

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**EVALUACIÓN DE BIOCONTROLADORES DE *Diplodia seriata*, EN
SARMIENTOS NO ENRAIZADOS DE UVA DE MESA CV. THOMPSON
SEEDLESS BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO.**

HECTOR ALEJANDRO TABILO OSORIO

SANTIAGO- CHILE

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**EVALUACIÓN DE BIOCONTROLADORES DE *Diplodia seriata*, EN
SARMIENTOS NO ENRAIZADOS DE UVA DE MESA CV. THOMPSON
SEEDLESS BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO.**

**EVALUATION OF BIOLOGICAL CONTROLLERS OF *Diplodia seriata*, IN
UNROOTED CANES THOMPSON SEEDLESS GRAPEVINES UNDER
LABORATORY CONDITION.**

HECTOR ALEJANDRO TABILO OSORIO

SANTIAGO- CHILE
2014

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

**EVALUACIÓN DE BIOCONTROLADORES DE *Diplodia seriata*, EN
SARMIENTOS NO ENRAIZADOS DE UVA DE MESA CV. THOMPSON
SEEDLESS BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO.**

Memoria para optar al título profesional de
Ingeniero Agrónomo

HECTOR ALEJANDRO TABILO OSORIO

PROFESOR GUIA

Sr. Jaime R. Montealegre A.
Ingeniero Agrónomo.

6,7

PROFESORES EVALUADORES

Sr. Jaime Auger S.
Ingeniero Agrónomo, M.S. Ph. D.

6,0

Sra. Loreto Prat del Rio
Ingeniero Agrónomo, Mg. Sc.

6,9

Santiago, Chile
2014

Calificaciones

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por haberme acompañado durante estos años de Universidad, por darme la tranquilidad y fuerza para seguir adelante.

Al proyecto FONDEF CA13I10035: Desarrollo de una herramienta eficaz de control biológico con efecto protector elicitador contra infecciones causadas por *Botryosphaeria* spp. en *Vitis vinífera*, que financió parcialmente esta memoria.

Agradezco la paciencia y dedicación de mi profesor guía sr. Jaime Montealegre, por estar siempre presente durante todo el desarrollo de esta memoria, así como a todas las personas del Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de Enfermedades, especialmente a Valeria Arriagada por su apoyo y tiempo. No puedo dejar de agradecer de igual forma a la profesora Luz María Pérez, por sus correcciones y palabras de aliento y apoyo. A todos ellos infinitas gracias.

A quienes son el pilar fundamental de mi vida, mi padre Hector Tabilo, a quien agradezco cada una de sus enseñanzas y valoro profundamente el esfuerzo por entregarme la mejor educación. A mi madre Eliana Osorio, por su amor y apoyo incondicional, por entender los momentos de estrés y por estar siempre conmigo. A mis hermanos Javier, Cristian y Matías quienes soportaron 5 años de conversaciones eternas sobre agronomía. A todos ustedes las personas que más amo en el mundo, muchas gracias.

En todo camino uno conoce a infinitas personas, todas ellas para bien o para mal, forman parte del camino y crecimiento personal. No puedo dejar de agradecer a aquellos que formaron parte de mi vida los últimos 5 años, mis amigos de estrés, estudio y carrete a quienes debo los mejores momentos que pase en la Universidad; Cony, Coca, Oscar, Wally, Hilda, Ciru, Paulis, Nacha y a todos con quienes compartí más que un saludo. A todos ustedes las mejores personas del mundo. Gracias.

Es imposible dejar de agradecer cuando en la vida, si bien gran parte de los logros dependen del esfuerzo personal, gran parte también la realizan quienes te rodean, quienes te corrigen, enseñan, ayudan, entienden o tan solo te acompañan. Abuelos, tíos, primos, amigos. Muchas gracias por formar parte de lo que hoy soy.

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
Objetivo General.....	3
Objetivo Especifico.....	3
MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
Lugar de estudio.....	4
MATERIALES.....	4
Cultivar.....	4
Obtención del Patógeno.....	4
Obtención de Antagonistas.....	4
Tratamientos.....	5
MÉTODOS.....	7
Aplicación de tratamientos.....	7
Evaluación.....	8
Diseño experimental.....	8
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
Aplicación de los tratamientos en el tiempo 1 y tiempo 2.....	9
Antagonistas bacterianos.....	11
Antagonistas Fungosos.....	12
Biocontrol en diferentes especies de Botyosphaeria spp.....	15
CONCLUSIONES.....	17
BIBLIOGRAFÍA.....	18
APENDICE I.....	23
Efectividad de fungicida.....	25
APENDICE II.....	25
Temperaturas y humedad relativa registradas durante la incubación del ensayo.....	25

RESUMEN

En los últimos años, la enfermedad descrita como “*Botryosphaeria dieback*”, se ha transformado en un grave problema al no existir un método de control químico efectivo, potenciando la búsqueda de alternativas de control biológico eficaces en limitar el daño provocado por patógenos de la madera de la vid. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar la acción de distintos biocontroladores sobre *Diplodia seriata*, que es el principal agente asociado en Chile al decaimiento y muerte del brazo de la vid. Se evaluaron distintos biocontroladores, fungosos (Trizian 1, Trizian 2, Closea 1, Producto comercial a base de *Trichoderma* spp. (*Trichoderma harzianum* cepa Queule, *T. virens* cepa Sherwood, *T. parceramosum* cepa Traile)) y bacterianos (Ballus 1, Ballus 2 y Producto comercial a base de *Streptomyces lydicus* WYEC 108). Estos tratamientos se compararon con un control químico a base de benomilo más mancozeb y controles inoculados y no inoculados con el patógeno. La evaluación se realizó mediante la determinación del índice de inhibición de la lesión en cada uno de los tratamientos. Se utilizaron sarmientos no enraizados de uva de mesa cv. Thompson Seedless, en los cuales se realizó una herida de 0,5 cm de diámetro. Una vez aplicados los tratamientos con los diferentes biocontroladores, se inocularon los sarmientos con un disco de micelio de *D. seriata*, cubriendo la zona de infección con parafilm. Los tratamientos fueron incubados por 30 días a una temperatura promedio de 20,3°C y una humedad relativa sobre el 98%. La inoculación con el patógeno se realizó en dos tiempos: 1 (tiempo 1) y 96 horas (tiempo 2) después de efectuados los tratamientos correspondientes. Los resultados mostraron que el mejor tratamiento fue el fungicida comercial con un 76,7% y 30,6% de eficacia tanto para el tiempo 1 como para el tiempo 2 respectivamente. Los mejores resultados de biocontrol con antagonistas bacterianos, se obtuvieron con el producto comercial a base de *Streptomyces lydicus* WYEC 108 y Ballus 2 con un índice de inhibición de 40,9% y 39,7%; menor porcentaje es el que obtuvo Ballus 1 alcanzando un índice de inhibición de 20%, en el tiempo 1. Los tratamientos en base a biocontroladores fúngicos que incluían *Trichoderma* spp.: producto comercial, Trizian 2 y Trizian 1, presentaron un índice de inhibición de 30,4%; 29% y 3,9% respectivamente en el tiempo 1, reduciendo a 0% la inhibición de *D. seriata* en el tiempo 2. A su vez Closea 1 logró un 20,3% de inhibición en el tiempo 1, siendo el único tratamiento que mejora su acción de biocontrol al aumentar el tiempo de inoculación del patógeno, alcanzando un 25,8% de inhibición en el tiempo 2.

Palabras clave: “*Botryosphaeria dieback*”, *Botryosphaeria obtusa*, Biocontrol.

ABSTRACT

In last years, the disease named "Botryosphaeria dieback", has been a serious problem due to ineffective chemical control methods. This has enhanced the search of effective biological control alternatives to limit the damage caused by trunk pathogens in grapevines. Therefore, the aim of this study was to evaluate the action of different biocontrollers on *Diplodia seriata*, which is the main agent of shoots decay and death in the vineyards of Chile. Several biocontrollers were evaluated, fungal (Trizian 1, Trizian 2, Closea 1, commercial product based on *Trichoderma* spp. (*Trichoderma harzianum* strain *Queule*, *T. virens* strain *Sherwood*, *T. parceramosum* strain *Traile*)) and bacterial (Ballus 1, Ballus 2 and commercial product based *Streptomyces lydicus* WYEC 108). These treatments were compared with a chemical control based on benomilo more mancozed and inoculated and uninoculated controls with the pathogen. The evaluation was made establishing the inhibition index of the lesion for each of the treatments. Unrooted canes of Thompson Seedless grapevines were used, in which a wound diameter of 0.5 cm was made. After applying the different biocontrollers treatments, the canes were inoculated with a mycelium disc of *D. seriata*, covering the area of infection with parafilm. Treatments were incubated for 30 days at 20.3°C on average and in a relative humidity above 98%. Inoculation with the pathogen was performed in two occasions: 1 (time 1) and 96 hours (time 2) after the corresponding treatments. The results showed that the best treatment was the commercial fungicide with 76.7% and 30.6% efficiency in time 1 and time 2, respectively. The best results of biocontrollers with bacterial antagonists were obtained with the commercial product based on *Streptomyces lydicus* WYEC 108 and Ballus 2 with an inhibition percentage of 40.9% and 39.7% respectively; the lowest percentage was the one managed with Ballus 1, reaching an inhibition index of 20% in time 1. Treatments based on fungal biocontrollers, as *Trichoderma* spp.: commercial product, Trizian 2 and Trizian 1 showed an inhibition percentage of 30.4%; 29% and 3.9% respectively at time 1, reducing to 0% inhibition of *D. seriata* in time 2. Closea 1 achieved a 20.3% inhibition at time 1, being the only treatment that enhanced the action as a biocontroller with increasing time of pathogen inoculation, reaching a 25.8% inhibition at time 2.

