

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

EVALUACIÓN *in vitro* DE ANTAGONISTAS SOBRE CEPAS SELECCIONADAS
DE *Cylindrocarpon macrodidymum* Halleen, Schroers & Crous, AGENTE CAUSAL
DE LA ENFERMEDAD DEL PIE NEGRO DE LA VID (*Vitis vinifera* L.).

GABRIEL FRANCISCO PINTO VEAS

SANTIAGO - CHILE
2014

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

EVALUACIÓN *in vitro* DE ANTAGONISTAS SOBRE CEPAS SELECCIONADAS
DE *Cylindrocarpon macrodidymum* Halleen, Schroers & Crous, AGENTE CAUSAL
DE LA ENFERMEDAD DEL PIE NEGRO DE LA VID (*Vitis vinifera* L.).

In vitro EVALUATION OF ANTAGONISTS OVER SELECTED STRAINS OF
Cylindrocarpon macrodidymum Halleen, Schroers & Crous, CAUSAL AGENT OF
BLACKFOOT DISEASE ON GRAPEVINES (*Vitis vinifera* L.)

GABRIEL FRANCISCO PINTO VEAS

SANTIAGO - CHILE
2014

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

EVALUACIÓN *in vitro* DE ANTAGONISTAS SOBRE CEPAS SELECCIONADAS DE *Cylindrocarpon macrodidymum* Halleen, Schroers & Crous, AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD DEL PIE NEGRO DE LA VID (*Vitis vinifera* L.).

Memoria para optar al título profesional de:
Ingeniero Agrónomo, mención Sanidad Vegetal

GABRIEL FRANCISCO PINTO VEAS

Profesores Guía	Calificación
Jaime R. Montealegre A. Ingeniero Agrónomo	6,8
Erwin Aballay E. Ingeniero Agrónomo, M.S. Ph. D.	6,5
Profesores Evaluadores	
Jaime Auger S. Ingeniero Agrónomo, M.S. Ph. D.	6,9
Cristián Kremer F. Ingeniero Agrónomo, Ph. D.	6,8

SANTIAGO - CHILE
2014

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Jaime Montealegre, por su infinita paciencia, apoyo constante y oportunas observaciones a lo largo de esta memoria de título, así como por todo lo aprendido durante mi estadía en el Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico

A los profesores Erwin Aballay, Jaime Auger y Cristián Kremer, por el tiempo dedicado y el hacerme saber sus correcciones y apreciaciones sobre esta memoria de título.

Al profesor Danilo Aros, por su amistad y las lecturas compartidas.

A todos los compañeros, tesisistas y colegas que formaron parte del Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de Enfermedades durante el desarrollo de esta memoria y con quienes compartí mucho más que las horas de trabajo. Así mismo, a los almuerzos y risas compartidos con quienes trabajan el Laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular.

A todo el personal del Departamento de Sanidad Vegetal. Felicia, Martita, Miguel, Don Jorge y, en especial, a la Señora Ángela (QEPD): muchas gracias por todo.

A los amigos de la universidad y también a los ajenos a ella, quienes entendieron mejor que yo las causas del retraso de esta memoria.

A mi familia adoptiva y adoptada, Alicia y Carolina, por su apoyo y cariño durante todo este tiempo. Porque los lazos sanguíneos son apenas un “pero” al momento de formar familia.

A mis hermanos Alejandra, Andrés, Iván, Diego y Beatriz, que me inspiraron – cada uno a su manera, con distintas visiones y mucho cariño – para finalizar esta memoria.

A Ewa, quien me dio no solo amor, sino el último empujón y motivación necesarias para terminar de una vez con esta memoria.

A mi abuela Leticia, quien desde que era pequeño y hasta el día de hoy, sigue ayudándome con mi formación intelectual y, más importante, en mi formación como ser humano.

A mi papá, de quien heredé el gusto por la investigación y quien me hizo entender que perseguir una carrera en donde el aprendizaje sea constante, es también parte de encontrar el camino hacia la felicidad y la realización personal.

Finalmente, a mi mamá, por todo el apoyo y cariño que me entregó antes, durante y después de esta memoria. Por todas las mañanas en que se levantó a prepararme el almuerzo. Por los buenos y los malos ratos. Por la paciencia suprema. Y porque esta memoria debe mucho más de lo que parece a ella.

ÍNDICE

RESUMEN	1
Palabras clave	1
ABSTRACT	2
Keywords	2
INTRODUCCIÓN	3
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
MATERIALES Y MÉTODO	6
Evaluación del rango óptimo de pH	6
Evaluación del rango óptimo de temperatura	7
Selección de cepas	7
Antagonismo directo: hongo antagonista – hongo fitopatógeno a través de cultivos duales.	7
Antagonismo directo: bacteria antagonista – hongo fitopatógeno.	8
Evaluación de metabolitos difusibles: hongo antagonista – hongo fitopatógeno.	9
Evaluación de metabolitos difusibles: bacteria antagonista – hongo fitopatógeno.	10
Análisis estadístico y diseño experimental	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
Evaluación del rango óptimo de pH	11
Efecto del rango óptimo de temperatura	11
Selección de cepas	12
Antagonismo directo: hongo antagonista – hongo fitopatógeno, a través de cultivos duales	12
Metabolitos difusibles: hongo antagonista – hongo fitopatógeno.	18
Antagonismo directo: bacteria antagonista – hongo fitopatógeno.	23
Metabolitos difusibles: bacteria antagonista – hongo fitopatógeno.	28
CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFÍA	34
APÉNDICE I	41
Selección de cepas	41

RESUMEN

Cylindrocarpon macrodidymum es uno de los fitopatógenos causantes de la enfermedad del pie negro en la vid. La reducción del cuidado sanitario, los cambios en los manejos culturales y la baja efectividad de algunos fungicidas químicos, ha obligado a buscar nuevas alternativas de control que no estén limitadas por las condiciones ambientales, ecológicas y económicas, abriendo una ventana para técnicas alternativas de control, tales como el control biológico. En el presente trabajo, se evaluó el efecto biocontrolador *in vitro* de 12 cepas fúngicas antagonistas y 9 cepas bacterianas antagonistas, sumado a dos productos comerciales, sobre tres cepas seleccionadas de *Cylindrocarpon macrodidymum* aisladas de los valles de Copiapó y Huasco. Estas fueron caracterizadas en función de su pH y temperatura óptima de crecimiento, determinando que el pH óptimo de crecimiento se encontraba entre 5,7 y 7,7, mientras que la temperatura óptima fue 25°C. Estos valores se utilizaron para las evaluaciones realizadas. Para cada combinación antagonista-fitopatógeno, se realizaron ensayos de antagonismo directo, mediante cultivos duales y de metabolitos difusibles de los biocontroladores sobre las tres cepas de *C. macrodidymum*. Todos los antagonistas fungosos y bacterianos utilizados, ejercieron algún grado de inhibición del crecimiento radial de las cepas de *C. macrodidymum* evaluadas, tanto en los ensayos de antagonismo directo como en los de metabolitos difusibles. La cepa *Trichoderma* 84a, fue aquella que obtuvo un mayor porcentaje de ICR promedio en los ensayos de antagonismo directo con hongos (81.5%), mientras que el producto comercial en base a *Streptomyces lydicus* WYEC108, fue aquel que obtuvo el mayor porcentaje de ICR promedio en los ensayos de antagonismo directo con bacterias (96.1%). En los ensayos de metabolitos difusibles, no existieron diferencias en los porcentajes de ICR para ninguno de los antagonistas fungosos evaluados, mientras que en los ensayos de metabolitos difusibles con bacterias, nuevamente el producto comercial en base a *Streptomyces lydicus* WYEC108, fue el que obtuvo un mayor porcentaje de ICR promedio (100%).

Palabras clave: biocontrol, enfermedades de la madera, *Streptomyces lydicus*, *Trichoderma harzianum*, *Paenibacillus* spp.

ABSTRACT

Cylindrocarpon macrodidymum is a phytopathogen fungi that has been associated with black foot disease of grape vines in Chile. Lack of sanitary measures, changes of cultural methods and low agrochemical efficacy, are forcing to seek out for new control alternatives that are not limited by environmental, ecological or economic conditions, thus leading to new ways of fungi disease management, such as biological control. The *in vitro* biocontrol efficacy of 12 antagonistic fungi strains, 9 antagonistic bacterial strains and two commercial biological control products were tested against three previously selected *C. macrodidymum* strains. These strains, isolated from Copiapó and Huasco valleys, were characterised by their optimal growth pH and temperature, establishing their optimal growth pH between 5,7 and 7,7 and their optimal growth temperature at 25°C. These values were used for the antagonistic trials. For each antagonist-pathogenic variant, antagonistic capacity of each antagonist was tested on dual cultures and diffusible metabolite efficacy trials against the pathogenic strains. Commercial biological control products, bacterial strains and fungi strains were all capable of inhibiting the radial growth of the three *C. macrodidymum* strains. In dual culture trials, *Trichoderma* 84a strain had the highest average inhibitory effect (81.5%). Commercial biocontrol product, based on *Streptomyces lydicus* WYEC108 bacterial strain, had the highest inhibitory control in bacterial trials (96.1%). No significant differences were shown in the fungi trials for diffusible metabolites efficacy. Commercial biocontrol product, based on *Streptomyces lydicus* WYEC108 had the highest inhibitory effect in diffusible metabolite trials (100%).

Keywords: biocontrol, wood diseases, *Streptomyces lydicus*, *Trichoderma harzianum*, *Paenibacillus* spp.

INTRODUCCIÓN

La uva de mesa (*Vitis vinifera* L.) es la especie frutícola de mayor importancia en Chile. En la actualidad, la superficie que alcanza esta especie en el país, sin considerar la dedicada para producción de vino, supera las 53.000 hectáreas, correspondiendo al 17,9% del total de hectáreas en producción del rubro frutícola (INE, 2007; ODEPA, 2014). Esta producción es requerida en su mayoría por el mercado externo, siendo Estados Unidos de América, China y los Países Bajos los principales destinos de esta fruta. Concentrando un 18,7% de los envíos del rubro, Chile es el principal país exportador de uva de mesa en el mundo y el noveno en lo que se refiere a producción (Bravo, 2013; FAO, 2008).

Los rendimientos por hectárea de fruta exportable fluctúan en torno a las 3000 cajas de 8,2 kilogramos, siendo los cultivares más producidos Thompson Seedless, Red Globe y Crimson Seedless. (Bravo, 2013, INDAP, 2009). No obstante lo anterior, una de las grandes limitantes en la producción de uva de mesa son las enfermedades causadas por fitopatógenos, las que producen pérdidas importantes tanto en los rendimientos como en la calidad de la fruta obtenida.

Esta relación es más compleja si se toma en cuenta que una de las fuentes de inóculo de ciertos patógenos, especialmente de aquellos que provocan enfermedades en la madera, es el material de propagación (Fourie y Halleen, 2006a).

A partir de la década de 1990, y coincidiendo con el establecimiento de varias plantaciones nuevas, se detectó un aumento en el decaimiento y muerte progresiva de plantas jóvenes ya desde el primer año de plantación. Esta situación, a su vez, se relacionó directamente con numerosos reportes de complejos fúngicos asociados a enfermedades de la madera (Ferro, 2008). La reducción en el cuidado sanitario del material de propagación; los cambios ocurridos en las prácticas de manejo culturales en viñas y parronales; y la baja efectividad de algunos productos en el control de los hongos asociados a estas enfermedades, pueden señalarse como causas directas de esta situación (Chiarappa, 2000 y Graniti *et al*, 2000 citados por Ferro, 2008; Fourie y Halleen, 2006a).

Reportado por primera vez en Chile en el verano del año 2006 por Auger *et al*, (2007), *Cylindrocarpon macrodidymum* Halleen, Schroers & Crous es uno de los patógenos que forma parte del complejo de hongos que causan la enfermedad del pie negro en vid (Halleen *et al*, 2007). Esta enfermedad se presenta con mayor frecuencia en viñas de entre dos y ocho años de edad causando ausencia o retraso en la formación de yemas, con una consiguiente reducción en el vigor. Además, se produce un acortamiento de los entrenudos y desecamiento, con posterior muerte, de algunos brazos. Otros síntomas incluyen decoloración de la corteza, producción de gomas al interior del xilema, lesiones necróticas en las raíces y reducción de la masa radical, la cual es compensada con un crecimiento anormal de raíces secundarias (Auger *et al*, 2007; Halleen *et al*, 2004; Halleen *et al*, 2005a).

Debido a que la infección de este hongo se produce principalmente en viveros durante el proceso de producción de plantas, el control de *Cylindrocarpon macrodidymum* es complejo, aún con el uso de agroquímicos (Halleen *et al*, 2007). A la fecha, las principales medidas de manejo que se han desarrollado para el control de este patógeno han estado basadas, principalmente, en el uso de termoterapia y el desarrollo de prácticas culturales, tales como la protección de heridas en los bloques de propagación, el poner un excesivo cuidado del proceso de corta y poda, evitar situaciones de estrés para las plantas, etc. (Ferro, 2008; Fourie y Halleen, 2006a).

