

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTAGONISTA DE BACTERIAS  
PSICROTOLERANTES DE LA ANTÁRTICA SOBRE BACTERIAS  
FITOPATÓGENAS DE LOS GÉNEROS *PSEUDOMONAS* Y *XANTHOMONAS***

**POR**

**SERGIO LEOPOLDO BUSTAMANTE MATURANA**

**MEMORIA PRESENTADA A LA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA  
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN – CHILE  
2021**

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTAGONISTA DE BACTERIAS  
PSICROTOLERANTES DE LA ANTÁRTICA SOBRE BACTERIAS  
FITOPATÓGENAS DE LOS GÉNEROS *PSEUDOMONAS* Y *XANTHOMONAS***

**POR**

**SERGIO LEOPOLDO BUSTAMANTE MATURANA**

**MEMORIA PRESENTADA A LA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA  
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN – CHILE  
2021**

Aprobada por:

Profesor Asociado, Ernesto Moya E.

Ing. Agrónomo, Ph. D.

---

Guía

Profesor Asociado, Macarena Gerding G.

Ing. Agrónomo, Ph. D.

---

Asesor

Profesor Asociado, Inés Figueroa C.

Ing. Agrónomo, Dr. Cs.

---

Asesor

Profesor Asociado, Guillermo Wells M.

Ing. Agrónomo, Mg. Cs.

---

Decano

**TABLA DE CONTENIDOS**

	<b>Página</b>
Resumen.....	1
Summary.....	1
Introducción.....	2
Materiales y métodos.....	5
Resultados y discusión.....	10
Conclusión.....	22
Referencias.....	23
Anexos.....	27

**INDICE DE FIGURAS Y TABLAS**

	<b>Página</b>
Tabla 1 Tratamientos con ciclos de temperatura.....	7
Tabla 2 Determinación de actividad antagonista de bacterias psicrotolerantes mediante la formación de halos de inhibición sobre tapices de bacterias fitopatógenas del género <i>Xanthomonas</i> y <i>Pseudomonas</i> bajo disitntos ciclos térmicos de crecimiento.....	11
Tabla 3 Tabla de doble entrada para halos de inhibición sobre <i>X. arboricola</i> pv. <i>corylina</i> , expresado en mm <sup>2</sup> .....	18

## **EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTAGONISTA DE BACTERIAS PSICROTOLERANTES DE LA ANTÁRTICA SOBRE BACTERIAS FITOPATÓGENAS DE LOS GÉNEROS *PSEUDOMONAS* Y *XANTHOMONAS*.**

EVALUATION OF THE ANTAGONIST EFFECT OF PSYCHROTOLERANT BACTERIA FROM THE ANTARTICA ON PHYTOPATHOGEN BACTERIA OF THE GENUS *PSEUDOMONAS* AND *XANTHOMONAS*.

**Palabras índice adicionales:** ciclos térmicos, Xac, Pss, Psa.

### **RESUMEN**

Las bacterias fitopatógenas de los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas* producen importantes pérdidas productivas en diferentes cultivos. Actualmente existe una necesidad de alternativas biológicas para su control. El objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto antagónico de cepas bacterianas psicrotolerantes obtenidas desde la rizósfera de plantas de la Antártica en condiciones *in vitro* y bajo diferentes regímenes térmicos sobre las bacterias fitopatógenas *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss), *P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa), *P. syringae* pv. *tomato* (Pst), *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Xac) y *X. arboricola* pv. *juglandis* (Xaj). De las 24 cepas psicrotolerantes evaluadas *in vitro*, sólo AG-144, AG-151 y AG-157 presentaron actividad inhibitoria sobre Xac en los ciclos térmicos que consideraron temperaturas de 15 °C. En un experimento en terreno, realizado en Pinto, Región de Ñuble, no fue posible determinar actividad de control de las cepas seleccionadas sobre Xac en ramillas de avellano europeo, así también como al usar hidróxido de cobre, *P. protegens* y sulfato de estreptomycin, ya que las condiciones climáticas fueron favorables para la infección de Xac. A pesar de las diferencias entre los resultados de laboratorio y de terreno, las bacterias psicrotolerantes pueden ser una alternativa para el desarrollo de formulaciones con potencial de biocontrol.

### **SUMMARY**

Phytopathogenic bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Xanthomonas* are produce significant productive losses in different crops. Currently, there exists a

need for the search of new alternatives that keep them under control. The aim of this thesis was to evaluate the antagonistic effect of psicotolerant bacterial strains obtained from the rhizosphere of plants from the Antarctic in conditions *in vitro* and under different thermal regimes over the phytoathogenic bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* (Pss), *P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa), *P. syringae* pv. *tomato* (Pst), *Xanthomonas arboricola* pv. *Corylina* (Xac) y *X. arboricola* pv. *juglandis* (Xaj). Out of the 24 psychrotolerant strains evaluated *in vitro*, only AG-144, AG151 and AG-157 presented inhibitory activity over Xac on the termic cycles that considered temperatures of 15 °C. In a field experiment carried out in Pinto, Región de Ñuble, it was not possible to determine the control activity of the selected strains over Xac in European hazelnut, as well as using copper hydroxide, *P. protegens* and streptomycin sulphate, as the climatic conditions were favorable for the infection of Xac. Despite the differences between the laboratory results and field results, the psicrotolerant bacteria might be an alternative for the development of formulation with biocontrol potential.

## INTRODUCCIÓN

Diversas especies y patovares de bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas* son causantes de manchas y tizones tanto en hojas como en frutos, además de canchros en tallos de diversas especies vegetales (Agris, 2005). Entre las principales enfermedades que causan está el cáncer o cancro bacterial del cerezo (*Prunus avium*) o tizón de la flor causado por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss), la bacteriosis del kiwi (*Actinidia chinensis* y *Actinidia deliciosa*) o cancro bacteriano del kiwi causado por *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), la peca y mancha bacteriana del tomate (*Solanum lycopersicum*) causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), el tizón bacteriano del avellano (*Corylus avellana*) causado por *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Xac) y la peste negra del nogal (*Juglandis regia*) causada por *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Xaj).

*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* es el patógeno más importante en los huertos de cerezo en Chile, ya que disminuye los rendimientos, produciendo importantes pérdidas de árboles en los huertos (Lemus *et al.*, 2020), sus efectos

deletéreos incluyen muerte parcial de ramas y brazos, precedidos por una marchitez, clorosis y desecamiento del follaje durante el verano. Además, causa atizonamiento de brotes y flores, muerte de yemas y brotación desuniforme (Latorre, 2018). Se caracteriza por la aparición de heridas cancrosas, con abundante exudación de goma en las bifurcaciones de ramas, yemas y dardos, base de las yemas y cortes de poda (Joublan, 2004).

Otra *Pseudomonas* de importancia en huertos de kiwi es Psa, detectada en Chile en el año 2010 y declarada plaga cuarentenaria presente bajo control oficial del SAG (Servicio Agrícola y Ganadero) en el año 2011 (Soto, 2017). La infección por esta bacteria genera el desarrollo de canchros en los brazos y tronco en kiwi con exudado blanco lechoso a rojizo. Marchitez parcial, muerte de brotes y necrosis de yemas. Las plantas severamente afectadas pueden morir en pocas semanas (Latorre, 2018), y se estima que este patógeno ha generado pérdidas de un 7 a 25 % de producción hasta la eliminación de huertos completos (Soto, 2017).

En el cultivo de tomate, Pst causa lesiones necróticas en los folíolos, las que también pueden afectar frutos, perdiendo éstos calidad comercial. En infecciones severas puede generar la defoliación completa de la planta (Sandoval, 2004).

Dentro del género *Xanthomonas*, Xaj es el principal patógeno causante de elevadas pérdidas en la producción de nacedales en Chile. La incidencia de este patógeno aumenta según la frecuencia de precipitaciones primaverales, por lo que en Chile aumenta de norte a sur (Moya-Elizondo *et al.*, 2018), generando pérdidas de rendimiento cercanas al 80 % (Gardan *et al.*, 1993). Esta enfermedad afecta a todas las partes de la planta, incluso las flores masculinas (amentos). En general se desarrollan manchas de color marrón oscuro a negro en las hojas nuevas, tallos y frutos. En infecciones severas puede causar una caída severa y prematura de frutos (Lamichhane, 2014).

Por su parte, dentro del mismo género, Xac es el patógeno más dañino para el avellano europeo en Chile, causando daños devastadores en vivero y en campo. La incidencia medida como árboles afectados por huerto, oscila entre 60 y 90 % (Lamichhane *et al.*, 2012). La sintomatología consiste en pequeñas manchas foliares angulosas, acuosas, oleosas, amarillentas o rojizas, necrosis y

ennegrecimiento de yemas, lesiones acuosas o rojizas en los brotes y ramillas, desarrollo de lesiones cancrosas que anillan ramas y ramillas. En frutos se desarrollan pequeñas lesiones oleosas con borde marrón (Latorre, 2018).