Key words: "Botryosphaeria dieback", *Botryosphaeria obtusa*, Biocontrol.

INTRODUCCIÓN

El área plantada con vid de mesa en Chile alcanza las 53.926 ha, liderando aún a las especies frutícolas plantadas a nivel nacional. Abarca cerca de un quinto de la superficie frutícola del país, siendo el cultivar Thompson Seedless el que cubre la mayor superficie plantada (ODEPA, 2010).

Dentro de las enfermedades, las denominadas “enfermedades de la madera de la vid” son responsables de pérdidas económicas importantes a nivel mundial. En los últimos años, la enfermedad descrita como “Muerte del brazo”, “Black dead arm” o recientemente denominada “*Botryosphaeria dieback*” (Urbez-Torres y Gubler, 2012), causada por una serie de hongos pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae, se ha transformado en un grave problema, al no existir actualmente un método de control efectivo (González y Tello, 2010; Urbez-Torres et al, 2012).

La presencia de distintas especies de *Botryosphaeria*, como agentes causales del decaimiento de la vid y muerte del brazo, coincidiendo con la misma sintomatología, decaimiento progresivo de la planta, defoliación y necrosis en forma de cuña en la madera (Van Niekerk, et al, 2006), ha sido informada en países como Francia (Larignon, et al, 2001), Portugal (Phillips, 2002), Chile (Auger, et al, 2004b), Regiones de Castilla y León, España (Urbez-Torres, et al, 2006a), California, USA (Urbez-Torres, et al, 2006b), Australia (Taylor, et al, 2005; Savocchia et al., 2007), México (Urbez-Torres, et al, 2008) e Italia (Burruano, et al, 2008; Linaldeddu, et al, 2010), entre otros.

La presencia de *Diplodia seriata*, anamorfo de *Botryosphaeria obtusa* (Phillips, et al, 2007), se informó hace algunos años en Chile, como principal agente asociado al brazo muerto y defoliación de la vid, evidenciando una presencia consistente en zonas con pudrición oscura en forma de cuña en la madera (Auger et al., 2005). Un estudio realizado en uva de mesa cv. Red Globe, informó que *B. obtusa* se aisló del 86% de las muestras recolectadas, de plantas que presentaban la misma sintomatología, en 12 localidades de las IV, V, VI y RM (Auger et al., 2004b). Este hallazgo demuestra la amplia distribución y el intenso ataque de esta especie. Estudios recientes confirman la presencia consistente de *D. seriata* en necrosis en forma de cuña en la madera, siendo considerado uno de los principales patógenos asociados al decaimiento de la vid (*Vitis vinífera*) en Chile (Díaz, et al., 2013). Por esta razón es de suma importancia la evaluación de nuevas formas de control para este patógeno.

La importancia del desarrollo de nuevas formas de control de las enfermedades de la madera de la vid, fundamentalmente se debe a la suspensión a nivel mundial de la utilización de uno de los fungicidas más efectivos en el control de estas patologías, que es el arsenito sódico, cuyo uso ha sido suspendido dada su alta toxicidad y daño al medio ambiente (Plata, 2010). Esta situación ha significado que el control de las diferentes enfermedades de la madera de la vid, se ha realizado con fungicidas patógeno-específicos,

excluyendo de esta forma a aquellos de amplio espectro, utilizados comúnmente como tratamientos invernales, cuya finalidad era la limpieza total del huerto, teniendo un control sobre las distintas especies de *Botryosphaeria* (Auger et al., 2004a). Dado lo anterior las opciones de tratamientos han sido en gran medida preventivas y se limitan principalmente a minimizar el riesgo de infección durante la poda. Las prácticas culturales más comunes radican en realizar podas en los periodos más secos, de manera de evitar las condiciones óptimas de desarrollo de este tipo de patógenos. También se emplea la eliminación de los restos de poda y de las plantas infectadas, para reducir las fuentes de inóculo en el campo (Epstein et al., 2008; González y Tello, 2010).

El método de control químico, sigue siendo a nivel mundial el más utilizado para el control de hongos patógenos de la madera de la vid. En los últimos años, se han evaluado fungicidas alternativos como sustitutos del arsenito sódico tales como dinitroortocresol, fenarimol, furmentamide, benodanil, fosetyl-Al y varios triazoles, los que no han sido plenamente efectivos (González y Tello, 2010). Estudios *in vitro* realizados en Sudáfrica evaluaron la eficacia de distintos fungicidas para el control de distintas especies de *Botryosphaeria*, concluyendo que productos como benomilo, tebuconazol, procloraz, cloruro de manganeso y flusilazol son eficaces para limitar la longitud de las lesiones producidas por el ataque de *Botryosphaeria* spp. (Denman et al., 2004; Bester et al., 2007). Otros investigadores en cambio, han demostrado que el uso de benomilo aplicado como pasta fungicida en cortes de poda, logra un 75% de protección frente a patógenos de la madera de la vid (Díaz y Latorre, 2011). No obstante lo anterior, el control químico es cada vez más cuestionado por las nuevas exigencias del mercado, que busca una producción amigable con el medio ambiente. Por este motivo la búsqueda de antagonistas biológicos eficaces para el control de hongos patógenos de la madera de la vid, es fundamental.

Solo recientemente se empieza a recomendar el uso de microorganismos en fase avanzada de investigación, como agentes de control de enfermedades de la madera de la vid. Estudios efectuados en los últimos años han evaluado varias cepas del género *Trichoderma*, las que han demostrado un alto grado de inhibición a la acción de estos hongos patógenos (Plata, 2010; Gramaje y Armengol, 2011; Montealegre y Pérez, 2013). Otras investigaciones están dirigidas al estudio de *Streptomyces*, que se caracteriza por ser una de las bacterias con más alto nivel de síntesis de antibióticos, lo que aumentaría su capacidad inhibidora del crecimiento de hongos fitopatógenos (Sarro et al., 2010). El estudio sobre posibles agentes de control biológico de las enfermedades de la madera de la vid en Chile, se ha centrado en el antagonismo que presentan *Trichoderma harzianum* cepas nativas y mejoradas y el uso de bacterias bioantagónicas que han mostrado buenos resultados en el control preventivo de enfermedades (Montealegre y Pérez, 2013). Por este motivo la evaluación de agentes de control biológico, tanto de origen fungoso como bacteriano para el control de *Diplodia seriata*, es un aporte en la búsqueda de controladores biológicos eficaces para limitar la lesión producida por este patógeno.

OBJETIVOS

Objetivo General

Establecer la eficacia del uso de antagonistas fungosos y bacterianos en el control de *Diplodia seriata*, en sarmientos no enraizados de uva de mesa cv. Thompson Seedless.

Objetivo Especifico

Evaluar el nivel de control de *D. seriata*, en sarmientos no enraizados de uva de mesa cv. Thompson Seedless, mediante la utilización de los antagonistas fungosos: Trizian 1, Trizian 2, Closea 1, Producto comercial a base de *Trichoderma* (*Trichoderma harzianum* cepa *Queule*, *T. virens* cepa *Sherwood*, *T. parceramosum* cepa *Traile*) y bacterianos: Ballus 1, Ballus 2 y producto comercial a base de *Streptomyces lydicus* WYEC 108.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

La presente memoria se realizó en las dependencias del Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de Enfermedades del Departamento de Sanidad Vegetal, de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

MATERIALES

Cultivar

La eficacia de los distintos antagonistas, fungosos y bacterianos, en el control de *Diplodia seriata*, se estableció utilizando sarmientos no enraizados de uva de mesa del cv. Thompson Seedless, de entre 1 - 1,5 cm de diámetro y de una longitud de 20 - 25 cm. Estos fueron colectados desde plantas sanas y vigorosas, injertadas sobre pie franco y conducidas bajo el sistema de parrón español, en el campo “El Resguardo” (ubicado en la comuna de Paine, Región Metropolitana), destinado a la producción de uva de mesa de exportación. Una vez colectados, los sarmientos fueron conservados en bolsas de polietileno, a una temperatura de 5° C y a una humedad cercana al 40%, hasta el momento de su utilización.