En lo que respecta al control químico, inmersiones en fungicidas como captan, triadimefon, benomilo o iprodione han demostrado no ser del todo efectivas para el control de este patógeno (Hallen *et al*, 2005b; Fourie y Halleen, 2006b). En Francia, por otra parte, la prohibición de uso del arsenito de sodio debido a su alta toxicidad y el daño que provocaba al medio ambiente, eliminó una herramienta eficaz para el control de este hongo y de otras enfermedades de la madera (Bertsch *et al.*, 2013, Larignon *et al.*, 2008). A lo anterior es importante añadir que, pese las múltiples investigaciones destinadas a constatar el efecto de los fungicidas sobre este patógeno, ninguno de los resultados obtenidos han sido del todo concluyentes (Ferro, 2008). Por lo anterior, la búsqueda de alternativas de control que no estén limitadas por condiciones ambientales, ecológicas y económicas, ha tomado fuerza en los últimos años, abriendo una ventana de investigación de técnicas alternativas, tales como el control biológico (Herrera, 2005).

Control biológico

La definición de control biológico está asociada al concepto de población. Todo tipo de control biológico implica la introducción y manejo de poblaciones de enemigos naturales dentro de un ecosistema, con el fin de suprimir la actividad y disminuir las poblaciones de uno o más agentes patógenos (Pal y McSpadden Gardener, 2006; Van Driesche *et al*, 2008). Este antagonismo entre biocontrolador y patógeno puede ser directo (hiperparasitismo), indirecto (competencia, inducción de resistencia en el hospedero) o bien, puede ser un antagonismo de doble vía (producción de antibióticos, enzimas líticas, productos de desecho, interferencia química o física), dependiendo de las características de cada especie (Pal y McSpadden Gardener, 2006).

Diversas investigaciones, fundamentalmente con hongos del género *Trichoderma* y bacterias del género *Bacillus*, han confirmado el efecto de estos antagonistas sobre patógenos tales como *Rhizoctonia solani* Kühn, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Fusarium oxysporum* Schltdl. y *Sclerotium rolfsii* Sacc. (Larenas, 1993; Reyes, 2000; Santander, 2001; Donoso, 2003; González *et al*, 2004; Montealegre, 2005; Herrera, 2005). *Clonostachys rosea*, ha mostrado ser un biocontrolador efectivo en cultivos hortícolas contra hongos patógenos del suelo como *Phythium* spp. y *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Saccardo, además de tener un efecto controlador sobre enfermedades de semillas en cereales (Mamarabadi *et al*, 2008). En estudios realizados en viveros forestales de Chile, la aplicación de cepas seleccionadas de *Clonostachys rosea* (Link) Schroers, sobre plantas de *Pinus radiata* D. Don y *Eucalyptus globulus* Labill., tuvieron un efecto considerable en el control de *Botrytis cinerea* Pers. (Molina *et al.*, 2006).

Recientemente, se ha apuntado al uso de rizobacterias como agentes de control biológico, ya que no solo han probado ser efectivas en este aspecto: varios investigadores apuntan a que el uso de éstas promueve el crecimiento de las especies vegetales, protege el sistema radical de nuevas infecciones e induce resistencia sistémica contra varias enfermedades (Ramamoorthy *et al*, 2001; Ait Barka *et al*, 2002; Bae *et al*, 2004; Aballay *et al*, 2009).

El uso de antagonistas biológicos para el control de pie negro de la vid ha sido evaluado en diversas ocasiones con algunos resultados satisfactorios. González y Tello (2011) evaluaron diversos hongos endófitos aislados de plantas de vid sobre *Cylindrocarpon macrodidymum* con resultados auspiciosos. Edmonds *et al.* (2013), citados por Khorasani (2013), tuvieron resultados promisorios en ensayos *in vitro* entre diversos agentes de biocontrol comerciales (bacterianos y fúngicos) y varios aislados de *Cylindrocarpon* spp. En un estudio realizado por Fourie *et al* (2001), se disminuyó la incidencia de *Cylindrocarpon* spp. en conjunto con un aumento de la masa radical usando cepas seleccionadas de *Trichoderma* spp. Sin embargo, al usar una formulación comercial de *Trichoderma harzianum* Rifai, Halleen *et al* (2007) no lograron reducir los niveles de *Cylindrocarpon macrodidymum* por debajo del tratamiento control sin tratar. En un estudio realizado por Jang *et al.* (2011), se determinó que dos aislados de *Bacillus* spp. mostraron un grado de control significativo sobre cepas de *Cylindrocarpon destructans* (Zinsm.) Scholten aisladas de ginseng.

Considerando los antecedentes expuestos, los objetivos de esta Memoria de Título fueron:

Objetivo general

Determinar el nivel de control *in vitro* de cepas seleccionadas de *Cylindrocarpon macrodidymum* aisladas de *Vitis vinifera* mediante la utilización de diferentes especies de hongos y bacterias.

Objetivos específicos

- Caracterizar y seleccionar las cepas de *Cylindrocarpon macrodidymum* respecto a su temperatura de desarrollo y pH.
- Evaluar el nivel de control *in vitro* de distintas especies de hongos y bacterias sobre cepas de *Cylindrocarpon macrodidymum*.

MATERIALES Y MÉTODO

Para la ejecución se utilizaron las instalaciones, equipos y materiales con los que los laboratorios e invernaderos mencionados cuentan. Además, se utilizaron 9 cepas (26, 79, 92, 115, 117a, 117b, 122, 179 y 194) de *Cylindrocarpon macrodidymum* colectadas de plantas enfermas en parronales de uva de mesa de los valles de Copiapó y Huasco (Montealegre *et al*, 2009).

Lo hongos y bacterias que se utilizaron en esta investigación fueron los siguientes:

- Cepas de *Trichoderma spp.* (82a, 82b, 83, 84a, 84b, 84d y 85b) *Clonostachys rosea* (24a y 24b) aisladas de suelos cultivados con parronales de uva de mesa de los valles de Copiapó y Huasco;
- Cepas de *Trichoderma* Th 650 y los mutantes Th12 A10.1 (obtenido a través de radiación UV-A) y ThF 2-1 (obtenido a partir de fusión de protoplastos), pertenecientes del cepario del Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de Enfermedades.
- Cepas de rizobacterias *Serratia spp.* (6), *Micrococcus spp.* (14), *Pantoea spp.* (54), *Bacillus spp.* (69 y 83) y *Rahnella spp.* (203) aisladas de suelos cultivados con parronales de uva de mesa de los valles de Copiapó y Huasco;
- Dos cepas de *Bacillus spp.* (639) y dos de *Paenibacillus spp.* (629 y 640) obtenidas del cepario del Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de Enfermedades;
- Producto comercial Trichonativa ® y
- Producto comercial a base de *Streptomyces lydicus* WYEC108.

El antagonismo se determinó considerando las condiciones óptimas para el desarrollo del patógeno en cuanto a temperatura y pH. Los hongos antagonistas y las cepas de *Cylindrocarpon macrodidymum* fueron cultivadas en medio agar papa dextrosa (APD) y los antagonistas bacterianos, en Medio B de King, con excepción del producto comercial en base a *Streptomyces lydicus* WYEC108, el cual fue cultivado en medio APD.

Evaluación del rango óptimo de pH

Para determinar el efecto del pH sobre el desarrollo de las cepas de *Cylindrocarpon macrodidymum*, se hizo crecer micelio del patógeno en medio bajo distintos valores de pH, en un rango de ± 2 unidades, con intervalos de una unidad, tomando como base el pH del medio al momento de su preparación. Esto se efectuó adicionando gotas de HCl o NaOH al medio de cultivo APD al momento de la preparación. Posteriormente, se sembraron los hongos y se incubaron en cámara a temperatura de 22 °C. La evaluación se realizó tras 7 días de crecimiento, midiendo el radio de crecimiento con un pie de metro, determinando de esta manera el pH al cual todas las cepas tuvieron un mayor crecimiento (Luque, 1989; Donoso, 2003).

Evaluación del rango óptimo de temperatura

El efecto de la temperatura sobre el desarrollo del micelio de las cepas de *Cylindrocarpon macrodidymum* se determinó haciendo crecer las distintas cepas a 19°, 22°, 25° y 28° C, estableciendo así la temperatura a la cual todas las cepas tuvieron un mayor crecimiento. La evaluación se realizó 10 días después del establecimiento de los hongos en medio APD, usando un pie de metro para medir el radio de crecimiento de los patógenos (Lefevre y de Souza, 1993; Ferro, 2008)

Selección de cepas

En forma análoga a los ensayos anteriores, se seleccionaron las 3 cepas de *Cylindrocarpon macrodidymum* que presentaron el mayor radio de crecimiento promedio en todos los pH y temperaturas evaluadas (ver Apéndice I).

Pruebas de antagonismo

a) Antagonismo directo: hongo antagonista – hongo fitopatógeno a través de cultivos duales.

Dos discos de APD de 5 mm de diámetro, uno con el hongo fitopatógeno y otro con el hongo antagonista obtenidos de cultivos puros desarrollados, fueron colocados frente a frente a la misma distancia del centro de la placa (4 cm) (Figura 1). Luego, las placas se incubaron en cámaras de cultivo a la temperatura y pH óptimos definidos por el primer ensayo. Los tratamientos testigo consistieron sólo en discos con el hongo fitopatógeno sobre medio APD.

La evaluación se realizó tras 7 días de incubación, determinando el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (ICR) mediante la siguiente fórmula, acorde al protocolo planteado por Reaves y Craford (1994):

$$\text{ICR (\%)} = (1 - (C1/C2)) * 100$$

Donde C1 corresponde al mayor radio de crecimiento alcanzado por el tratamiento testigo y C2 se refiere al radio de crecimiento del patógeno hacia el antagonista.

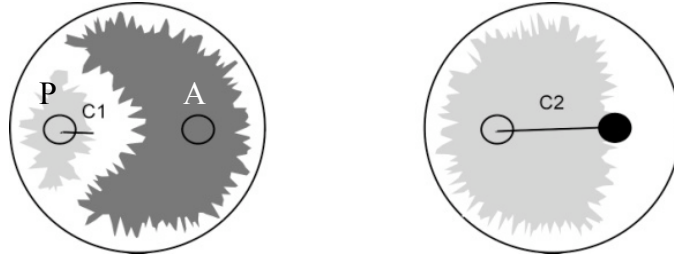


Figura 1. Interacción entre cultivos duales donde: P corresponde al patógeno; A corresponde al antagonista. La imagen de la derecha corresponde al tratamiento testigo.

b) Antagonismo directo: bacteria antagonista – hongo fitopatógeno.

Se realizó una suspensión de $1 \cdot 10^8$ UFC*mL⁻¹ en agua destilada estéril con un cultivo puro de bacteria de 24 horas de edad, desarrollada en medio B de King, tras lo cual, y con ayuda de un pincel previamente esterilizado, se depositó la suspensión formando una circunferencia equidistante al centro de la placa con medio de cultivo APD. En los tratamientos testigo la suspensión del antagonista bacteriano se reemplazó por agua destilada estéril (Reyes, 2000)

Posteriormente, se depositó en el centro de las placas un disco de micelio de 5 mm de diámetro proveniente de la zona de avance del crecimiento de cada cepa (Figura 2). En el caso del producto comercial en base *Streptomyces lydicus* WYEC108, el período de establecimiento de la bacteria sobre la placa con medio de cultivo APD, se extendió por 96 horas¹, en cámara de cultivo a 28°C, tras lo cual se depositó el disco de micelio en el centro de la placa.

Cuando el crecimiento de *Cylindrocarpon spp.* en las placas testigo alcanzó los depósitos de agua destilada estéril, se midió el radio de mayor crecimiento alcanzado por el patógeno en todas las placas. En este caso, el porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente fórmula (Reyes, 2000):

$$\% \text{ de Inhibición} = (1 - (\text{Crecimiento del hongo} / \text{Crecimiento del testigo}) \times 100)$$

¹ En base a ensayos realizados previamente. Jaime Montealegre, Ingeniero Agrónomo. Profesor del Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.

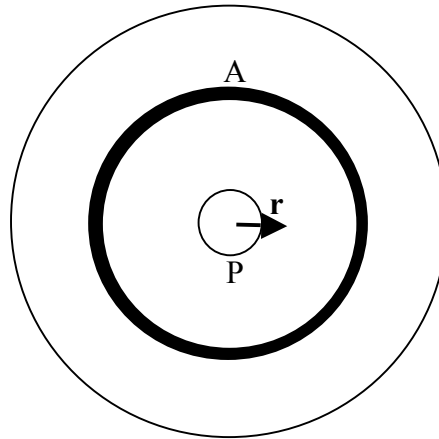


Figura 2. Interacción antagonista – patógeno donde: A corresponde a bacteria antagonista; P corresponde al patógeno; y r al radio de crecimiento

c) Evaluación de metabolitos difusibles: hongo antagonista – hongo fitopatógeno.

