

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**EFFECTO BIOCONTROLADOR DE FORMULADOS DE *PSEUDOMONAS  
PROTEGENS* PARA EL CONTROL DE CANCRO BACTERIANO  
(*PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ACTINIDIAE*) EN KIWI (*ACTINIDIA  
DELICIOSA*)**

**POR**

**VERÓNICA FERNANDA RETAMAL RODRÍGUEZ**

**MEMORIA PRESENTADA A LA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA  
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERA AGRÓNOMA.**

**CONCEPCIÓN-CHILE  
2023**

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EFFECTO BIOCONTROLADOR DE FORMULADOS DE *PSEUDOMONAS  
PROTEGENS* PARA EL CONTROL DE CANCRO BACTERIANO  
(*PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ACTINIDIAE*) EN KIWI (*ACTINIDIA  
DELICIOSA*)**

**POR**

**VERÓNICA FERNANDA RETAMAL RODRÍGUEZ**

**MEMORIA PRESENTADA A LA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA  
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERA AGRÓNOMA.**

**CONCEPCIÓN-CHILE  
2023**

Aprobada por:

Profesor Asociado, Ernesto Moya E.  
Ing. Agrónomo, Ph.D.

---

Guía

Profesor Asociado, Arturo Calderón O.  
Ing. Agrónomo, Ph.D.

---

Asesor

Profesora Asociada, Macarena Gerding G.  
Ing. Agrónoma, Ph. D.

---

Asesor

Profesor Asociado, Guillermo Wells M.  
Ing. Agrónomo, Mg. Cs.

---

Decano

**TABLA DE CONTENIDOS**

	<b>Página</b>
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción .....	2
Materiales y Métodos.....	5
Resultados y Discusión.....	10
Conclusiones.....	20
Referencias.....	21
Anexos.....	25

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

		<b>Página</b>
Tabla 1	Tratamientos usados en la evaluación inducción de resistencia en plantas de kiwi en maceta.....	7
Tabla 2	Área de inhibición (mm <sup>2</sup> ) evaluada 48 horas posterior a la inoculación del ensayo <i>in vitro</i> de los tratamientos sobre un césped de bacterias <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> y <i>Pseudomonas viridiflava</i> para dos experimentos (E1 y E2).....	11
Tabla 3	Promedios de parámetros fisiológicos medidos en plantas de kiwi cv. Hayward en huerto comercial ubicado en Dadinco.....	19
Tabla 4	Análisis de correlación de los parámetros fisiológicos medidos en plantas de kiwi cv. Hayward en huerto comercial ubicado en Dadinco.....	20
Figura 1	Área de inhibición (mm <sup>2</sup> ) evaluada 48 horas posterior a la inoculación del ensayo <i>in vitro</i> de los tratamientos sobre un césped de bacterias <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> sembrado en placas Petri con APD para dos experimentos (E1 y E2).....	11
Figura 2	Severidad de la bacteriosis del kiwi determinada mediante el cálculo del área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) de cuatro mediciones del número de manchas necróticas realizadas cada 7 días después de la inoculación de Psa en plantas de kiwi de 8 hojas bajo condiciones ambientales controladas.....	15
Figura 3	Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) para la severidad de la bacteriosis del kiwi observado en un huerto comercial de kiwi 'Hayward' durante la temporada de crecimiento del año 2019 en Dadinco, San Nicolás, región del Ñuble. El cálculo de la severidad se realizó con cinco evaluaciones realizadas en diferentes fechas.....	17

Figura 4	Porcentaje de incidencia de manchas necróticas en plantas de kiwi 'Hayward' por el complejo bacteriano asociado a la bacteriosis del presente en el huerto comercial localizado en Dadinco, San Nicolás, región del Nuble, durante la temporada de crecimiento del año 2019.....	17
----------	--	----

**EFFECTO BIOCONTROLADOR DE FORMULADOS DE *PSEUDOMONAS PROTEGENS* PARA EL CONTROL DE CANCRO BACTERIANO (*PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ACTINIDIAE*) EN KIWI (*ACTINIDIA DELICIOSA* (A. CHEV.) C. F. LIANG & A. R. FERGUSON).**

BIOCONTROL EFFECT OF *PSEUDOMONAS PROTEGENS* FOR THE CONTROL OF BACTERIAL CANCER (*PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ACTINIDIAE*) IN KIWI PLANTS (*ACTINIDIA DELICIOSA* (A. CHEV.) C. F. LIANG & A. R. FERGUSON).

**RESUMEN**

*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) biovar 3 es el agente causal más virulento de la bacteriosis del kiwi, llegando a ocasionar la muerte de la planta. Además, Psa, junto con *P. syringae* pv. *syringae* (Pss) y *P. viridiflava* (Pv) forman un consorcio bacteriano que afecta la floración en los huertos de kiwi. Existen variadas restricciones sobre los productos disponibles para el control de esta bacteriosis, por lo que el uso de microorganismos antagonistas es una importante herramienta para el manejo integrado. *Pseudomonas protegens* (Pp) es una especie bacteriana de la rizósfera reconocidas por la producción de compuestos como 2,4-diacetilfloroglucinol y la capacidad de inducir genes de resistencia. Se evaluaron cepas puras Ca2 y ChC7 de Pp y formulaciones en polvo y aceite de cada una para el control *in vitro* de Psa, Pss y Pv; inducción de resistencia de estos bioproductos y la combinación de Nacillus® con las cepas Ca2 y ChC7 en plantas de maceta bajo condiciones controladas y su efecto biocontrolador en condiciones de campo. Sólo las formulaciones en polvo lograron inhibir a Psa, Pss y Pv *in vitro*. Los formulados y la combinación de cepas con Nacillus®, lograron disminuir la severidad en plantas de kiwi bajo condiciones controladas, desde un 48 % a 88 %. En campo los formulados redujeron entre un 48 y 50% la severidad de la enfermedad y la combinación de Nacillus® con cepas Pp, lo hizo en un 72 %.

**Palabras índice adicionales: biocontrol, formulaciones, incidencia, inducción de resistencia, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.**

## ABSTRACT

*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) biovar 3 is the most virulent causative agent of kiwifruit bacteriosis causing the death of the plant. Furthermore, Psa, together with *P. syringae* pv. *syringae* (Pss) and *P. viridiflava* (Pv) form a bacterial consortium that affects kiwifruit flowers in orchards. There are various restrictions on the products available to control this bacterial disease, then the use of antagonistic microorganisms is an important tool in integrated management programs. *Pseudomonas protegens* (Pp) are rhizobacteria recognized to produce compounds such as 2,4-diacetylphloroglucinol and the ability to induce resistance genes. Pure strains Ca2 and ChC7 of Pp and powder and oil formulations of each were evaluated for *in vitro* control of Psa, Pss and Pv; resistance induction of these bioproducts and the combination of Nacillus® with the Ca2 and ChC7 strains in pot plants under controlled conditions and its biocontrol effect under field conditions. Only the powder formulations were able to inhibit Psa, Pss and Pv *in vitro*. The formulations and the combination of strains with Nacillus® managed to reduce the severity in kiwi plants under controlled conditions, from 48 % to 88 %. In the field, the formulations reduced disease severity between 48 and 50% and the combination of Nacillus® with Pp strains reduced the disease in 72 %.

## INTRODUCCION

El kiwi (*Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C. F. Liang & A. R. Ferguson) es una liana originaria del Extremo Oriente, actualmente distribuida a nivel mundial. Chile está situado como el sexto mayor productor y tercer exportador a nivel mundial de este fruto (FAO, 2020), registrando una superficie nacional de 6.973 hectáreas desde la región de Valparaíso hasta la región de Los Ríos, con la mayor área plantada ubicada en las regiones del Maule y O'Higgins (CIREN, 2021).

*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), agente causal del cancro bacteriano del kiwi, fue reportada en huertos de kiwi de la región del Maule el año 2011 (EPPO, 2011). Se han determinado 3.489 ha positivas a Psa, con el 69 % de ellas concentradas en la región del Maule (SAG, 2020), presuntamente del biovar 3 que ha sido el único identificado en Chile (Flores *et al.*, 2018) y causante de las mayores pérdidas económicas

en muchos países por su conocida agresividad y patogenicidad en otras especies de *Actinidia* (Ferrante *et al.*, 2009; Everett *et al.*, 2011; Vanneste, 2013; Vanneste *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2014). Tras su detección en Chile, se declaró el estado de plaga cuarentenaria bajo el control oficial del SAG desde el año 2011 hasta fines de mayo del 2020 (BCN, 2020). Psa causa manchas necróticas en las hojas rodeadas por un halo clorótico, atizonamiento de las yemas o flores, cancros en los órganos leñosos de la planta, exudado bacteriano y decaimiento de algunos órganos e incluso la muerte de la planta debido al daño a nivel vascular y sistémico. Esta bacteria puede sobrevivir como epífita sobre la planta sin producir síntomas (Vanneste *et al.*, 2011) hasta alcanzar un umbral de población que permite su ingreso vía apoplasto por aberturas naturales o heridas causadas por prácticas agrícolas, logrando colonizar sistémicamente al huésped (Donati *et al.*, 2020). Los patógenos *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss), agente causal de la necrosis de los brotes florales en kiwi; y *Pseudomonas viridiflava* (Pv) causante del tizón bacteriano del kiwi; manifiestan síntomas similares a Psa en plantas de kiwi y actúan como un consorcio de microorganismos en huertos infectados con el cancro bacteriano (Young *et al.*, 1988; Balestra y Varvaro, 1997; Balestra *et al.*, 2009; Vanneste *et al.*, 2011; Purahong *et al.*, 2018).