Obtención del Patógeno

La cepa de *D. seriata* se obtuvo de la colección de cultivos del Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de Enfermedades, del Departamento de Sanidad Vegetal. Previo a su utilización, se determinó la patogenicidad *in vivo*, desde donde había sido aislada. La cepa fue multiplicada en placas de Petri, en medio de cultivo agar papa dextrosa (APD) y cultivada por 7 días en una cámara de cultivo a una temperatura de 25 °C (Valderrama, 2013)

Obtención de Antagonistas

La elección de los antagonistas para el control de *D. seriata* se basó en el estudio *in vitro* realizado por Valderrama (2013), quien determinó que las mejores cepas bioantagónicas

bacterianas correspondían al producto comercial a base de *Streptomyces lydicus* WYEC 108, Ballus 1, Ballus 2 y fungosas al producto comercial a base de *Trichoderma* spp., Trizian 1, Trizian 2 y Closea 1. A excepción de los productos comerciales, los otros antagonistas, forman parte del cepario del Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de Enfermedades, de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile y fueron utilizados previa activación en medio APD, en el caso de los hongos y medio B de King en el caso de las bacterias (Schaad et al, 2001).

Trizian 1 y Trizian 2 se cultivaron por cuatro días a una temperatura de 28°C. Trizian 2 fue expuesto un día a la luz para generar conidias previo a su utilización. Closea 1 fue cultivado por 12 días a una temperatura de 28°C. Las bacterias (Ballus 1 y Ballus 2) fueron cultivadas por 2 dos días a una temperatura de 28°C.

Los antagonistas bacterianos fueron utilizados en forma de suspensión ($5 \cdot 10^9$ UFC·mL⁻¹), cuya concentración fue determinada mediante diluciones seriadas y uso de espectrofotómetro. Los hongos, se utilizaron en una concentración de $1 \cdot 10^6$ UFC·mL⁻¹, determinada mediante el uso de hemacitómetro (Montealegre, 1991). Los productos comerciales a base de *Streptomyces lydicus* y *Trichoderma* spp. fueron utilizados en la concentración recomendada por el fabricante, que corresponde a $1 \cdot 10^9$ UFC·mL⁻¹ y $1 \cdot 10^6$ conidias·mL⁻¹; utilizados en la dosis comercial de 0,9 mL y 100 mL en 1000 mL de agua estéril respectivamente.

Para comparar la eficacia de los distintos antagonistas con un control químico, se utilizó un fungicida cuyo ingrediente activo (i.a.) correspondió a benomilo más mancozeb, con una concentración de 6% y 20% respectivamente. El fungicida se utilizó en la dosis comercial que correspondió a 10 g en 1000 mL de agua estéril. Previo a la elección de la dosis del fungicida se realizó una prueba *in vitro* para probar la eficacia sobre *Diplodia seriata* (véase apéndice I).

Los antagonistas fungosos (Trizian 1, Trizian 2 y Closea 1) y bacterianos (*Ballus* 1 y *Ballus* 2) fueron formulados en mezcla con el adherente carboximetilcelulosa (CMC) (Nandakumar et al., 2001; Requía, 2012) a una concentración final de 0,5%.

Tratamientos

Los sarmientos tratados, fueron depositados en cámaras húmedas (bandejas plásticas de 15·24·6 cm, acondicionadas con agua estéril en el fondo, con la finalidad de mantener una humedad que facilite el desarrollo del patógeno). Los sarmientos fueron depositados sobre una malla rígida de polietileno, de manera de impedir el contacto directo de estos con el agua (Figura 1). Estos se incubaron por 30 días en una sala calefaccionada en completa oscuridad, a una temperatura promedio de 20,3°C (Foster, 1937 citado por Copes y Hendrix 2004) y humedad por sobre el 98%; temperatura y humedad fueron registradas cada una hora mediante la utilización de un Data Logger (véase registro de temperatura y humedad en el apéndice II).



Figura 1. Cámara húmeda.

Cuadro 1. Tratamientos realizados

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIÓN	FORMULACIÓN	DISCO DE INOCULACIÓN
Testigo positivo	---	agua estéril	<i>Diplodia seriata</i>
Testigo negativo	---	agua estéril	Agar Papa Dextrosa (APD)
Control químico Benomil + Mancozeb	Benomil 6% Mancozeb 20%	agua estéril	<i>Diplodia seriata</i>
Producto comercial 1 ACTINOVATE (<i>Streptomyces lydicus</i> WYEC 108)	$1 \cdot 10^9$ UFC·mL ⁻¹	agua estéril	<i>Diplodia seriata</i>
Ballus 1	$5 \cdot 10^9$ UFC·mL ⁻¹	CMC al 0,5%	<i>Diplodia seriata</i>
Ballus 2	$5 \cdot 10^9$ UFC·mL ⁻¹	CMC al 0,5%	<i>Diplodia seriata</i>
Closea 1	$1 \cdot 10^6$ UFC·mL ⁻¹	CMC al 0,5%	<i>Diplodia seriata</i>
Trizian 1	$1 \cdot 10^6$ UFC·mL ⁻¹	CMC al 0,5%	<i>Diplodia seriata</i>
Trizian 2	$1 \cdot 10^6$ UFC·mL ⁻¹	CMC al 0,5%	<i>Diplodia seriata</i>
Producto comercial 2 TRICHONATIVA (<i>Trichoderma</i> spp.)	$1 \cdot 10^6$ conidias·mL ⁻¹	agua estéril	<i>Diplodia seriata</i>

Los tratamientos fueron realizados a dos tiempos de inoculación con el patógeno: tiempo 1, la inoculación se realizó 1 hora después de aplicado el tratamiento y tiempo 2, el patógeno fue inoculado 96 horas después de aplicado el tratamiento.

MÉTODOS

Los sarmientos fueron cortados en sus extremos, procurando conservar el entrenudo de una longitud de 10-15 cm aproximadamente, para luego ser desinfectados con etanol al 70% (Savocchia et al., 2007), sumergiéndolos en dicha solución durante dos minutos.

Una vez desinfectados los sarmientos se realizó una herida en V de 0,5 cm de ancho y 0,5cm de profundidad aproximadamente en el centro del entrenudo (teniendo presente no llegar a la medula del sarmiento), mediante el uso de un bisturí estéril (Figura 2).



Figura 2. Herida en el centro del entrenudo.

Aplicación de tratamientos

Luego de realizar la herida se aplicaron los tratamientos seleccionados, mediante el uso de pinceles estériles (0,2 mL de solución de cada tratamiento por sarmiento aproximadamente), para inocular posteriormente los sarmientos con *D. seriata* al tiempo 1 (una hora post-tratamiento) o al tiempo 2 (96 horas post-tratamiento). La inoculación con el patógeno se realizó adhiriendo discos de micelio de 0,5 cm de diámetro sobre la zona de tratamiento. Posteriormente la zona inoculada fue cubierta con parafilm (Savocchia et al., 2007), y luego los sarmientos se depositaron en cámaras húmedas.

En el caso de los testigos positivo y negativo, se aplicó como tratamiento agua destilada estéril + CMC, para luego inocular con el disco de micelio del patógeno (testigo positivo) o

con un disco de APD (testigo negativo). En ambos casos se cubrió la zona de aplicación con parafilm y luego los sarmientos se dejaron en cámaras húmedas. Ambos tratamientos fueron efectuados en los tiempos 1 y 2.

Evaluación

La evaluación se realizó 30 días después de montado el ensayo. Se midió la longitud de la lesión en el entre nudo, en centímetros, utilizando un pie de metro. La eficacia de los distintos antagonistas utilizados se estableció mediante la determinación del índice de inhibición de cada sarmiento tratado, usando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de inhibición (\%)} = (1 - C1 \cdot C2^{-1}) \cdot 100$$

Dónde:

C1: Crecimiento del patógeno en presencia del biocontrolador.

C2: Crecimiento del patógeno en ausencia del biocontrolador.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado (DCA), de 10 tratamientos, aplicados en dos tiempos, con 5 repeticiones por tratamiento. Por lo tanto, la unidad experimental de este ensayo, correspondió a una cámara húmeda con 4 sarmientos tratados.

Los resultados fueron evaluados mediante la realización de un análisis de varianza (ANDEVA), utilizando el programa estadístico INFOSTAT.

Se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Fisher, previa transformación angular o de Bliss de los índices de inhibición obtenidos como resultado del ensayo.

Una vez finalizada la evaluación de los ensayos realizados (tiempo 1 y tiempo 2), se recuperó la cepa de *D. seriata*, desde cada uno de los tratamientos donde fue inoculada. Esta fue aislada de uno de los extremos del avance de la lesión y cultivada en medio APD, con el fin de determinar que la lesión en ambos ensayos y para cada uno de los tratamientos fue producida por *D. seriata* cumpliendo así con lo establecido en los postulados de Koch.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de este bioensayo, tanto la evaluación realizada en el tiempo 1 (inoculación 1 hora después de aplicado el tratamiento) como en el tiempo 2 (inoculación con el patógeno 96 horas después de aplicado el tratamiento), muestran el efecto de los distintos agentes de biocontrol (fungos y bacterianos), en limitar la longitud de la lesión provocada por *Diplodia seriata*. Sin embargo el tiempo transcurrido desde que se produce la lesión, hasta que se genera la infección por el patógeno, es fundamental para lograr el buen establecimiento y protección del biocontrolador, teniendo directa relación en la eficacia que pueda ejercer el agente de control biológico sobre el patógeno (Pitt, et al., 2012).