Acorde a lo señalado por Dennis y Webster (1971), las placas Petri con APD se cubrieron con discos de papel celofán (sin film impermeabilizante) previamente esterilizados en autoclave a 121°C por una hora. Sobre estos discos se depositó un disco de APD de 5 mm de diámetro obtenido de un cultivo puro del hongo antagonista

Antes de que el hongo antagonista alcanzara el borde del papel celofán, este se retiró con una pinza, antagonista incluido, cuidando de que éste y la superficie del medio APD no entraran en contacto. Sobre este medio se depositó un nuevo disco de APD de 5 mm de diámetro, esta vez obtenido de un cultivo puro del hongo fitopatógeno (Figura 3). Los tratamientos testigo consistieron sólo en discos con el hongo fitopatógeno sobre medio APD.

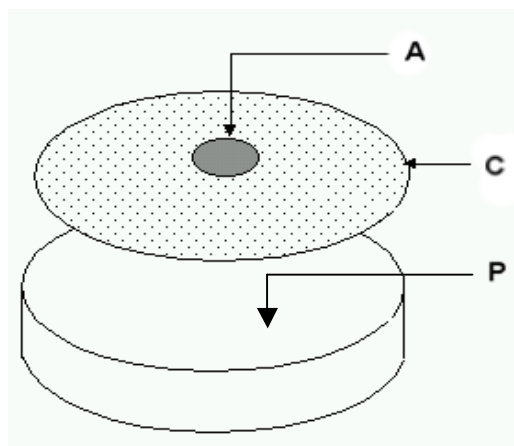


Figura 3. Interacción de metabolitos difusibles, donde: P corresponde al patógeno; A corresponde al antagonista; y C corresponde al papel celofán

Tras 7 días de crecimiento, se midió el radio de crecimiento del patógeno cultivado sobre el medio tratado con el hongo antagonista (C1) y se comparó con el radio de

crecimiento del tratamiento testigo (C2), calculando el %ICR mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ICR} = (1 - (C1 / C2)) * 100$$

d) Evaluación de metabolitos difusibles: bacteria antagonista – hongo fitopatígeno.

De manera similar al método anterior, y siguiendo el protocolo utilizado por Reyes (2000), sobre placas Petri tapizadas con filtro Millipore®, de 0,45µ de tamaño de poros, previamente esterilizado, se depositó una suspensión de la bacteria antagonista de $1 \cdot 10^8$ UFC*mL⁻¹, obtenida de un cultivo de 24 horas de edad. Esta suspensión se extendió sobre el filtro milipórico, usando un asa de acero inoxidable previamente esterilizada. En el caso del producto comercial en base a *Streptomyces lydicus* WYEC108., la suspensión de la bacteria antagonista se obtuvo de un cultivo de 96 horas de edad, y se dejó durante 48 horas sobre el filtro milipórico, en espera de la producción de metabolitos por parte de éste².

Tras 96 horas de incubación, se retiró el filtro milipórico junto al antagonista, tras lo cual se depositó en el centro de la placa Petri un disco de 5 mm de diámetro obtenido de la zona de avance del crecimiento de los cultivos de *Cylindrocarpon macrodidymum*.

96 horas después de montado el ensayo, se evaluó el crecimiento del hongo en las placas testigo y se comparó con el crecimiento de éste sobre el medio tratado con la bacteria antagonista, calculando el porcentaje de inhibición causado por el antagonista mediante la fórmula anteriormente señalada.

Análisis estadístico y diseño experimental

Para cada ensayo señalado, se realizaron cuatro repeticiones por cada combinación cepa patogénica/cepa antagonista. Los resultados, obtenidos en porcentaje, fueron modificados mediante la transformación angular de Bliss, los cuales se analizaron mediante análisis de varianza (ANDEVA) y, en caso de existir diferencias significativas entre ellos, se realizó la prueba LSD de Fisher, con la finalidad de encontrar la menor diferencia significativa entre los resultados.

Posteriormente, y con los valores promedio de inhibición del crecimiento radial, se definió mediante el análisis realizado anteriormente, cual bacteria y cual hongo tuvo mayor capacidad antagónica.

² En base a ensayos realizados previamente. Jaime Montealegre, Ingeniero Agrónomo. Profesor del Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Comunicación personal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación del rango óptimo de pH

Todas las cepas evaluadas crecieron en los pH $4,73\pm 0,2$, $5,73\pm 0,2$, $6,73\pm 0,2$ y $7,73\pm 0,2$. En el valor de pH $3,73\pm 0,2$, el medio de cultivo perdió sus características físicas, por lo que no se obtuvieron datos en ese rango.

Con excepción del pH $4,73\pm 0,2$, ninguno de los rangos de pH presentó diferencias significativas en el crecimiento promedio de las cepas evaluadas (Cuadro 1). Por lo anterior, y con el fin de simplificar la metodología de trabajo, se seleccionó el valor de pH $5,73\pm 0,2$ para el resto de los ensayos de esta memoria de título.

Cuadro 1. Evaluación del radio de crecimiento promedio de todas las cepas de *Cylindrocarpon macrodidymum* distintos valores de pH

Valor de pH	Radio de crecimiento promedio (cm)
$5,73\pm 0,2$	4,12 a
$6,73\pm 0,2$	4,01 a
$7,73\pm 0,2$	4,00 a
$4,73\pm 0,2$	3,41 b
$3,73\pm 0,2$	S/d

Letras distintas implican diferencias significativas entre los distintos valores según prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$). S/d: sin datos.

En un ensayo *in vitro* destinado a evaluar el efecto de la variación del pH sobre el crecimiento micelial de tres cepas de *C. macrodidymum*, Agustí-Brisach y Armengol (2012) encontraron similares rangos de crecimiento entre pH 4 y pH 8. Tanto estos datos como los obtenidos en esta memoria de título, se corresponden con lo indicado por Deacon (2006) (citado por Agustí-Brisach y Armengol, 2012), quien señala que los rangos de pH óptimo para el crecimiento micelial de la mayoría de los hongos se encuentran entre los valores evaluados.

Efecto del rango óptimo de temperatura

Todos los aislados crecieron a todas las temperaturas evaluadas, existiendo diferencias significativas entre todas ellas, siendo 25°C la temperatura óptima para el desarrollo de las distintas cepas de *Cylindrocarpon macrodidymum* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Evaluación del radio de crecimiento promedio de todas las cepas de *Cylindrocarpon macrodidyma* distintos valores de temperatura.

Temperatura (° C)	Radio de crecimiento promedio (cm)
25	6,23 a
22	5,64 b
19	4,74 c
28	1,90 d

Letras distintas implican diferencias significativas entre los distintos valores según prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

Estos datos son comparables con los analizados por Halleen *et al.* (2003) y Auger *et al.* (2007), quienes sitúan el óptimo de crecimiento a los $\pm 25^{\circ}\text{C}$ y confirmados por Ferro (2008), quién situó el óptimo de temperatura de 56 aislados de *C. macrodidymum* entre 20 y 25 °C.

Selección de cepas

Las cepas seleccionadas para los ensayos de antagonismo directo y metabolitos difusibles fueran las cepas 26, 179 y 194 (ver Apéndice I).

Antagonismo directo: hongo antagonista – hongo fitopatógeno, a través de cultivos duales.

a) Cepa 26

Todos los antagonistas inhibieron el crecimiento de la cepa 26, siendo las cepas *Trichoderma* 84a y *Trichoderma* 83 aquellas que tuvieron un mayor porcentaje de inhibición (78,71% y 77,64% respectivamente) y fueron significativamente diferentes al resto de las cepas antagonistas evaluadas. Entre la cepa 83 y la cepa 26, se presentó un leve halo de inhibición.

Las cepas que ejercieron menor inhibición sobre la cepa 26, fueron *Clonostachys rosea* 24a y 24b, con un 10,80% y un 9,17% de inhibición, respectivamente. (Cuadro 3)

Cuadro 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (ICR) por antagonismo directo de los antagonistas fúngicos evaluados sobre *Cylindrocarpon macrodidymum*, cepa 26.

Cepa	% ICR
Trichoderma 84a	78,71 a
Trichoderma 83	77,64 a
Trichoderma 82b	74,87 b
Trichoderma 84d	74,87 b
Trichoderma 82a	74,12bc
Trichoderma 85b	73,37bc
Trichoderma 84b	72,30 cd
Th12 A 10.1	71,36 d
Trichonativa ®	69,03 e
Th650	68,03 e
ThF 2-1	62,56 f
<i>Clonostachys rosea</i> 24a	10,80 g
<i>Clonostachys rosea</i> 24b	9,17 h

Letras distintas implican diferencias significativas entre los distintos valores según prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

b) Cepa 179

Tal como se muestra en el Cuadro 5, todas las cepas antagonistas evaluadas inhibieron el crecimiento radial de la cepa 179, siendo la cepa Trichoderma 84d aquella que tuvo un mayor porcentaje de inhibición (82,25%), formándose un halo de inhibición en la zona de contacto entre esta cepa y el patógeno. El porcentaje de inhibición de esta cepa fue significativamente superior al del resto de las cepas antagonistas evaluadas.

Las cepas *Clonostachys rosea* 24a y 24b fueron aquellas que presentaron un menor porcentaje de inhibición del crecimiento radial, con un 17,10% y un 13,41%, respectivamente (Cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (ICR) por antagonismo directo de los antagonistas fúngicos evaluados sobre *Cylindrocarpon macrodidymum*, cepa 179.

Cepa	%ICR
Trichoderma 84d	82,25 a
Trichoderma 82a	80,12 b
Trichoderma 84a	80,12 b
Trichoderma 83	79,27bc
Trichoderma 82b	78,69bc
Trichoderma 84b	78,17bc
Trichoderma 85b	77,78 cd
Trichonativa ®	76,10 de
Th12 A 10.1	75,06 e
Th650	66,90 f
ThF 2-1	66,84 f
<i>Clonostachys rosea</i> 24a	17,10 g
<i>Clonostachys rosea</i> 24b	13,41 h

Letras distintas implican diferencias significativas entre los distintos valores según prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

c) Cepa 194

Todas las cepas antagonistas ejercieron algún grado de inhibición sobre la cepa 194. Los porcentajes de inhibición del crecimiento radial de las cepas Trichoderma 82a (87,15%), Trichoderma 84a (85,81%) y Trichoderma 83 (85,55%) fueron los mayores entre todas las cepas antagonistas evaluadas y no presentaron diferencias significativas entre sí (Cuadro 5). En la zona de contacto de la cepa 83 con el patógeno, se formó un halo de inhibición.

Al igual que en los casos anteriores, las cepas *Clonostachys rosea* 24a y *Clonostachys rosea* 24b, fueron las que presentaron un menor porcentaje de inhibición del crecimiento radial, con un 25,77% y un 22,63% de inhibición, respectivamente.

Cuadro 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (ICR) por antagonismo directo de los antagonistas fúngicos evaluados sobre *Cylindrocarpon macrodidymum*, cepa 194.

Cepas	%ICR
Trichoderma 82a	87,15 a
Trichoderma 84a	85,81 ab
Trichoderma 83	85,55 ab
Trichoderma 84d	84,08 bc
Trichoderma 82b	83,38 bc
Trichoderma 85b	82,61 cd
Trichoderma 84b	80,63 d
Trichonativa ®	73,59 e
Th12 A 10.1	72,12 ef
ThF 2-1	69,25 fg
Th650	67,84 g
<i>Clonostachys rosea</i> 24a	25,77 h
<i>Clonostachys rosea</i> 24b	22,63 i

Letras distintas implican diferencias significativas entre los distintos valores según prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

Los resultados de las evaluaciones para antagonismo directo, demostraron que todos los aislados de *Trichoderma* spp. tuvieron distintos grados de control sobre las tres cepas de *C. macrodidymum* seleccionadas, superando en todos los casos el 60% de inhibición del crecimiento radial.

De los aislados de *Trichoderma* spp., aquel grupo que tuvo mayor grado de inhibición sobre las cepas de *C. macrodidymum*, fue el de cepas obtenidas de la misma zona geográfica que las cepas patogénicas. Los mayores valores promedio de inhibición los tuvieron las cepas de *Trichoderma* spp. 84, 83 y 82a (ver Figura 4).

