

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
ESCUELA DE AGRONOMIA**

MEMORIA DE TITULO

**EFFECTO *in vitro* DE BIOANTAGONISTAS EN CEPAS DE BASIDIOMYCOTAS
AISLADOS DE VID (*Vitis vinifera* L.) CON SINTOMAS DE DEGRADACION
DE LA MADERA**

CLAUDIO IGNACIO SEPULVEDA RUBIO

**Santiago – Chile
2012**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
ESCUELA DE AGRONOMIA**

MEMORIA DE TITULO

**EFFECTO *in vitro* DE BIOANTAGONISTAS EN CEPAS DE BASIDIOMYCOTAS
AISLADOS DE VID (*Vitis vinifera* L.) CON SINTOMAS DE DEGRADACION
DE LA MADERA**

***in vitro* EFFECT OF BIOCONTROL AGENTS AGAINST BASIDIOMYCOTAS
STRAINS ISOLATED FROM GRAPEVINE (*Vitis vinifera* L.) WITH WOOD
DEGRADATION SYMPTOMS**

CLAUDIO IGNACIO SEPULVEDA RUBIO

**Santiago – Chile
2012**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
ESCUELA DE AGRONOMIA**

**EFFECTO *in vitro* DE BIOANTAGONISTAS EN CEPAS DE BASIDIOMYCOTAS
AISLADOS DE VID (*Vitis vinifera* L.) CON SINTOMAS DE DEGRADACION
DE LA MADERA**

Memoria para optar al Título Profesional de:
Ingeniero Agrónomo

CLAUDIO IGNACIO SEPULVEDA RUBIO

Profesores Guía

Calificaciones

Sr. Jaime R. Montealegre A.
Ingeniero Agrónomo

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

Profesores Evaluadores

Sra. Marcela A. Esterio. G.
Ingeniero Agrónomo, M. S.

**Santiago – Chile
2012**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco, ante todo, a ti que me permites vivir día a día, que me das luz y respondes mis plegarias constantemente y que sé que jamás dudarías de mí. Simplemente gracias.

Agradezco al Sr. Jaime R. Montealegre A. por sus constantes consejos, conversaciones, excelente disposición y notable apoyo y paciencia. Gracias Profe, por su gran confianza y preocupación personal hacia mí.

Agradezco al Sr. Jaime G. Auger S., por su interés en ser partícipe de esta investigación, por su disposición y consejos.

A los que me tendieron una mano mas que amiga en todo este proceso, todos los días ayudándome, buscando soluciones, rebuscándolas, animándome que todo saldría bien... valió la espera: Danae, Gabriel, Mauricio, José y Javiera. Estoy más que agradecido de ustedes.

A mis amigos, a los que jamás dudaron de lo que era capaz de hacer. A los que estuvieron conmigo siempre, alentándome a seguir, a titularme finalmente. Sin ustedes, creo que hubiese sido muy difícil cerrar este proceso. Gracias por los coscachos, por las palabras, por el tiempo compartido, por el cariño... espero volver a verlos: Patricio C., Camila G., Karla C., Felipe P., Pola M., Ariel S., Daniela B., Cristian C., Luis R., Nati y Feña.

A mis padres, Patricio y Julia, hermana Elisa y sobrino Nachito, por aguantarme todos estos años, y por nunca dejar de apoyarme, creer en mí, y defenderme cuando muchos decían que no lograría ser nadie... Hasta el momento vamos bien! Los amo muchísimo.

Y por último, y la mas importante de todos, a ti hija... esto es para ti. Todo lo que soy hoy, es gracias a ti. Doy la vida por ti, me las banco todas por ti... Eres mi vida, eres mi luz y la guía para enfrentar mis días! Este logro es para ti... tu "papá cauió" por fin es un profesional. Te amo con todo el corazón hija... salí adelante solo por ti, luche solo por ti, para que algún día puedas sentirte orgulloso de lo que soy como papá! Gracias por tus sonrisas, gracias por amarme...