Las estrategias de control para las enfermedades mencionadas incluyen recomendaciones en cuanto al uso de material sano de vivero, aplicaciones de antibióticos y compuestos a base de cobre (Latorre, 2018). El uso indiscriminado y/o inadecuado de antibióticos y productos cúpricos durante la temporada favorecen la selección y aparición de razas resistentes a sus ingredientes activos en cepas del género *Xanthomonas* y *Pseudomonas* (Moya-Elizondo *et al.*, 2018; Mella *et al.*, 2004; McManus *et al.*, 2002; Ninot *et al.*, 2002; Khachatourians, 1998; Scheck y Pscheidt, 1998).

Por otra parte, el uso intensivo de cobre durante varios años resulta en la acumulación de este elemento en el suelo provocando un impacto negativo al ecosistema, reducción de la capacidad de las plantas de metabolizar ciertos elementos, toxicidad a raíces y desequilibrio en el contenido de polifenoles, reduciendo las defensas naturales de la planta (Ninot *et al.*, 2002). Esta problemática hace atractiva la opción de incluir un control complementario del tipo biológico que sea más amigable con la planta y el medio ambiente.

Muchos de los microorganismos adaptados a condiciones de vida inhabituales logran sobrevivir sintetizando moléculas adaptadas a condiciones extremas, las que han sido reconocidas como una fuente importante de nuevos recursos biológicos (Sánchez *et al.*, 2009; Margesin y Miteva, 2010). Bacterias psicrotolerantes crecen a 0 °C o más y típicamente tienen máximos a aproximadamente 35 °C (Willey *et al.*, 2011). Se ha descrito la actividad antimicrobiana y antifúngica de un compuesto llamado “violacina” producido por una cepa bacteriana aislada de la Antártica (género *Janthinobacterium*), la cual podría tener aplicación en infecciones asociadas con la salud humana (Asencio *et al.*, 2014).

La flora de la Antártica marítima incluye solo dos especies de plantas vasculares: *Deschampsia antarctica* Desc. perteneciente a la familia de las *Poaceas* y *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl., de la familia *Caryophyllaceae*, ambas especies se encuentran también en la Antártica subantártica y marítima, incluida la costa oeste de la península antártica hacia el sur hasta la Isla Alexander, y los

archipiélagos Scotia Arc South Shetland, South Orkney y South Sandwich (Parnikoza *et al.*, 2007). Reyes (2018), comprobó la capacidad de producir ácido indolacético y solubilizar fósforo de algunas bacterias rizosféricas psicrotolerantes de la Antártica asociadas a estas dos plantas, estos factores podrían promover el crecimiento vegetativo y asimilación de nutrientes en especies agrícolas. Sin embargo, estas bacterias no han sido evaluadas en su capacidad para producir compuestos antimicrobiales y de biocontrol sobre fitopatógenos de interés como bacterias de los géneros *Xanthomonas* y *Pseudomonas*, lo que ayudaría a mitigar las problemáticas de resistencia a bactericidas y la contaminación del ecosistema que causa su uso. Además, considerando que bacterias mesófilas del género *Pseudomonas* y *Xanthomonas* tienen la capacidad de infectar a temperaturas inferiores a 20 °C, las cuales se presentan al inicio de la temporada de crecimiento, se hace interesante la opción de utilizar agentes biológicos psicrotolerantes que tengan la capacidad de competir mejor a bajas temperaturas (Latorre, 2018; Lamichhane y Varvaro, 2014; Lamichhane, 2014; Willey *et al.*, 2011; Joublan, 2004).

Basado en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar actividad antagonista de bacterias psicrotolerantes asociadas a la rizósfera de *Deschampsia antarctica* y *Colobanthus quitensis*, presentes en la Antártica, sobre bacterias fitopatógenas de los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Área de estudio**

Los ensayos *in vitro* fueron realizados en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Producción Vegetal de la Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Campus Chillán, mientras que los ensayos *in vivo* se realizaron en el huerto "Fundo las Nieves", ubicado en la comuna de Pinto 36°39'13.1" Sur, 71°59'31.4" Oeste, Comuna de Pinto, Región de Ñuble, Chile.

### **Microorganismos psicrotolerantes y fitopatógenos**

Se utilizaron cinco bacterias fitopatógenas pertenecientes a la colección del Laboratorio de Fitopatología Facultad de Agronomía Universidad de Concepción, Campus Chillán. Las bacterias fitopatógenas utilizadas fueron: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) cepa Ps3, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa)

cepa 105743, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Xaj) cepa Xaj Negrete y *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Xac) cepa Xac7. Se evaluaron 24 bacterias psicrotolerantes obtenidas desde el cepario del Laboratorio de Bacteriología, que fueron previamente colectadas y aisladas de dos sectores de la Antártica marítima: Arctowski (62°9'40.60"S; 58°28'30.72"O; 62°9'45.96"S; 58°28'14.29"O y 62°9'44.72"S; 58°28'11.51"O) y Coppermine (62°24'S; 59°30'W) (Reyes, 2018) (Anexo 1).

### **Obtención de inóculo**

Las bacterias *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y las cepas psicrotolerantes fueron incubadas en caldo King B (KB), Luria Bertani (LB) y nutritivo (CN), respectivamente, durante un período de 48 h a 25 °C a 150 rpm., para la obtención del inóculo. Este procedimiento fue realizado cada vez que se necesitó inóculo para los ensayos.

### **Ensayos *in vitro***

#### **Preselección de bacterias psicrotolerantes con actividad antagonista**

Se estableció un césped o tapiz bacteriano para cada especie de *Xanthomonas* en agar LB y de *Pseudomonas* en medio de cultivo KB, utilizando 500 µL de cada bacteria multiplicada en caldo de cultivo. Sobre este césped bacteriano se aplicó cada tratamiento. Los tratamientos consistieron en las diferentes cepas de bacterias psicrotolerantes aplicadas con un volumen de 10 µL sobre el tapiz de la bacteria fitopatógena. También se dispusieron tres controles, el control negativo (agua destilada estéril), el control positivo consistente en estreptomicina en dosis de 200 mg L<sup>-1</sup> (Ant) y el agente de control biológico *Pseudomonas protegens* cepa ChB7 (Pp). Las placas fueron incubadas a 25 °C en oscuridad durante 48 h en una incubadora (Biochemistry Incubator, GrupoBios). En este caso, se evaluó la capacidad antagonista de las bacterias psicrotolerantes mediante la observación y medición del halo de inhibición generada sobre el tapiz de la bacteria fitopatógena. La condición de "cepa con desarrollo sobre el tapiz" se uso como criterio de selección.

#### **Análisis *in vitro* de actividad antagonista de bacterias psicrotolerantes con diferentes ciclos de temperatura**

Realizando la misma metodología antes descrita se evaluó el comportamiento de las bacterias fitopatógenas y las bacterias psicrotolerantes seleccionadas en el

ensayo anterior, en ocho ciclos, de 8 h a distintas temperaturas, usando tres cámaras incubadoras (Biochemistry Incubator, GrupoBios) con 8 °C, 15 °C y 25 °C, dichos ciclos se describen en la Tabla 1, y sus objetivos se discuten en el Anexo 2.

Tabla 1. Tratamientos con distintos ciclos de temperatura.

Código Tratamiento	Tiempo (h)	Temperatura (°C)
25 - 8 - 25	0 - 8	25
	8 - 16	8
	16 - 24	25
	24 - 32	8
	32 - 40	25
	40 - 48	8
	48 - 56	25
	56 - 64	8
15 - 25 - 8	0 - 8	15
	8 - 16	25
	16 - 24	8
	24 - 32	15
	32 - 40	25
	40 - 48	8
	48 - 56	15
	56 - 64	25
8 - 15 - 25	0 - 8	8
	8 - 16	15
	16 - 24	25
	24 - 32	8
	32 - 40	15
	40 - 48	25
	48 - 56	8
	56 - 64	15
8	0 - 64	8
15	0 - 64	15

Se evaluó la capacidad antagonista de las bacterias psicotolerantes en cada tratamiento mediante la observación y medición del halo de inhibición generado sobre el tapiz de la bacteria fitopatógena por medio del software "ImageJ". Aquellas bacterias que presentaron actividad controladora fueron seleccionadas para los ensayos sobre plantas.

### **Ensayo *in vivo***

El estudio en campo se llevó a cabo en un huerto productivo de avellanos cv. Barcelona durante la temporada 2019.

Los tratamientos consistieron en un control absoluto en base a agua destilada estéril (T1), hidróxido de cobre [Kocide® 2000, 200 g P.C. hL<sup>-1</sup>] (T2), control biológico *Pseudomonas protegens* cepa ChB7 (T3) y las bacterias psicotolerantes seleccionadas en el ensayo *in vitro* (Tn). El diseño experimental fue completamente al azar con ocho repeticiones que correspondieron a ocho árboles sobre los cuales se aplicaron los tratamientos. Para esto, en cada árbol fueron seleccionadas ramas de un año con ocho brotes cada una, completamente sanas, en las cuales se aplicaron los tratamientos con un volumen de 10 mL, utilizando un atomizador manual. La aplicación de los tratamientos fue de modo preventivo, es decir, antes de inocular la bacteria patógena (*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*), el día 13 de septiembre de 2019. La aplicación de la bacteria patógena se realizó el 16 de septiembre de 2019, utilizando el mismo volumen de aplicación. La unidad experimental fue la rama inoculada.