Los productos disponibles para el control de bacterias fitopatógenas se dividen en metales pesados, antibióticos, elicitores y productos biológicos, donde los primeros tres poseen importantes restricciones en favor de la protección del consumidor, las plantas y el medioambiente. Los más utilizados a nivel mundial para el control de la bacteriosis del kiwi son los compuestos cúpricos y antibióticos, pero el uso inadecuado puede causar fitotoxicidad, seleccionar resistencia a estos compuestos por Psa y/o persistir como residuo en frutas (Vanneste *et al.*, 2003; Cameron y Sarojini, 2014). Los elicitores químicos pueden afectar el rendimiento y calidad de la fruta por lo que tienen un límite de cuatro aplicaciones por temporada y no están autorizadas las aplicaciones posteriores al periodo de floración del kiwi (Reglinski *et al.*, 2013).

El mercado chileno cuenta con un limitado número de productos biológicos disponibles para el control de Psa, estos son en base a microorganismos pertenecientes a especies del género *Brevibacillus* y *Bacillus* (Nacillus®, Bio Insumos Nativa Spa., y

Serenade® ASO, Bayer) (SAG, 2019). En este contexto, es de gran relevancia aumentar la diversidad de bioproductos que permita el control de esta enfermedad.

*Pseudomonas* es uno de los géneros bacterianos más ampliamente distribuido en el mundo y que ha sido aislado desde diversos nichos ecológicos. Dentro de este género, las especies que se encuentran asociadas a las plantas pueden ser tanto benéficas como patogénicas (Höfte y De Vos, 2006). Las especies *P. fluorescens* y *P. protegens* han sido material de diversos estudios debido a sus cualidades biocontroladoras frente a fitopatógenos, vinculada a diferentes mecanismos de control (Nowak-Thompson *et al.*, 1994; Lavicoli *et al.*, 2003) como la competencia por nutrientes y nichos, la inducción de resistencia sistémica en plantas y la producción de metabolitos secundarios de naturaleza antibiótica. Estos últimos tienen una actividad antagónica asociada a la producción de compuestos como: 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG), pioluterina, pirrolnitrina y derivados de fenazina (Thomashow y Weller, 1996; Ramette *et al.*, 2011; Yang y Cao, 2011). Un estudio en Nueva Zelanda demostró que bacterias endófitas del género *Pseudomonas* encontradas en arbustos de *Leptospermum scoparium*, presentan la capacidad de colonización endófitas en las plantas de kiwi y producen compuestos antimicrobianos que reducen la colonización y gravedad de Psa (Wicaksono *et al.*, 2018).

En cepas de *Pseudomonas protegens* (Pp) aisladas desde la rizosfera de trigo en suelos ubicados en el sur de Chile, fueron detectados los genes *phlD*, *pyr* y *pil*, asociados a la producción de los compuestos antibióticos (Moya-Elizondo *et al.*, 2013). La evaluación de las cepas bacterianas contra Psa, en condiciones *in vitro* y sobre plantas de kiwi enfermas, demostró una acción antagonista y de inducción de resistencia sistémica adquirida en las plantas tratadas (Moya-Elizondo *et al.*, 2019; Moya-Elizondo, 2020). El potencial de inhibición de las cepas bacterianas Ca2 y ChC7 de Pp, con genes asociados a la producción de 2,4-DAPG y pioluterina, sobre Psa plantean el desafío de producir un producto formulado para el control biológico de la bacteriosis del kiwi.

El objetivo de la presente investigación fue determinar la efectividad *in vitro* de las cepas Ca2 y ChC7 de Pp sobre bacterias que atacan el kiwi (Psa, Pv y Pss). Además, evaluar el biocontrol de formulaciones elaboradas a partir de estas cepas para el control de Psa, al igual que la efectividad de la mezcla de estas cepas con un bioproducto

comercial bacteriano en condiciones de plantas de maceta en ambiente controlado y en terreno.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Presentación de formulados y verificación del gen que codifica 2,4-diacetilfloroglucinol**

La formulación de los productos fue elaborada por la empresa de Bio Insumos Nativa Spa. a partir de dos aislados bacterianos de Pp, pertenecientes a la colección del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción, almacenados en el Banco de Recursos Genéticos Microbianos del Instituto de Investigaciones Agropecuarias en Chillán. Por cada cepa bacteriana, se crearon formulaciones en aceite (OIL) y en polvo (WP). Estas fueron etiquetadas con el código RGM 2328 para el aislado ChC7 y RGM 2329 para el aislado Ca2.

La presencia de los aislados bacterianos ChC7 y Ca2 de Pp fue verificada en los cuatro productos entregados, utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinar la presencia del gen *phlD* (Vera *et al.*, 2019).

### **Origen y multiplicación de las bacterias**

Para todos los ensayos se utilizó la cepa 105743 del biovar 3 de Psa proporcionada por el SAG, aislada desde plantas de kiwi verde en la localidad de Linares, Región del Maule. La bacteria Pss cepa PS3 fue obtenida el año 2013 desde un huerto cerezos ubicado en la localidad de Pueblo Seco, Región del Ñuble. La bacteria Pv, aislada el año 2018 desde plantas de avellano europeo en la localidad de Pinto, Región del Ñuble. Por su parte, las cepas ChC7 y Ca2 de Pp, fueron aisladas desde raíces de trigo obtenidas de un predio en Chillán, región del Ñuble, y de Cajón, en la región de La Araucanía, respectivamente. La identificación de todas las bacterias utilizadas fue corroborada mediante técnicas moleculares.

Para la multiplicación de las cepas ChC7 y Ca2 de Pp, se añadió 100  $\mu$ L de cada bacteria en 5 mL de caldo King B (KB), posteriormente fueron incubadas durante 48 h dentro de un agitador orbital a 24°C y 150 rpm. Las bacterias Psa, Pss y Pv fueron

multiplicadas añadiendo 200  $\mu\text{L}$  de bacteria en 5 mL de caldo KB, usando el mismo protocolo de incubación de Pp.

### **Pruebas de antagonismo *in vitro***

Se realizaron pruebas de antagonismo de las formulaciones WP y OIL de Pp frente a cada bacteria fitopatógena (Psa, Pss y Pv) *in vitro*. La dilución del formulado en polvo se preparó a razón 1:10, agregando 1 g en 9 mL de agua destilada estéril (ADE) dentro de un tubo centrífuga de 50 mL. Para los tratamientos de aceite, se añadió 1 mL del formulado junto con 3 gotas del surfactante Tween 20®, en 9 mL de agua destilada estéril.

En dos diferentes placas Petri con medio agar KB se distribuyeron los ocho tratamientos, con tres repeticiones por placa. El tratamiento blanco o control negativo fue ADE, tres controles positivos, conformados por estreptomicina y los cultivos puros de las cepas Ca2 y ChC7 de Pp, y la dilución de los dos formulados (WP y OIL) por cada cepa Pp. En las placas se agregó un césped de 500  $\mu\text{L}$  de bacteria fitopatógena, luego cada tratamiento fue sembrado en gotas de 5  $\mu\text{L}$  de manera equidistante. El ensayo fue realizado dos veces.

Para evaluar la actividad antagonista entre las formulaciones y las bacterias Psa, Pss y Pv, se fotografiaron las placas luego de 48 horas de incubación. Posteriormente, se midió el área del halo de inhibición ( $\text{mm}^2$ ) formada alrededor de las microgotas, utilizando el software de procesamiento de imagen digital ImageJ versión 1.52a, desarrollado por National Institutes of Health, Estados Unidos. En las mediciones se consideró toda la zona que indicara un efecto antagonista, es decir, áreas con tonos opacos o lípidos.

### **Manejo de plantas de kiwi para evaluaciones bajo condiciones controladas**

Para el establecimiento de experimentos bajo condiciones controladas se utilizaron plantas de kiwi (*A. deliciosa*), obtenidas de semillas de frutos del cv. Hayward, de 4 hojas no cotiledonares, sobre macetas con mezcla 2:1 de turba con vermiculita, que contenía 4 g  $\text{L}^{-1}$  de fertilizante de liberación controlada (Multicote 8M 11-31-5, Anasac). La frecuencia de riego fue de dos veces por semana, incluyendo fertirriego en una de estas, utilizando un fertilizante de crecimiento (Green Grow 5-3-5, Quemanta) a una dosis de 2 g  $\text{L}^{-1}$ . Las plantas se mantuvieron en una sala bajo un ambiente controlado a temperaturas promedio de 21,1°C, fotoperiodo de 16 h luz suministradas por luces LED mediante

longitudes de onda azul, blanco y rojo, 8 h de oscuridad y una humedad relativa promedio de 87,1 %.