Aplicación de los tratamientos en el tiempo 1 y tiempo 2.

Cuadro 2. Índice de inhibición obtenido en el ensayo realizado en el tiempo 1 y tiempo 2.

Tratamientos	Índice de Inhibición				Variación en la eficacia *
	Tiempo 1		Tiempo 2		
	MEDIA	D.E	MEDIA	D.E	
	------(%)-----				
Control químico	76,7 a	7,1	30,6 a	7,7	-46,1
Producto comercial 1	40,9 b	12,7	0 b	0	-40,9
Ballus 2	39,7 b	13	29,5 a	6,1	-10,2
Producto comercial 2	30,4 b c	5,2	0 b	0	-30,4
Trizian 2	29,0 b c	4,3	0 b	0	-29
Ballus 1	20,3 c	7	1,3 b	2,2	-19
Closea 1	20,0 c	8,2	25,8 a	5,9	+5,9
Trizian 1	3,9 d	3,3	0 b	0	-3,9
<i>p</i> -valor	< 0,0001		< 0,0001		

Índices de inhibición, expresados en porcentaje. Tratamientos unidos por la misma letra, no presentan diferencias estadísticamente significativas. Según prueba de Fisher (p -valor < 0,05).

*Variación calculada de la diferencia entre las medias obtenidas en el tiempo 1 y tiempo 2 para cada uno de los tratamientos.

Los ensayos evaluados en el tiempo 1 y tiempo 2, muestran un bajo nivel de control ejercido por los distintos antagonistas (fungos y bacterianos) en limitar la longitud de la lesión producida por *D. seriata*, en comparación con el porcentaje de inhibición del control químico, que resultó ser, bajo estas condiciones el mejor tratamiento, con un índice de inhibición de 76,7% y 30,6% respectivamente (Cuadro 2). A pesar de haber resultado el mejor tratamiento, en ambos tiempos de inoculación, el control químico no cumple las

expectativas de inhibir en un 100% la acción del patógeno, como ocurrió en la prueba *in vitro* realizada con el fungicida (véase resultado prueba *in vitro* en el apéndice I). Los resultados de este bioensayo, coinciden con otros estudios realizados en donde el uso de benomil aplicado como pasta fungicida sobre los cortes de poda logra sobre un 75% de protección (Díaz y Latorre, 2013).

El fungicida resultó ser el tratamiento que mayor pérdida de eficacia presenta al aumentar el tiempo de inoculación con el patógeno a 96 horas, logrando una pérdida porcentual de 46,1 (Cuadro 2). La pérdida de eficacia del fungicida conforme pasa el tiempo (Arauz y Sutton, 1990), muestra una de las principales debilidades del uso de productos de síntesis química en la protección de heridas de poda, atribuyendo un mayor potencial a la estabilidad y persistencia en la eficacia que presentan algunos agentes de biocontrol.

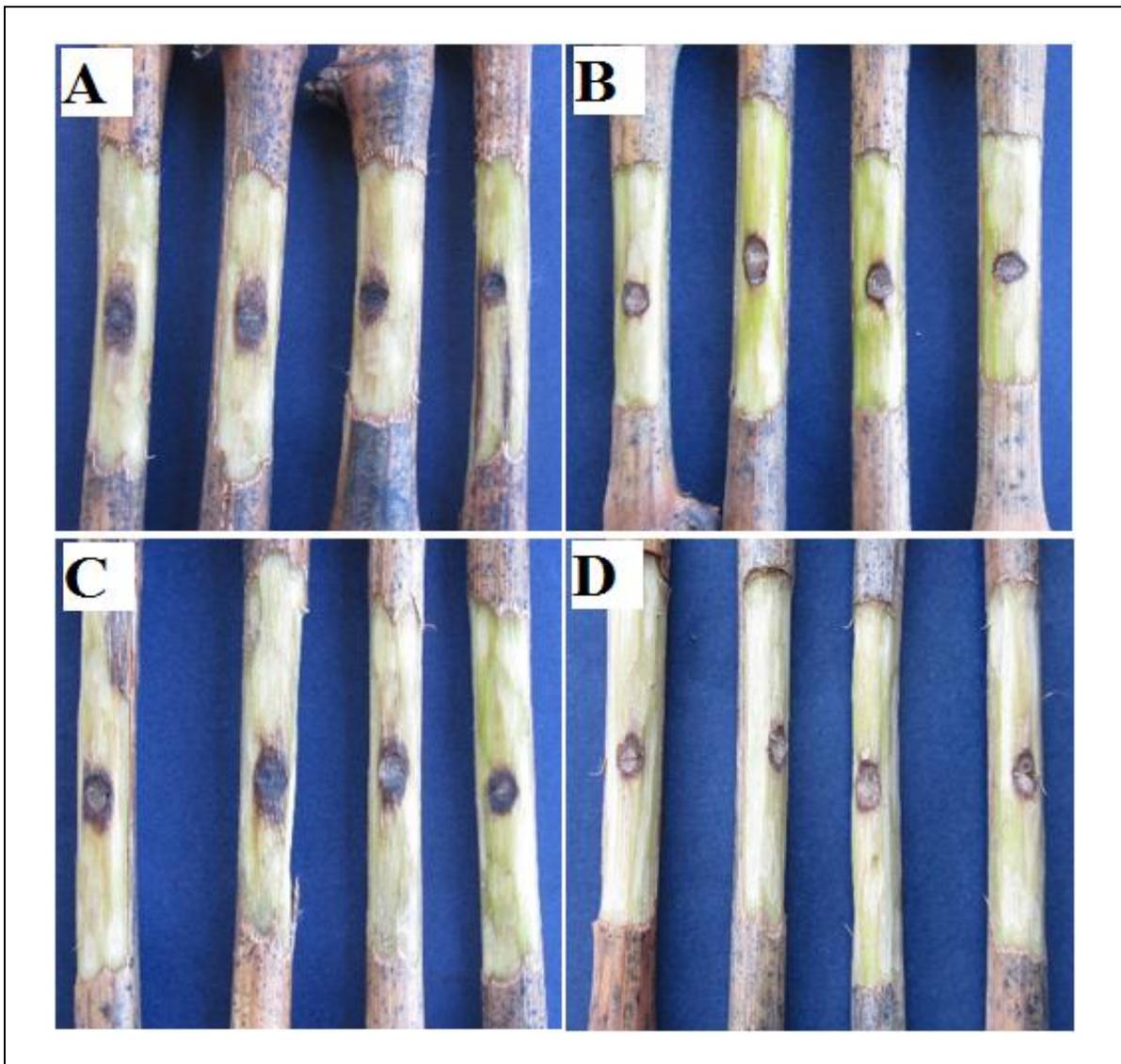


Figura 3. Ensayo tiempo 1. Donde: **A**= control o testigo positivo y **B**= fungicida comercial; Ensayo tiempo 2. Donde: **C**=control o testigo positivo y **D**= fungicida comercial.

Antagonistas bacterianos

La respuesta del producto comercial 1 (a base de *Streptomyces lydicus* WYEC 108) y Ballus 2, muestran un porcentaje de inhibición intermedio en el tiempo 1, considerando que el tiempo de inoculación posterior a la aplicación del tratamiento fue de una hora. El tiempo transcurrido desde que se produce la lesión hasta que ingresa el patógeno, es fundamental para lograr un buen establecimiento del agente de biocontrol, pese a esto ambos tratamientos logran inhibir la longitud de la lesión provocada por *D. seriata* en un 40,9% y 39,7% respectivamente, mientras que Ballus 1 logra inhibir la longitud de la lesión en un 20,3%.

Los resultados obtenidos en el tiempo 2, donde la inoculación con el patógeno se efectuó 96 horas después de aplicado el tratamiento, mostró que el mejor resultado de biocontrol bacteriano fue Ballus 2, con un índice de inhibición de 29,5%, sin presentar diferencias estadísticamente significativas con el fungicida. Mientras que el producto comercial 1 y Ballus 1 logran una inhibición de 0% y 1,3% respectivamente.

Pese a que el producto comercial 1 (a base de *Streptomyces lydicus* WYEC 108) logra un rápido establecimiento, inhibiendo la longitud de la lesión en más de un 40% en el tiempo 1, es el antagonista bacteriano que presenta la mayor pérdida de eficacia tras aumentar el tiempo de inoculación con el patógeno (Cuadro2). Siendo Ballus 2 el agente de biocontrol bacteriano que presenta una mayor estabilidad en el tiempo, disminuyendo su eficacia en un 10,2% en el tiempo 2 respecto de la inhibición obtenida en el tiempo 1.