La evaluación de incidencia y severidad de la enfermedad se llevó a cabo a los 10 y 21 días posterior a la aplicación de las bacterias patógenas, con base en estudios realizados por Lamichhane *et al.* (2012).

La evaluación consistió en medir las siguientes variables:

1. Incidencia: contemplando el número de hojas infectadas por agrupación de hojas evaluadas dentro del brote (ocho brotes para cada tratamiento), generando un porcentaje de infección por rama.
2. Severidad: la severidad de la infección generó un "grado de daño", para lo cual se contaron todas aquellas hojas sintomáticas, considerando halo necrótico/cloróticos y quemaduras en borde foliar asignándoles un grado de daño por hoja mediante la escala de daño modificada (Anexo 3) de López-Vázquez *et al.*

(2016), y un “índice de daño” el que considera para su cálculo los grados de daños de cada hoja por brote (GD), el número de hojas por brote (NHB) y el grado máximo de escala de daño (GM), obteniendo la siguiente formula:  $(\text{SUMA}(\text{GD})/(\text{NHB} \times \text{GM})) \times 100$ .

### **Condiciones meteorológicas durante el desarrollo del experimento en terreno**

Se utilizaron los registros de temperatura y precipitación de la estación Chillán Mayulermu, ubicada en la Comuna de San Ignacio, Provincia Diguillín, Región de Ñuble, para determinar si se presentaron las condiciones climáticas favorables para la infección de los fitopatógenos a evaluar (datos obtenidos desde [meteo Chile.cl](http://meteo Chile.cl)). Para esto se analizaron los datos climáticos del mes de septiembre y octubre del año 2019, periodo en el cual se realizó el experimento de terreno (Anexo 4).

El análisis de la condición meteorológica presente en el estudio de campo mostró dos eventos climáticos favorables para una posible infección de Xac durante el periodo de desarrollo del experimento. El primer evento climático se presentó entre los días 14 y 22 de septiembre. Desde el día 14 al 16 de septiembre precipitaron 20,3 mm de forma constante, además el día 16 de septiembre la temperatura mínima alcanzó los -2,1 °C con una temperatura media de 6,5 °C y una máxima de 15 °C. El día 18 de septiembre nuevamente precipitó con 0,2 mm acumulados y desde el día 19 al 22 de septiembre la temperatura mínima se mantuvo bajo los 0 °C, alcanzando -2,5 °C el día 20 de septiembre.

Entre los días 23 al 25 de septiembre, aunque no hubo precipitación la temperatura máxima promedio estuvo sobre los 25 °C (temperatura media promedio 14,2 °C).

El segundo evento climático se presentó entre los días 26 de septiembre y 8 de octubre en donde el 54 % de los días precipitó (30,7 mm), posibilitando una humectación foliar frecuente y prolongada. Durante los días 3, 4, 5 y 8 de octubre la temperatura mínima se presentó bajo los 0 °C acompañada de una precipitación de 30,7 mm en dicho periodo.

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

Todos los ensayos fueron realizados utilizando un diseño completamente al azar, con arreglo factorial para los ensayos *in vitro*. Los resultados fueron sometidos a un

análisis de varianza, previa verificación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, con la prueba de Shapiro-Wilk modificado y prueba de Levene, respectivamente. Todos los datos porcentuales fueron transformados usando la fórmula de Bliss (Raíz  $[X+0,5]$ ) donde X corresponde al dato porcentual. Diferencias entre tratamientos fueron determinadas mediante la prueba de comparación de medias LSD Fisher, con significancia de  $p < 0,05$ ., y en el caso de la variable Grado de daño los datos fueron sometidos a un análisis no paramétrico mediante la prueba de Kruskal Wallis ( $p = 0,05$ ). Estos análisis se llevaron a cabo utilizando el software estadístico Infostat (Balzarini *et al.*, 2008).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Ensayo *in vitro***

#### **Preselección de bacterias psicrotolerantes con actividad antagonista**

De acuerdo a la metodología de preselección de bacterias psicrotolerantes, luego de 48 h a 25 °C, no fue posible observar la formación de halos de inhibición visiblemente notorios. A pesar de esto, las bacterias *Pseudomonas* sp. cepas AG-144 y AG-151, *Pedobacter cryoconitis* cepa AG-157<sup>A</sup> y AG-157<sup>B</sup>, *Pseudomonas frederiksbergensis* cepa AG-153 y cepa AG-155, y *Pseudomonas antartica* cepa AG-158, crearon colonias notoriamente definidas, aunque sin el desarrollo de un halo medible.

Considerando que las temperaturas que permiten el crecimiento de las bacterias psicrotolerantes están entre 0 °C y 35 °C (Willey *et al.*, 2011), se decidió estudiar el comportamiento de las siete cepas sometidas a distintas temperaturas dentro de este rango.

#### **Análisis *in vitro* de actividad antagonista de bacterias psicrotolerantes con diferentes ciclos de temperatura.**

De todas las bacterias evaluadas solo se ~~destacó~~destacó la formación de halo de inhibición por parte de las cepas AG-144, AG-151 y AG-157<sup>A</sup> sobre la bacteria patógena *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* en los ciclos térmicos que contenían una temperatura de 15 °C., las respuestas observadas para estas cepas y demás se presentan a continuación en la Tabla 2.

### Determinación de actividad antagonista de bacterias psicrotolerantes bajo diferentes ciclos térmicos.

Tabla 2. Actividad antagonista (+) de bacterias psicrotolerantes mediante la formación de halos de inhibición sobre tapices de bacterias fitopatógenas de los géneros *Xanthomonas* y *Pseudomonas* bajo distintos ciclos térmicos de crecimiento.

Ciclo térmico	Cepas y otras variables	Bacterias fitopatógenas <sup>1</sup>				
		Xaj	Xac	Pss	Psa	Pst
		Halo	Halo	Halo	Halo	Halo
25-8-25	Cepa AG-144	-	-	-	-	-
	Cepa AG-151	-	-	-	-	-
	Cepa AG-153	-	-	-	-	-
	Cepa AG-155	-	-	-	-	-
	Cepa AG-157 <sup>A</sup>	-	-	-	-	-
	Cepa AG-157 <sup>B</sup>	-	-	-	-	-
	Cepa AG-158	-	-	-	-	-
	<i>P.protegens</i>	-	+	-	+	+
	Estreptomicona	+	+	+	+	-
15-25-8	Cepa AG-144	-	+	-	-	-
	Cepa AG-151	-	+	-	-	-
	Cepa AG-153	-	-	-	-	-
	Cepa AG-155	-	-	-	-	-
	Cepa AG-157 <sup>A</sup>	-	+	-	-	-
	Cepa AG-157 <sup>B</sup>	-	-	-	-	-
	Cepa AG-158	-	-	-	-	-
	<i>P.protegens</i>	-	+	+	+	+
	Estreptomicona	+	+	+	+	-
8-15-25	Cepa AG-144	-	+	-	-	-
	Cepa AG-151	-	+	-	-	-
	Cepa AG-153	-	-	-	-	-
	Cepa AG-155	-	-	-	-	-
	Cepa AG-157 <sup>A</sup>	-	+	-	-	-
	Cepa AG-157 <sup>B</sup>	-	-	-	-	-
	Cepa AG-158	-	-	-	-	-
	<i>P.protegens</i>	-	+	+	-	+
	Estreptomicona	+	+	+	+	-

Tabla 2 (cont.). Actividad antagonista (+) de bacterias psicrotolerantes mediante la formación de halos de inhibición sobre tapices de bacterias fitopatógenas de los géneros *Xanthomonas* y *Pseudomonas* bajo distintos ciclos térmicos de crecimiento.

Ciclo térmico	Cepas y otras variables	Bacterias fitopatógenas <sup>1</sup>				
		Xaj Halo	Xac Halo	Pss Halo	Psa Halo	Pst Halo
8	Cepa AG-144	-	-	-	-	-
	Cepa AG-151	-	-	-	-	-
	Cepa AG-153	-	-	-	-	-
	Cepa AG-155	-	-	-	-	-
	Cepa AG-157 <sup>A</sup>	-	-	-	-	-
	Cepa AG-157 <sup>B</sup>	-	-	-	-	-
	Cepa AG-158	-	-	-	-	-
	<i>P.protegens</i>	-	+	-	-	+
	Estreptomycin	-	+	+	+	-
15	Cepa AG-144	-	+	-	-	-
	Cepa AG-151	-	+	-	+	-
	Cepa AG-153	-	-	-	-	-
	Cepa AG-155	-	-	-	-	-
	Cepa AG-157 <sup>A</sup>	-	+	-	+	-
	Cepa AG-157 <sup>B</sup>	-	-	-	-	-
	Cepa AG-158	-	-	-	-	-
	<i>P.protegens</i>	-	+	+	+	+
	Estreptomycin	+	+	+	+	-

<sup>1</sup> *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Xaj); *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Xac); *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss); *Pseudomonas syringae* pv. *actinideae* (Psa); *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst).