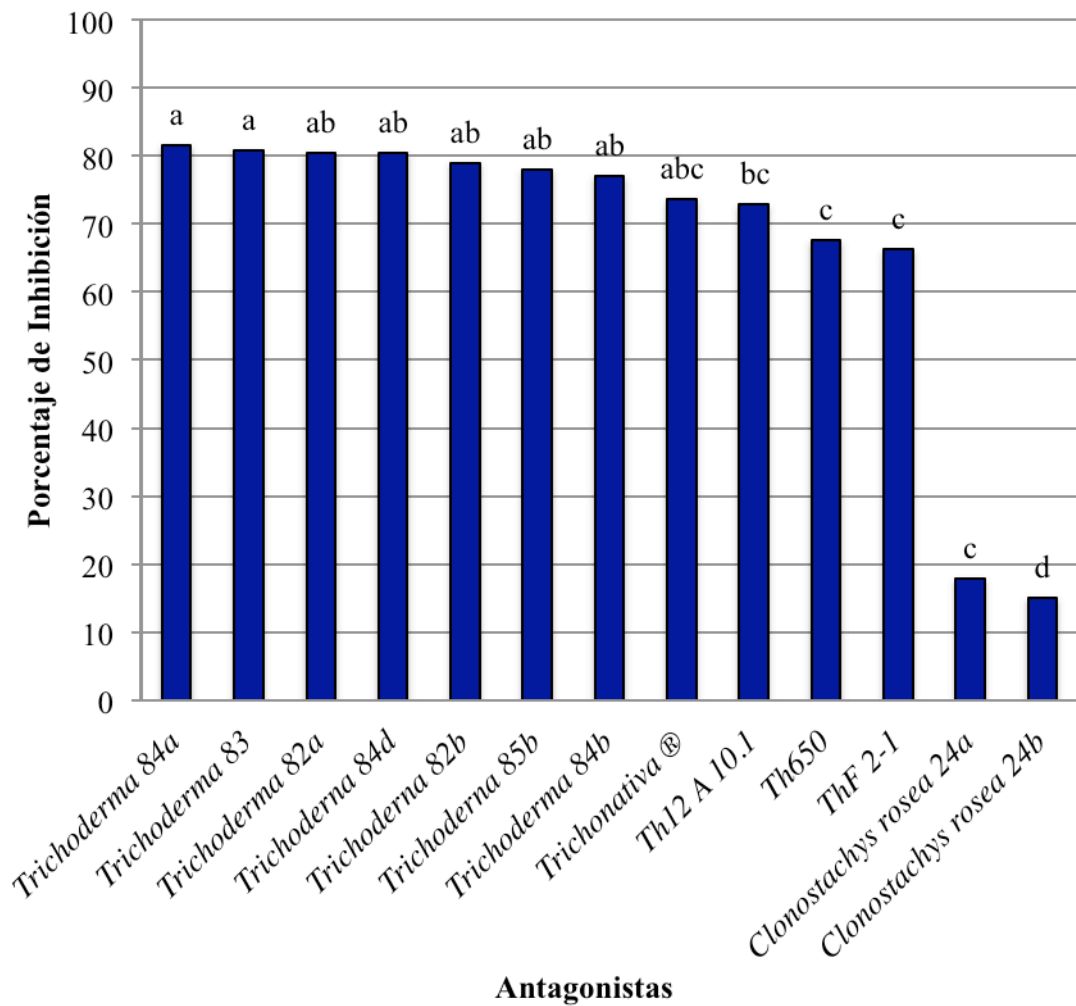


Figura 4. Promedio de porcentajes de inhibición del crecimiento radial (%ICR) para antagonismo directo por antagonistas fúngicos sobre cepas seleccionadas de *C. macrodidymum*. Letras distintas implican diferencias significativas entre los distintos valores según prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

En el caso de las cepas 83 y 84d, se presentó un halo de inhibición en la zona de contacto con los aislados de *C. macrodidymum* 26 y 179, respectivamente. El resto de las cepas de *Trichoderma* spp. utilizadas en este ensayo además del producto comercial Trichonativa®, crecieron sobre los aislados de *C. macrodidymum* seleccionados, cubriéndolos completamente, sin presentarse un área de inhibición entre ellos, lo que es interesante de resaltar para el caso de efectuar mezclas de diferentes cepas en futuras formulaciones a desarrollar.

Las diferencias existentes entre los 3 grupos de cepas de *Trichoderma* spp. (cepas obtenidas del cepario del Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de Enfermedades; cepas aisladas de la misma zona geográfica que los patógenos y el producto comercial Trichonativa®), podrían deberse a tanto a los distintos mecanismos de antagonismo que presenta este género, como al origen geográfico de estas cepas.

Trichoderma spp. es un hongo que tiene la capacidad de crecer rápidamente y competir por espacio, lo que contribuye a su habilidad de inhibir el crecimiento de los patógenos cuando se realizan ensayos en cultivos duales (Kucuk and Kivanc, 2004). Sin embargo, a este efecto pueden sumarse otros mecanismos de antagonismo directo e indirecto que actúan de manera conjunta a su crecimiento y potencian su acción biocontroladora. Al respecto, Howell (2003) indica que estos mecanismos son complejos, pero lo que define su acción antagonista, es el resultado de la acción sinérgica de ellos sobre el control de fitopatógenos.

Para Benítez *et al.* (2004), la acción antagónica de *Trichoderma* spp. es el resultado tanto de la competencia por nutrientes y espacio, como de la habilidad de este hongo para producir y/o resistir metabolitos que impiden la germinación de esporas o causan muerte celular. Así mismo, indica que el biocontrol puede ser resultado de una interacción directa entre el patógeno y el biocontrolador.

En un estudio *in vitro* con cultivos duales realizado por Kotze *et al.* (2011), se evidenció el efecto de varios mecanismos de biocontrol de *Trichoderma* spp. sobre diversos patógenos de enfermedades de la madera en vid. En aquellas placas donde las cepas de *Trichoderma* spp. crecieron sobre el patógeno, se observó microscópicamente enrollamiento y adhesión de hifas, lo que sería un claro indicio de micoparasitismo por parte de este hongo (Almeida *et al.*, 2007 citados por Kotze *et al.*, 2011). En los casos en que, a nivel macroscópico, se observaron zonas de inhibición entre los patógenos y los antagonistas, a nivel microscópico se evidenció desintegración de hifas. Ambas reacciones están relacionados con la habilidad de *Trichoderma* spp. de emitir metabolitos volátiles y no volátiles (John *et al.*, 2004 citados por Kotze *et al.*, 2011; Kucuk y Kivanc, 2004), tales como enzimas y antibióticos (Benhamou y Chet, 1997 citado por Kotze *et al.*, 2011).

Larralde-Corona *et al.* (2008), en ensayos con cultivos duales entre distintas especies de *Trichoderma* y *Macrophomina phaseolina*, también identificaron algunos de estos mecanismos, observando degradación de micelio y esclerocios, además de enrollamiento y formación de apresorios. Mediante el uso de microscopía electrónica, Alvindia y Natsuaki (2008) observaron enrollamiento entre *Trichoderma harzianum* y *Lasiodiplodia theobromae*, tras realizar un ensayo con cultivos duales entre estos dos hongos.

Aunque en los ensayos de antagonismo directo realizados pareciera existir evidencia de estos mecanismos de biocontrol (competencia, antibiosis, micoparasitismo y emisión de enzimas), las diferencias entre el grupo de aislados obtenidos de la misma zona geográfica y el resto de las cepas de *Trichoderma* spp. y el producto comercial Trichonativa® se debe, precisamente, a las ventajas que presentan los biocontroladores aislados desde el mismo hospedero o ambiente, en relación a aquellos ajenos a éste.

Para Stirling (1991) (citado por Affokpon *et al.*, 2011), el uso de aislados no nativos como agentes de biocontrol no es efectivo debido a la alta variabilidad en el control que estos aislados tienen sobre los fitopatógenos, ya que están menos adaptados a las condiciones climáticas y las especies locales. Peng y Sutton (1991) (citados por Mercader *et al.* 2006) y Sturz *et al.* (2000), han reforzado este punto, indicando que el

efecto de cepas biocontroladoras autóctonas u obtenidas del mismo ecosistema que las cepas patogénicas, siempre será mayor al de especies invasoras a él.

Para Ommati y Zaker (2012), la eficiencia en el biocontrol de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium* spp. puede variar en distintas regiones, debido a las diferencias agroclimáticas existentes en ellas. Así mismo, Otadoh *et al.* (2011) y Hajieghrari *et al.* (2008) (ambos citados por Ommati y Zaker, 2012), apuntan a que una cepa con una actividad antagonista muy alta contra un particular patógeno, puede no tener el mismo efecto sobre el mismo patógeno en otra región.

En ensayos realizado por Affokpon *et al.* (2011), 17 cepas del género *Trichoderma* aisladas de Benín (África Occidental) fueron comparadas en su actividad antagonista *in vitro* e *in vivo* con una cepa de *T. asperellum* aislada de Kenya (África Oriental). Para todos los parámetros evaluados (competencia en la rizósfera, efecto en el crecimiento de las plantas, rendimientos y grado de control), los resultados obtenidos por la cepa aislada de Kenya se encontraron bajo el promedio del total de cepas evaluadas.

En un ensayo *in vitro*, sobre una cepa de *Botrytis cinerea* obtenida de plantas de *Pinus radiata*, cuatro cepas nativas de *Trichoderma* spp. (aisladas del follaje de plantas de *Eucalyptus globulus* y *P. radiata*) Mercader *et al.* (2006) obtuvieron una disminución en la esporulación de un 78%, en relación al testigo. En ensayos *in vitro* de cultivos duales, Larralde-Corona *et al.* (2008), observaron una fuerte actividad hiperparasítica sobre *M. phaseolina* con aislados nativos de *Trichoderma* sp. y *Trichoderma koningiopsis*.

A pesar de que las cepas de *C. rosea* también fueron aisladas de la misma zona geográfica que las cepas de *Trichoderma* spp., éstas ejercieron un bajo porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de todas las cepas de *C. macrodidymum*.

Aunque *C. rosea* ha tenido efecto tanto *in vivo* como *in vitro* sobre la incidencia y esporulación de *Botrytis cinerea*, tanto en especies ornamentales (Morandi *et al.* 2000), forestales (Molina *et al.* 2006) y horticolas (Cota *et al.* 2008; Kapongo *et al.* 2008), no existen antecedentes de control por esta especie sobre *C. macrodidymum* u otras enfermedades de la madera.

Los resultados obtenidos en los ensayos de antagonismo directo, pueden tener explicación en la lenta velocidad de crecimiento de las cepas de *C. rosea* evaluadas.

Metabolitos difusibles: hongo antagonista – hongo fitopatógeno.

a) Cepa 26

Todas las cepas antagonistas evaluadas ejercieron algún grado de inhibición sobre la Cepa 26, sin superar el 20% de inhibición. Aunque no existieron diferencias estadísticas significativas entre ellas, las cepas de *Trichoderma* 84d (16,31%), *Trichoderma* 83 (16,08%) y *Clonostachys rosea* 24a (16,08%), tuvieron un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento radial (%ICR)

El producto comercial Trichonativa ® (11,58%) y la cepa ThF 2-1 (11,35%) fueron las que presentaron los menores %ICR, sin que existieran diferencias estadísticas significativas entre ellas ni con el resto de las cepas antagonistas evaluadas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (ICR) por metabolitos difusibles de los antagonistas fúngicos evaluados sobre *Cylindrocarpon macrodidymum*, cepa 26.

Cepa	% ICR
Trichoderma 84d	16,31 a
Trichoderma 82a	16,08 a
Trichoderma 83	16,08 a
Trichoderma 84a	15,83 a
Trichoderma 84b	14,89 a
<i>Clonostachys rosea</i> 24b	14,89 a
<i>Clonostachys rosea</i> 24a	14,65 a
Trichoderma 85b	14,65 a
Th12 A 10.1	14,18 a
Trichoderma 82b	13,00 a
Th650	11,59 a
Trichonativa ®	11,58 a
ThF 2-1	11,35 a

Letras distintas implican diferencias significativas entre los distintos valores según prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

b) Cepa 179

Las cepas Trichoderma 82a (19,01%), Trichoderma 83 (18,52%) y Trichoderma 84a (18,52%) fueron las que presentaron mayor porcentaje de inhibición de crecimiento radial. Por otra parte, las cepas antagonistas obtuvieron los menores porcentajes de ICR, fueron *Clonostachys rosea* 24b (13,33%) y *Clonostachys rosea* 24a (12,84%).

Como es posible apreciar en el Cuadro 7 no existieron diferencias estadísticas entre ningunas de las cepas antagonistas evaluadas.

Cuadro 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (ICR) por metabolitos difusibles de los antagonistas fúngicos evaluados sobre *Cylindrocarpon macrodidymum*, cepa 179.