Ballus 1 y Ballus 2 presentan un comportamiento similar al de *Paenibacillus lentimorbus*, agente de control biológico que ha sido evaluado para el control de hongos de suelo, como *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*, generando un elevado grado de inhibición de estos patógenos, no solo por su acción inhibidora del crecimiento del patógeno, si no también, por su acción promotora del crecimiento de raíces (Santander, et al., 2003; Gonzalez, et al., 2004). Un estudio en donde se evaluó la capacidad de *Paenibacillus lentimorbus* en inhibir la acción de *Botryosphaera dothidea* en Pistacho, demostró que la aspersion de este agente en cortes de poda, es capaz de inhibir significativamente la infección producida por este patógeno (Chen et al., 2003), efecto similar al que se produjo en este bioensayo con el uso de Ballus 2 para el control de *Botryosphaeria obtusa* en la evaluación realizada en el tiempo 1.

Si bien, hasta el momento se ha demostrado la eficacia de *Streptomyces lydicus* WYEC 108 principalmente sobre hongos del suelo como *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani* (Yuan and Crawford, 1995), también podría presentar una elevada eficacia en la protección de cortes de poda a nivel de campo, al actuar de manera rápida en la protección de heridas, reduciendo el riesgo de infección por el patógeno en el corto plazo. Aunque en este ensayo resultó ser el antagonista bacteriano que presenta una mayor inconsistencia en la eficacia conforme pasa el tiempo de inoculación y la bacteria es sometida a condiciones promedio de temperatura de 20,3°C y una humedad superior al 98%, reduciendo a 0% el porcentaje de inhibición en un periodo de 96 horas.

Estos resultados no concuerdan con la investigación *in vitro* realizada por Valderrama, 2013, para el control de *Diplodia seriata*, mediante antagonismo directo y la producción de metabolitos difusibles, quien señala en su investigación que todos los tratamientos bacterianos realizados en este trabajo presentan un mayor control del patógeno mediante el mecanismo de metabolitos difusibles, logrando hasta un 100% de inhibición en el caso del producto comercial Actinovate (a base de *Streptomyces lydicus* WYEC 108), efecto que no se refleja tras dejar actuar a los antagonistas por un periodo de 96 horas, donde todos los tratamientos bacterianos reducen su efectividad.

Antagonistas Fungosos

Los mejores tratamientos fungosos en el tiempo 1 fueron el Producto comercial 2 (a base de *Trichoderma* spp.) y Trizian 2, que lograron un índice de inhibición de 30,4% y 29% respectivamente, sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Pese a que *Trichoderma* spp., como agente de biocontrol, requiere del tiempo necesario para lograr un buen establecimiento, ejerciendo su control mediante la colonización de la lesión. Por otra parte Closea 1 mostró un menor índice de inhibición con un porcentaje de 20%. El peor tratamiento de biocontrol fungoso para el tiempo 1 fue Trizian 1 con 3,9% de inhibición de la lesión producida por *D. seriata*.

Los resultados de la evaluación realizada en el tiempo 2 muestran que los peores tratamientos fueron Trizian 1, Trizian 2 y producto comercial 2 (a base de *Trichoderma* spp.) sin mostrar diferencias estadísticas entre ellos, logrando un índice de inhibición de 0%. Si bien las condiciones de temperatura y humedad fueron las óptimas para el buen establecimiento de Trizian 1, Trizian 2 y el producto comercial 1 (a base de *Trichoderma* spp.) (Infante, et al., 2009). No se obtuvo el resultado esperado tras dejar actuar al biocontrolador por un periodo de 96 horas. Las expectativas de lograr incrementar el porcentaje de inhibición de este agente de biocontrol, dando un mayor tiempo de colonización de la lesión y aumentado así su capacidad de antagonismo directo, no se vio reflejada en detener la lesión provocada por el patógeno.

Closea 1 a diferencia de lo ocurrido en el ensayo realizado en el tiempo 1, es el único tratamiento fungoso que logra una respuesta efectiva tras aumentar el tiempo de inoculación a 96 horas. Esta respuesta se debería principalmente a que Closea 1 tiene una tasa de crecimiento más baja, respecto de los otros biocontroladores fungosos probados en este ensayo, similar a la que presenta *Clonostachys rosea*, hongo utilizado como biocontrolador principalmente contra hongos patógenos de suelo (Xue, 2003; Rodriguez, et al., 2011), por lo que a las 96 horas a las que se inoculó el patógeno, ayudaron a potenciar el crecimiento de este antagonista, aumentando su actividad de producción de sustancias tóxicas e impulsando su actividad de micoparasitismo. Este agente de biocontrol resulto ser, bajo las condiciones de desarrollo de este ensayo, el único tratamiento capaz de aumentar su eficacia conforme aumenta el tiempo de inoculación, alcanzando un índice de inhibición de 25,8%, sin presentar diferencias estadísticamente significativas con el fungicida en la evaluación realizada en el tiempo 2 (Cuadro 2). Lo ocurrido en este caso es respaldado por información obtenida recientemente en el laboratorio donde se ejecutó este trabajo, al

determinarse que Closea 1 posee una muy buena capacidad de colonización con abundante producción de conidias en estacas de vid tratadas. Por lo que el uso de fungicidas, si bien asegura una alta efectividad en la protección de cortes de poda, en una primera instancia, esta efectividad se ve fuertemente disminuida conforme pasa el tiempo y la molécula es expuesta a diferentes condiciones de temperatura y humedad relativa del ambiente.

Los resultados obtenidos por los distintos biocontroladores fúngicos, no concuerdan con la investigación *in vitro* realizada por Valderrama, 2013, para el control de *Diplodia seriata*, mediante antagonismo directo y la producción de metabolitos difusibles, quien señala que el producto comercial 2 (a base de *Trichoderma* spp.) logra un 100% de inhibición del crecimiento micelial, efecto que no se traduce en una respuesta efectiva en este bioensayo. Lo mismo ocurre con Trizian 1 quien es capaz de inhibir *in vitro* un 100% el crecimiento de *Diplodia seriata* mediante el antagonismo por metabolitos difusibles y un 27% mediante el antagonismo directo. Concluyendo que la efectividad que pueda ejercer este biocontrolador, depende del tiempo que éste tenga para su establecimiento, dado que un buen establecimiento asegura la producción de metabolitos difusibles y por ende un mayor control sobre el patógeno.

Dentro de los agentes de biocontrol fúngicos estudiados, se ha informado que Closea 1, genera un control mediante micoparasitismo y la competencia por nutrientes y espacio, además de la producción de sustancias tóxicas, acción similar a la que presenta *Clonostachys rosea* (Sutton, et al., 1997). Por lo que el tiempo que tenga este agente para la colonización de la lesión, es absolutamente necesario para lograr un buen resultado de control, efecto similar al que al que se produjo en el aumento de eficacia de Closea 1 en la evaluación realizada en el tiempo 2. El uso de este antagonista ha mostrado una alta eficacia en la protección contra patógenos de suelo, como *Phytophthora cactorum* (Carreño et al., 2006), también ha mostrado ser eficaz en el control *Botrytis cinerea*. (Sutton, et al., 1997). Los resultados obtenidos en este bioensayo dejan entrever el real potencial que tendría este hongo en la protección de cortes de poda a nivel de campo, dado que es el único tratamiento capaz de aumentar su eficacia conforme aumenta el tiempo de infección con el patógeno, presentando una estabilidad superior a la del fungicida (Cuadro 2).

Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados en el control de enfermedades de las plantas, esto dado que poseen buenas cualidades para el control de patógenos del suelo, principalmente de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium* (Ezziyyani, et al., 2004); dentro de los patógenos que producen enfermedades en la madera de la vid, *Trichoderma harzianum* cuyo modo de crecimiento y control es muy similar a Trizian 1 y Trizian 2, ha presentado un elevado nivel de control sobre *Ilyonectria macrodidyma* (Montealegre y Pérez, 2013); al respecto también se ha potenciando la acción de estos antagonistas a través de la obtención de cepas mejoradas (Besoain, et al., 2007).

En este bioensayo se evaluaron dos cepas de *Trichoderma* spp., estas fueron Trizian 1 y Trizian 2, presentando diferencias estadísticamente significativas entre ellas, en la inhibición de la longitud de la lesión producida por *Diplodia seriata*, este resultado no concuerda con la prueba *in vitro* realizada por Valderrama, 2013, donde ambas cepas de *Trichoderma*, no presentan diferencias de significancia estadística tanto en los resultados

obtenidos en las pruebas de antagonismo directo, como en el mecanismo de producción de metabolitos difusibles. El nivel de control ejercido por ambas cepas de *Trichoderma*, concuerda con estudios en donde se evaluó el efecto de “Vinevax”, producto que contiene *Trichoderma harzianum* Rifai, probado para la protección de cortes de poda, contra la infección producida por el hongo *Eutypa lata*, cuyo control sobre las especies de *Botryosphaeria* se presenta limitado (Pitt, et al. 2012). De la misma forma se ha evaluado el producto comercial Trichonativa, en el uso como protector de cortes de poda, contra *Neofusicoccum parvum* (*Botryosphaeria parva*), agente causal del decaimiento y muerte de tallos en arándano, concluyendo que el uso de este producto como protector de heridas de poda es ineficaz (Latorre, et al., 2013), efecto similar al obtenido en esta investigación, donde logra un índice de inhibición de *Diplodia seriata* cercano al 30%, eficacia que no cumple el nivel de control obtenido en pruebas *in vitro* (Valderrama, 2013).