La mejor respuesta inhibitoria por parte de las cepas psicrotolerantes se observó sobre la bacteria patógena *X. arboricola* pv. *corylina* (Xac), dado que sólo en este caso las cepas AG-151, AG-144 y AG-157<sup>A</sup> desarrollaron halos de inhibición dentro de los ciclos térmicos 15-25-8, 8-15-25 y 15, con halos promedio de 25,7; 29,7 y 35,6 mm<sup>2</sup>, respectivamente. Los controles *P. protegens* cepa ChB7, la cual tiene la presencia del gen *phlD* asociado con la biosíntesis de 2,4-DAPG y pioluteorina (antibióticos de amplio espectro) (Vera- et al.,2018; Weller et al., 2007), y el

antibiótico sulfato de estreptomicina, antibiótico aminoglucósido con acción bactericida (inhibición de síntesis proteica) (Mella *et al.*, 2004; Palomino y Pachón, 2003; McManus *et al.*, 2002) presentaron halos de inhibición promedio de 62,4 y 48,3 mm<sup>2</sup>, respectivamente. Cabe mencionar que en el co-cultivo con *P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa) las cepas AG-151 y AG-157<sup>A</sup> generaron un halo de inhibición bajo el ciclo térmico 15 (15 °C por 64 h) de 6,7 y 10,8 mm<sup>2</sup>, respectivamente.

La mejor respuesta inhibitoria sobre Xac expresada en área de inhibición la alcanzó *P. protegens* en el tratamiento 25-8-25, con un área de 114,1 mm<sup>2</sup>, seguido por el antibiótico (sulfato de estreptomicina) con un área 48,3 % menor. Es relevante mencionar que en este ciclo térmico la respuesta inhibitoria de las cepas psicrotolerantes fue nula, dándose una respuesta similar a la primera evaluación con 48 h a 25 °C (preselección bacterias psicrotolerantes).

En el ciclo térmico 15-25-8 la respuesta promedio de inhibición por parte de las cepas psicrotolerantes fue de 25,7 mm<sup>2</sup>, considerando las cepas AG-144, AG-151 y AG-157<sup>A</sup>, y en el caso de *P. protegens* y estreptomicina el área de inhibición observada fue de 76,93 y 48,61 mm<sup>2</sup>, respectivamente.

Bajo las condiciones del ciclo térmico 8-15-25, las cepas AG-144, AG-151 y AG-157<sup>A</sup> tuvieron la capacidad de formar un halo de inhibición promedio de 29,7 mm<sup>2</sup>, siendo 46,8 % menor a la respuesta obtenida por *P. protegens* (55,9 mm<sup>2</sup>), y 42,7 % menor al antibiótico sintético sulfato de estreptomicina (51,9 mm<sup>2</sup>).

En el ciclo térmico 8 (8 °C durante 64 h), las bacterias psicrotolerantes no tuvieron la capacidad de formar halos de inhibición y el desarrollo del césped fitopatógeno fue bajo, mientras que los controles presentaron una menor área de inhibición con respecto a los otros ciclos térmicos, alcanzando 5,91 y 29 mm<sup>2</sup>, para *P. protegens* y estreptomicina, respectivamente. El régimen térmico de 8 °C constante limitó el desarrollo de Xac y afectó la acción inhibitoria de las cepas psicrotolerantes estudiadas.

Bajo la condición térmica del ciclo 15 (15 °C por 64 h), las cepas psicrotolerantes AG-144, AG-151 y AG-157<sup>A</sup>, tuvieron la capacidad de formar halos de inhibición, y en el caso de AG-144 y AG-157<sup>A</sup> los halos formados fueron los de mayor tamaño dentro de todos los ciclos térmicos. El área promedio formada por

las tres cepas psicotolerantes fue de 35,6 mm<sup>2</sup>, siendo 40 % menor a *P. protegens* (59,3 mm<sup>2</sup>) y 32,9 % menor al sulfato de estreptomicina (53 mm<sup>2</sup>).

Desde la perspectiva del crecimiento de las bacterias psicotolerantes fue posible observar que existió influencia de la especie fitopatógena sobre el cual la rizobacteria se co-cultivó. Todas las cepas psicotolerantes crecieron sobre Xaj, mientras que no fue así para Xac, ya que la cepa AG-158 presentó un bajo crecimiento en los ciclos térmicos que consideraron una temperatura de 25 °C. Basado en este resultado, se podría inferir que dicha cepa competiría mejor por nutrientes con respecto a Xac a temperaturas menores a 15 °C, aunque no sería capaz de producir algún compuesto antimicrobial que inhiba la bacteria fitopatógena. En el caso del co - cultivo las cepas AG-153, AG-155 y AG-157<sup>B</sup>, fueron las únicas que presentaron un crecimiento adecuado en los ciclos térmicos 8 y 15 sobre Pss, indicando que estas cepas psicotolerantes crecen bajo condiciones térmicas menores a 15 °C, pudiendo competir con Pss. En co-cultivo de las cepas psicotolerantes sobre Psa la cepa AG-158, presentó un bajo desarrollo en el ciclo de temperatura de 8 °C durante 64 h, a pesar de que sobre Xac tuvo una mejor capacidad de crecimiento en ciclos con temperaturas menores a 15 °C. Esto sugiere que la densidad celular bacteriana es influenciada por la interacción de los microorganismos en co - cultivo, por una parte la alteración de la densidad poblacional afectaría la comunicación célula-célula y las señales que activan factores de transcripción que inducen genes específicos en la bacteria (detección de “quórum sensing”) (Babalola, 2010), y por otra parte, la colonización y competencia de nutrientes pueden estar relacionadas con la capacidad del agente de biocontrol para adherirse a sitios específico, incluidos los tejidos del huésped (medio nutritivo) y del patógeno (Droby *et al.*, 2009). Además, la asimilación de nutrientes disponibles y la dilución de la solución nutritiva con mayor rapidez presenta una ventaja de un microorganismo frente a otro (Janisiewicz y Korsten, 2002), como es el caso de *Candida oleophila*, levadura la cual por medio de la competencia por nutrientes logra ejercer acción biocontroladora sobre *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* (Guerrero *et al.*, 2011).

Al co - cultivar las cepas psicotolerantes con Pst se observó que todas las cepas tuvieron dificultad para crecer adecuadamente.

Por último, cabe destacar la particular capacidad de la cepa psicotolerante AG-151 (*Pseudomonas* sp.) de moverse sobre el tapiz inoculado con *X. arboricola* pv. *juglandis* (Anexo 4) en todos los ciclos térmicos estudiados, así como también en menor medida en Xac y Pst. La capacidad de esta cepa presupone un modo de acción por competencia (nichos o nutrientes), la cual ha sido estudiada en microorganismos como bacterias del género *Pseudomonas*, hongos como *Trichoderma* spp. y micorrizas, tanto por separado como en uso combinado, en el afán de encontrar soluciones a patógenos radiculares, aéreos y de postcosecha (Cano, 2011; Infante *et al.*, 2009; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007). A modo de recomendación, conociendo antecedentes de que esta cepa tiene la capacidad de producir ácido indolacético (AIA) y solubilizar fósforo (Reyes, 2018), sería interesante evaluar la posible co-aplicación con alguno de los agentes biocontroladores antes mencionados.

Al evaluar el crecimiento de las cepas fitopatógenas en los distintos ciclos térmicos utilizados se observó que las bacterias del género *Xanthomonas*, presentaron un adecuado desarrollo cuando la temperatura de 25 °C estuvo presente en el ciclo térmico, mientras que en los ciclos térmicos con temperaturas inferiores (8 y 15 °C por 64 h) el crecimiento se vio afectado y fue menor. Esto se puede deber a que *Xanthomonas arboricola* es una bacteria mesofílica que requiere de temperaturas superiores a 20 °C para su reproducción, aunque la enfermedad puede ocurrir a temperaturas inferiores a 20 °C cuando se prolonga el periodo de humedad (Lamichhane y Varvaro, 2014; Lamichhane, 2014).

El crecimiento de *P. syringae* pv. *syringae* (Pss) se observó disminuido en los ciclos térmicos 15 (15 °C por 64 h) y 8 (8 °C por 64 h). Según Latorre (2018), Pss se favorece con temperaturas frías a templadas (0 – 15 °C), y según Joublan (2004), las temperaturas favorables a la infección están entre -0,5 °C y 2 °C, con un rango óptimo para el desarrollo de síntomas de 15 °C a 25 °C. De este modo, se puede inferir que Pss tiene la capacidad de infectar a bajas temperaturas y esta infección se favorece con temperaturas desde 0 °C a 15 °C, alcanzando su óptimo a los 25 °C, lo que concuerda con los resultados observados. En cuanto a Psa, el crecimiento observado fue bajo en el ciclo térmico 8 (8 °C por 64 h), lo que concuerda con Latorre (2018), donde menciona que este patógeno se ve favorecido con temperaturas entre

10 °C a 18 °C, por lo que el ciclo térmico de 8 °C por 64 h entregó una condición bajo el rango favorable para su crecimiento. Por último, dentro del mismo género, Pst presentó un bajo crecimiento en los ciclos térmicos 8 y 15, lo cual fue esperado considerando que este patógeno se favorece con ambientes templados a fríos con temperaturas en un rango entre 18 a 24 °C (Latorre, 2018).