Para la preparación del inóculo se centrifugó caldo de cultivo de Psa ( $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>) a 5000 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante compuesto por medio KB, para adicionar el mismo volumen de ADE y 3 gotas del surfactante Tween 20®.

### **Evaluación de eficacia de los formulados en base a *Pseudomonas protegens* en plantas de kiwi en maceta**

En la Tabla 1 se describen los tratamientos utilizados en la evaluación la capacidad de inducción de resistencia de los formulados WP y OIL sobre plantas de kiwi en maceta. Cada experimento fue realizado en un diseño en bloques completamente al azar con cinco repeticiones por cada tratamiento. Para ambos se utilizó como control químico acibenzolar-S-metil (50 % p/p) (Bion ® 50 WG, Syngenta) que actúa como inductor de mecanismo de defensa natural de las plantas y como control negativo ADE. Además, se incluyó el producto biológico comercial de especies de *Bacillus* y *Brevibacillus* (Nacillus®, Bio Insumos Nativa spa) y su combinación con las cepas de Pp. Todos los tratamientos fueron aplicados por aspersion (5 mL) sobre el follaje siete días antes de inocular la bacteria Psa en todas las plantas tratadas.

Tabla 1. Tratamientos usados en la evaluación inducción de resistencia en plantas de kiwi en maceta.

<b>Tratamiento</b>	<b>Concentración</b>
Agua destilada estéril	-
Acibenzolar-S-metilo (Bion ® 50 WG)	0,2 mg mL <sup>-1</sup> ADE
<i>Pseudomonas protegens</i> Ca2	10 <sup>9</sup> UFC mL <sup>-1</sup>
<i>Pseudomonas protegens</i> ChC7	10 <sup>8</sup> UFC mL <sup>-1</sup>
WP RGM 2328	2 mg mL <sup>-1</sup> ADE
WP RGM 2329	2 mg mL <sup>-1</sup> ADE
OIL RGM 2328	2 µL mL <sup>-1</sup> ADE
OIL RGM 2329	2 µL mL <sup>-1</sup> ADE
Nacillus ®	2 mg mL <sup>-1</sup> ADE
Nacillus ® + cepa Ca2 y ChC7	2 mg mL <sup>-1</sup> ADE; 10 <sup>9</sup> UFC mL <sup>-1</sup> ; 10 <sup>8</sup> UFC mL <sup>-1</sup>

La severidad de los síntomas ocasionados por Psa fueron evaluados partir de la expresión de manchas necróticas sobre las hojas una semana después de la inoculación de la bacteria patógena y cada 7 días durante tres semanas.

### **Evaluación en campo de eficacia de formulados en base a *Pseudomonas protegens*.**

El ensayo en campo se realizó en un huerto comercial de kiwi cv. Hayward positivo a Psa, con sistema de conducción en parronal, perteneciente a la empresa CarSol Fruit, ubicado en la localidad de Dadinco, comuna de San Nicolás (36°32'45.8" S y 72°11'18.4" O), región de Ñuble, durante la temporada invierno/primavera 2019.

El diseño experimental se constituyó en bloques completamente al azar con cuatro repeticiones separadas en hileras. En cada repetición se distribuyeron diez tratamientos que se describen en la Tabla 1, pero sin la posterior inoculación de Psa. El ensayo comenzó a mediados del mes de octubre (BBCH 51) y finalizó a inicio de febrero (BBCH 77) (Salinero *et al.*, 2009). Durante este intervalo de tiempo se llevaron a cabo cinco aplicaciones de los tratamientos los días 14 y 28 de octubre, 13 de noviembre, 4 de diciembre y 30 de enero, en los estados BBCH 51, BBCH 55, BBCH 60, BBCH 63 y BBCH 73 respectivamente.

Las evaluaciones en hojas se realizaron cada 7 días previo a la tercera aplicación de los tratamientos. Se muestreó hojas cinco veces en la temporada, los días 28 de octubre, 13 de noviembre, 26 de noviembre, 12 de diciembre de 2019 y 11 de febrero de 2020.

### **Evaluación de la enfermedad**

Para evaluar el daño causado por el complejo bacteriano asociado a la bacteriosis del kiwi, se determinó la incidencia y severidad de síntomas foliares en los experimentos realizados bajo condiciones de ambiente controlado y en condiciones de campo. La incidencia de la enfermedad fue obtenida calculando el porcentaje del número de hojas con síntomas de necrosis y/o clorosis foliar, característicos de la enfermedad, respecto al total de hojas evaluadas. La severidad se determinó mediante el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC), el cual es un índice que recopila el daño acumulado durante todas las evaluaciones realizadas sobre la planta (Jeger *et al.*, 2001; Madden *et al.*, 2007). La AUDPC se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$AUDPC = \sum_{j=1}^{n_j-1} \left( \frac{y_j + y_{j+1}}{2} \right) (t_{j+1} - t_j)$$

Donde: y= número de manchas necróticas; t=tiempo en días; j= índice de orden para los tiempos.

Durante las evaluaciones de manchas necróticas realizadas en las etapas de floración y maduración del fruto, se midieron los siguientes parámetros: potencial hídrico de la hoja (bomba Scholander, PMS 615, PMS Instruments), conductancia estomática (porómetro, SC-1, Decagon Instruments), fluorescencia de la clorofila (fluorómetro, Pocket PEA, Hansatech Instruments), índice de área foliar y densidad de flujo de fotones fotosintéticos por sobre y bajo el dosel de la planta (ceptómetro, LP-80, Decagon Instruments) para determinar el efecto de la enfermedad presentado al momento del registro de datos sobre la actividad fisiológica de las plantas.

Adicionalmente, se evaluó la incidencia de botones necrosados y aborto floral para cada tratamiento. La evaluación de botones necrosados se realizó el 28 de octubre de 2019 (BBCH 55) en el árbol central de cada parcela experimental donde se seleccionaron 100 botones florales en forma aleatoria y considerando 25 de estos por cada cuadrante de la planta, para cuantificar la cantidad de aquellos que se presentan necrosis y obtener el porcentaje de botones necrosados por planta. Para la evaluación del aborto floral realizada el 13 de noviembre de 2019, durante etapa de floración (BBCH 60) se seleccionaron flores aleatoriamente desde el árbol central de cada repetición y fueron marcadas para determinar el porcentaje de aborto floral en base a el número de frutos que lograron formarse en el periodo de cuaja (BBCH 69) evaluadas el 19 diciembre de 2019.

### **Análisis estadístico**

Los datos de área de inhibición de los ensayos *in vitro* medidos 48 horas luego de la siembra y el análisis de datos de AUDPC de los tratamientos en maceta y de terreno fueron sometidos al análisis de normalidad y de homogeneidad de varianza mediante la prueba de Shapiro-Wilk y de Levene, respectivamente. De cumplirse los supuestos se sometieron los datos a un análisis de varianza (ANDEVA); en caso contrario, se utilizó la

prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los datos de severidad expresado como AUDPC fueron transformados al  $\text{Log}_{10} n + 1$ , mientras los porcentajes de incidencia, botón necrótico y cuaja fueron transformados al  $\sqrt{n + 0,5}$ , previo al ANDEVA. De existir diferencias entre tratamientos la comparación de medias se realizó con la prueba LSD Fisher para datos paramétricos, y con el test de pares para los datos no paramétricos, considerando un 95 % de confianza ( $P < 0,05$ ). Los parámetros fisiológicos fueron estudiados mediante un análisis de correlación y ANDEVA. Los análisis se realizaron con el software estadístico Infostat versión estudiante 2020, de la Universidad de Córdoba, Argentina (Balzarini *et al.*, 2019), mientras que los análisis realizados en los parámetros fisiológicos, se utilizó el software estadístico SAS 9.4 (SAS Studio, University Edition, SAS Institute, NC, EE. UU.).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