Pese a los resultados obtenidos en este bioensayo, nuevos estudios a nivel de campo sugieren que el uso de *Trichoderma* spp. y Closea 1, aplicados en mezcla, no sólo logran inhibir el crecimiento de la lesión producida por *Diplodia seriata*, sino que también son capaces de tener un efecto erradicante (Arriagada, 2013)¹.

A pesar de estos resultados el uso de *Trichoderma* spp., no es absolutamente descartado para futuras pruebas en campo, donde dada la alta plasticidad ecológica que presenta este agente de biocontrol (Infante, et al., 2009), pudiese tener un mayor efecto en la inhibición de *Diplodia seriata*, considerando que las condiciones de temperatura y humedad en este bioensayo fueron las condiciones óptimas de crecimiento del patógeno, condiciones que no permanecen estables a nivel de campo.

Los resultados de este bioensayo son concluyentes (Cuadro 2), respecto de aquellos agentes de biocontrol que ejercen un rápido establecimiento y de aquellos que logran una mayor estabilidad en el tiempo, logrando mantener un nivel de control similar al del fungicida. Sin embargo, estos resultados deben ser evaluados en campo para tener una visión certera del real potencial que pudiesen tener estos biocontroladores en la protección de cortes de poda.

¹ Valeria Arriagada. 2014, mar. Bioingeniera. [Entrevista personal]. Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de Enfermedades. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile.

Biocontrol en diferentes especies de *Botryosphaeria* spp.

Estudios similares, en donde se evaluó la eficacia de distintos agentes de control biológico (fungosos y bacterianos) sobre tres especies de *Botryosphaeria*, entre ellas *Diplodia mutila*, *Neofusicoccum aesculi* y *Neofusicoccum australe* (Montealegre, 2014)², mostraron resultados que difieren en el nivel de patogenicidad (Urbez-Torres, et al., 2006b) y respuesta de los distintos biocontroladores en limitar la longitud de la lesión producida por estos patógenos, concluyendo que las especies del género *Fusicoccum* se presentaron de una manera mucho más agresiva que las especies del género *Diplodia*.

Así por ejemplo, en el caso de *Diplodia mutila*, el control químico (i.a. Benomil + Mancozeb), al igual que en el caso de *Diplodia seriata* resulta ser el mejor tratamiento, alcanzando un 80,9% de inhibición en el tiempo 1.

Dentro de los antagonistas evaluados en el tiempo 1, Closea 1 y Trizian 1, son aquellos biocontroladores que logran inhibir en un mayor porcentaje la lesión producida por *D. mutila*, alcanzando un 40,8% y 24% respectivamente. En el tiempo 2, los mejores tratamientos son el fungicida y Closea 1, sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre ellos, lo que sugiere al igual que el presente estudio, que el uso de Closea 1 es capaz de igualar la eficacia del fungicida conforme aumenta el tiempo de establecimiento del biocontrolador.

En el caso de *Neofusicoccum australe*, el fungicida (i.a. Benomil + Mancozeb) se presenta como el mejor tratamiento, evaluado en el tiempo 1, diferenciándose absolutamente del efecto que tienen los biocontroladores como *Trichoderma* spp. dentro de los antagonistas fungosos y Ballus 1 dentro de los bacterianos, alcanzando un 55,7% de inhibición, efecto que difiere de los resultados obtenidos al evaluar la eficacia de distintos antagonistas aumentando el tiempo de inoculación a 96 horas, en este caso la eficacia del fungicida se reduce a un 7,5%, siendo los mejores tratamientos Trizian 2 y el producto comercial Trichonativa (a base de *Trichoderma* spp.), con índices de inhibición de 22,3% y 28,5% respectivamente. Resultados que no concuerdan con la evaluación de antagonistas para el control de *Diplodia seriata*, donde el producto Trichonativa y el antagonista Trizian 2, no logran inhibir la lesión producida por este patógeno en el tiempo 2, obteniendo un índice de inhibición de 0%.

La evaluación de antagonistas biológicos eficaces en controlar la lesión producida por *Neofusicoccum aesculi*, muestra al igual que las evaluaciones anteriores que el fungicida (i.a. Benomil + Mancozeb) es el mejor tratamiento, alcanzando un índice de inhibición de 78,5% en la evaluación realizada en el tiempo 1, eficacia que se reduce a un 49,1% tras aumentar el tiempo de inoculación a 96 horas. A diferencia de lo ocurrido en la evaluación de antagonistas para el control de *Diplodia seriata*, *Diplodia mutila* y *Neofusicoccum australe*, los antagonistas bacterianos son los que presentan una mayor eficacia en el control de *Neofusicoccum aesculi*, al aumentar el tiempo de inoculación. Presentando una

² Jaime Montealegre. 2014, abr. Profesor Titular. [Entrevista personal]. Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de Enfermedades. Universidad de Chile.

eficacia superior a la del fungicida, en este estudio los antagonistas Ballus 1, Ballus 2 y el producto comercial Actinovate (a base de *Streptomyces lydicus* WYEC 108), logran un 41,7%; 44,4% y 52,5% respectivamente, sin presentar diferencias estadísticas significativas con la eficacia obtenida por el fungicida en el tiempo 2.

Al analizar los resultados obtenidos en la evaluación de diferentes antagonistas en el control de distintas especies de *Botryosphaeria*, utilizando la misma metodología descrita en el presente estudio, permiten concluir que el comportamiento de los distintos antagonistas difiere en su nivel de eficacia de acuerdo a la especie de *Botryosphaeria* sobre las cuales actúan.

CONCLUSIONES

El control químico en base a benomil más mancozeb resultó ser el tratamiento más efectivo en la protección de heridas producidas por cortes de poda contra *Diplodia seriata*. Sin embargo, no aseguró un 100% de protección.

El mayor efecto de bioantagonismo se consiguió con el uso de los antagonistas bacterianos, como Producto comercial 1 (*Streptomyces lydicus* WYEC 108) y Ballus 2, siendo el segundo de ellos capaz de presentar una mayor persistencia, logrando mantener su eficacia por un periodo más prolongado de tiempo.

Dentro de los antagonistas fungosos, *Trichoderma* spp., quien genera un elevado biocontrol mediante el mecanismo de antagonismo directo, no se vio reflejada su eficacia en este bioensayo, mostrando un mayor control en el tiempo 1 (inoculación 1 hora después de aplicado el tratamiento) que en el tiempo 2 (inoculación con el patógeno 96 horas después de aplicado el tratamiento).

Closea 1, fue el único antagonista capaz de aumentar su eficacia conforme aumentó el periodo libre de infección, siendo el tiempo de establecimiento un factor determinante en la eficacia que pueda presentar este antagonista.

BIBLIOGRAFÍA

- Arauz, L. F. and Sutton, B. 1990. Protectant and after-infection activity of fungicides against *Botryosphaeria obtusa* on Apple. *Plant Disease*, 74: 1029-1034.
- Auger, J.; M. Esterio e I. Pérez. 2004a. La Declinación y Muerte de Planta Joven de la Vid en Chile. *Aconex*, 85:15-21.
- Auger, J.; M. Esterio.; G. Ricke e I. Pérez. 2004b. Black Dead Arm and Basal Canker of *Vitis vinifera* cv. Red Globe Caused by *Botryosphaeria obtusa* in Chile. *Plant Disease*, 88(11): 1286.
- Auger, J.; M. Esterio; I. Pérez.; G. Ricke. y C. Ramos. 2005. El Síndrome de la Declinación y Brazo muerto de la Red Globe en Chile. *Aconex*, 89:30-36.
- Besoain X., L.M. Pérez; A. Araya.; Ll. Lefever, M. Sanguinetti. y J. Montealegre. 2007. New strains obtained after UV treatment and protoplast fusion of native *Trichoderma harzianum*: their biocontrol activity on *Pyrenochaeta lycopersici*. *Electronic journal of biotechnology*. Recuperado en: [En línea] <<http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v10n4-16/107>>. Consultado el 15 de Marzo de 2014.
- Bester, W.; P. W. Crous. and P. H. Fourie. 2007. Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species. *Australasian Plant Pathology*, 36(1): 73-77.
- Burruano, S.; V. Mondello.; G. Conigliaro.; A. Alfonzo.; A. Spagnolo. and L. Mugnai. 2008. Grapevine decline in Italy caused by *Lasiodiplodia theobromae*. *Phytopathologia Mediterranea*, 47: 132-136.
- Carreño, Á.; J. Blanco y V. Villegas. 2006. Selección de hongos biocontroladores de *Phytophthora cactorum* Agente causal de la pudrición radical y corona en manzano. *Agron*, 14 (1): 89-96.
- Chen, W.Q.; D.P. Morgan.; D. Felts and T. J. Michailides. 2003. Antogonism of *Paenibacillus lentimorbus* to *Botryosphaeria dothidea* and biological control of panicle and shoot blight of pistachios. *Plant Disease*, 87: 359-365.
- Copes, W. E and Jr. Hendrix F. F. 2004. Effect of temperature on sporulation of *Botryosphaeria dothidea*, *B. obtusa*, and *B. rhodina*. *Plant Disease*, 88(3):292-296.
- Denman, S., P. Crous.; A. Sadie and M. Wingfield. 2004. Evaluation of fungicides for the control of *Botryosphaeria protearum* on *Protea magnifica* in the Western Cape Province South Africa. *Australasian Plant Pathology*, 33: 97-102.