A mi completamente amada hija.

INDICE

RESUMEN	1
Palabras clave	1
ABSTRACT	2
Key words	2
INTRODUCCION	3
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
MATERIALES Y METODOS	6
Lugar de estudio	6
Materiales	6
Metodología	6
1. Cepas aisladas	6
2. Caracterización de las cepas aisladas	7
• Evaluación del rango óptimo de temperatura	7
• Evaluación del rango óptimo de pH	7
Análisis estadístico	7
3. Pruebas de antagonismo	8
3.1. Directo	8
• Bacterias	8
• Hongos	9
3.2. Metabolitos difusibles	10
• Bacterias	10
• Hongos	11
Análisis estadístico	12
RESULTADOS Y DISCUSION	13
1. Caracterización de las cepas aisladas	13
2. Pruebas de Antagonismo	17
2.1. Antagonismo Directo	17
• Bacterias	17
• Hongos	22
2.2. Antagonismo mediante Metabolitos Difusibles	32
• Bacterias	32
• Hongos	36
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFIA	43

RESUMEN

Se evaluó la capacidad bioantagónica *in vitro* de diferentes bacterias (*Bacillus* sp. cepa 1; *Paenibacillus* sp. cepas 1 y 2) y hongos (cepas 24-A y 24-B de *Clonostachys rosea*; cepas Th 650, Th 12A 10.1 y ThF 2-1 de *Trichoderma harzianum*) y los productos comerciales Actinovate® (*Streptomyces lydicus* WYEC 108) y Trichonativa® (*Trichoderma virens*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma parceramosum*) en el control de 13 cepas de basidiomycotas recuperadas desde plantas de vid con síntomas de enrollamiento clorótico y degradación de la madera, provenientes de 3 regiones de Chile (IV Región de Coquimbo, V Región de Valparaíso y RM de Chile). Se caracterizaron las diferentes cepas de hongos aislados respecto a temperatura (19, 22, 25 y 28°C) y pH (5, 6, 7 y 8). La capacidad bioantagónica se determinó a través de pruebas de antagonismo directo realizado mediante cultivos duales y antagonismo por metabolitos difusibles. En los resultados de caracterización de las cepas recuperadas, se observó que el mayor crecimiento miceliar se obtuvo a 28°C a un pH 6 del medio, determinándose ambos valores como los óptimos para el desarrollo de los aislados investigados. Acorde con los resultados obtenidos en antagonismo directo, todos los bioantagonistas demostraron tener un cierto grado de capacidad antagónica sobre las cepas. Mediante la inhibición del crecimiento miceliar, la bacteria que presentó un mayor efecto fue la cepa 1 de *Paenibacillus* sp., con un máximo de 63,5% de inhibición. En el caso de los hongos fueron todas las cepas de *T. harzianum* utilizadas, oscilando el máximo porcentaje de control entre un 82,7% para la cepa Th 650, un 84,6% para Th 12A 10.1 y 87,7% para la cepa ThF 2-1. En relación a los productos comerciales, Trichonativa® logró un 61,5% de inhibición miceliar, mientras que Actinovate® logró un 100% de inhibición, siendo por lo tanto *S. lydicus* WYEC108 el antagonista que ejerció el mayor efecto. Los resultados obtenidos en el ensayo de antagonismo mediante metabolitos difusibles ayudaron a corroborar el tipo de mecanismo de biocontrol que ejercieron los antagonistas. Las bacterias utilizadas para este ensayo reflejaron que básicamente son los metabolitos difusibles que producen, los que ejercen la inhibición de crecimiento miceliar de las cepas de basidiomycotas, obteniéndose con ambas cepas 1, de *Bacillus* sp. y *Paenibacillus* sp., valores en promedio superiores a 70%; en relación al producto comercial Actinovate®, se obtuvo una completa inhibición miceliar. Con respecto a los hongos *C. rosea* 24-B y *T. harzianum* ThF 2-1, estos mostraron una baja inhibición mediante la producción de metabolitos difusibles, obteniéndose valores en promedio que no superaron el 14% de inhibición de crecimiento miceliar, lo que indica que poseen otro tipo de mecanismos como en el caso de las cepas de *T. harzianum*. Para el producto comercial Trichonativa®, se obtuvo en promedio un 16,7% de inhibición miceliar, siendo éste el mayor dentro de los hongos. Los resultados obtenidos señalan a *S. lydicus* WYEC108 (Actinovate®) como al bioantagonista de mayor efecto.