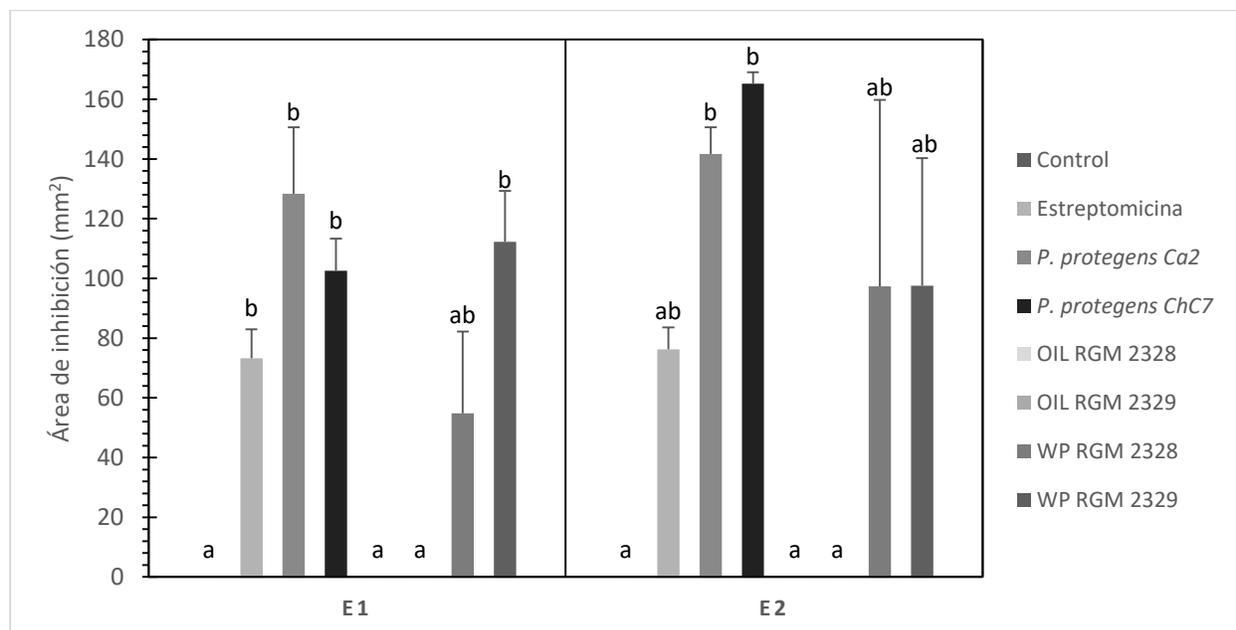
### Pruebas de antagonismo *in vitro*

La Figura 1 y Tabla 2 muestran el área de inhibición que alcanzó cada tratamiento bajo condiciones *in vitro* sobre las bacterias Psa, Pss y Pv. En las pruebas realizadas sobre el patógeno Psa (Figura 1) no se observó la formación de halos de inhibición por parte de las dos formulaciones de aceite. Los formulados en polvo presentaron un efecto antagonista frente a Psa después de 48 h. Si bien estos no mostraron diferencias significativas con las bacterias puras y la estreptomycinina, tampoco fueron diferentes del control ADE, a excepción de WP RGM 2329, que en el primer experimento generó un mayor halo de inhibición, similar al obtenido por las cepas puras de ChC7 y Ca2.

Las cepas ChC7 y Ca2 fueron eficaces en el control de Pss (Tabla 2) durante el primer experimento, mientras que las formulaciones no presentaron halos de inhibición. En la repetición del ensayo, se observaron altos valores de antagonismo sólo en los formulados en polvo luego de 48 h, además el tratamiento WP RGM 2328 permitió observar una masa mucilaginoso similar a una biopelícula sobre el área de la inhibición. En ambos experimentos realizados sobre la bacteria Pv (Tabla 2), las cepas puras de ChC7 y Ca2 presentaron valores de antagonismo iguales que estreptomycinina. Si bien las formulaciones en polvo formaron halos de inhibición a las 48 h en ambos experimentos,

no presentaron diferencias significativas con el control ADE, lo que también ocurrió con los aceites en el experimento 1. Adicionalmente, se observó la formación de una masa mucilaginosa amarillenta en el límite del área inhibida (datos no mostrados), lo que puede ser asociado a la formación de una biopelícula de Pv.

Figura 1. Área de inhibición (mm<sup>2</sup>) evaluada 48 horas posterior a la inoculación del ensayo *in vitro* de los tratamientos sobre un césped de bacterias *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* sembrado en placas Petri con APD para dos experimentos (E1 y E2).



Diferencias obtenidas mediante prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en ensayo.

Tabla 2. Área de inhibición (mm<sup>2</sup>) evaluada 48 horas posterior a la inoculación del ensayo *in vitro* de los tratamientos sobre un césped de bacterias *Pseudomonas syringae* y *Pseudomonas viridiflava* para dos experimentos (E1 y E2).

Tratamiento	Área de inhibición bacteriana			
	Pss		Pv	
	E1	E2	E1	E2
Control ADE	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Estreptomicina	57,8 b	76,5 b	135,2 bcd	120,7 b
<i>P. protegens</i> Ca2	51,6 b	27,3 ab	263,3 d	216,5 b
<i>P. protegens</i> ChC7	25,0 b	16,6 ab	212,9 cd	223,1 b
OIL RGM 2328	0,0 a	0,0 a	42,2 ab	0,0 a
OIL RGM 2329	0,0 a	0,0 a	49,1 ab	0,0 a
WP RGM 2328	0,0 a	248,8 b	47,8 abc	31,4 ab

WP RGM 2329	0,0 a	122,7 b	52,3 abc	24,7 ab
Valor p	0,0021	0,0114	0,0054	0,0022

Diferencias obtenidas mediante prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en cada columna.

Las biopelículas corresponden estructuras compuestas principalmente de exopolisacáridos que protegen a las bacterias del estrés ambiental (Cellini *et al.*, 2020). Las biopelículas se forman de acuerdo con la densidad poblacional bacteriana por activación del mecanismo de detección de quórum que en bacterias Gram negativas comúnmente ocurre por la síntesis del autoinductor N-acil homoserina lactonas (NAHL) (Cellini *et al.*, 2020). Pv no sintetiza NAHL, sin embargo, Pv contiene proteínas LuxR que perciben AHL (Bez *et al.*, 2021), y existen antecedentes de algunas cepas de Pp capaces de producir AHL (Wang *et al.*, 2022), por lo cual, la formación de biopelículas en Pv pudo ser desencadenada por AHL exógeno, presuntamente como mecanismo de defensa frente a la bacteria antagonista, creando una barrera que restringe la penetración de las sustancias antimicrobianas.

Los resultados indican que las cepas también ejercen un efecto antagonista sobre Pss y Pv. Sobre Pv se observó mayor susceptibilidad a las cepas Ca2 y ChC7, que presentaron una extensa área de inhibición que fue consistente en ambos experimentos, mientras que en Pss fue menor, pero comparable con la estreptomycinina en el experimento 1. Anteriormente ya se había comprobado la acción antagonista de las cepas ChC7 y Ca2 sobre Psa (Moya-Elizondo *et al.*, 2019; Moya-Elizondo., 2020). Las cepas Ca2 y ChC7 de Pp usadas directamente sobre céspedes de Psa generaron un extenso halo de inhibición (135 y 134 mm<sup>2</sup>). El antagonismo entre bacterias del género *Pseudomonas* y Psa *in vitro* e *in planta*, también ha sido reportado con cepas endófitas aisladas desde plantas de *L. scoparium*, demostrando la inhibición del crecimiento del agente causal del cancro bacteriano del kiwi (Wicaksono *et al.*, 2018). El antagonismo producido por los tratamientos que contienen *P. protegens*, se atribuye principalmente a la síntesis de 2,4-DAPG (Ramette *et al.*, 2011; Wicaksono *et al.*, 2018) por la presencia del gen *phlD* en los dos aislados evaluados. No obstante, los aislados Ca2 y ChC7 también poseen genes precursores de metabolitos secundarios antimicrobianos como el pioluteorin y pirrolnitrina, detectados en otras cepas de la misma especie (Yan *et al.*, 2016).

El recuento de bacterias (Anexo 1) comprobó la presencia de las cepas antagonistas en los aceites pero en cantidades insuficiente para enfrentar las *Pseudomonas* fitopatógenas, lo que explica la ausencia de antibiosis. Además, la mezcla del aceite, agua y tensioactivo no logró una emulsión, pues al pasar un minuto de la agitación, comenzaban a separarse en fases. La suspensión a base de aceite debe diluirse en agua para producir una emulsión de aceite en agua, también debe producirse un sistema autoemulsionable y esto requiere la presencia de los tensioactivos apropiados para la autoemulsión (Tharwat, 2018). La heterogeneidad de la suspensión y la baja UFC mL<sup>-1</sup> que se registró en los aceites versus el patógeno, dificultó el uso del producto y el efecto de antibiosis. Por su parte, la estabilidad bacteriana en los formulados en polvo podría estar relacionada con su menor contenido de humedad que implica una reducción de los procesos metabólicos e induce estados de latencia que mantengan la viabilidad durante el almacenamiento (Immediato *et al.*, 2017).

Las tres bacterias fitopatógenas presentaban un mayor número de UFC en comparación con las formulaciones en polvo (Anexo 1), afectando la formación halos de inhibición que en gran parte no fue estadísticamente diferente al control ADE, mientras que las cepas Ca2 y ChC7 mostraron actividad antagonista frente a Psa, Pss y Pv, sin diferencias estadísticas con la estreptomycinina luego de las 48 h. El número de UFC de las cepas antagonistas puras fue mayor a los formulados y cercanos al de las cepas fitopatógenas, comprobando que esta variable afectó la producción y efectividad de los metabolitos secundarios frente a Psa, Pss y Pv.