Al evaluar el efecto inhibitorio de *Pseudomonas protegens* y Sulfato de estreptomicina sobre Xaj, Pss, Psa y Pst, fue posible observar que, *P. protegens* no generó efecto inhibitorio en el ciclo térmico 25-8-25 sobre los patógenos Xaj y Pss, mientras que sobre Psa y Pst presentó un halo de inhibición que fue un 68,3 % y 87,2 % menor al halo generado sobre *X. arboricola* pv. *corylina* (114,1 mm<sup>2</sup>). Con respecto al sulfato de estreptomicina, no hubo efecto inhibitorio sobre Pst y el halo de mayor tamaño se dio sobre Xaj con un área de 101,8 mm<sup>2</sup>, en el caso de Pss y Psa los halos formados fueron en un 23 y 52,6 % menor al observado en Xaj, respectivamente.

Dentro del ciclo térmico 15-25-8, *P. protegens* no tuvo la capacidad de inhibir el desarrollo de Xaj, mientras que el efecto inhibitorio se dio en mayor medida sobre Psa con un área de 33,3 mm<sup>2</sup>, seguido por Pss con 22,1 mm<sup>2</sup> y Pst con 10,4 mm<sup>2</sup>. La estreptomicina alcanzó el mejor resultado sobre Pss con un área de inhibición de 104,2 mm<sup>2</sup>, seguido por Xaj y Psa con un área respectiva de 68,2 mm<sup>2</sup> y 52,2 mm<sup>2</sup>. En el caso de Pst, el antibiótico sintético no tuvo la capacidad de inhibir su desarrollo en el ciclo térmico de 15-25-8.

En el ciclo térmico 8-15-25, *P. protegens* sólo fue capaz de generar efecto inhibitorio sobre Pss y Pst con áreas de inhibición de 29,5 y 15,4 mm<sup>2</sup>, respectivamente, mientras que Xaj y Psa no fueron inhibidas por este antagonista. La estreptomicina tuvo su mayor área de inhibición sobre Xaj, generando halos promedios de 77,6 mm<sup>2</sup>, la cual fue mayor en 4,8 mm<sup>2</sup> a Pss y 36,1 mm<sup>2</sup> a Psa. En el caso de Pst, la estreptomicina no tuvo la capacidad de inhibir su desarrollo considerando los tres ciclos de 8 h a 8 °C, tres ciclos de 8 h a 15 °C y dos ciclos de 8 h a 25 °C correspondientes.

En el ciclo térmico 8, *P. protegens* sólo tuvo efecto inhibitorio sobre Pst con un halo de inhibición de 16 mm<sup>2</sup>. Cabe destacar que bajo este ciclo térmico se observó la mayor área de inhibición por parte de *P. protegens* sobre Pst. Aparentemente la

suma de factores en torno a este ciclo térmico de temperatura constante (8 °C durante 64 h) generan una condición relativamente adecuada para la acción de *P. protegens*. A pesar de esta destacable situación, el tamaño del área de inhibición fue 86 % menor al área de mayor tamaño generada por dicho control sobre Xac. En cuanto a la estreptomycinina, sólo se observó efectos de inhibición sobre Pss y Psa con áreas de 93,1 y 53,7 mm<sup>2</sup>, respectivamente.

En el ciclo térmico 15 (15 °C durante 64 h), *P. protegens* generó el área de inhibición de mayor tamaño sobre Psa (53,3 mm<sup>2</sup>), seguido por Pss y Pst con áreas 47,5 y 81 % menor, respectivamente. Esta bacteria antagonista no tuvo la capacidad de generar inhibición sobre Xaj. Estreptomycinina alcanzó el mayor tamaño de halo sobre Xaj con un área de 99,8 mm<sup>2</sup>, seguido por Pss y Psa con áreas de 86,7 y 29,6 mm<sup>2</sup>, respectivamente. Este antibiótico no tuvo la capacidad de inhibir el crecimiento del tapiz de Pst.

#### **Análisis *in vitro* de actividad antagonista de bacterias psicrotolerantes con diferentes ciclos de temperatura sobre *X. arboricola* pv. *corylina***

El análisis de los datos de halos de inhibición (mm<sup>2</sup>) sobre Xac determinó interacción entre las bacterias psicrotolerantes y los tratamientos térmicos ( $p = 0,0079$ ; CV: 38,3), indicando que no todas las bacterias se comportan de la misma manera frente a distintas temperaturas. En base a este resultado se analizaron los halos de inhibición producido por las bacterias de forma individual para cada ciclo térmico (Tabla 3).

Las tres bacterias rizosféricas psicrotolerantes: AG-144, AG-151 y AG-157<sup>A</sup>, no presentaron diferencias significativas entre los distintos ciclos térmicos en los cuales formaron halos de inhibición, por lo que se puede inferir que la respuesta antagónica de las bacterias psicrotolerantes sobre Xac estaría en un óptimo cercano a los 15 °C. En los ciclos térmicos 25-8-25 y 8, no hubo formación de halo de inhibición para las tres cepas psicrotolerantes, indicando que las bacterias psicrotolerantes, se ven afectadas en su actividad antagonista con temperaturas cercanas a los 8 y 25 °C, ya que no forman halos de inhibición. Aunque no significativamente diferente, la bacteria AG-151 tiene su máxima formación en el ciclo térmico 8-15-25, esto podría indicar que esta cepa puede producir compuestos antimicrobiales a temperaturas entre 8 y 15 °C, ya que este ciclo térmico aporta una temperatura inicial de 8 °C por

8 h, seguido de 8 h a 15 °C, con un total de tres ciclos a 8 °C, tres ciclos a 15 °C y 2 ciclos de 25 °C. Por su parte las cepas AG-144 y AG-157<sup>A</sup> tuvieron la mayor área de inhibición sobre *Xac* en el régimen térmico de 15 °C por 64 h, lo cual sugiere que la producción óptima de compuestos inhibitorios sería alrededor de los 15 °C.

Tabla 3. Halos de inhibición (mm<sup>2</sup>) sobre *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (*Xac*) producido por las bacterias psicotolerantes (AG-151, AG-144, AG-157<sup>A</sup>), *Pseudomonas protegens* (PP) y sulfato de estreptomycin (ANT 200 mg L<sup>-1</sup>) sometidos a distintos ciclos térmicos.

Ciclos tempe- ratura <sup>2</sup>	AG-151	AG-144	AG-157 <sup>A</sup>	PP	ANT
25-8-25	0,0 b <sup>1</sup> B	0,0 b B	0,0 b B	114,1 a A	58,9 a A
15-25-8	25,2 a B	27,4 a B	24,3 a B	76,9 ab A	48,6 ab AB
8-15-25	36,8 a A	25,3 a A	27,1 a A	55,9 b A	51,9 ab A
8	0,0 b B	0,0 b B	0,0 b B	5,9 c AB	29,0 b A
15	30,7 a A	28,3 a A	47,8 a A	59,3 b A	53,0 ab A

<sup>1</sup> Letras minúsculas distintas en una misma columna indican diferencias entre ciclos térmicos para cada tratamiento con bacterias psicotolerantes o controles positivos. Letras mayúsculas distintas en una misma fila indican diferencias entre cada tratamiento con bacterias psicotolerantes o controles positivos en un mismo ciclo térmico. Comparaciones de media fueron realizadas utilizando la prueba LSD de Fisher, con un nivel de significancia del 95 %.

<sup>2</sup> Los ciclos térmicos en sus temperaturas y tiempos son descritos en la Tabla 1.

Los controles biológicos (*P. protegens*) y químico (sulfato de estreptomycin) fueron más estables frente a los distintos tratamientos térmicos. *P. protegens* cepa ChB7 logró generar áreas de halo mayores a estreptomycin, excepto en el tratamiento de 8 °C, pero este antibiótico fue menos variable en la dimensión de los halos desarrollados. Cabe destacar que frente a temperaturas de 8 °C ambos controles tuvieron una menor actividad antagónica sobre *Xac*.

*P. protegens* cepa ChB7 y sulfato de estreptomycin respondieron de mejor manera bajo temperaturas cercanas a 25 °C, lo cual es conveniente considerando que *Xac* tiene su óptima patogenicidad entre 25 °C – 30 °C (Morales *et al.*, 2018).

A temperaturas cercanas a 25 °C las tres bacterias psicotolerantes no desarrollaron compuestos inhibitorios, mientras los controles *P. protegens* y estreptomicina tuvieron una alta actividad (halos promedios de 114,1 y 58,88 mm<sup>2</sup>, respectivamente), sin presentar diferencias significativas entre ellos, y siendo diferentes de las tres bacterias psicotolerantes ( $P < 0,05$ ).

*Pseudomonas protegens* presentó una mejor adaptación a temperaturas de 15 – 25 °C, y el antibiótico no se vio afectado mayormente por estas temperaturas. Así ambos controles fueron diferentes de las tres cepas psicotolerantes, las cuales promediaron un área de inhibición de 25,7 mm<sup>2</sup>, lo que fue 66,6 % menor a *P. protegens* y 47,1 % al sulfato de estreptomicina.