Cepa	% ICR
Trichoderma 82a	19,01 a
Trichoderma 83	18,52 a
Trichoderma 84a	18,52 a
ThF 2-1	17,78 a
Trichoderma 84d	17,04 a
Trichonativa ®	16,30 a
Trichoderma 82b	16,30 a
Th12 A 10.1	15,80 a
Trichoderma 85b	15,06 a
Th650	14,82 a
Trichoderma 84b	14,32 a
<i>Clonostachys rosea</i> 24b	13,33 a
<i>Clonostachys rosea</i> 24a	12,84 a

Letras distintas implican diferencias significativas entre los distintos valores según prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

c) Cepa 194

Aunque todas las cepas antagonistas evaluadas ejercieron algún grado de inhibición sobre la Cepa 194, no existieron diferencias estadísticas significativas entre los porcentajes de ICR obtenidos por ellas.

En el Cuadro 8, es posible apreciar que las cepas que obtuvieron un mayor porcentaje de ICR fueron las cepas Trichoderma 82a y Trichoderma 83, con un 19,29% y un 19,07%, respectivamente. Las cepas con un menor porcentaje de ICR fueron *Clonostachys rosea* 24a (14,21%) y *Clonostachys rosea* 24b (14,19%).

Cuadro 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (ICR) por metabolitos difusibles de los antagonistas fúngicos evaluados sobre *Cylindrocarpon macrodidymum*, cepa 194.

Cepa	% ICR
Trichoderma 82a	19,29 a
Trichoderma 83	19,07 a
Trichoderma 82b	19,04 a
Trichoderma 84d	19,01 a
Trichoderma 84a	18,53 a
Th12 A 10.1	18,29 a
ThF 2-1	18,27 a
Trichonativa ®	18,27 a
Trichoderma 84b	17,01 a
Trichoderma 85b	16,75 a
Th650	15,74 a
<i>Clonostachys rosea</i> 24a	14,21 a
<i>Clonostachys rosea</i> 24b	14,19 a

Letras distintas implican diferencias significativas entre los distintos valores según prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

Al igual que en los ensayos por antagonismo directo, las cepas que tuvieron un mejor desempeño sobre la inhibición del crecimiento de las cepas de *C. macrodidymum*, se encontraron dentro del grupo de cepas de *Trichoderma* spp. obtenidas desde la misma zona geográfica que las cepas patogénicas. En términos generales, las cepas con mejor desempeño fueron las de *Trichoderma* 82a, 83 y 84a (Figura 5).

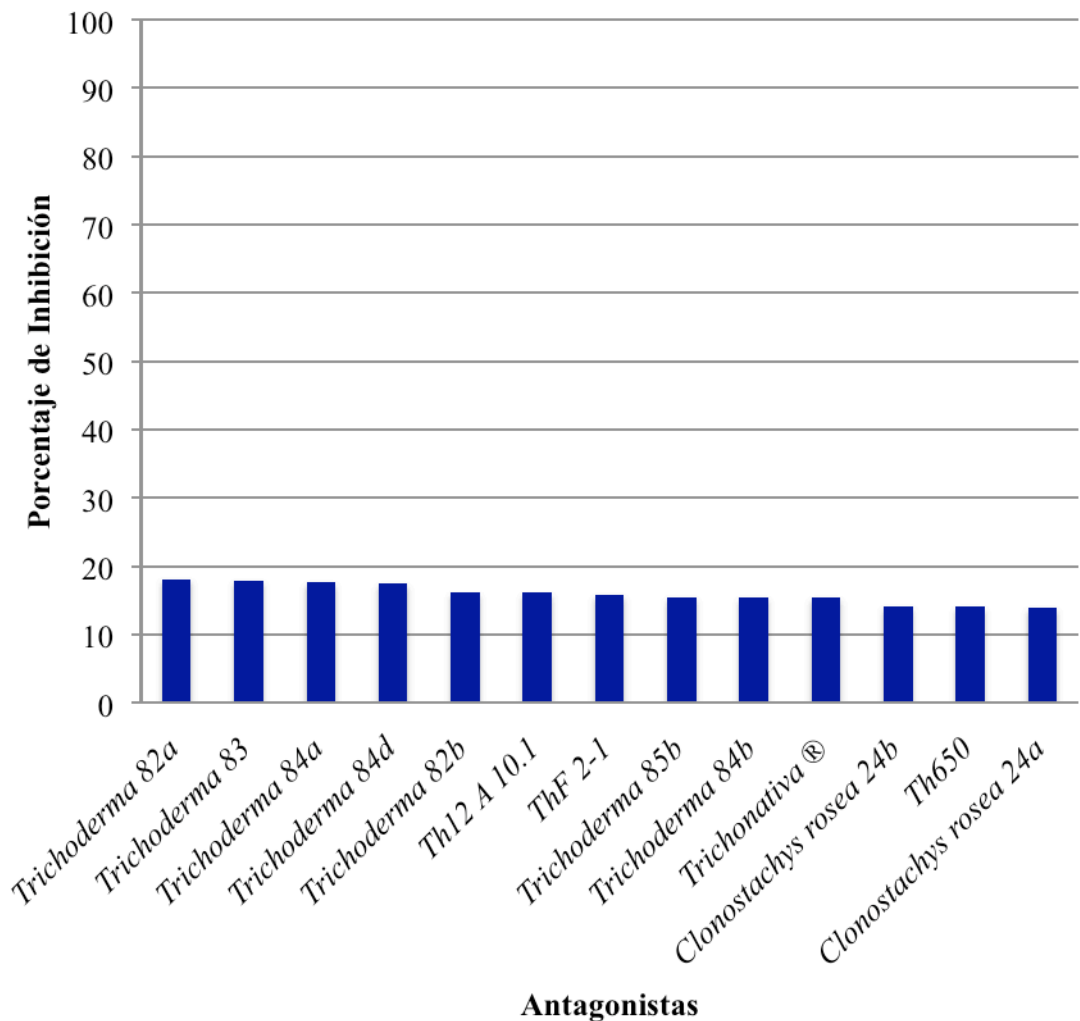


Figura 5. Promedio de porcentajes de inhibición del crecimiento radial (%ICR) para metabolitos difusibles de antagonistas fúngicos sobre cepas seleccionadas de *C. macrodidymum*. Letras distintas implican diferencias significativas entre los distintos valores según prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

Benítez *et al.* (2004), señalan que existen cepas de *Trichoderma* spp. capaces de producir metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles, que impiden el crecimiento y colonización de los microorganismos fitopatógenos. Estos metabolitos regulan tanto los mecanismos de antibiosis (mediante la secreción de antibióticos) como la acción lítica (mediante la secreción de enzimas) que puedan presentar algunas cepas de *Trichoderma* spp.

Con respecto a *Clonostachys rosea*, Mamarabadi *et al.* (2009) indican que los modos de acción de este biocontrolador aún no están bien entendidos, aunque existe evidencia que tanto la actividad enzimática, la competencia por sustrato y producción de metabolitos secundarios, juegan un rol fundamental en su acción antagonista.

Si bien, gran parte de los aislados tuvo un alto porcentaje de ICR en cultivos duales, cuando se realizaron los ensayos con metabolitos difusibles, ninguno de ellos fue más

efectivo que el otro en reducir el diámetro de crecimiento de las cepas patogénicas. Para Besoain *et al.* (2001) (citados por Pérez *et al.*, 2002) y Benítez *et al.* (2004), esto no indica que los aislados no sean capaces de producir estos metabolitos, sino a que las cepas evaluadas tienen la habilidad de usar diferentes mecanismos de biocontrol

Montealegre *et al.* (2005), caracterizaron la acción antagónica de la cepa Th650, determinando que para tres patógenos distintos (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Pyrenochaeta lycopersici* y *Rhizoctonia solani*), la cepa Th650 era capaz de secretar tres enzimas distintas, dependiendo del patógeno sobre el que ésta actuara. Al respecto, Pérez *et al.* (2002) apuntan que para la cepa Th650, estas diferencias en su acción enzimática, están mediadas por un conjunto de genes que se expresan de manera distinta para cada patógeno.

Howell (2003), señala que las enzimas y antibióticos involucrados en la actividad biocontroladora de *Trichoderma* están fuertemente influenciados tanto por el sustrato en el que el hongo crece, como por la temperatura a la cual se producen y tienen actividad estos metabolitos. Además, añade que aunque estos factores no niegan la actividad biocontroladora de este patógeno, sí pueden limitar su eficacia.

Aunque solo existen estudios sobre la actividad enzimática de la cepa Th650, es posible deducir que las diferencias existentes entre los porcentajes de ICR para antagonismo directo y metabolitos difusibles para los antagonistas fúngicos, están determinadas tanto por la diferencias en la expresión de genes de las distintas cepas de antagonistas; las diferencias existentes entre cada cepa de *C. macrodidymum*; y el efecto que pueda haber tenido la realización de las evaluaciones de metabolitos difusibles *in vitro*, con condiciones controladas que limitasen la actividad de estos.

Antagonismo directo: bacteria antagonista – hongo fitopatógeno.

a) Cepa 26

Todas las cepas antagonistas ejercieron algún grado de inhibición de *C. macrodidymum*, cepa 26. Los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento radial (ICR), lo obtuvieron el producto comercial en base a *Streptomyces lydicus* WYEC108 y la cepa *Paenibacillus* spp. 640, con un 88,3% y un 81,98% de control, respectivamente. Estos porcentajes de ICR no presentaron diferencias significativas entre sí y fueron significativamente mayores al del resto de las bacterias evaluadas.

Las cepas *Bacillus* spp. 69 (34,26%) y *Bacillus* spp. 639 (33,65%), fueron las que tuvieron un menor grado de control sobre la cepa 26 de *C. macrodidymum*, sin presentar diferencias significativas entre sí (ver Cuadro 11).

Cuadro 11. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (ICR) por antagonismo directo de los antagonistas bacterianos evaluados sobre *Cylindrocarpon macrodidymum*, cepa 26.

Cepas	%ICR
<i>Streptomyces lydicus</i> WYEC108	88,30 a
<i>Paenibacillus</i> spp. 640	81,98 a
<i>Serratia</i> spp. 6	65,91 b
<i>Paenibacillus</i> spp. 629	54,99 c
<i>Bacillus</i> spp. 83	50,72 c
<i>Pantoea</i> spp. 54	50,50 c
<i>Micrococcus</i> spp. 14	47,12 c
<i>Rahnella</i> spp. 203	46,62 c
<i>Bacillus</i> spp. 69	34,26 d
<i>Bacillus</i> spp. 639	33,65 d

Letras distintas implican diferencias significativas entre los distintos valores según prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

b) Cepa 179

Todas las cepas antagonistas evaluadas obtuvieron distintos grados de control sobre la cepa de *C. macrodidymum* 179. El producto comercial en base a *Streptomyces lydicus* WYEC108, fue aquel que tuvo un mayor grado de control sobre la cepa 179 de *C. macrodidymum*, con un 100% de inhibición del crecimiento radial (ICR). Este valor fue significativamente superior a las del resto de las bacterias antagonistas evaluadas.

Las cepas *Bacillus* spp. 69 y *Bacillus* spp. 649 fueron aquellas que obtuvieron un menor porcentaje de ICR, con un 36,61% y un 32,29%, respectivamente (Cuadro 12).

Cuadro 12. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (ICR) por antagonismo directo de los antagonistas bacterianos evaluados sobre *Cylindrocarpon macrodidymum*, cepa 179.

Cepas	%ICR
<i>Streptomyces lydicus</i> WYEC108	100,00 a
<i>Paenibacillus</i> spp. 640	79,98 b
<i>Pantoea</i> spp. 54	72,22 c
<i>Serratia</i> spp. 6	71,50 c
<i>Paenibacillus</i> spp. 629	68,48 cd
<i>Bacillus</i> spp. 83	66,77 cd
<i>Rahnella</i> spp. 203	62,74 de
<i>Micrococcus</i> spp. 14	58,47 e
<i>Bacillus</i> spp. 69	36,61 f
<i>Bacillus</i> spp. 639	32,29 f

Letras distintas implican diferencias significativas entre los distintos valores según prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

c) Cepa 194

Tal como se muestra en el Cuadro 13, todas las cepas antagonistas bacterianas evaluadas inhibieron el crecimiento radial de la cepa 194, siendo el producto comercial en base a *Streptomyces lydicus* WYEC108 aquel que tuvo un mayor porcentaje de inhibición (100%). El porcentaje de inhibición de esta cepa fue significativamente superior a las del resto de las cepas antagonistas bacterianas evaluadas.

Nuevamente, las cepas *Bacillus* spp. 639 (47,74%) y *Bacillus* spp. 69 (37,63%), fueron las que ejercieron el menor grado de control sobre la cepa 194 de *C. macrodidymum*.

Cuadro 13. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (ICR) por antagonismo directo de los antagonistas bacterianos evaluados sobre *Cylindrocarpon macrodidymum*, cepa 194.