Palabras clave: Enrollamiento clorótico de la vid, *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Streptomyces lydicus*, *Trichoderma harzianum*.

ABSTRACT

The *in vitro* bioantagonistic capacity of different bacteria (*Bacillus* sp. strain 1, *Paenibacillus* sp. strains 1 and 2) and fungi (24-A and 24-B strains of *Clonostachys rosea*, and Th 650, Th 12A 10.1 and ThF 2-1 strains of *Trichoderma harzianum*) and of the biofungicides Actinovate® (*Streptomyces lydicus* WYEC 108) and Trichonativa® (*Trichoderma virens*, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma parceramosum*) was evaluated in the control of 13 basidiomycota strains recovered from grapevines grown in three regions of Chile (IV Region of Coquimbo, V Region of Valparaiso and Metropolitan Region). The vines showed wood degradation and chlorotic leafroll symptoms. Different isolated fungus strains were characterized with respect to temperature (19, 22, 25, and 28°C) and pH (5, 6, 7, and 8). The bioantagonistic capacity was determined by tests of direct antagonism with dual cultures and by diffusible metabolite antagonism. The results of recovered strain characterization showed that mycelial growth was highest with the culture medium at 28°C and pH 6, indicating both values as optimum for the development of the investigated isolates. According to the direct antagonism results, all bioantagonists demonstrated to have some degree of antagonistic capacity over recovered strains. Through mycelial growth inhibition, the bacterium that showed a better effect was *Paenibacillus* sp. strain 1, with a maximum of 63.5% of inhibition. In the case of fungi, all the used *T. harzianum* strains had excellent results with the highest control percentages being 82.7% for the Th 650 strain, 84.6% for the Th 12A 10.1 strain and 87.7% for ThF 2-1 strain. In relation to the biofungicides tested, Trichonativa® achieved a maximum of 61.5% of mycelial inhibition, while Actinovate® showed 100% of inhibition of the 13 basidiomycota strains. The results obtained in the antagonism trial by diffusible metabolite helped to corroborate the type of biocontrol mechanism exerted by the antagonists. The bacteria used for this trial basically showed that the diffusible metabolites that they produce are the ones which exert mycelial growth inhibition of basidiomycota strains, with both *Bacillus* sp. and *Paenibacillus* sp. strains 1 showing average values over 70%. With respect to Actinovate®, complete mycelial growth inhibition was obtained with this biofungicide. Regarding fungi *C. rosea* 24-B and *T. harzianum* ThF 2-1, these showed low inhibition by diffusible metabolite production with average values not exceeding 14% of mycelial growth inhibition, which indicates that they have other types of mechanisms as in the case of *T. harzianum* strains. With Trichonativa®, an average of 16.7% of mycelial growth inhibition was obtained, this biofungicide being the higher within the fungi used. The obtained results showed *S. lydicus* WYEC108 (Actinovate®) as the bioantagonist with higher effect.

Key words: Grapevine chlorotic leafroll, *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Streptomyces lydicus*, *Trichoderma harzianum*.