Cuando en los ciclos térmicos se redujeron las temperaturas a rangos entre 8 y 15 °C se comenzó a observar que no hubo diferencias entre bacterias psicotolerantes y los dos controles. Las cepas psicotolerantes AG-144 y AG-157<sup>A</sup> bajo este último ciclo térmico presentaron los mayores halos de inhibición, lo que podría deberse a la mejor adaptación de estas cepas a temperaturas cercanas a los 15 °C. En el ciclo térmico 8, no hubo diferencias significativas entre las tres bacterias psicotolerantes, ya que no hubo actividad antibacteriana, mientras *P. protegens* cepa ChB7 mostró una leve inhibición y no fue estadísticamente diferente de las bacterias psicotolerantes, lo que se explica porque una de las repeticiones de *P. protegens* no tuvo inhibición sobre *Xac*.

Es interesante considerar en estudios posteriores, la evaluación de compatibilidad de *P. protegens* más las bacterias psicotolerantes, con el fin de desarrollar consorcios de microorganismos que se apliquen en conjunto para el control de bacterias fitopatógenas como *Xac*.

### **Ensayo *in vivo***

En base al análisis realizado en condiciones *in vitro*, se seleccionaron las cepas psicotolerantes AG-144, AG-151 y AG-157<sup>A</sup> para efectuar los estudios de control sobre *Xac* en plantas, ya que estas cepas presentaron actividad antagonista sobre esta bacteria fitopatógena.

Al momento de la aplicación de los tratamientos el árbol se encontraba en inicios de brotación, por lo cual las evaluaciones se realizaron sobre número de hojas que

fue aumentando en el tiempo. La sintomatología observada consistió en numerosas lesiones poligonales que en casos de severa infección producían una clorosis general en toda la lámina foliar (Anexo 5), la cual posteriormente caía. Las hojas infectadas presentaron comúnmente un necrosamiento en los márgenes de las hojas (Anexo 6). Esta sintomatología desarrollada por Xac concuerda con la observada para esta bacteria en avellano europeo por Lamichhane *et al.* (2013) en la Provincia de Viterbo en Italia.

El requerimiento térmico de Xac para su reproducción es de temperaturas superiores a 20 °C, aunque la enfermedad puede ocurrir a temperaturas inferiores cuando se prolonga el periodo de humedad (Lamichhane y Varvaro, 2014; Lamichhane, 2014), condición que se presentó durante el periodo de evaluación, incluyendo 9 días con eventos de heladas (temperaturas bajo 0 °C), lo que aumenta las posibilidades de entrada del patógeno a los tejidos vegetales, debido a su eventual congelación y formación de micro lesiones (Bascope, 2013; Lamichhane, 2014). Por lo tanto, frente a las condiciones meteorológicas que se presentaron durante el estudio, la infección y propagación del patógeno sobre los tejidos evaluados fue favorable, además que, al ser el experimento realizado en un huerto comercial adulto de avellano europeo, contaba con una alta concentración de inóculo natural de Xac.

El componente ambiental determina críticamente el riesgo de enfermedades y está definido por las condiciones cambiantes de humedad y temperatura (Adaskaveg *et al.*, 2008). Así, las precipitaciones y la temperatura han sido descritos como los factores más influyentes en la aparición y severidad de infecciones fitobacterianas (Morales *et al.*, 2018; Lamichhane *et al.*, 2013; Pietrarelli *et al.*, 2006). Estos factores predisponentes estuvieron presentes en conjunto durante el desarrollo del experimento, ya que la precipitación de 20,3 mm caída entre el 14 y 22 de septiembre previo a la inoculación de las plantas posibilitó la humectación foliar continua sobre hojas jóvenes en desarrollo y en donde la probabilidad de agua libre sobre estomas abiertos por más de una hora fue alta, haciendo posible la infección de Xac (Lamichhane, 2014). Por otra parte, Xac al ser una bacteria que tiene fase epifítica sobre plantas de avellano (EPPO, 2004) tiene una alta probabilidad de dispersión y crecimiento por efecto de las gotas de lluvia, debido a

que las gotas de lluvia arrastran colonias bacterianas a corta y larga distancia (Pietrarelli *et al.*, 2006).

### **Evaluación de incidencia y severidad de Xac sobre avellano europeo cv. Barcelona**

La incidencia del patógeno en hojas varió de 86 % a 94 %, lo que es un nivel alto de infección sobre los brotes presentes en las ramillas inoculadas, considerando que en estudios realizados por Lamichhane *et al.* (2013) la incidencia varió de 1 % a 75 %. El análisis de la incidencia mostró que no existieron diferencias significativas entre tratamientos ( $p = 0,32$ ) y que el menor porcentaje de infección fue para el tratamiento con agua destilada estéril (86 % de incidencia), seguido por las tres cepas psicotolerantes (AG-144, AG-151 y AG-157<sup>A</sup>) con una incidencia de 88 % para las tres cepas, mientras en orden ascendente hidróxido de cobre alcanzó un 90 % y *P. protegens* cepa ChB7 un 94 % de incidencia.

A partir del recuento de UFC realizado a yemas provenientes del sitio de estudio se detectó un inóculo inicial de  $8,5 \times 10^3$  UFC por gramo de tejido, cantidad que se encuentra dentro del rango que se pudiese encontrar en una hoja a lo largo de la temporada de crecimiento ( $10^3 - 10^6$  UFC g de tejido) según Lamichhane *et al.* (2014). Se puede suponer que las condiciones climáticas que se presentaron fueron favorables para la multiplicación y propagación del inóculo natural de Xac, presente de forma epifítica en la planta, lo que sumado a la cantidad inoculada favoreció la incidencia de la enfermedad.

La severidad de la infección de Xac medida como grado de daño según la escala de daño modificada de López-Vázquez *et al.* (2016), varió de 2,6 a 2,9, sin encontrar diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ( $p = 0,66$ ). La severidad de la infección expresada como índice de daño, varió de 51 % a 58 %, sin encontrar diferencias significativas entre tratamientos ( $p=0,32$ ;  $cv=5,6$ ). No obstante, lo anterior, las cepas psicotolerantes AG-157<sup>A</sup> y AG-144 tuvieron una tendencia a un menor daño, con 2,6 y 2,7 grados, respectivamente. Debe considerarse que las temperaturas medias estuvieron entre 6,1 °C y 14,9 °C con un promedio de 9,6 °C, pudiendo ser favorables para estas bacterias, considerando que en las pruebas *in vitro* estas cepas tuvieron una mayor actividad antimicrobial a 15 °C.

El factor ambiental es difícil y costoso de modificar, pero se podría mejorar la eficacia de control de estas cepas psicotolerantes mediante una adecuada formulación de las mismas con el objetivo de aumentar su eficiencia metabólica y la producción de compuestos antimicrobiales (Alexandre *et al.*, 2000; Galicia-Jiménez *et al.*, 2011).

La evaluación *in vitro* y la prueba *in vivo* difieren en cuanto a la acción inhibitoria de las cepas psicotolerantes y controles sobre el desarrollo de Xac. Babalola (2010) menciona la inconsistencia entre los resultados de campo y los de laboratorio, que se deben a la influencia de diversos factores, tales como las complejas interacciones entre huéspedes, bacterias, patógenos y clima. Además, este autor destaca que en la mayoría de los estudios con microorganismos rizosféricos se han realizado en su actividad en la rizósfera y no en el área foliar. Los resultados obtenidos *in vitro* donde cepas psicotolerantes como AG-144, AG-151 y AG-157<sup>A</sup> expresaron respuesta inhibitoria sobre el crecimiento de Xac en condiciones térmicas de 15 °C, que están dentro de la condición térmica predominante al inicio de la brotación del avellano europeo en la Región de Ñuble. Esto sugiere seguir trabajando en estudios que contemplen una mejora en la formulación de las mismas o el desarrollo de mezclas con otros microorganismos, previo a considerar el desechar el uso de estos recursos microbiológicos como herramientas de biocontrol de bacterias fitopatógenas.

## CONCLUSIONES

1. Las cepas de bacterias psicotolerantes evaluadas no presentaron actividad antagonista frente a bacterias fitopatógenas de los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas* evaluadas *in vitro* bajo una condición térmica de 25 °C.
2. Las cepas psicotolerantes *Pseudomonas* sp. AG-151, *Pseudomonas* sp. AG-144 y *Pedobacter cryoconitis* AG-157<sup>A</sup> presentaron inhibición *in vitro*, solamente sobre *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Xac) en aquellos ciclos térmicos que contenían una temperatura de 15 °C.
3. Las cepas psicotolerantes AG-151, AG-144 y AG-157<sup>A</sup> no presentaron control sobre Xac, bajo las condiciones ambientales de inoculación e infección natural que se presentaron durante el desarrollo de un experimento en avellano europeo cv. Barcelona, en la Región de Ñuble entre septiembre y octubre de 2019.