Cepas	%ICR
<i>Streptomyces lydicus</i> WYEC108	100,00 a
<i>Paenibacillus</i> spp. 640	78,45 b
<i>Pantoea</i> spp. 54	74,06 bc
<i>Serratia</i> spp. 6	72,55 bcd
<i>Bacillus</i> spp. 83	71,11 bcd
<i>Micrococcus</i> spp. 14	64,64 cd
<i>Paenibacillus</i> spp. 629	61,93 de
<i>Rahnella</i> spp. 203	51,13 ef
<i>Bacillus</i> spp. 639	47,74 fg
<i>Bacillus</i> spp. 69	37,63 g

Letras distintas implican diferencias significativas entre los distintos valores según prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

En términos generales, el producto comercial en base a *Streptomyces lydicus* WYEC108 fue aquel que obtuvo el mayor porcentaje de inhibición entre todas las bacterias evaluadas, con un valor promedio de inhibición un 96,10%. Tras ella, las cepas *Paenabacillus* spp. 629 y *Serratia* spp. 6 fueron las que obtuvieron una mejor inhibición, con un valor promedio de inhibición de 80,14% y 69,99%, respectivamente (ver Figura 6).

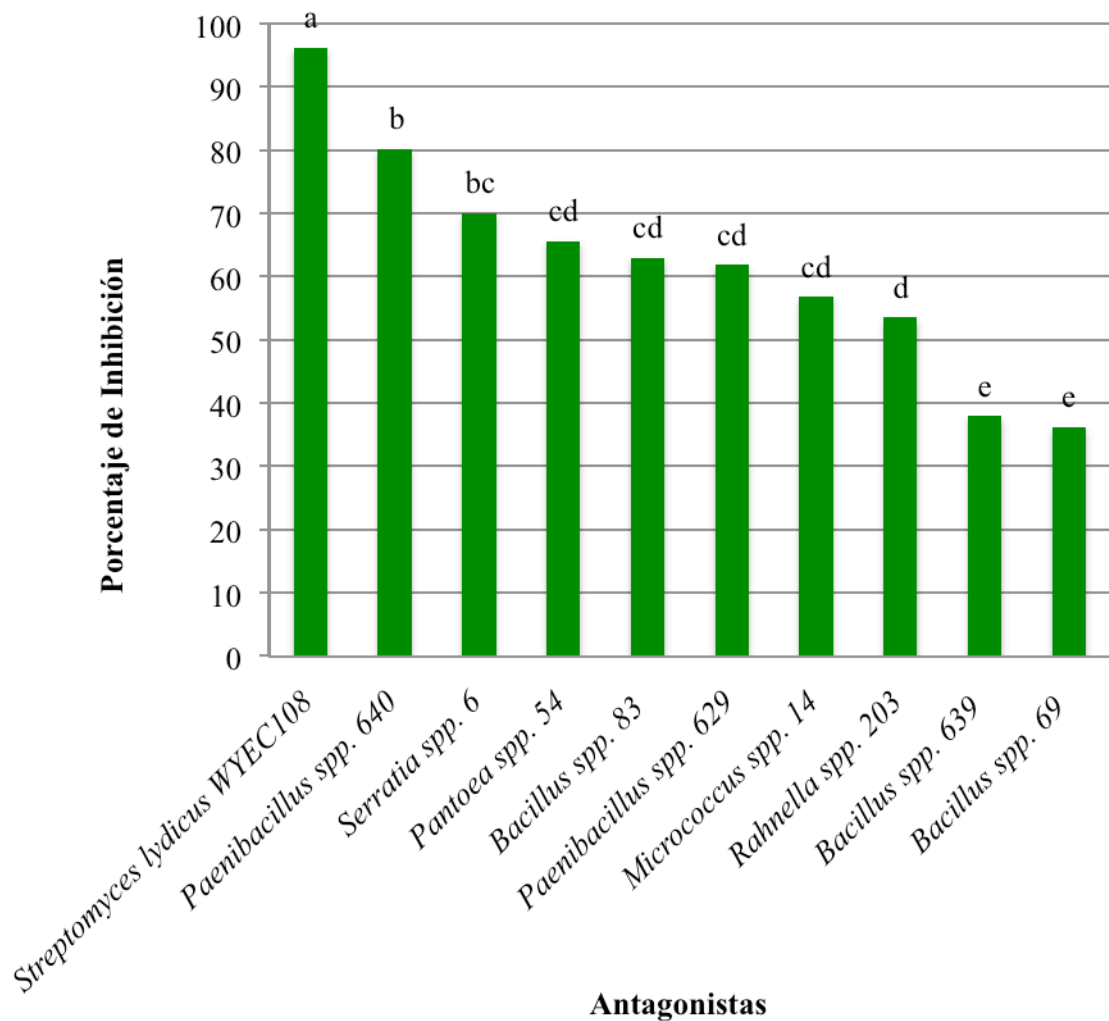


Figura 6. Promedio de porcentajes de inhibición del crecimiento radial (%ICR) para antagonismo directo por antagonistas bacterianos sobre cepas seleccionadas de *C. macrodidymum*. Letras distintas implican diferencias significativas entre los distintos valores según prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

En todos los casos, existió una zona de inhibición entre el patógeno y la bacteria antagonista. Para Jamalizadeh *et al.* (2009), la presencia de esta zona de inhibición en ensayos *in vitro*, evidencia la producción de metabolitos secundarios producidos por las bacterias. Compánt *et al.* (2013), apuntan que estos metabolitos pueden actuar de distintas maneras sobre los patógenos, ya sea fomentando el crecimiento bacteriano en detrimento del patógeno (competencia); o bien, causando lisis celular y/o bloqueando funciones específicas relacionadas al crecimiento del patógeno (antibiosis). Berg (2009), añade que *in vivo* estos metabolitos pueden, directa o indirectamente, estimular el crecimiento de las plantas.

González-Franco y Robles-Hernández (2009), señalan que *Streptomyces* spp. es una bacteria capaz de colonizar la superficie las raíces de las plantas, protegiéndola de la presión que los patógenos ejercen sobre ella. Además, destacan la habilidad de este

género para producir antibióticos y sintetizar enzimas extracelulares que permiten, respectivamente, la supresión del crecimiento de los hongos fitopatógenos así como la degradación de las paredes celulares de estos mismos.

Sepúlveda (2012), en ensayos *in vitro* con el mismo producto comercial en base a *Streptomyces lydicus* WYEC108 sobre cepas basidiomycotas, evidenció detención del crecimiento de éstas en el medio de cultivo y microscópicamente, adelgazamiento y deformación de hifas. Para Ferreira *et al.* (1991), estas malformaciones en el micelio son causadas por metabolitos que interfieren con el crecimiento normal del micelio.

En ensayos *in vitro* con la cepa de *Streptomyces lydicus* WYEC108 sobre diversos patógenos del suelo, Yuan y Crawford (1995) no encontraron cambios en la morfología de las hifas, aunque detectaron pérdida en la viabilidad de las cepas patogénicas evaluadas.

En ambos casos señalados, los efectos causados por la cepa *Streptomyces lydicus* WYEC108 serían indicadores de la actividad antifúngica de uno o más antibióticos (Yuan y Crawford, 1995) así como de la actividad de la enzima quitinasa (Mahadevan y Crawford, 1997, Quintana-Jones, 2011).

Paenibacillus sp. es un género que ha mostrado una alta capacidad antagónica para el control de fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, *Phythium* spp., *Cylindrocarpon destructans*, *Phytophthora cactorum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*, entre otros (Dijksterhuis *et al.* 1999, citados por Narayanasamy, 2013; Yang *et al.*, 2004; Bae *et al.*, 2004; Montealegre *et al.*, 2005).

McSpadden-Gardener (2004), señala la existencia de diversos aislados de *Paenibacillus* sp. capaces de producir toxinas que inhiben el crecimiento de algunos hongos patógenos. Narayanasamy (2013), dice que algunos de estos aislados son capaces de secretar metabolitos para el control de los patógenos, los cuales tienen la capacidad de degradar la pared celular e inhibir el desarrollo conidial, mediante la acción de antibióticos y enzimas.

En un ensayo realizado por Montealegre *et al.* (2003), para determinar si la acción antagónica de *Paenibacillus* spp. 640 estaba mediada por la secreción de enzimas, no se logró detectar la presencia de endoquitinasas, β -1,3-glucanasas o proteasas en el sobrenadante de medios de cultivo líquidos sobre los cuales se hizo crecer esta bacteria. Por lo mismo, se concluyó que el principal modo de acción de esta cepa era la producción de antibióticos.

Las diferencias en el tamaño de la zona de inhibición entre las distintas cepas evaluadas en este ensayo, dependen tanto de la movilidad de los distintos metabolitos producidas por ellas en el medio de cultivo, como de la complejidad y el número de estos (Etebarian *et al.*, 2005). Sin embargo, en los ensayos de antagonismo directo bacteria antagonista-hongo fitopatógeno realizados, las diferencias en el tiempo de incubación entre el producto comercial en base a *Streptomyces lydicus* WYEC108 y el resto de las cepas evaluadas, también es un factor a considerar para la evaluación de los resultados.

Este fenómeno ya había sido observado por Ait Barka *et al.* (2002), en ensayos con cultivos duales entre *Botrytis cinerea* y una bacteria antagonista. En ellos, los autores señalaron que, al cultivar simultáneamente ambos microorganismos, no existía inhibición por parte de la bacteria antagonista sobre el fitopatógeno. Sin embargo, cuando *B. cinerea* fue inoculada sobre el medio de cultivo 48 horas después que la bacteria antagonista, se pudo identificar claramente una zona de inhibición alrededor del hongo.

Prapagdee *et al.* (2008) en ensayos *in vitro* con una cepa de *Streptomyces* spp. sobre distintos hongos fitopatógenos, determinaron que, coincidiendo con la fase de crecimiento exponencial de la bacteria, la producción de metabolitos a las 48 horas de incubación fue significativamente mayor en relación a la producción de metabolitos a las 24 horas de incubación. Estos datos tienen relación con la expuesto por Froés *et al.* (2012), quienes en ensayos *in vitro* con una cepa de *Streptomyces* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum*, determinaron que la mayor producción de enzimas hidrolíticas por parte de la cepa biocontroladora, se obtuvo luego de tres días de incubación a 25°C. En lo que respecta a la producción de antibióticos, Couillerot *et al.* (2014) observaron que la mayor producción de estos para una cepa de *Streptomyces* spp. ocurría al cabo de 7 días de incubación a 28°C.

En el caso de *Paenibacillus* spp. y las demás cepas evaluadas en los ensayos de antagonismo directo, el punto de mayor producción de metabolitos difusibles es alcanzado con mayor rapidez. Tanto Monteiro *et al.* (2005) como Mageshwaran *et al.* (2011), observaron que el *peak* de actividad antimicrobiana de aislados de *Bacillus* spp. y *Paenibacillus* spp. se alcanzó entre las 48 y 60 horas de incubación, coincidiendo con la fase post-estacionaria de desarrollo bacteriano (Lee *et al.*, 2008 y Hassanein *et al.*, 2009, citados por Mageshwaran *et al.*, 2011).

Metabolitos difusibles: bacteria antagonista – hongo fitopatógeno.

a) Cepa 26

Todas las bacterias antagonistas ejercieron algún grado de inhibición sobre la cepa 26, siendo el producto comercial en base a *Streptomyces lydicus* WYEC108 el que presentó un mayor porcentaje de inhibición con respecto al resto de las cepas evaluadas (100%). Este valor fue significativamente diferente al resto de las cepas antagonistas evaluadas.

La cepa *Bacillus* spp. 69 fue la que tuvo el menor porcentaje de ICR, con un 40,89% (ver Cuadro 15).

Cuadro 15. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (ICR) por metabolitos difusibles de los antagonistas bacterianos evaluados sobre *Cylindrocarpon macrodidymum*, cepa 26.

Cepas	%ICR
<i>Streptomyces lydicus</i> WYEC108	100,00 a
<i>Paenibacillus</i> spp. 640	83,67 b
<i>Pantoea</i> spp. 54	80,33 b
<i>Serratia</i> spp. 6	71,02 c
<i>Micrococcus</i> spp. 14	69,67 c
<i>Paenibacillus</i> spp. 629	68,68 c
<i>Bacillus</i> spp. 83	67,28 c
<i>Rahnella</i> spp. 203	65,84 c
<i>Bacillus</i> spp. 639	45,37 d
<i>Bacillus</i> spp. 69	40,89 c

Letras distintas implican diferencias significativas entre los distintos valores según prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

b) Cepa 179

Todas las cepas antagonistas ejercieron algún grado de inhibición sobre la cepa 179. El porcentaje de inhibición del crecimiento radial del producto comercial en base a *Streptomyces lydicus* WYEC108 (100%), fue el mayor entre todas las cepas antagonistas evaluadas siendo, además, significativamente diferente al resto de los antagonistas evaluados (Cuadro 16).

Las cepas *Bacillus* spp. 639, *Bacillus* spp. 69 y *Bacillus* spp. 83, fueron las que presentaron un menor porcentaje de inhibición del crecimiento radial, con un 60,72%, un 59,08% y un 55,79% de inhibición, respectivamente. Ninguna de estas tres cepas presentó diferencias significativas entre sí.