INTRODUCCION

El cultivo de la vid (*Vitis vinifera* L.) en Chile es uno de los más importantes tanto en superficie plantada como en producción. Según Bravo (2010), la superficie plantada de uva de mesa alcanzaría las 53.926 há, mientras que para uva de vinificación, al año 2007, la superficie era de aproximadamente 117.558 há (ODEPA, s.a.). Con respecto a la producción del cultivo, Bravo (2010) estima que esta sería del orden de 1.200.000 toneladas para uva de mesa; mientras que Banfi (2011) señala que la producción de vino ya alcanza los 884 millones de litros. En relación a las exportaciones, Bravo (2010) indica que Chile se encuentra en el primer lugar de exportación uva de mesa, con una participación en el mercado de un 23% (representado por 850.000 toneladas de fruta). El total de exportaciones de vino es de 732,1 millones de litros (Banfi, 2011).

A pesar de las alentadoras cifras del cultivo en Chile, los problemas fitosanitarios, y en particular los asociados a hongos, son un tópico que temporada a temporada se debe revisar. En relación a las enfermedades causadas por hongos que atacan a la madera del cultivo, se encuentran “Exocortis o necrosis cortical de la vid” (*Phomopsis viticola*) (Auger *et al.*, 1991 y Cruz, 2004), “declinación de la planta joven” (causada por los hongos *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp.) (Auger *et al.*, 2004), “brazo muerto de la Red Globe” (causada por los hongos *Botryosphaeria obtusa* y *Acremonium alternatum*) (Auger *et al.*, 2005) y el enrollamiento clorótico de la vid (asociándose a un hongo Basidiomycota degradador de madera por Auger (1983) y posteriormente identificado preeliminarmente por Aguilera (2004) como *Fomitiporella vitis*). Con respecto a esta última, Auger (1983) indica que es una de las enfermedades de origen fungoso que más afecta a la vid en Chile, señalando que los daños se traducen en una disminución de los rendimientos a causa de la destrucción parcial o total de las plantas. En un principio, varios investigadores adjudicaron esta enfermedad a una deficiencia de boro, lo que después, a través de la realización de distintos ensayos, se determinó que no era la causa ni tampoco lo era una deficiencia de algún otro nutriente (Auger, 1983).

Una de las características de la sintomatología de la enfermedad es un crecimiento anormal de los brotes y deformación de las hojas, las cuales presentan un borde redondeado, no pudiéndose reconocer ni lóbulos ni dientes (Auger, 1983). Al final del verano, los síntomas observados corresponden a clorosis en la totalidad de la hojas; en la corteza de los entrenudos se generan lesiones acuosas pardo-oscuros, las cuales van cubriendo el brote (Auger, 1983). En la temporada siguiente, los síntomas comprometen otros brazos, lo cual conlleva a la muerte de estos y en consecuencia, de la planta. Con respecto a la sintomatología en la madera, se observa que en la médula generalmente hay presencia de consistencia corchosa, de un color más oscuro que las zonas sanas de los brazos. A medida que avanza hacia el tronco principal, en la madera se observa un cambio de color con estrías pardo oscuro (Auger, 1983), por lo que se pueden observar dos tipos de pudrición en la madera: pardo-oscuro y duro, y pardo-claro y blando. Generalmente, éstos síntomas se encuentran asociados a plantas adultas con más de 10 años de edad (Auger, 1983).

Dentro de los antecedentes relacionados con el desarrollo de hongos basidiomycotas degradadores de la madera de la vid, no existe información detallada en

relación a la temperatura ni pH óptimos para el crecimiento micelial *in vitro*. No obstante, Aguilera (2004) señala que la tasa de crecimiento de micelio a temperaturas de 20 a 25°C, para *F. vitis*, es de 70 a 80 mm en quince días.