Los halos de inhibición de los formulados mostraron diferentes tonalidades (datos no mostrados), con una menor opacidad que la estreptomycinina y cepas puras de Pp, que formaban un halo más límpido. Al analizar la presencia del gen *phlD* en el área de inhibición mediante PCR, se determinó que en las áreas más límpidas se encontraba Pp, mientras que en los halos opacos se detectó con una baja frecuencia (datos no mostrados). Lo anterior indica que posiblemente ocurrió menor difusión de compuesto 2,4-DAPG que ocasionó la tonalidad opaca causando un posible efecto bacteriostático en esas áreas.

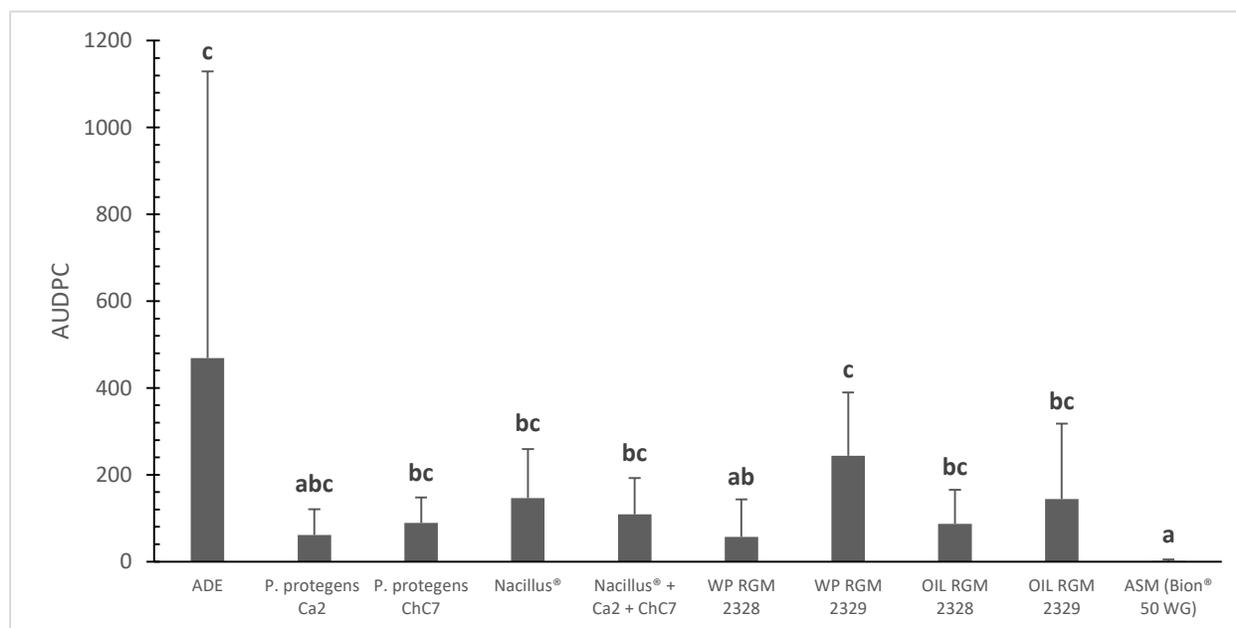
### **Evaluación de eficacia de formulados en base a *Pseudomonas protegens* en plantas de kiwi de maceta**

La inoculación de plantas de kiwi bajo condiciones controladas permitió observar síntomas desde la primera evaluación, asociadas principalmente a pequeñas manchas necróticas (< 2 mm) que fueron incrementando en número hasta la cuarta observación. Todos los tratamientos presentaron una menor AUDPC respecto a las plantas del control asperjadas con ADE antes de la inoculación de la bacteria Psa, mostrando diferencias significativas entre tratamientos ( $P= 0,027$ ; Figura 2). ASM redujo la severidad causada por Psa (AUDPC= 2,3) en un 99,5 %, presentando diferencias significativas con las plantas pretratadas con ADE (AUDPC= 468,6). Por su parte, la formulación WP RGM2328 presentó una disminución del 88 % de síntomas necróticos en las hojas (AUDPC= 56,7) respecto al resto de los bioproductos, mostrando diferencias significativas respecto al control. Las cepas puras de Pp y el resto de los tratamientos con productos biológicos, no fueron estadísticamente diferentes al control. Sin embargo, la presencia de las cepas Ca2 y ChC7 en sus diferentes formulaciones tendió a reducir la expresión de la enfermedad sobre las plantas inoculadas. Las cepas bacterianas no formuladas mostraron una reducción de la severidad en 86,8 % y 80,9 % (Ca2 y ChC7 respectivamente), mientras que las conservadas en formulaciones presentaron resultados variables y poco concordantes con los resultados de sus correspondientes cepas, donde la reducción en las formulaciones WP fue de 88 % y 48 %, y en OIL fue de 81,4 % y 69,3 % respectivamente. Adicionalmente, la combinación de ambas cepas con el producto Nacillus® (Bio Insumos Nativa Spa), permitió la disminución de un 25,4 % del daño en comparación al producto comercial aplicado por sí solo; y una disminución del 76,8 % respecto al control.

El número de manchas necróticas en las repeticiones de los tratamientos presentó gran variabilidad, presentando un bajo número y diámetro de manchas necróticas (datos no mostrados). Esta baja infección por Psa puede explicarse por el hecho que la cámara de crecimiento registró una temperatura promedio de 21° C con una humedad relativa (HR) del 80 % (Anexo 3), lo cual es desfavorable para el crecimiento endófito de Psa que ocurre a 24°C y HR 80 % (Donati *et al.*, 2020). Si se hubiesen dado las condiciones para

una mayor expresión de síntomas foliares, es posible que los tratamientos hubiesen logrado diferencias más notorias entre ellos. Sin embargo, dos semanas posteriores a la inoculación se observaron manchas necróticas en las plantas del control, que superaron al resto de los tratamientos.

Figura 2. Severidad de la bacteriosis del kiwi determinada mediante el cálculo del área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) de cuatro mediciones del número de manchas necróticas realizadas cada 7 días después de la inoculación de *Psa* en plantas de kiwi de 8 hojas bajo condiciones ambientales controladas.



Diferencias obtenidas mediante prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

Los resultados sugieren que el estado de “priming” o de activación de defensa en las plantas de kiwi se desencadenó en aquellas plantas pre-tratadas con ASM, mostrando una baja manifestación de síntomas necróticos (< 2 manchas/hoja). Cabe indicar que este tratamiento perdió dos de las cinco repeticiones debido a una infección por *Botrytis cinerea*, dada la alta humedad de la cámara de crecimiento, lo cual pudo explicar la elevada reducción de la severidad y las diferencias significativas con los tratamientos que contenían las cepas Ca2 y ChC7. La pre-inoculación de Nacillus®, de cepas puras de Pp y de algunas formulaciones, presentaron una disminución similar de la severidad de síntomas foliares. Estos microorganismos podrían estar favoreciendo la expresión de

algún/os tipos de genes de resistencia, induciendo un estado fisiológico en la planta que le permite responder rápidamente al estímulo de un patógeno (Conrath *et al.*, 2015). *Pseudomonas protegens* CHA0 ha mostrado actividad de inducción de resistencia en plantas de *Arabidopsis thaliana* y tabaco (Maurhofer *et al.*, 19974; Iavicoli *et al.*, 2003) como también las cepas Ca2 y ChC7 en kiwi (Moya-Elizondo *et al.*, 2019; Moya-Elizondo., 2020). La baja severidad observada al combinar las cepas de Pp con el consorcio de bacterias de Nacillus®, en comparación a ASM, sugiere una sinergia entre las especies de bacteria que promueven la expresión de ciertos genes de resistencia. Adicionalmente, la presencia de las bacterias antagonistas sobre la planta pudo generar un efecto de inhibición del desarrollo de Psa a través de la producción de metabolitos secundarios (Wicaksono *et al.*, 2019).