Cuadro 16. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (ICR) por metabolitos difusibles de los antagonistas bacterianos evaluados sobre *Cylindrocarpon macrodidymum*, cepa 179.

Cepas	%ICR
<i>Streptomyces lydicus</i> WYEC108	100,00 a
<i>Paenibacillus</i> spp. 640	93,21 b
<i>Serratia</i> spp. 6	87,42 c
<i>Pantoea</i> spp. 54	78,24 d
<i>Rahnella</i> spp. 203	75,11 de
<i>Micrococcus</i> spp. 14	69,64 ef
<i>Paenibacillus</i> spp. 629	69,00 f
<i>Bacillus</i> spp. 639	60,72 g
<i>Bacillus</i> spp. 69	59,08 g
<i>Bacillus</i> spp. 83	55,79 g

Letras distintas implican diferencias significativas entre los distintos valores según prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

c) Cepa 194

Todas las cepas antagonistas evaluadas ejercieron algún grado de control sobre la cepa 194 de *C. macrodidymum*.

En el Cuadro 17, es posible apreciar que la cepa que obtuvo un mayor porcentaje de ICR y que presentó diferencias significativas con el resto de las cepas fue, al igual que en los casos anteriores, el producto comercial en base a *Streptomyces lydicus* WYEC108, con un 100% de inhibición. Las cepas con un menor porcentaje de ICR fueron *Paenibacillus* spp. 640 (59,07%), *Bacillus* spp. 639 (57,71%) y *Micrococcus* spp. 14 (56,81%), las cuales no presentaron diferencias significativas entre sí.

Cuadro 17. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (ICR) por metabolitos difusibles de los antagonistas bacterianos evaluados sobre *Cylindrocarpon macrodidymum*, cepa 194

Cepas	%ICR
<i>Streptomyces lydicus</i> WYEC108	100,00 a
<i>Paenibacillus</i> spp. 640	88,46 b
<i>Pantoea</i> spp. 54	83,50 b
<i>Serratia</i> spp. 6	72,07 c
<i>Rahnella</i> spp. 203	68,52 c
<i>Bacillus</i> spp. 83	68,41 c
<i>Bacillus</i> spp. 69	66,33 c
<i>Paenibacillus</i> spp. 629	59,07 d
<i>Bacillus</i> spp. 639	57,71 d
<i>Micrococcus</i> spp. 14	56,81 d

Letras distintas implican diferencias significativas entre los distintos valores según prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

Al igual que en los ensayos por antagonismo directo, el antagonista que tuvo un mejor desempeño sobre la inhibición del crecimiento de todas las cepas de *C. macrodidymum*, fue el producto comercial en base a *Streptomyces lydicus* WYEC108. Las cepas *Paenibacillus* spp. 640 (88,45%) y *Pantoea* spp. 54 (80,69%), también tuvieron un buen desempeño, superando el 80% de ICR en promedio (Figura 7).

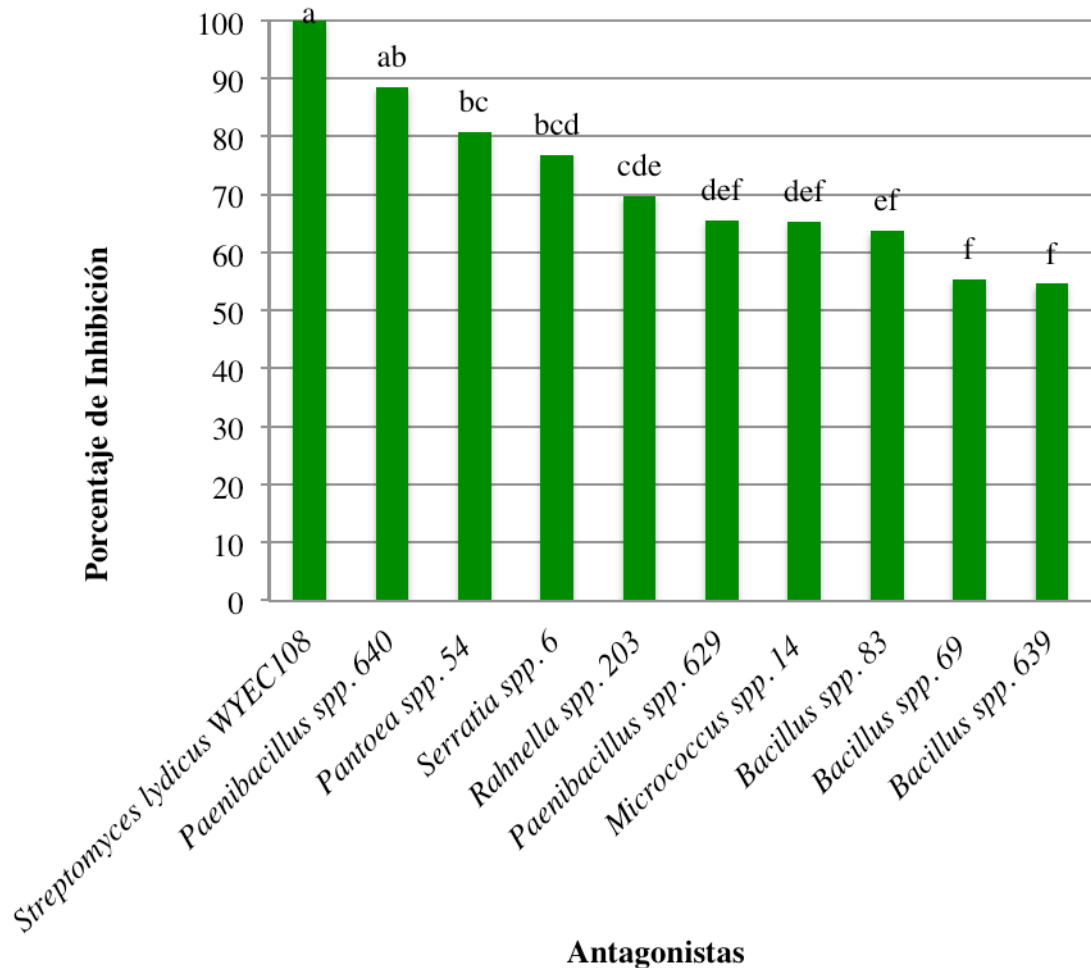


Figura 7. Promedio de porcentajes de inhibición del crecimiento radial (%ICR) para metabolitos difusibles de antagonistas bacterianos sobre cepas seleccionadas de *C. macrodidymum*. Letras distintas implican diferencias significativas entre los distintos valores según prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

Según Compánt *et al.* (2005), el rol de los metabolitos secundarios es crucial para determinar el potencial antagonico de las bacterias antagonistas. Al respecto, señala que los distintos antibióticos producidos por las bacterias antagonistas como la caracterización de la actividad enzimática de éstas, aportan un mayor espectro de herramientas para el control de hongos fitopatógenos.

Los resultados obtenidos en los ensayos de metabolitos difusibles, apuntan a que el

modo de acción de las cepas evaluadas estaría mediado, principalmente, por la producción de metabolitos secundarios, ya que el valor promedio de ICR obtenido en estos ensayos fue significativamente mayor al obtenido por antagonismo directo (datos no mostrados). De esta manera, lo expuesto con anterioridad respecto al modo de acción puntual del producto comercial en base a *S. lydicus* WYEC108 y la cepa *Paenibacillus* spp. 640, queda confirmado.

CONCLUSIONES

De la investigación realizada y acorde con la metodología utilizada, se desprenden las siguientes conclusiones:

En relación a la caracterización de las cepas de *Cylindrocarpon macrodidymum*, todas las cepas son capaces de crecer entre los pH 5,7 y 7,7 sin que existan diferencias significativas entre los diámetros de crecimiento.

Todas las cepas de *C. macrodidymum* son capaces de crecer en todas las temperaturas evaluadas (19°C, 22°C, 25°C y 29°C).

Todos los antagonistas fúngicos y bacterianos utilizados en esta memoria de título, ejercieron algún grado de inhibición del crecimiento de las cepas de *C. macrodidymum* evaluadas, tanto en antagonismo directo como en metabolitos difusibles. En términos generales, el grupo de cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de la misma zona geográfica que las cepas de *C. macrodidymum*, presentaron un grado de inhibición mayor que el resto de los antagonistas.

Las cepas con mayor porcentaje de ICR promedio sobre las cepas de *C. macrodidymum* son *Trichoderma* 84a y el producto comercial en base *Streptomyces lydicus* WYEC108.

Los resultados obtenidos en esta memoria de título permitirán establecer las bases para futuros ensayos *in vivo* y en el campo, que permitan establecer mejores medidas de control para evitar los síntomas asociados a la enfermedad del pie negro en la vid.

BIBLIOGRAFÍA

- ABALLAY, E.; PERSSON, P.; MARTENSSON, A. 2009. Rhizobacteria associated to *Vitis vinifera* root systems and its effects on the parasitism caused by *Xiphinema index*. XV Congreso Latinoamericano y XVIII Congreso Chileno de Fitopatología. Libro de Resúmenes: 242.
- AFFOKPON, A.; COYNE, D.L.; HTAY, C.C.; AGBÈDÈ, R.D.; LAWOUIN, L. COOSEMANS, J. 2011. Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. *Soil Biology & Biochemistry* 43: 600-608.
- AGUSTÍ-BRISACH, C. y ARMENGOL, J. 2012. Effects of temperature, pH and water potential on mycelial growth, sporulation and chlamydospore production in culture of *Cylindrocarpon* spp. associated with black foot of grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 51 (1): 37-50.
- AIT BARKA, E.; GOGNIES, S.; NOWAK, J.; AUDRAN, J.C.; BELARBI, A. 2002. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biological Control*: 135-142.
- ALVINDIA, D.G. y NATSUAKI, K.T. 2008. Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana fruit surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. *Crop Protection* 27: 1200-1207.
- AUGER, J.; ESTERIO, M.; PÉREZ, I. 2007. First report of black foot disease of grapevine caused by *Cylindrocarpon macrodidymum* in Chile. *Plant Disease* 91 (4): 470.
- BAE, Y.S.; PARK, K.; KIM, C.H. 2004. *Bacillus* spp. as biocontrol agents of root rot and phytophthora blight on ginseng. *Plant Pathology Journal* 20 (1): 63-66.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CODÓN, A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249-260.
- BERG, G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology Biotechnology* 84: 11-18.
- BERTSCH, C., RAMÍREZ-SUERO, M., MAGNIN-ROBERT, M., LARIGNON, P., CHONG, J., ABOU-MANSOUR, E., SPAGNOLO, A., CLÉMENT, C. y FONTAINE, F. (2013). Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology* 62 (2): 243-265.
- BRAVO, J. 2013. Uva de mesa: se confirma liderazgo exportador mundial de Chile. Artículo ODEPA Disponible en:

<http://www.odepa.cl/odepaweb/publicaciones/doc/11258.pdf> Fecha de visita: 14/03/2014.

COMPÁNT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, C., CLÉMENT, C.; AIT BARKA, E. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (9): 4951 – 4959.

COMPÁNT, S.; BRADER, G.; MUZAMMIL, S.; SESSITSCH, A.; LEBRIHI, A.; MATHIEU, F. 2013. Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. *BioControl* 58: 435-455.

COTA, L.V.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.; MACEDO, P.; ANTUNES, R. 2008. Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. *Biological Control* 46: 515-522.

COUILLEROT, O.; LOQMAN, S.; TORIBIO, A.; HUBERT, J.; GANDNER, L.; NUZILLARD, J.M.; OUHDOUCH, Y.; CLÉMENT, C.; AIT BARKA, E.; RENAULT, J.H. 2014. Purification of antibiotics from the biocontrol agent *Streptomyces anulatus* S37 by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography B* 944: 30-34.

DENNIS, C. y WEBSTER, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society* 57: 25-39.

DONOSO, M. 2003. Control biológico de *Fusarium* spp. en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mediante antagonistas fungosos. Memoria de Título de Ing. Agrónomo. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 78 p.

ETEBARIAN, H.R.; SHOELBERG, P.; EASTWELL, C.J.; SAYLER, R. 2005. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Microbiology* 51: 591-598.

FAO. 2008. Top ten grape producers. FAOStat. Economic and Social Department: The Statistical Department. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#anchor> . Fecha de visita: 01/05/2009

FERREIRA, J.H.S.; MATTHEE, F.N.; THOMAS, A.C. 1991. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 81: 283-287.

FERRO, S.A. 2008. Caracterización y control de *Cylindrocarpon* spp. agente causal del pie negro de la vid. Tesis doctoral. Valencia, Universidad Politécnica de Valencia. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. 184p.

FOURIE, H.P. y HALLEEN, F. 2006a. Sanitary control measures against trunk disease pathogens in grapevine nurseries. *Wynboer: A Technical Guide for Wine Producers* 94.