En Europa se ha descrito una enfermedad similar conocida como Esca que desarrolla, entre otros síntomas, pudrición oscura y dura y posteriormente blanda y parda de la madera. Su etiología se ha asociado al hongo *Fomitiporia mediterranea*, el cual genera un cuerpo frutal pileado de color pardo amarillento (Auger *et al.*, 2002). En España, Armengol¹ (2010) ha asociado los hongos *Fomitiporia mediterranea*, *Stereum hirsutum*, *Phaeoconiella chlamyospora* y *Phaeoacremonium* spp., como los responsables de los síntomas de Esca. En Sudáfrica, ésta es una enfermedad relativamente desconocida y previamente en el pasado pocos reportes se han descrito; *Phaeoconiella chlamyospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* y algunas especies de basidiomycotas se han asociado al síndrome de degradación de la madera en este país (Halleen *et al.*, 2010). Por otro lado, en Norteamérica se ha descrito la enfermedad conocida como Black Measles en vid, la que presenta síntomas similares a la Esca, pero esta se ha asociado al hongo *Phellinus igniarius*, el cual produce un cuerpo frutal resupinado de color pardo amarillento (Auger *et al.*, 2002). En Argentina, Gatica *et al.* (s.a.) indican a la “Hoja de Malvón” como una enfermedad que produce necrosis de madera, decaimiento y muerte de la planta, pero se le ha asociado al hongo basidiomycota *Inocutis jamaicensis*.

Los patógenos asociados a enfermedades de la madera, como los ya nombrados, tienen como principales sitios de infección primaria a las heridas, especialmente a los cortes de poda (Ferreira *et al.*, 1989; Mugnai *et al.*, 1999; Larignon y Dubos, 2000; Mostert *et al.*, 2005; van Niekerk *et al.*, 2005; todos citados por Bester *et al.*, 2007; Armengol¹, 2010). Por lo tanto, Auger (1983 y 1995) indica que el control del Enrollamiento clorótico de la vid en conjunto con la degradación de la madera de la vid, se debe enfocar principalmente a la prevención de la infección del hongo, realizando una aplicación de pintura fungicida luego de efectuada la poda y también, para evitar la diseminación del problema, la remoción de los brazos ya dañados hasta un sector en donde no se observe el avance del hongo y aplicar pintura en la herida. En relación al uso de fungicidas, los productos que han mostrado gran eficacia para cubrir las heridas fueron las emulsiones acrílicas con un 3 y 5% de producto activo de carboxin, oxicarboxin o triadimefón, Podexal Super (0,5% de hexaconazole), Bayleton 2 PA (triadimefón) (Auger, 1983 y 1995). En adición a la información anterior, Auger *et al.*, (2010) señalan que en pruebas *in vitro*, tebuconazole, prochloraz y prochloraz + carbendazima son los fungicidas más efectivos para la inhibición del crecimiento micelial de *F. vitis*.

En búsqueda de alternativas al uso de fungicidas químicos, el control biológico puede ser una herramienta bastante efectiva en el control de ciertos patógenos de plantas. El control biológico, según Pérez (2005), constituye una práctica ampliamente difundida, no obstante sigue siendo objeto de investigación y desarrollo en Chile. Al respecto, Montealegre (2005) indica que, como método alternativo al uso de agroquímicos, el control biológico ha ido adquiriendo una mayor importancia ya sea por la producción eco-compatible y sustentable, como también por las exigencias del mercado hortofrutícola tanto interno como externo.

¹ Dr. Josep Armengol Fortí, Catedrático de universidad, Universidad Politécnica de Valencia, 2010. (Comunicación personal).

Distintos biocontroladores se utilizan en el mundo y en Chile, siendo los más utilizados las especies del hongo *Trichoderma* spp., como también distintas bacterias, principalmente del género *Bacillus*. En referencia al tema, Montealegre² (2010) señala que hay algunas investigaciones que indican que existen cepas de hongos del género *Trichoderma*, nativas y mejoradas, que han demostrado un buen nivel de control *in vitro* de *F. vitis*. Giogia *et al.* (2006), indican que el producto BINAB T® Pellet (*Trichoderma harzianum* y *T. polysporum*) aplicado durante el primer año de la presencia de la sintomatología de Enrollamiento clorótico, reduce en promedio un 85% la incidencia de plantas enfermas a la siguiente temporada, mostrando un claro efecto en el control y supresión de la enfermedad.