### **Evaluación en terreno de la eficacia de formulados en base a *Pseudomonas protegens*.**

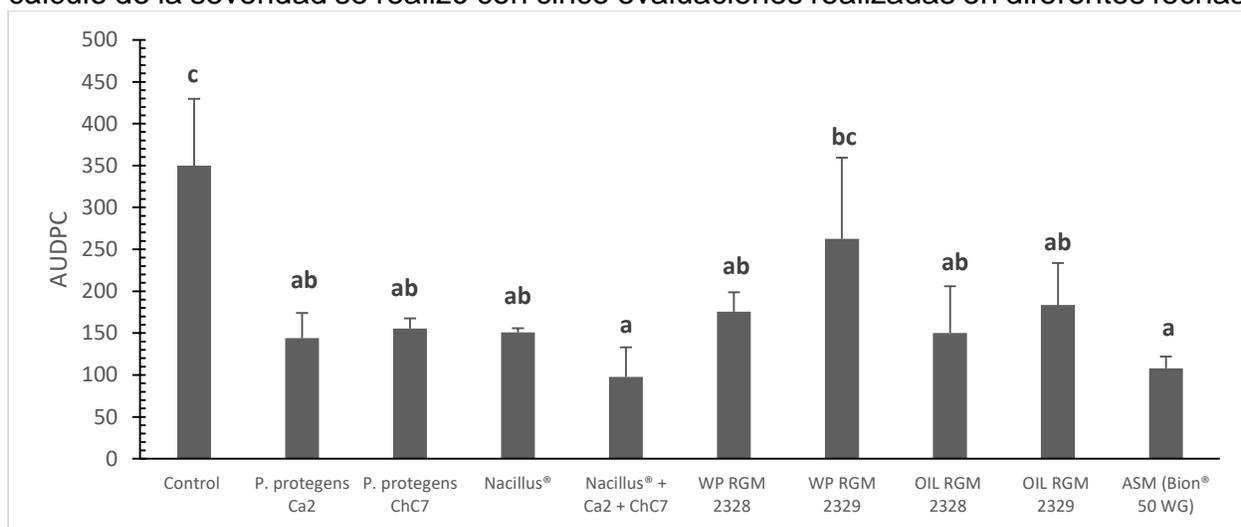
El análisis de AUDPC a partir de las cinco evaluaciones realizadas en terreno mostró que los tratamientos redujeron eficazmente el daño foliar en las plantas de kiwi bajo condiciones de campo, con la excepción del formulado WP RGM 2329 ( $P= 0,007$ ;  $CV= 46,1$ ; Figura 3). El producto biológico comercial de especies de *Bacillus* y *Brevibacillus* (Nacillus®, Bio Insumos Nativa SpA.) combinado con las cepas ChC7 y Ca2 de Pp, y el inductor químico ASM, disminuyeron en un 72 % y 69 % de los síntomas respecto al resto de los tratamientos, respectivamente. Sin embargo, no presentaron diferencias significativas con las bacterias puras, formulados en aceite y WP RGM 2328. La reducción de los síntomas necróticos de los formulados fue desde un 48% a 50% respecto al tratamiento control.

Aunque la incidencia de hojas con manchas necróticas en las plantas fue baja durante la temporada, con un promedio del 24 % en el experimento, permitió observar diferencias significativas entre tratamientos ( $P= 0,0018$ ;  $CV= 21,9$ ; Figura 4). Los resultados indican que los tratamientos OIL RGM 2328, ASM, Nacillus® + Ca2 y ChC7, WP RGM 2328 y Pp cepa ChC7 redujeron la incidencia de forma significativa con respecto al control.

El porcentaje promedio de botones florales con necrosis fue de sólo del 1 % y no se observó diferencias significativas entre tratamientos (datos no mostrados). Durante la

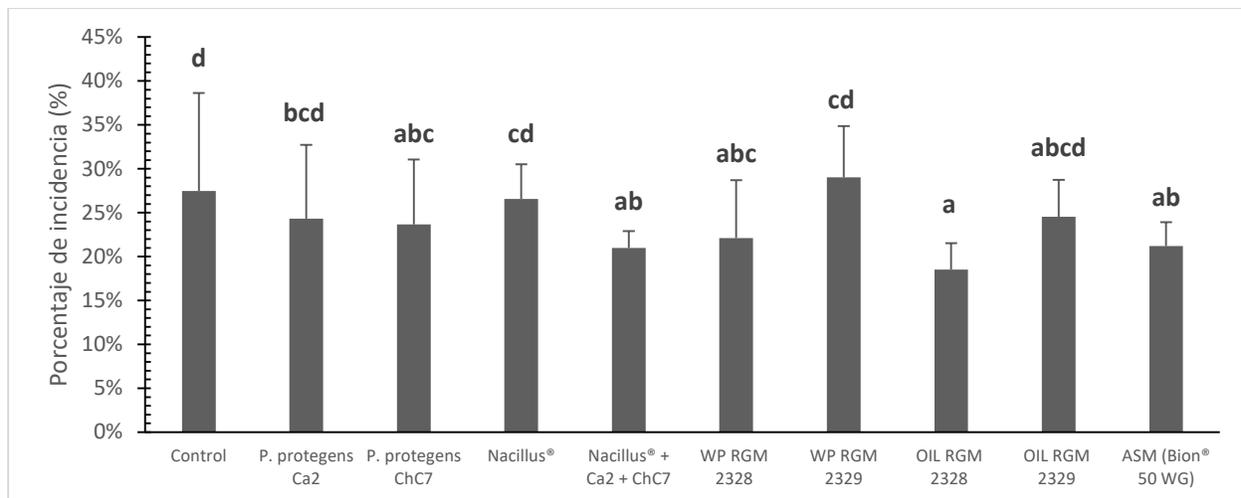
formación la baya no se observó mayor daño, ya que en promedio el 94,4 % de las flores evaluadas lograron cuajar y formar un fruto sano (datos no mostrados). Estos resultados muestran que no hubo condiciones predisponentes para una epifitía de la enfermedad; sin embargo, los niveles de inóculo permitieron evaluar la eficacia de los tratamientos en las hojas del frutal.

Figura 3. Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) para la severidad de la bacteriosis del kiwi observado en un huerto comercial de kiwi 'Hayward' durante la temporada de crecimiento del año 2019 en Dadinco, San Nicolás, región del Ñuble. El cálculo de la severidad se realizó con cinco evaluaciones realizadas en diferentes fechas.



Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0,05$ ), según la prueba diferencia mínima significativa de Fisher (LSD) sobre medidas de AUDPC transformadas a  $\text{Log}_{10} n + 1$ .

Figura 4. Porcentaje de incidencia de manchas necróticas en plantas de kiwi 'Hayward' por el complejo bacteriano asociado a la bacteriosis del presente en el huerto comercial localizado en Dadinco, San Nicolás, región del Ñuble, durante la temporada de crecimiento del año 2019.



Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0,05$ ), según la prueba diferencia mínima significativa de Fisher (LSD) sobre los porcentajes de incidencia transformados a  $\sqrt{n + 0,5}$ .

La combinación de bacterias de los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Pseudomonas* redujo los síntomas foliares en terreno de forma significativa y fueron comparables a los del inductor químico ASM que ha sido validado en otros estudios (Reglinski *et al.*, 2013; Cellini *et al.*, 2014) y es usado comercialmente en Chile y Nueva Zelanda. Del mismo modo, las cepas puras y formuladas de *Pseudomonas* aplicadas en terreno demostraron una efectividad mejor o similar a Nacillus®, producto biológico autorizado para el control de Psa en Chile (SAG, 2015).

El uso combinado de cepas de *Pseudomonas* versus su uso individual ha presentado mayor efectividad contra la colonización de Psa en heridas de plantas de kiwi (Wicaksono *et al.*, 2018) mostrando que la mezcla de cepas antagonistas puede mejorar el control biológico de enfermedades en kiwi. Del mismo modo, el consorcio de bacterias redujo la incidencia de la bacteriosis del kiwi en comparación a los tratamientos Nacillus® y cepas de Pp individuales, con resultados similares a ASM. Estos antecedentes también sugieren que el uso de las formulaciones de cepas de *P. protegens* bajo un manejo integrado de Psa en kiwi sería efectivo en estados fisiológicos de la planta, como la floración, cuando las aplicaciones de productos son restringidas. Además, podría ser compatible junto a aplicaciones de ASM y potenciar su efecto, como se observó al combinar *Aureobasidium pullulans* con ASM (de Jong *et al.*, 2019), lo cual sería

interesante evaluar en un futuro estudio.

La baja eficacia del tratamiento WP RGM 2329 respecto a las demás formulaciones, puede explicarse por la baja homogeneidad al preparar una dosis del producto, debido a que el seguimiento realizado durante siete meses de las UFC presentes en las formulaciones, mostraron un descenso en las poblaciones con una alta variación en estas poblaciones entre fechas de evaluación (datos no mostrados). Esta situación también puede explicar la alta variación observada entre repeticiones en los experimentos al determinar el AUDPC.

Las condiciones ambientales presente entre los estados fenológicos del kiwi BBCH 50 (emergencia de inflorescencias) al BBCH 73 (Fruto con 30% de crecimiento) durante la temporada 2019/2020, no fueron favorables para el desarrollo de la enfermedad en comparación a otros años. Las temperaturas registradas no restringieron en gran medida la multiplicación bacteriana, pero la baja precipitación en los meses de primavera posiblemente limitó la propagación sobre los tejidos de las plantas. Las condiciones óptimas de temperatura y HR para que ocurra el proceso de infección son de 21° C a 24° C y de 65 % a un 75 % para el crecimiento epifítico y endofítico respectivamente (Donati *et al.*, 2020). Durante los cuatro meses que se llevó a cabo el ensayo, la temperatura promedio fue de 13, 17, 20, 23 y 21° C, y la HR fue de 75, 67, 61, 55 y 57 % respectivamente (Anexo 4), es decir, las condiciones fueron escasas para el desarrollo endofítico y explica la baja incidencia y severidad manifestada en las plantas del huerto. Esto también explica el bajo porcentaje de botones florales con necrosis y el alto porcentaje de cuaja que se observó.