Díaz, G., J. Auger.; X. Besoain.; E. Bordeu and B. Latorre. 2013. Prevalence and pathogenicity of fungi associated with grapevine trunk diseases in Chilean vineyards. *Ciencia e Investigación Agraria*, 40 (2): 327-339.

Díaz, G. y B. Latorre. 2011. Aspersión y pastas fungicidas en la protección de cortes de poda en vid. XX Congreso de la Sociedad de Fitopatología Chilena 29-30 de Noviembre y 1 de Diciembre. Libro de resúmenes. Santiago, Chile. 42p.

Díaz, G. y Latorre, B. 2013. Efficacy of paste and liquid fungicide formulations to protect pruning wounds against associated with grapevine trunk diseases in Chile. *Crop Protection*, 46: 106-112.

Epstein, L.; K. Sukhwinder. and J. S.Vander Gheynst. 2008. Botryosphaeria-related dieback and control investigated in noncoastal California grapevines. Wine grapes go green: The Sustainable Viticulture Issue. *California Agriculture*, 62 (4): 161-166.

Ezziyyani, M., Pérez, C. Ahmed, S.A., Requena, M.E y Candela, M.E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el control de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). *Anales de Biología* 26:35-45.

Gramaje, D. y J. Armengol. 2011. Fungal Trunk Pathogens in the Grapevine Propagation Process: Potential Inoculum Sources, Detection, Identification, and Management Strategies. *Plant Disease* 95 (9): 1040-1055.

Gonzalez, R.; J. Montealegre. y R. Herrera. 2004. Biological control of *Fusarium solani* in tomato by bioantagonist *Paenibacillus lentimorbus* and *Trichoderma spp.* *Ciencia e Investigación Agraria*. 3(1): 21-28.

González, V. y M. Tello. 2010, Jun. Enfermedades fúngicas de la madera de vid: Revisión del conocimiento actual y retos sobre el manejo y control. (Bol. Inf. N°70), Sociedad Española de Fitopatología. España: SEF. 34p.

Infante, D.; B. Martinez.; N. González y S. Reyes. 2009. Mecanismo de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección vegetal*. [En línea]. Recuperado en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522009000100002&script=sci_arttext. Consultado el 31 de marzo de 2014.

Larignon, P.; R. Fulchic.; L. Cere and B. Dubos. 2001. Observation on black dead arm in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*. 40: 336-342.

Latorre, B.; R. Torres.; T. Silva and K. Elfar. 2013. Evaluation of use of wound-protectant fungicides and biological control agent against stem canker (*Neofusicoccum parvum*) of blueberry. *Ciencia e Investigación Agraria*, 40(3): 537-545.

Linaldeddu, B.; B. Scanu.; A. Schiaffino and S. Serra. 2010. First report of *Neofusicoccum australe* associated with grapevine cordon dieback in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 49: 417-420.

Montealegre, J. 1991. Microbiología Manual de Laboratorio. pp. 127-145. 4^{ta} edición. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Santiago, Chile. p208.

Montealegre, J. y L.M. Perez,. (Eds.). 2013. Control Biológico de enfermedades de las plantas en Chile. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 147p. Publicación digital. Recuperado en: <http://libros.uchile.cl/index.php/sisib/catalog/book/363>.

Nandakumar, R., S. Babu.; R. Viswanathan.; J. Sheela.; T. Raguchander y R. Samiyappan. 2001. A new bio-formulation containing plant growth promoting rhizobacterial mixture for the management of sheath blight and enhanced grain yield in rice. *BioControl*, 46: 493-510.

ODEPA. 2010. Mercado de la uva de mesa. Publicación de la Oficina de Estudio de Políticas Agraria. Ministerio de Agricultura. 15p. Recuperado en: <http://odepa.gob.cl/odepaweb/publicaciones/doc/2405.pdf>. Leído el 27 de Agosto de 2012.

Phillips, A.; P. Crous and A. Alves. 2007. *Diplodia seriata*, the anamorph of “*Botryosphaeria*” *obtusa*. *Fungal Diversity*, 25: 141-155.

Phillips, A. 2002. Botryosphaeria species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea*, 41: 3-18.

Pitt, W.; M. Sosnowski.; R. Huang.; Y. Qui.; C. Steel y S. Savocchia. 2012. Evaluation of fungicides for the Management of Botryosphaeria Canker of Grapevine. *Plant Disease*, 96:1303-1308.

Plata, J. 2010. Aislamiento y evaluación *in vitro* del efecto de *Trichoderma* spp nativas sobre hongos patógenos de la madera de vid aislados en la región vitivinícola de Ensenada, baja California. Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. México. 96p.

Requia, F. 2012. Uso de polímeros em formulações para armazenamento de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride*. Tesis presentada para obtener al grado de magister en Agróbologia. Universidad Federal de Santa María, centro de ciencias naturales y exactas. Brasil. 60p.

Rodriguez, M. A.; C. Cabrera.; F. Gozzo.; M. N. Eberlin y A. Godeas. 2011. *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as abiocontrol agent. *Journal of Applied Micribiology*, 110: 1177-1186.

Santander, C. J. Montealegre y R. Herrera. 2003. Control biológico de *Rhizoctonia solani* en tomate en suelos previamente sometidos a solarización y bromuro de metilo. *Ciencia e Investigación Agraria*, 30 (2): 107-112.

Sarro, A.; J. M. Lara y C. Fernández. 2010. Efectividad *in vitro* de un nuevo bio-fungicida basado en esporas de *Streptomyces lydicus* WYEC 105. XV Congreso Sociedad Española de Fitopatología. 27 de Septiembre – 1 de Octubre. Palacio Europa. p 416.

Schaad, N.; J. Jones y W. Chun. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Third Ed. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 373 p.

Savocchia, S.; C. Steel.; B. Stodart y A. Somers. 2007. Pathogenicity of *Botryosphaeria* species isolated from declining grapevines in sub-tropical regions of Eastern Australia. *Vitis*, 46 (1): 27-32.

Sutton, J.C.; D. Li.; G. Peng.; H. Yu.; P. Zhang y R. Valdebenito-Sanhueza. 1997. *Gliocadium roseum*: a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease*, 81: 316-328.

Taylor, A.; G. E. St J. Hardy.; P. Woodand and T. Burgess. 2005. Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 34: 187-195.

Urbez-Torres, J. R.; W. Gubler.; H. Peláez.; Y. Santiago.; C. Martín and C. Moreno. 2006a. Occurrence of *Botryosphaeria obtusa*, *B. dothidea* and *B. parva* associated with grapevine trunk diseases in Castilla and León region, Spain. *Plant Disease*, 90:835.

Urbez-Torres, J. R.; G. Leavitt.; J. Guerrero.; J. Guevara and W. Gubler. 2008. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease*, 92:519-529.

Urbez-Torres, J. R.; G. Leavitt.; T. Voegel and W. Gubler. 2006b. Identification and distribution of *Botryosphaeria* species associated with grapevines cankers in California. *Plant Disease*, 90:1490-1503.

Urbez-Torres, J. R.; F. Peduto.; R. Striegler.; K. Urrea-Romero.; J. Rupe.; R. Cartwright and W. Gubler. 2012. Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. *Fungal Diversity*, 52(1):169-189.

Urbez-Torres J. R. and W. Gubler 2012. *Botryosphaeria* dieback: the current status of *Botryosphaeriaceae* species infecting grapevines. 8th Workshop on Grapevine Trunk Diseases. 18 - 21 de junio. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. p169.

Valderrama, F. 2013. Selección in-vitro de bioantagonistas para el control de *Diplodia seriata*, *Diplodia mutila*, *Fusicoccum aesculi* y *Neofusicoccum australe*. Memoria Ingeniero Agrónomo. Santiago, Chile : Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. 46h.

Van Niekerk, J.; P. Fourie.; F. Halleen y P. Crous. 2006. *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogen. *Phytopathologia Mediterranea* 45: 43-54.

Xue, A. G. 2003. Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Plant Disease*, 93 (3): p. 329-335.

Yuan, W. M. and D. Crawford. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a Potential Biocontrol Agent against Fungal Root and Seed Rots. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (8): p. 3119–3128.

