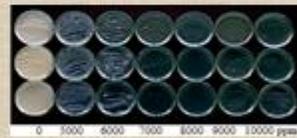
KOCTE



CUPRATEC



DOSES EFECTIVA MEDIA DE CUPRATÉC SOBRE *PSEUDOMONA SYRINGAE*



GERMINACIÓN DE CONIDIAS DE *BOTRYTIS CINEREA*

CARACTERÍSTICAS GENERALES FUNGICIDA

3TAC®



3TAC® ES UN FUNGICIDA BIOLÓGICO EN BASE AL HONGO TRICHODERMA SPP. (TRIPLE TRICHODERMA ACTIVADO). ACTÚA FRENTE A ENFERMEDADES VASCULARES, PUDRICIONES PRE- Y POST-COSECHA Y HONGOS FITOPATÓGENOS EN DIVERSOS CULTIVOS.

GERMINACIÓN DE CONIDIAS DE *BOTRYTIS CINEREA*

PROCEDIMIENTO



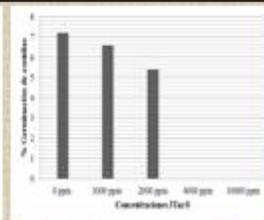
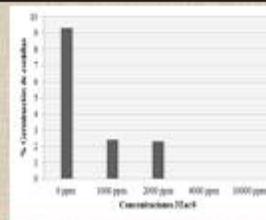
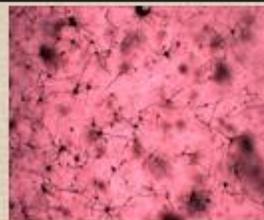
GERMINACIÓN DE CONIDIAS DE *BOTRYTIS CINEREA*

RESULTADOS

CUADRO 3. PROMEDIO DE CONIDIAS GERMINADAS DE *BOTRYTIS CINEREA* EN 48 HORAS Y 30 DÍAS

CONCENTRACIÓN (PPM)	48 HORAS	30 DÍAS
0	9,3 c	7,2 c
1000	2,1 b	6,7 c
2000	2,3 b	5,5 b
4000	0,0 a	0,0 a
10000	0,0 a	0,0 a

*LAS DISTINTAS LETRAS EN CADA COLUMNA INDICAN LA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA SEGÚN T-TEST ($P \leq 0,05$).



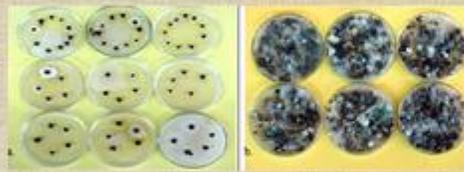
DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO RAMILLAS DE ARÁNDANO

PROCEDIMIENTO



DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO RAMILLAS DE ARÁNDANO

RESULTADOS



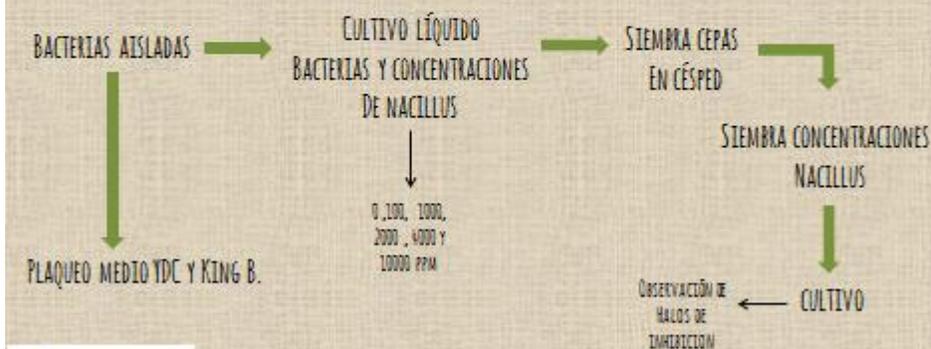
- CRECIMIENTO BACTERIANO DESDE YEMAS FLORALES EN MEDIO KING B.
- PROLIFERACIÓN DE HONGOS EN CÁMARA HÚMEDA.

ANTIBIOSIS ENTRE BACTERIAS AISLADAS DE LAS YEMAS DE ARÁNDANO



PRUEBA DE BIOANTAGONISMO

PROCEDIMIENTO EVALUACIÓN BACTERICIDA BIOLÓGICO NACILLUS



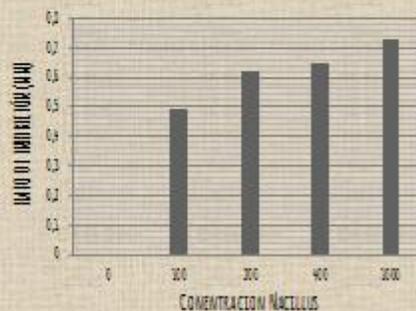
PRUEBA DE BIOANTAGONISMO

RESULTADO EVALUACIÓN BACTERICIDA BIOLÓGICO NACILLUS



CONCENTRACIÓN (PPM)	43 HORAS
0	0
100	0,49
200	0,62
400	0,65
1000	0,79

CUADRO 2. PROMEDIOS (MM) DE HALOS DE INHIBICIÓN NACILLUS



CONCLUSIONES

1. DURANTE EL PERIODO DE PRÁCTICA SE LOGRÓ INTEGRAR DE MANERA CONJUNTA DIVERSOS CONCEPTOS Y TÉCNICAS DE LABORATORIO RELACIONADAS CON EL PROCESO DE DIAGNÓSTICO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS FITOPATÓGENOS.
2. EN LO ESPECÍFICO SE IDENTIFICARON 4 HONGOS FITOPATÓGENOS (*ROTTYTES CENEREA*, *MONILIA LAXA*, *PESTALOTIA PISIS SP.*, *FUSARIUM OXYSPORIUM*) Y LAS BACTERIAS *PSEUDOMONAS SYRINGAE* Y *XANTHOMONAS COPOLYINA*. OTRAS LOGROS FUERON DETERMINAR EFICACIA IN VITRO DE FUNGICIDAS Y BACTERICIDAS EN CEPAS DE *P. SYRINGAE*.
3. EN LO FORMATIVO SE CUMPLIÓ EL PROPÓSITO DE CONSOLIDAR CONOCIMIENTOS BIOTECNOLÓGICOS, APLICADOS EN EL ÁREA DE LA FITOPATOLOGÍA APLICADA.
4. LA COMPILACIÓN DE INFORMACIÓN BIBLIOGRÁFICA, EL ANÁLISIS DE INFORMACIÓN CUANTITATIVA Y CUALITATIVA Y LA ELABORACIÓN DEL ESCRITO DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS, HAN CONSTITUIDO UN FACTOR IMPORTANTE EN EL DESARROLLO DE CAPACIDADES INVESTIGATIVAS, SUSTENTADA EN EL MÉTODO CIENTÍFICO.
5. LA ACTIVIDAD PRÁCTICA INVOLUCRO TAMBIÉN DIVERSOS ASPECTOS VALÓRICOS QUE CONTRIBUYERON EN LA FORMACIÓN PROFESIONAL Y EN POTENCIAR LA COMPRENSIÓN DEL ENTORNO NATURAL Y SOCIAL. JUNTO CON RECONOCER LA IMPORTANCIA DE ESTOS PRINCIPIOS ÉTICA CIENTÍFICA, EN EL DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS.



... GRACIAS POR SU ATENCIÓN