La infección por Psa en la planta se caracteriza por una colonización vía apoplasto que llega al sistema vascular y lo obstruye, impidiendo el flujo normal de agua desde las raíces hasta las hojas (Donati *et al.*, 2020). En este contexto, es esperable que una hoja con síntomas severos de la enfermedad pueda deshidratarse más rápidamente que una hoja sana, y por ende mostrar una mayor severidad de estrés hídrico (menor valor de potencial hídrico de la hoja al mediodía), especialmente en áreas con una alta demanda evaporativa atmosférica (> 3,0 kPa). Debido a la relación que existe entre potencial hídrico de la planta y conductancia estomática de las hojas, una importante disminución



No obstante, las dificultades ambientales que no favorecieron el desarrollo de la enfermedad, los resultados de esta investigación muestran que el uso de las cepas Ca2 y ChC7 de *P. protegens* en una formulación en polvo u oleosa reducen las infecciones por Psa en kiwi, por lo que su uso es una opción interesante para el biocontrol de la bacteriosis del kiwi en terreno.

## CONCLUSIÓN

El consorcio de bacterias Psa, Pss y Pv, que causan la bacteriosis del kiwi, son inhibidos por las cepas individuales puras y formulados en polvo de las cepas Ca2 y ChC7 de *P. protegens* bajo condiciones *in vitro*. Los formulados en aceite no mostraron actividad antagonista sobre las tres bacterias fitopatógenas estudiadas bajo condiciones *in vitro*.

En plantas de macetas, no se logró determinar un efecto controlador significativo en todas las formulaciones, sólo en las pretratadas con la formulación WP RGM2328.

La combinación de las cepas Ca2 y ChC7 de *P. protegens* con el bioproducto bacteriano Nacillus®, permitió una mayor reducción de severidad e incidencia bajo condiciones de maceta y de campo.

Los formulados en polvo y oleoso a base de las cepas Ca2 y ChC7 de *P. protegens* disminuyen significativamente la severidad de la bacteriosis del kiwi en plantas de kiwi bajo condiciones de terreno, bajo condiciones de infección moderadas de la enfermedad.

## REFERENCIAS

1. Balestra, G.M. and L. Varvaro. 1997. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causal agent of disease on floral buds of *Actinidia deliciosa* (A. Chev) Liang et Ferguson in Italy. J. Phytopathol. 145: 375-378.
2. Balestra, G.M., A. Mazzaglia, A. Quattrucci, M. Renzi and A. Rossetti. 2009. Current status of bacterial canker spread on kiwifruit in Italy. Australas. Plant Dis. Notes. 4(1): 34-36.
3. Balzarini, M., L. Gonzalez, E. Tablada, F. Casanoves, J. Di Rienzo y C. Robledo. 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Primera Edición, Editorial Brujas Argentina.

4. Bez, C., S. Covaceuszach, I. Bertani, K. S. Choudhary and V. Venuri. 2021. LuxR Solos from Environmental Fluorescent Pseudomonads. *MSphere*. 6(2): 1-18.
5. Cameron, A. and V. Sarojini. 2014. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: chemical control, resistance mechanisms and possible alternatives. *Plant Pathol.* 63(1): 1-11.
6. Cellini, A., I. Donati, L. Fiorentini, E. Vandelle, A. Polverari, V. Venturi, G. Buriani, J.L. Vanneste and F. Spinelli. 2020. N-Acyl homoserine lactones and Lux solos regulate social behaviour and virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Microb. Ecol.* 80: 383-396.
7. Cellini, A., L. Fiorentini, G. Buriani, J. Yu, I. Donati, D.A. Cornish, B. Novak, G. Costa, J.L. Vanneste and F. Spinelli. 2014. Elicitors of the salicylic acid pathway reduce incidence of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Ann. Appl. Biol.*, 165(3): 441-453.
8. Conrath, U., G. J. Beckers, C. J. Langenbach and M. R. Jaskiewicz. 2015. Priming for enhanced defense. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 53(1): 97-119.
9. de Jong, H., T. Reglinski, P. A. Elmer, K. Wurms, J. L. Vanneste, L. F. Guo and M. Alavi. 2019. Integrated use of *Aureobasidium pullulans* strain CG163 and acibenzolar-S-methyl for management of bacterial canker in kiwifruit. *Plants*. 287(8): 1-19.
10. Donati, I., A. Cellini, D. Sangiorgio, J. L. Vanneste, M. Scortichini, G. M. Balestra and F. Spinelli. 2020. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: Ecology, infection dynamics and disease epidemiology. *Microb. Ecol.* 80(1): 81-102.
11. EPPO. 2011. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Chile. <<https://gd.eppo.int/reporting/article-137>> [Consulta: 17 junio 2019].
12. Everett, K.R., R.K. Taylor, M.K. Romberg, J. Rees-George, R.A. Fullerton, J.L. Vanneste and M.A. Manning. 2011. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing kiwifruit bacterial canker in New Zealand. *Australas. Plant. Dis. Notes*. 6(1): 67-71.
13. Ferrante, P., and M. Scortichini. 2009. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* as causal agent of bacterial canker of yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planchon) in central Italy. *J. Phytopathol.* 157: 768-770.
14. Flores, O., C. Prince, M. Nuñez, A. Vallejos, C. Mardones, C. Yañez, X. Besoain y R. Bastías. 2018. Genetic and phenotypic characterization of indole-producing isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* obtained from Chilean kiwifruit orchards. *Front. Microbiol.* 9: 1-12.

15. FAO. 2020. Top 20 commodities production in Chile. <[http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities\\_by\\_country](http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities_by_country)>. [Consulta: 22 diciembre 2021].
16. Höfte, M. and P. De Vos. 2006. Plant pathogenic *Pseudomonas* species. pp: 507-533. In: S.S. Gnanamanickam (Ed.). Plant-associated Bacteria. Springer. The Netherlands.
17. Iavicoli, A., E. Boutet, A. Buchala, and J. Métraux. 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Mol. Plant-Microbe Interact. 16(10): 851–858.
18. Immediato, D., R. Iatta, A. Camarda, A. Giangaspero, G. Capelli, L.A. Figueredo, D. Otranto and C. Cafarchia. 2017. Storage of *Beauveria bassiana* conidia suspension: A study exploring the potential effects on conidial viability and virulence against *Dermanyssus gallinae* De Geer, 1778 Acari: Dermanyssidae. Exp. Appl. Acarol, 72(2), 307-317.
19. Jeger, M.J., and S.L.H. Viljanen-Rollinson. 2001. The use of area under the disease-progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. Theor. Appl. Genet. 102: 32-402.
20. Madden, L. V., G. Hughes, and F. Van Den Bosch. 2007. The study of plant disease epidemics (No. 632.3 M33). St. Paul, MN: American Phytopathological Society.
21. Maurhofer, M., C. Hase, p. Meuwly, J. P. Metraux, and G. Defago. 1997. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. Plant Soil. 192(1): 37-48.
22. Moya-Elizondo, E., N. Cattán, B. Ruiz and J. San Martín. 2019. Ability of Chilean bacteria to control *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit by antibiosis and induction of resistance. J. Plant Pathol. 4th International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases.
23. Moya-Elizondo, E. 2020. Impact of phytopathogenic bacteria in Chilean fruit crop productions and advances in management and control. pp: 37-51. In: E. Moya-Elizondo (Ed.). The plant health, a view from the plant bacteriology. Ediciones Universidad de Concepción, Chile.
24. Moya-Elizondo, E. N. Cattán, N. Arismendi y H. Doussoulin. 2013. Determination of 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG) and phenazine-producing *Pseudomonas* spp. in wheat crops in southern Chile. Phytopathology, 103 (Suppl. 2), p. 100.

25. Nowak-Thompson, B., S.J. Gould, J. Kraus and J.E. Loper. 1994. Production of 2,4-diacetylphloroglucinol by the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Canadian J. Microbiol. 40(12): 1064–1066.
26. Salinero, M. C., P. Vela and M. J. Sainz. 2009. Phenological growth stages of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* 'Hayward'). Sci. Hortic. 121(1): 27-31.
27. SAG. 2019. Lista de plaguicidas para el control de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. <<https://www.sag.gob.cl/content/plaguicidas-para-el-control-de-pseudomonas-syringae-pv-actinidiae-psa-0>>. [Consulta 17 junio 2020].
28. SAG. 2019. Autoriza, en el marco del control obligatorio de la plaga *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) en Kiwi, el uso del plaguicida Nacillus<[https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/3193\\_06052015\\_plaguicidas.pdf](https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/3193_06052015_plaguicidas.pdf)>. [Consulta 22 agosto 2022].
29. BCN. 2020. Derogación resolución n° 7.540, de 2020, que actualiza las medidas fitosanitarias de control oficial de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) y deroga resolución n° 6.132/2017 y sus modificaciones. <<https://www.leychile.cl/Navegar?idNorma=1145592&buscar=Psa>>. [Consulta 17 junio 2020].
30. CIREN. 2021. Catastro frutícola, Principales resultados Región de O'Higgins/septiembre 2021. <<https://bibliotecadigital.odepa.gob.cl/bitstream/handle/20.500.12650/71122/Ohiggins202109.pdf>>. [Consulta 22 diciembre 2021].
31. Purahong, W., L. Orrù, I. Donati, G. Perpetuini, A. Cellini, A. Lamontanara, V. Michelotti, G. Tacconi and F. Spinelli. 2018. Plant microbiome and its link to plant health: Host species, organs and *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* infection shaping bacterial phyllosphere communities of kiwifruit plants. Front. Plant Sci. 9: 1568-1579.
32. Ramette, A., M. Frapolli, M. Fischer-Le Saux, C. Gruffaz, J. Meyer, G. Défago, L. Sutra and Y. Moënne-Loccoz. 2011. *Pseudomonas protegens* sp. Nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. Syst. Appl. Microbiol. 34: 180-188.
33. Reglinski, T., J. L. Vanneste, K. Wurms, E. Gould, F. Spinelli and E. Rikkerink. 2013. Using fundamental knowledge of induced resistance to develop control strategies for bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Front. Plant Sci. 24(4): 1-4.
34. Taylor R.K., J.R. Chapman, M.K. Romberg, B.S. Weir, J.L. Vanneste, K.R. Everett, L.I. Ward, L.W. Liefting, B.S.M. Lebas and B.J.R. Alexander. 2014. Diagnostic challenges for the detection of emerging pathogens: a case study involving the