APENDICE I

Efectividad del fungicida

La dosis utilizada fue determinada mediante una prueba *in vitro* en la que se evaluaron tres dosis distintas del fungicida (5g, 10g y 15g en 1000 mL de agua estéril respectivamente) y un testigo o control que correspondió al crecimiento del patógeno, en agar papa dextrosa (APD) en ausencia del fungicida.

Para llevar a cabo esta prueba se utilizaron discos de micelio de *D. seriata*, cultivados en APD por 7 días, en una cámara de cultivo a 25 °C. Cada una de las concentraciones del fungicida fueron diluidas en APD, en placas de Petri, para posteriormente poner en el centro de la placa un disco de micelio de 0,5 cm de diámetro. Los tratamientos fueron conservados en una cámara de cultivo por 7 días, a una temperatura de 25 °C. Finalmente se evaluó en índice de inhibición de cada uno de los tratamientos.

El diseño de este ensayo correspondió a un DCA, de 4 tratamientos con 5 repeticiones por tratamiento. Los resultados fueron evaluados mediante la realización de un análisis de varianza (ANDEVA), utilizando el programa estadístico INFOSTAT.

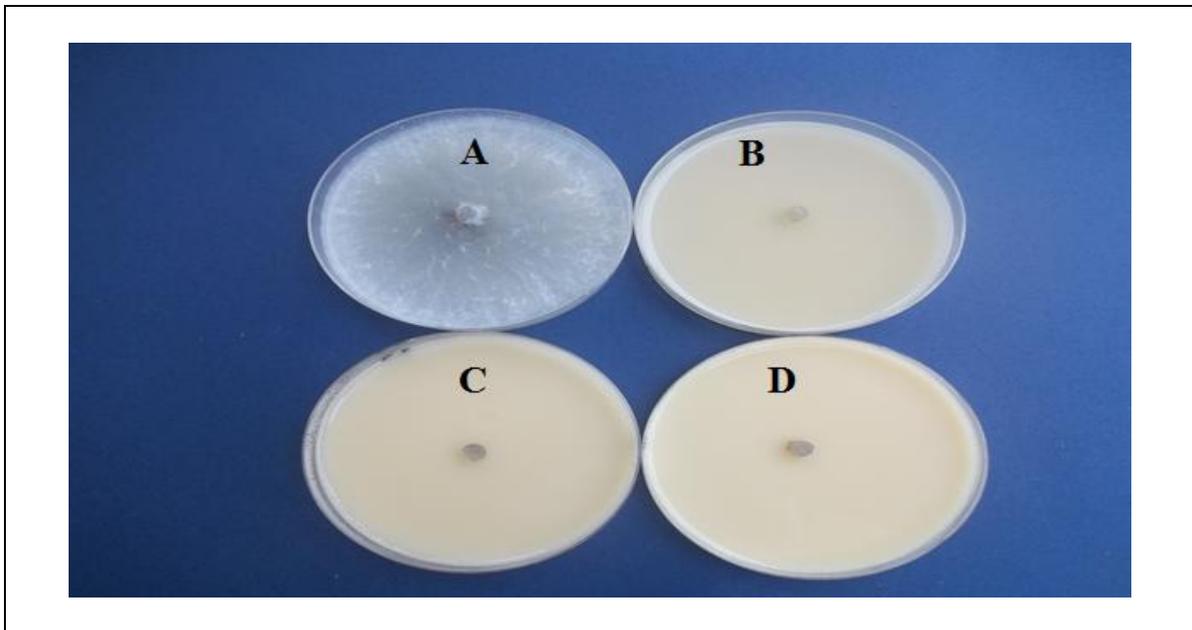


Figura 1. Ensayo *in vitro*. **A**= control, **B**=concentración 1 ($5\text{g}\cdot 1000\text{ mL}^{-1}$), **C**= concentración 2 ($10\text{g}\cdot 1000\text{ mL}^{-1}$), **D**=concentración 3 ($15\text{g}\cdot 1000\text{ mL}^{-1}$).

La prueba realizada *in vitro*, muestra que al 50% de la dosis comercial ($5\text{g}\cdot 1000\text{ mL}^{-1}$), el fungicida es capaz de inhibir en un 100% el crecimiento del patógeno. Lo que concuerda

con otros estudios realizados *in vitro*, en donde se menciona que benomil es altamente eficaz en la inhibición del crecimiento micelial de especies de *Botryosphaeria* (Denman et al., 2004; Bester et al., 2007). Bajo estos antecedentes para la realización del ensayo de biocontrol se trabajó con la dosis comercial del fungicida.

APENDICE II

Temperaturas y humedad relativa registradas durante la incubación del ensayo.

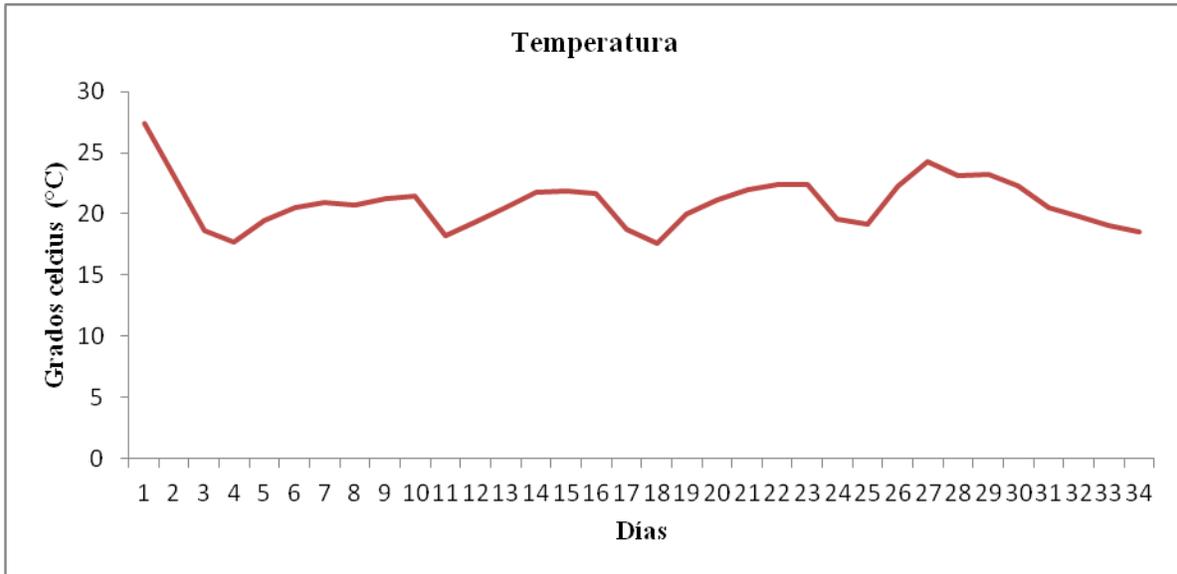


Figura 2. Promedio de temperatura diaria, durante la incubación del ensayo.

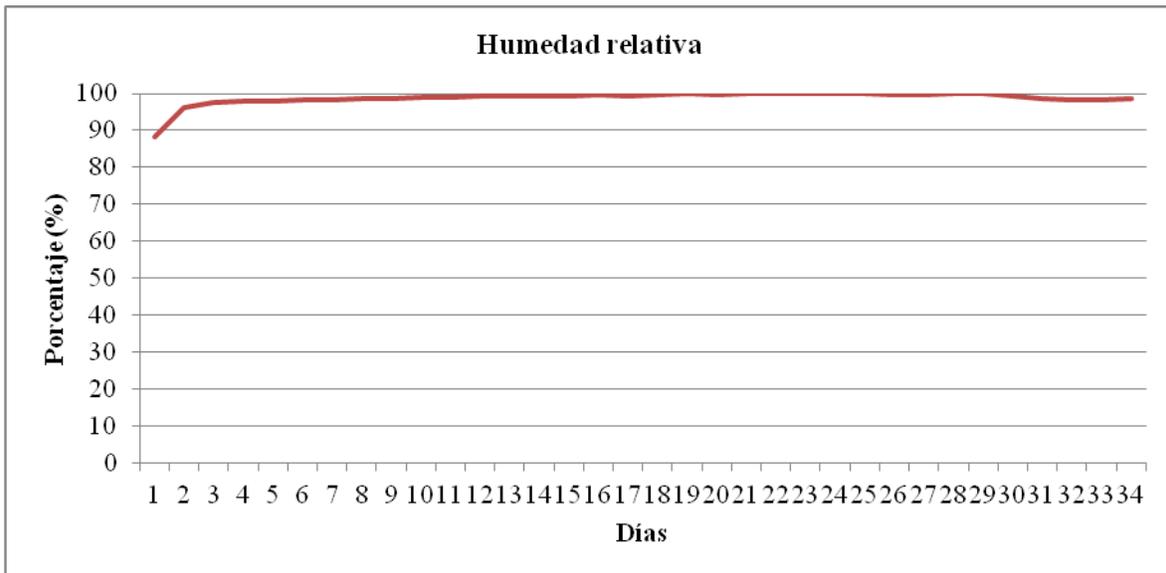


Figura 3. Promedio de humedad diaria, durante la incubación del ensayo.