En base a los antecedentes expuestos, la hipótesis que se postula en esta investigación es que “existen biocontroladores que, *in vitro*, ejercen un buen control de las cepas de basidiomycotas asociadas a síntomas de degradación de la madera de la vid”.

El objetivo general de esta memoria de título fue “evaluar *in vitro* la efectividad de diferentes bioantagonistas en el control de hongos lignícolas asociados a los síntomas de la degradación de la madera de la Vid”.

Los objetivos específicos fueron:

1. Caracterizar aislados de hongos lignícolas asociados a la degradación de la madera de la vid, en cuanto al efecto *in vitro* de la temperatura y pH.
2. Evaluar la efectividad, *in vitro*, de diferentes bioantagonistas sobre cepas de hongos lignícolas asociados a la degradación de la madera de la vid.

² Jaime Montealegre. Ingeniero Agrónomo Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Departamento de Sanidad Vegetal. 2010. (Comunicación personal).

MATERIALES Y METODOS

Lugar del estudio

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Sanidad Vegetal, de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Materiales

Se utilizaron los materiales, instrumentos y equipos del Laboratorio de Microbiología, además de cepas de hongos lignícolas asociados a degradación de la madera de la vid, provenientes de las Regiones IV de Coquimbo, V Región de Valparaíso y de la Región Metropolitana de Chile.

Se utilizaron los siguientes bioantagonistas pertenecientes al cepario del Laboratorio de Microbiología:

- **Bacterias**
 - *Bacillus* sp., cepa 1.
 - *Paenibacillus* sp., cepas 1 y 2.

- **Hongos**
 - *Trichoderma harzianum*, cepas Th 650, Th 12A 10.1 y ThF 2-1.
 - *Clonostachys rosea*, cepas 24-A y 24-B.

- **Productos comerciales**
 - En base a bacterias: Actinovate® (Ingrediente activo: *Streptomyces lydicus* WYEC108).
 - En base a *Trichoderma* spp.: Trichonativa® (Ingrediente activo: *Trichoderma virens*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma parceramosum*).

Las cepas Th 12A 10.1 y ThF 2-1 corresponden a cepas mejoradas a través de la luz UV y fusión de protoplastos respectivamente (Besoain *et al.*, 2007).

Metodología

Para el desarrollo de los objetivos planteados, se realizaron los siguientes procedimientos y evaluaciones *in vitro*:

1) Cepas aisladas

Se utilizaron las siguientes cepas de hongos lignícolas asociados a síntomas de degradación de la madera de la vid obtenidas de parronales y/o viñedos que presentaban los síntomas de la enfermedad (Enrollamiento clorótico).

- Región Metropolitana: 4 cepas (M1, M2, M3 y M4), provenientes de la comuna

de Alto Jahuel, cultivar Cabernet Sauvignon.

- V Región de Valparaíso: 3 cepas (LL1, LL2 y LL3), provenientes de la localidad de Llay-Llay, cultivar Crimson Seedless.
- IV Región de Coquimbo: 6 cepas (LSPB1, LSPB2, LSPB3, LSPB4, LSNR1 y LSNR2), provenientes de la comuna de Monte Patria, cultivar Superior.

Las muestras se trasladaron identificadas y refrigeradas al Laboratorio. Posteriormente se realizaron aislamientos desde las zonas con pudrición de color pardo-claro y blanda, para luego sembrar en Agar Papa Dextrosa (APD) y obtener cultivos puros de las cepas. Estas fueron guardadas mediante la técnica de almacenamiento en trozos de papel estéril (Montealegre³, 2009), y en frascos viales con medio APD en un refrigerador a 6°C.