- incursion of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in New Zealand. pp: 71-86. En: P. J. M. Bonants y M. L. Gullino (Eds.). Detection and diagnostics of plant pathogens. Springer, Alemania.
35. Thomashow, L.S. and D.M. Weller. 1996. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: Mechanisms and Antifungal Metabolites. pp: 187-236. In: G. Stacey y N. Keen (Eds.) Plant Microbe Interactions. Chapman and Hall Ltd., London.
  36. Vanneste, J. L. and M. D. Voyle. 2003. Genetic basis of copper resistance in New Zealand strains of *Pseudomonas syringae*. N. Z. Plant Prot. 56, 109-112.
  37. Vanneste, J.L., J. Yu, D.A. Cornish, S. Max and G. Clark. 2011. Presence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit, on symptomatic and asymptomatic tissues of kiwifruit. N. Z. Plant. Prot. 64: 241-245.
  38. Vanneste, J.L. 2013. Recent progress on detecting, understating and controlling *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: short review. N. Z. Plant Prot. 66: 170-177.
  39. Vanneste, J. L., D.A. Cornish, J. Yu and C.A. Stokes. 2014. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* the causal agent of bacterial canker of kiwifruit on *Actinidia arguta* vines in New Zealand. Plant Dis. 98(3): 418-418.
  40. Wang, M. F., J. Wang, X. B. Wang, X. C. Zhu, Y. P. Wang and W. Wang. 2022. Effect of SPoT-mediated stringent response on biofilm formation, stress resistance and quorum sensing in *Pseudomonas protegens* SN15-2. Appl Biochem Micro. 58(4): 406-415.
  41. Weller, D. M., D. V. Mavrodi, J. A. van Pelt, C. M. Pieterse, L. C. van Loon, and P. A. Bakker. 2012. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathology, 102(4), 403-412.
  42. Wicaksono, W.A., E.E. Jones, S. Casonato, J. Monk and H.J. Ridgway. 2018. Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), the causal agent of bacterial canker of kiwifruit, using endophytic bacteria recovered from a medicinal plant. Biol. Control 116: 103-112.
  43. Yang, F. and Y. Cao. 2011. Biosynthesis of phloroglucinol compounds in microorganisms - review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 93(2): 487-495.
  44. Young, J.M., G.J. Cheesmur, F.V. Welham, and W.R. Henshall. 1988. Bacterial blight of kiwifruit. Ann. Appl. Biol. 112(1): 91-105.



## ANEXOS

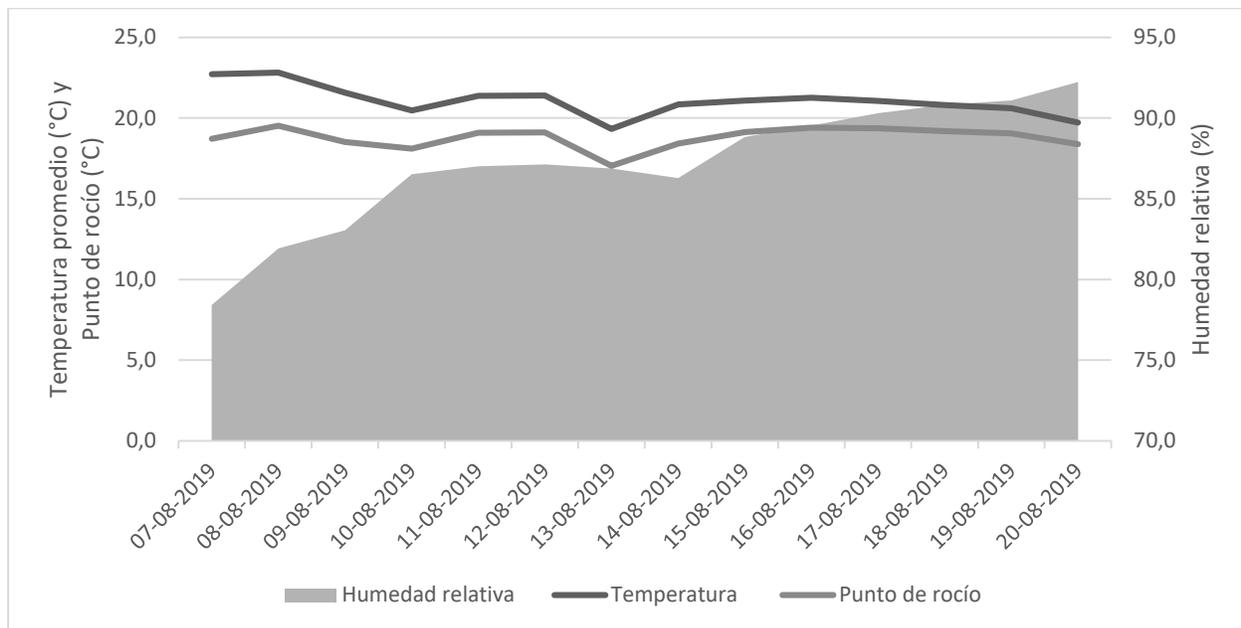
Anexo 1. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC mL<sup>-1</sup>), sobre placas Petri con medio sólido king B, de tratamientos y patógenos utilizados en las pruebas de antagonismo *in vitro*.

Tratamiento	Unidades formadoras de colonias mL <sup>-1</sup>	
	Experimento 1	Experimento 2
<i>P. protegens</i> Ca2	5,0 x 10 <sup>8</sup>	8,0 x 10 <sup>8</sup>
<i>P. protegens</i> ChC7	2,0 x 10 <sup>8</sup>	1,3 x 10 <sup>9</sup>
<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	2,7 x 10 <sup>9</sup>	9,0 x 10 <sup>9</sup>
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	8,0 x 10 <sup>9</sup>	2,7 x 10 <sup>9</sup>
<i>P. viridiflava</i>	2,3 x 10 <sup>9</sup>	6,0 x 10 <sup>9</sup>
OIL RGM 2328	2,0 x 10 <sup>7</sup>	4,0 x 10 <sup>6</sup>
OIL RGM 2329	6,7 x 10 <sup>6</sup>	6,7 x 10 <sup>6</sup>
WP RGM 2328	6,0 x 10 <sup>6</sup>	1,7 x 10 <sup>7</sup>
WP RGM 2329	2,3 x 10 <sup>7</sup>	3,7 x 10 <sup>7</sup>

Anexo 2. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC mL<sup>-1</sup>) de tratamientos con bacterias y *P. syringae* pv. *actinidiae* aplicados en las pruebas de inducción de resistencia en plantas de kiwi en macetas.

Tratamiento	Unidades formadoras de colonias mL <sup>-1</sup>
<i>P. protegens</i> ChC7	5,7 x 10 <sup>8</sup>
<i>P. protegens</i> Ca2	4,0 x 10 <sup>9</sup>
<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	1,7 x 10 <sup>9</sup>
Nacillus ®+Ca2+ChC7	1,3 x 10 <sup>9</sup>
OIL RGM 2328	3,6 x 10 <sup>4</sup>
OIL RGM 2329	1,0 x 10 <sup>3</sup>
WP RGM 2328	2,7 x 10 <sup>5</sup>
WP RGM 2329	1,7 x 10 <sup>3</sup>

Anexo 3. Registro promedio diario de temperatura, humedad relativa y punto de rocío dentro de la cámara de crecimiento de las plantas de kiwi pretratadas e inoculadas con Psa durante agosto del año 2019. Los datos corresponden a la semana de aplicación de pretratamientos, seguido de la semana luego de inocular Psa.



Anexo 4. Registro promedio diario de temperatura, humedad relativa y precipitación acumulada desde octubre a diciembre del año 2019 y enero a febrero del año 2020 (Agromet, 2020).