[En línea] Disponible en:
 <<http://www.wynboer.co.za/recentarticles/200610sanitary.php3>> Fecha de visita:
 23/09/2009

FOURIE, H.P.; HALLEEN, F.; VAN DER VYVER, J.; SCHREUDER, W. 2001. Effect of *Trichoderma* treatments in the roots and rootstocks of nursery grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 40: 473-478.

FOURIE, H.P. y HALLEEN, F. 2006b. Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 116: 255-265.

FROÉS, A.; MACRAE, A.; ROSA, J.; FRANCO, M.; SOUZA, R.; SOARES, R.; COELHO, R. 2012. *Journal of Microbiology* 50 (5): 798-806.

GONZÁLEZ-FRANCO, A.C. y ROBLES-HERNÁNDEZ, L. 2009. Actinomycetes as biological control agents of phytopathogenic fungi. *Technociencia Chihuahua* 3 (2): 64-73.

GONZÁLEZ, R.; MONTEALEGRE, J. y HERRERA, R. 2004. Control biológico de *Fusarium solani* en tomate mediante el empleo de los antagonistas *Paenibacillus lentimorbus* y *Trichoderma* spp. *Ciencia e Investigación Agraria* 31(1): 21-28

GONZÁLEZ, V. y TELLO, M. 2011. The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity* 47: 29-42.

HALLEEN, F.; CROUS, P.W.; PETRINI, O. 2003. Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. *Australasian Plant Pathology* 32: 47-25.

HALLEEN, F.; FOURIE, H.P.; CROUS, P.W. 2005a. Black foot disease of grapevine: Summary of research in South Africa. *Wynboer: A Technical Guide for Wine Producers* 106. [En línea] Disponible en:
<http://www.wynboer.co.za/recentarticles/200512blackfoot.php3>. Fecha de visita:
 23/09/2009.

HALLEEN F.; FOURIE H.P.; CROUS, P.W. 2005b. Proactive management of black foot disease in South African grapevine nurseries. *Phytopathologia Mediterranea* 44: 118.

HALLEEN, F.; FOURIE, H.P.; CROUS, P.W. 2007. Control of black foot disease in grapevine nurseries. *Plant Pathology* 56: 637-645.

HALLEEN, F.; SCHROERS, H.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. 2004. Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylorcarpon* gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). *Studies in Mycology* 50: 431-455.

HERRERA, R. 2005. Control biológico de *R. solani*, *F. oxysporum*, *F. lycopersici* y

Fusarium solani en tomate bajo condiciones de invernaderos. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Disponible en: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/14.html. Fecha de visita: 13/06/2009.

HOWELL, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolutions of current concepts. *Plant Disease* 87: 4-10.

INDAP. 2009. Uva de mesa: Análisis de mercado nacional e internacional. Servicio de información para la agricultura familiar campesina. Disponible en: http://beta1.indap.cl/Docs/Documentos/Vitivinicultura/Pisco/mercado_nacional_e_internacional_uvas.doc . Fecha de visita: 02/05/2009.

INE. 2007. Superficie con frutales en plantación compacta o industrial y huertos caseros en formación y producción, según región y especie. VII Censo Agropecuario y Forestal. Disponible en: http://www.censoagropecuario.cl/noticias/08/6/xls/2007/10_rev.xls. Fecha de visita: 01/05/2009

JAMAZILADEH, M.; ETEBARIAN, H.R.; AMINIAN, H; ALIZADEH, A. 2009. Evaluation of *Bacillus* spp. as potential biocontrol agent for postharvest gray mold control on Golden Delicious apple in Iran. *Journal of Plant Protection Research* 49 (4): 405-409.

JANG, Y; KIM, S.G., KIM, Y.H. 2011. Biocontrol efficacies of *Bacillus* species against *Cylindrocarpon destructans* causing Ginseng root rot. *Plant Pathol. J.* 27 (4): 333-341.

KAPONGO, J.P; SHIPP, L.; KEVAN, P.; SUTTON, J.C. 2008. Co-vectoring of *Beauveria bassiana* and *Clonostachys rosea* by bumble bees (*Bombus impatiens*) for control of insect pests and suppression of grey mould in greenhouse tomato and sweet pepper. *Biological Control* 46: 508-514.

KHORASANI, M. 2013. *Cylindrocarpon* Species in Pacific Northwest Douglas-fir Nurseries: Diversity and Effects of Temperature and Fungicides on Mycelial Growth. PhD Thesis. University of Washington. 88 p.

KOTZE, C.; VAN NIEKERK, J.; MOSTERT, L.; HALLEEN, F. y FOURIE, P. 2011. Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Pytopathologia Mediterranea* 50: 247-263.

KUCUK, C. y KIVANC, M. 2004. *In vitro* antigunfal activity of strains of *Trichoderma harzianum*. *Turkish Journal of Biology* 28: 111-115.

LARENAS, C. 1993. Control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en frejol mediante *Trichoderma harzianum* V. Memoria de Título de Ing. Agrónomo. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 64 p.

LARIGNON, P., DARNE, G., MENARD, E., DESACHE, F. y DUBOS, B. 2008.

Comment agissait l'arsénite de sodium ser l'esca de la vigne? Le Progrés Agricole et Viticole 125 (23): 642-651.

LARRALDE-CORONA, C.P.; SANTIAGO-MENA, M.R.; SIFUENTES-RINCÓN, A.M.; RODRÍGUEZ-LUNA, I.C.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, M.A.; SHIRAI, K.; NARVÁEZ-ZAPATA, J.A. 2008. Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. Appl. Microbiol. Biotechnol. 80: 167-177.

LEFEVRE, A.F. y DE SOUZA, N.L. 1993. Determinação da temperatura letal para *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* e efecto da solarização sobre a temperatura do solo. Summa Phytopathologica 19 (2): 107-112.

LUQUE, J. 1989. Efectos de la temperatura, medio de cultivo y pH en el crecimiento colonial de *Diplodia mutila* Fr. Apud Mont. Anales Jard. Bot. Madrid 46 (1): 215-221.

MAGESHWARAN, V.; WALIA, S.; GOVINDASAMY, V.; ANNAPURNA, K. 2011. Antibacterial activity of metabolite produced by *Paenibacillus polymyxa* strain HKA-15 against *Xanthomonas campestris* pv. phaseoli. Indian Journal of Experimental Biology 49: 229-233.

MAHADEVAN, B. y CRAWFORD, D.L. 1997. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. Enzyme and Microbial Technology 20 (7): 489-493.

MAMARABADI, M.; JENSEN, D.F.; LÜBECK, M. 2009. An N-acetyl- β -D-glucosaminidase gene, *cr-nag1*, from the biocontrol agent *Clonostachys rosea* is up-regulated in antagonistic interactions with *Fusarium culmorum*. Mycological Research 113: 33-43.

MOLINA, G.; ZALDÚA, F.; GONZÁLEZ, G.; SANFUENTES, E. 2006. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales de Chile. Bosque 27 (2): 126-134.

MONTEALEGRE, J.; REYES, R.; PÉREZ, L.M.; HERRERA, R.; SILVA, P.; BESOAIN, X. 2003. Selection of antagonists to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. Electronic Journal of Biotechnology 2 (2). Disponible en <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol6/issue2/full/8> Fecha de visita: 22/10/2013.

MONTEALEGRE, J. 2005. Perspectivas y situación del uso de biofungicidas en Chile. Santiago, Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Disponible en: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/1.htm l. Fecha de visita: 14/06/2009.

MONTEALEGRE, J.; HERRERA, R.; VELASQUEZ, J. C.; SILVA, P.; BESOAIN, X. y PÉREZ, L. M. 2005. Biocontrol of root and crown rot in tomatoes under greenhouse conditions using *Trichoderma harzianum* and *Paenibacillus lentimorbus*. Additional

effect of solarization. *Electronic Journal of Biotechnology* 8 (3): 249-257

MONTEALEGRE, J.; ABALLAY, E.; GARCIA-JIMENEZ, J.; RIVERA, L.; ARMENGOL, J.; FIORE, N.; PINO, A.M. 2009. Hongos y fitopatógenos asociados al sistema radical en uva de mesa en la III Región de Chile. XV Congreso Latinoamericano y XVIII Congreso Chileno de Fitopatología. Libro de Resúmenes: 248.

MONTEIRO, L.; MARIANO, R.L.R.; SOUTO-MAIOR, A.M. 2005. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48 (1): 23-29.

MORANDI, M.A.B; SUTTON, J.C. y MAFFIA, L.A. 2000. Effects of host and microbial factor son development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. *European Journal of Plant Pathology* 106: 439-448.

NARAYANASAMY, P. 2013. Biological Management of Diseases of Crops. Volume 1: Characteristics of Biological Control Agents. 600 p.

ODEPA, 2014. Frutales: Superficie y producción. Estimación ODEPA (cifras sujetas a revisión). Disponible en: <http://www.odepa.cl/frutales-superficie-y-produccion-2/> Fecha de visita: 15/03/2014.

OMMATI, F. y ZAKER, M. 2012. Evaluation of some *Trichoderma* isolates for biological control of potato wild disease (*Fusarium oxysporum*) under laboratory and greenhouse conditions. *Journal of Crop Protection* 1 (4): 279-286.

PAL, K. K. y MCSPADDEN GARDENER, B. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor* DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-0

PENG, G. y SUTTON, J. 1991. Evaluation of microorganisms for biological control of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 13: 247-257.

PÉREZ, L.M.; BESOAIN, X.; REYES, M.; PARDO, G.; MONTEALEGRE, J. 2002. The expression of extracellular fungal cell wall hydrolytic enzymes in different *Trichoderma harzianum* isolates correlates with their ability to control *Pyrenochaeta lycopersici*. *Biological Research* 35 (3-4): 401-410.

PRAPAGDEE, B.; KUEKULVONG, C.; MONGKOLSUK, S. 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Sciences* 4 (5): 330-337.

QUINTANA-JONES, A. 2011. Evaluation of drip applications and foliar sprays of the biocontrol product Actinovate® on powdery mildew and other fungal diseases of tomato. Magister of Science in Agriculture Thesis. California Polytechnic State Univerisity. 69p.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM,

- V.; SAMIYAPPAN, R. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection* 20: 1-11.
- REAVES, J. L. y CRAWFORD, R. H. 1994. *In vitro* colony interactions among species of *Trichoderma* with inference toward biological control. United States Department of Agriculture, Forest Service (Pacific Northwest Research Station), 8 p.
- REYES, R. 2000. Control biológico de *Rhizoctonia solani* (Kühn) en tomate (*Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten) mediante el empleo de antagonistas bacterianos. Memoria de Título Ing. Agr. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 81 p.
- SANTANDER, C. 2001. Control biológico de *Rhizoctonia solani* (Kühn) en *Lycopersicon esculentum* Mill. mediante *Bacillus lentimorbus* y *Trichoderma* spp. Memoria de Título de Ing. Agrónomo. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 88 p.
- SEPÚLVEDA, C. 2012. Efecto *in vitro* de antagonistas en cepas de basidiomycotas aislados de vid (*Vitis vinifera* L.) con síntomas de degradación de la madera. Memoria de título de Ing. Agrónomo. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 46 p.
- STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R. y NOWAK, J. 2000. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences* 19 (1): 1-30.
- VAN DRIESCHE, R.; HODDLE, M. y CENTER, T. 2008. Control of pests and weeds: An introduction to biological control, pp: 3-6. Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom. 450 p.
- YANG, J; KHARBANDA, P.D.; MIRZA, M. 2004. Evaluation of *Paenibacillus polymyxa* pkb1 for biocontrol of *Pythium* disease of cucumber in a hydroponic system. *Acta Horticulturae* 635: 59-66,
- YUAN, M.W. y CRAWFORD, D.L. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (8): 3119-3128.

APÉNDICE I

Selección de cepas

Al evaluar el promedio del crecimiento radial de cada una de las cepas en función de las temperaturas, ninguno de los aislados presentó diferencias significativas entre sí. Sin embargo, cuando el crecimiento radial fue comparado usando los datos obtenidos por el pH, existieron diferencias significativas entre algunas de las cepas evaluadas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Evaluación del radio promedio de crecimiento de cada cepa de *Cylindrocarpon macrodidymum* usando como parámetro el pH.

Cepas	Radio de crecimiento promedio (cms)
26	4,50 a
179	4,17 ab
194	3,93 b
79	3,84 b
92	3,78bc
117a	3,73bc
117b	3,72bc
122	3,31 c
115	3,28 c

Letras distintas implican diferencias significativas entre los distintos valores según prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

En el Cuadro 1, se puede apreciar que las tres cepas con mayor crecimiento radial fueron las cepas 26, 179 y 194. De estas tres cepas, solo la cepa 26 presentó diferencias significativas con todas las otras cepas utilizado, a excepción de la cepa 179, la cual solo fue mostró diferencias significativas con las cepas 122 y 125, al igual que la cepa 194.