2) Caracterización de las cepas aisladas

Las cepas de los basidiomycotas aislados se caracterizaron respecto a su respuesta a diferentes temperaturas y pH en medio APD, utilizando la metodología de Donoso (2003), con el fin de realizar las pruebas de antagonismo a la temperatura y pH óptimos para estas. La metodología consistió en:

- **Evaluación del rango óptimo de temperatura**

Las diferentes cepas se hicieron crecer en APD (pH 5,6), a 19°C, 22°C, 25°C y 28°C.

- **Evaluación del rango óptimo de pH**

Las diferentes cepas se hicieron crecer a la temperatura óptima de estas en medio APD a diferentes pH (5, 6, 7 y 8) para determinar sus respectivos valores óptimos de crecimiento. Para ajustar el pH, se adicionó HCl o NaOH al medio de cultivo APD al momento de la preparación. Para la medición del pH del medio se utilizó un pH-imetro. Luego se sembraron y posteriormente incubaron en una cámara de cultivo.

Para determinar el rango óptimo de crecimiento, tanto a diferentes temperaturas como pH, se evaluó el crecimiento radial de las colonias con un pie de metro luego de 11 días post siembra.

Análisis estadístico

Luego de realizados los ensayos de temperatura y pH, los resultados obtenidos y sus promedios fueron sometidos a un ANDEVA y, posteriormente a la prueba de comparación múltiple LSD de Fisher.

³ Jaime Montealegre. Ingeniero Agrónomo Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Departamento de Sanidad Vegetal. 2009. (Comunicación personal).

3) Pruebas de antagonismo

3.1) Directo (Dennis y Webster, 1971a)

- Bacterias

En una placa Petri con medio APD se procedió a disponer las cepas de los aislados basidiomycotas en el centro de la placa (disco de 5 mm de diámetro de la zona de avance de un cultivo puro). Luego se sembró el antagonista de manera equidistante con las cepas a 3 cm de distancia, como se observa en la Figura 1. El antagonista se sembró utilizando la técnica del pincel, obteniéndolo de una suspensión bacteriana (5×10^8 ufc \cdot mL⁻¹), la cual se preparó a partir de un cultivo puro de 24 horas en medio B de King (Reyes, 2000). Para la preparación de la suspensión bacteriana se utilizó un Espectrofotómetro con una longitud de onda de 640 nm.

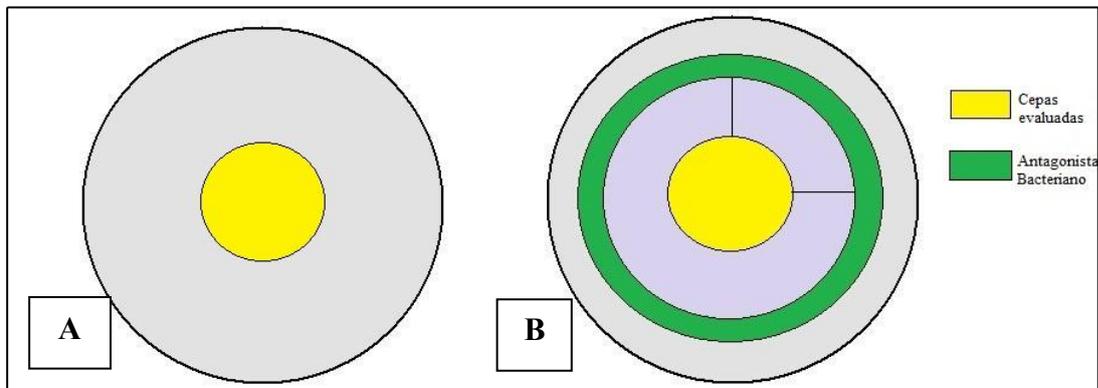


Figura 1: Determinación de antagonismo bacteriano directo. **A:** siembra de la cepa de hongo lignícola al centro de la placa. **B:** siembra del antagonista con un pincel, alrededor de la cepa fungosa.