## REFERENCIAS

1. Adaskaveg, J.E., H. Förster, D. Thompson, G. Driever, J. Connell, R. Buchner, T. Prichard, J. Grant and L. Wade. 2008. Epidemiology and management of walnut blight [en línea]. University of California, USA. <<http://ceking.ucanr.edu/files/19076.pdf>>. [Consulta: 12 noviembre 2020].
2. Agrios, G.N. 2005. Plant pathology. (5th. ed.). Elsevier Academic Press. Burlington, USA.
3. Alexandre, G., S.E. Greer and I.B. Zhulin. 2000. Energy taxis is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol. 182(21): 6042-6048.
4. Asencio, G., P. Lavin, K. Alegría, M. Domínguez, H. Bello, G. González-Rocha and M. González-Aravena. 2014. Antibacterial activity of the Antarctic bacterium *Janthinobacterium* sp. SMN 33.6 against multi-resistant Gram-negative bacteria. Electron. J. Biotechnol. 17(1): <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2013.12.001> [en línea].
5. Babalola, O.O. 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. Biotechnol. Lett. 32(11): 1559-1570.
6. Balzarini, M.G., L. González, M. Tablada, F. Casanoves, J.A. Di Rienzo y C.W. Robledo. 2008. InfoStat: software estadístico. Manual del usuario. Versión 2008. Brujas. Córdoba. Argentina.
7. Bascopé, A. 2013. Estudio: Efecto heladas de septiembre en frutales y hortalizas entre la Región de Coquimbo y la del Maule [en línea]. ODEPA, Chile. <<https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2013/12/estudioDanioHeladas.pdf>>. [Consulta: 12 noviembre 2020].
8. Cano, M.A. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. una revisión. Rev. U.D.C.A. Act. Div. Cient. 14(2): 15-31.
9. Droby, S., M. Wisniewski, D. Macarisin and C. Wilson. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? Postharv. Biol. Technol. 52(2): 137-145.
10. EPPO (France). 2004. Normes OEPP. EPPO Standards. Diagnostic protocols for regulated pests protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés. PM 7/22. Bulletin N°34. EPPO. Paris, France.

11. Galicia-Jiménez, M.M., C. Sandoval-Castro, R. Rojas-Herrera y H. Magaña-Sevilla. 2011. Quimiotaxis bacteriana y flavonoides: perspectivas para el uso de probióticos. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 14(3): 891-900.
12. Gardan, L., T. Brault and E. Germain. 1993. Cooper resistance of *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* in French walnut orchards and its association with conjugative plasmids. *Acta Hort.* (311): 259-265.
13. Guerrero, V.M., A.C. Blanco, C. Guigón, C.J. Tamayo, F.J. Molina, D.I. Berlanga, E. Carvajal y G.D. Ávila. 2011. Competencia por nutrientes: modo de acción de *Candida oleophila* contra *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*. *Rev. Mex. Fitopatol.* 29(2): 90-97.
14. Hernández-Lauzardo, A.N., S. Bautista-Baños y M.G. Velázquez-del Valle. 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Rev. Mex. Fitopatol.* 25(1): 66-74.
15. Infante, D., B. Martínez, N. González e Y. Reyes. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Prot. Veg.* 24(1): 14-21.
16. Janisiewicz, W.J. and L. Korsten. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 411-441.
17. Joublan, J.P., J. Claverie. 2004. El cerezo: guía técnica. Universidad de Concepción. Facultad de Agronomía. Chillán, Chile.
18. Khachatourians, G.G. 1998. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Can. Med. Assoc. J.* 159(9): 1129-1136.
19. Lamichhane, J.R., P. Grau and L. Varvaro. 2012. Emerging hazelnut cultivation and severe threat of bacterial blight in Chile. *J. Phytopathol.* 160(11-12): 752-754.
20. Lamichhane, J.R., A. Fabi, R. Ridolfi and L. Varvaro. 2013. Epidemiological study of hazelnut bacterial blight in central Italy by using laboratory analysis and geostatistics. *PLoS One* 8(2): <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056298> [en línea].
21. Lamichhane, J.R. 2014. *Xanthomonas arboricola* diseases of stone fruit, almond, and walnut trees: progress toward understanding and management. *Plant Dis.* 98(12): 1600-1610.

22. Lamichhane, J.R. and L. Varvaro. 2014. *Xanthomonas arboricola* disease of hazelnut: current status and future perspectives for its management. *Plant Pathol.* 63(2): 243-254.
23. Latorre, B. 2018. Compendio de las enfermedades de las plantas. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.
24. Lemus, G., A. France, P. Millas, M.F. Beltrán, B. Sagredo, V. Osorio, J. Otárola, F. Correa y J.M. Donoso. 2020. Cáncer bacterial del cerezo: epidemiología de la enfermedad y estrategias de control. Boletín INIA N°420. INIA Rayentué. Rengo, Chile.
25. López-Vázquez, J.J., A. Valdez-Balero, H.V. Silva-Rojas, C. Flores-Revilla y C.A. Rangel-Ortega. 2016. Evaluación de tres métodos de inoculación de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, en caña de azúcar (*Saccharum* spp.). *Agroproductividad* 9(7): 62-67.
26. Margesin, R. and V. Miteva. 2010. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Res. Microbiol.* 162(3): 346-361.
27. McManus, P.S., V.O. Stockwell, G.W. Sundin and A.L. Jones. 2002. Antibiotic use in plant agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 443-465.
28. Mella, S., M. Sepúlveda, G. González, H. Bello, M. Domínguez, R. Zemelman y C. Ramírez. 2004. Aminoglucósidos-aminociclitolos: características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Rev. Chil. Infectol.* 21(4): 330-338.
29. Morales, G., C. Moragrega, E. Montesinos and I. Llorente. 2018. Effects of leaf wetness duration and temperature on infection of *Prunus* by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *PLoS One* 13(3): <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193813> [en línea].
30. Moya-Elizondo, E., P. Auil, P. Oyarzúa y M. Gerding. 2018. Resistencia al ión cobre de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* en nucedales de la Región del Biobío. *Chilean J. Agric. Anim. Sci.* 34(1): 3-11.
31. Ninot, A., N. Aletà, C. Moragrega and E. Montesinos. 2002. Evaluation of a reduced copper spraying program to control bacterial blight of walnut. *Plant Dis.* 86(6): 583-587.
32. Palomino, J. y J. Pachón. 2003. Aminoglucósidos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clín.* 21(2): 105-115.

33. Parnikoza, I.Y., D.N. Maidanuk and I.A. Kozeretska. 2007. Are *Deschampsia antarctica* desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. Migratory relicts? Cytol. Genet. 41(4): 226-229.
34. Pietrarelli, L., G.M. Balestra and L. Varvaro. 2006. Effects of simulated rain on *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* populations on tomato plants. J. Plant Pathol. 88(3): 245-251.
35. Reyes, J.C. 2018. Identificación de rizobacterias psicrotolerantes asociadas a *Colobanthus quitensis* y *Deschampsia antártica* con actividad promotora de crecimiento vegetal. Memoria de título, Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía. Chillán, Chile.
36. Sánchez, L.A., F.F. Gómez and O.D. Delgado. 2009. Cold-adapted microorganisms as a source of new antimicrobials. Extremophiles 13(1): 111-120.
37. Sandoval, C. 2004. Manual técnico: Manejo integrado de enfermedades en cultivos hidropónicos. Universidad de Talca. Talca, Chile.
38. Scheck, H.J. and J.W. Pscheidt. 1998. Effect of copper bactericides on copper-resistant and sensitive strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Plant Dis. 82(4): 397-406.
39. Soto, S. 2017. Fitopatología - Enfermedades frutales: Psa en kiwi. Ficha Técnica N°36. INIA La Platina. Santiago, Chile.
40. Vera, C.A., R.P. Madariaga, M. Gerding, B. Ruiz and E.A. Moya-Elizondo. 2019. Integration between *Pseudomonas protegens* strains and fluquiconazole for the control of take-all in wheat. Crop Prot. 121: 163-172.
41. Weller, D.M., B.B. Landa, O.V. Mavrodi, K.L. Schroeder, L. de la Fuente, S. Blouin, R. Allende, R.F. Bonsall, D.V. Mavrodi and L.S. Thomashow. 2007. Role of 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. Plant Biol. 9(1): 4-20.
42. Willey, J.M., L.M. Sherwood and C.J. Woolverton. 2011. Prescott's microbiology. (8th. ed.). McGraw-Hill. New York, USA.

## ANEXOS

Anexo 1. Aislados bacterianos extraídos desde rizósfera de muestras de *Deschampsia antarctica* y *Colobanthus quitensis* con su lugar de muestreo.

Cepa	Origen	Hospedero	Sitio de muestreo	Especie
AG-143	Exorizosfera	<i>D. antarctica</i>	Coppermine	<i>Pseudomonas</i> sp.
AG-144	Endorizosfera	<i>C. quitensis</i>	Arctowski	<i>Pseudomonas</i> sp.
AG-145	Exorizosfera	<i>D. antarctica</i>	Coppermine	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>
AG-146	Endorizosfera	<i>D. antarctica</i>	Coppermine	<i>Pseudomonas</i> sp.
AG-147	Exorizosfera	<i>C. quitensis</i>	Arctowski	<i>Zooglea</i> sp.
AG-148	Exorizosfera	<i>D. antarctica</i>	Arctowski	<i>Pseudomonas graminis</i>
AG-149	Exorizosfera	<i>D. antarctica</i>	Coppermine	<i>Janthinobacterium</i> sp
AG-150	Exorizosfera	<i>D. antarctica</i>	Coppermine	<i>Duganella</i> sp.
AG-151	Exorizosfera	<i>C. quitensis</i>	Arctowski	<i>Pseudomonas</i> sp.
AG-152	Endorizosfera	<i>D. antarctica</i>	Arctowski	<i>Pedobacter cryoconitis</i>
AG-153	Endorizosfera	<i>D. antarctica</i>	Coppermine	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>
AG-154	Endorizosfera	<i>D. antarctica</i>	Coppermine	<i>Janthinobacterium</i> sp.
AG-155	Endorizosfera	<i>C. quitensis</i>	Arctowski	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>
AG-156	Exorizosfera	<i>D. antarctica</i>	Coppermine	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>
AG-157 <sup>A</sup>	Exorizosfera	<i>D. antarctica</i>	Arctowski	<i>Pedobacter cryoconitis</i>
AG-157 <sup>B</sup>	Exorizosfera	<i>D. antarctica</i>	Arctowski	<i>Pedobacter cryoconitis</i>
AG-158	Exorizosfera	<i>D. antarctica</i>	Arctowski	<i>Pseudomonas antarctica</i>
AG-159	Endorizosfera	<i>D. antarctica</i>	Arctowski	<i>Pseudomonas antarctica</i>
AG-160	Exorizosfera	<i>C. quitensis</i>	Arctowski	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>
AG-161	Endorizosfera	<i>D. antarctica</i>	Arctowski	<i>Pseudomonas graminis</i>
AG-162	Endorizosfera	<i>C. quitensis</i>	Arctowski	<i>Flavobacterium</i> sp.
AG-163	Exorizosfera	<i>C. quitensis</i>	Arctowski	<i>Pseudomonas</i> sp.
AG-164	Endorizosfera	<i>D. antarctica</i>	Arctowski	<i>Pedobacter cryoconitis</i>
AG-165	Exorizosfera	<i>D. antarctica</i>	Coppermine	<i>Pseudomonas</i> sp.
AG-167	Endorizosfera	<i>D. antarctica</i>	Coppermine	<i>Pseudomonas</i> sp.

## Anexo 2. Objetivo de los ciclos térmicos.

Los ciclos térmicos fueron creados bajo la suposición de que temperaturas bajas podrían favorecer a las bacterias psicotolerantes y temperaturas medias-altas favorecen a las bacterias fitopatógenas. El objetivo fue evaluar la capacidad biocontroladora de las cepas psicotolerantes, bajo estas suposiciones y determinar una condición favorable para la generación de halos de inhibición.

Ciclos térmicos	Objetivo de los ciclos térmicos
25-8-25	El objetivo de este ciclo térmico es otorgar una temperatura inicial de 25 °C, en la cual se observó un escaso crecimiento de las rizobacterias, pero un crecimiento normal de las bacterias patógenas (resultado de la preselección de bacterias psicotolerantes), además de producir un quiebre de temperatura baja con 8 °C, para así observar si esta condición era capaz de estimular el crecimiento de las bacterias psicotolerantes desfavoreciendo las patógenas. En total se otorgaron cuatro ciclos de 8 h a 25 °C y cuatro ciclos de 8 h a 8 °C.
15-25-8	El objetivo de este ciclo térmico es otorgar una temperatura inicial de 15 °C, la cual se encuentra dentro del rango de crecimiento de las bacterias psicotolerantes (Willey <i>et al.</i> , 2011) y también representa una temperatura media dentro de los rangos usados., posteriormente se dio una condición térmica de 25 °C para estimular el crecimiento de las bacterias patógenas (primeras 16 h de temperatura ascendente) y luego se bajó la temperatura a 8 °C. En total se otorgaron tres ciclos de 8 h a 15 °C, tres ciclos de 8 h a 25 °C y dos ciclos de 8 h a 8 °C.
8-15-25	El objetivo de este ciclo térmico es otorgar una temperatura inicial baja de 8 °C, luego una temperatura media de 15 °C y posteriormente una temperatura de 25 °C (primeras 24 h de temperatura ascendente), suponiendo que las temperaturas bajas estimulan a las bacterias psicotolerantes, dándoles una ventaja inicial, subiendo la temperatura gradualmente hasta dar una condición óptima para las bacterias patógenas. En total se otorgaron tres ciclos de 8 h a 8 °C, tres ciclos de 8 h a 15 °C y dos ciclos de 8 h a 25 °C.

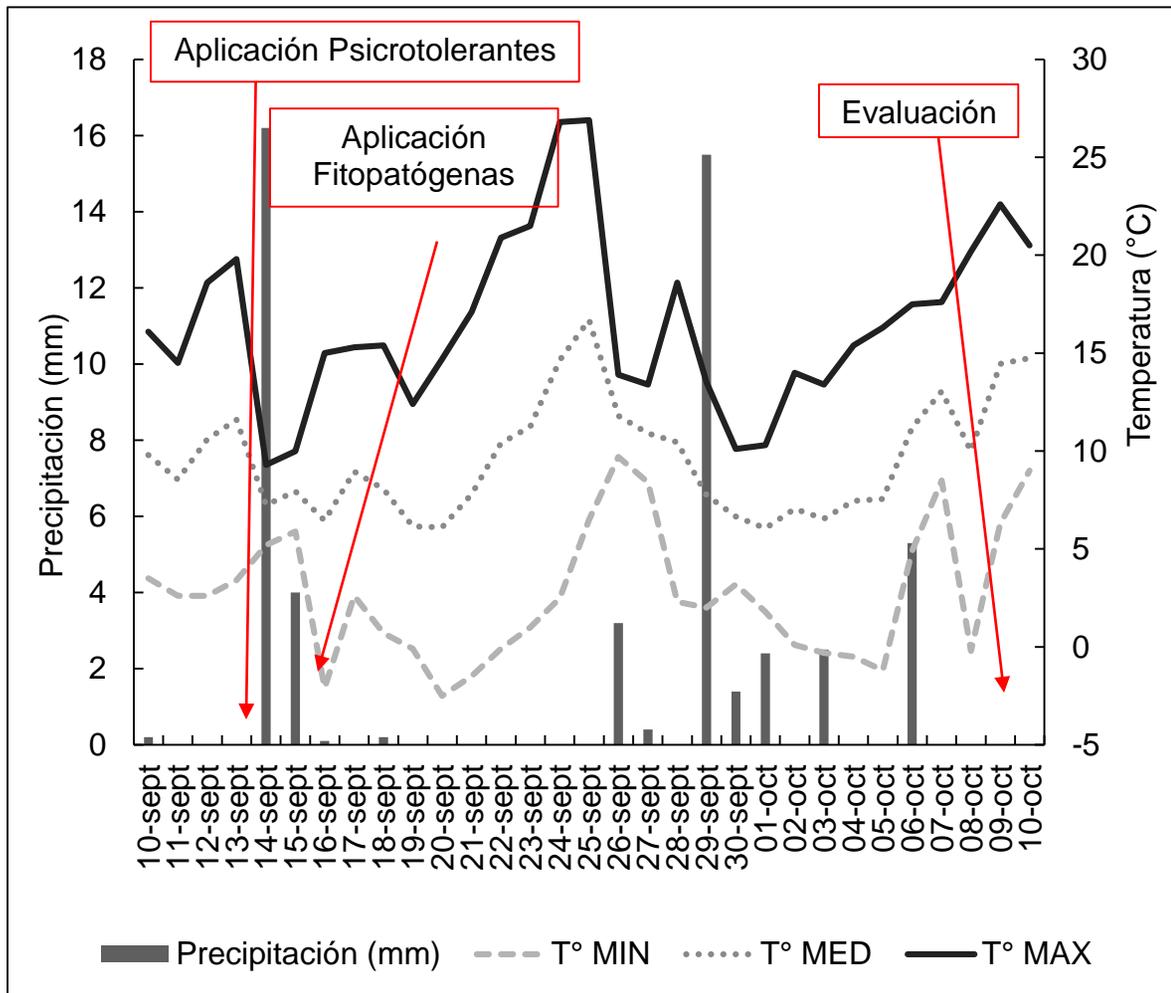
Anexo 2 (cont.). Objetivo de los ciclos térmicos.

Ciclos térmicos	Objetivo de los ciclos térmicos
8	El objetivo de este ciclo térmico es otorgar una temperatura ininterrumpida de 8 °C por 64 h, utilizándolo, así como testigo de la influencia constante de temperaturas bajas.
15	El objetivo de este ciclo térmico es otorgar una temperatura ininterrumpida de 15 °C por 64 h, con el fin de observar el comportamiento de bacterias psicrotolerantes y fitopatógenas bajo este régimen térmico.

Anexo 3. Escala de daño modificada de López *et al.* (2016).

Grado	Reacción	Descripción
1	Resistente (R)	Sin síntomas visibles
2	Moderadamente resistente (MR)	Halos cloróticos o necróticos en lámina foliar, 1 % hasta 5 %
3	Moderadamente susceptible (MS)	Halos cloróticos o necróticos y/o necrosis borde foliar de 6 % hasta un 15 % del tejido
4	Susceptible (S)	Entre un 16 a 30 % del área foliar necrosada
5	Altamente susceptible (AS)	Más de un 31 % del área foliar necrosada

Anexo 4. Temperaturas y precipitaciones durante el estudio en campo.



Anexo 5. Crecimiento ramificado de cepa AG-151, sobre *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* en ciclo térmico "15-25-8".



Anexo 6. Clorosis de la lámina foliar por infección de *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*.



Anexo 7. Necrosamiento de los márgenes de la lámina foliar por infección de *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*.