El tratamiento testigo consistió en el reemplazo del antagonista por agua destilada estéril (ADE) en la placa con el medio APD. La evaluación consistió en medir el radio de crecimiento de las cepas evaluadas y se realizó cuando estas sobrepasaron el depósito de ADE. En base a la evaluación, se calculó el porcentaje de inhibición a través de la siguiente fórmula:

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

En el caso del producto Actinovate® (en base a *Streptomyces lydicus* WYEC108), se realizó la siembra del antagonista (1×10^7 ufc/g de producto comercial) por medio de la técnica del pincel, y luego de transcurridas 96 horas de edad, tiempo en el cual se esperó la producción de sus metabolitos difusibles (Montealegre, 2010)⁴, se procedió a sembrar un disco de las cepas recuperadas en la placa de Petri. El tratamiento testigo y el procedimiento de evaluación, se realizaron de la misma manera que con las

⁴ Jaime Montealegre. Ingeniero Agrónomo Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Departamento de Sanidad Vegetal. 2010. (Comunicación personal).

otras bacterias utilizadas.

- **Hongos**

En una placa de Petri con medio APD, utilizando la temperatura y pH óptimos previamente determinados de las cepas de basidiomycotas, se sembraron 2 discos de micelio de 5 mm de diámetro (basidiomycota y antagonista), los que se obtuvieron con un sacabocados desde los márgenes de cultivos puros de, 11 días de crecimiento (basidiomycotas degradadores de la madera) y entre 3 y 8 días (*Trichoderma* spp. y *C. rosea*, respectivamente). Se colocaron frente a frente a 4 cm y en forma equidistante del centro de la placa, como se observa en la Figura 2.

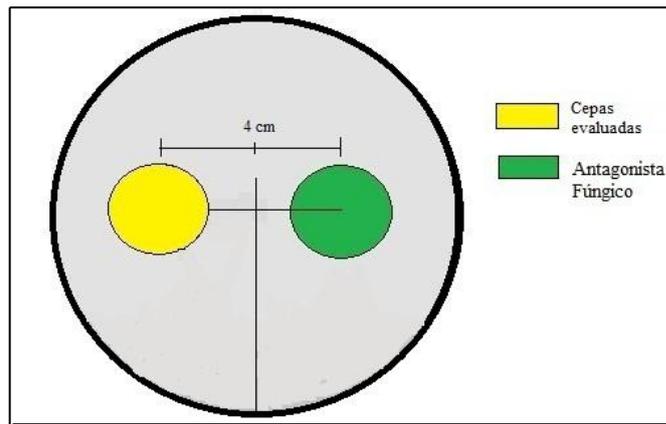


Figura 2: Determinación de antagonismo directo para bioantagonistas fungosos.

Luego las placas se incubaron a la temperatura y pH óptimos determinados, acorde con los resultados obtenidos (28°C y pH 6). Se realizaron 3 repeticiones para cada una de las cepas de basidiomycotas junto al antagonista. El tratamiento testigo consistió en un disco de micelio de las cepas las cuales se hicieron crecer en el medio APD, y en la posición del antagonista se dispuso un disco de APD. La evaluación, se realizó cuando el crecimiento del testigo alcanzó la posición inicial del antagonista, utilizándose la siguiente fórmula:

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

Basándose en los resultados obtenidos de los ensayos de antagonismo directo, en los cuales se estableció cuales cepas fueron más y menos inhibidas en su crecimiento miceliar, se determinó el uso de los bioantagonistas más efectivos entre cepas de la misma especie (ya sea bacteria u hongo), además de los siguientes antagonistas:

- **Bacterias**

- *Bacillus* sp. (cepa 1).

- **Productos comerciales**

- En base a bacterias: Actinovate® (Ingrediente activo: *Streptomyces lydicus* WYEC108).

- En base de *Trichoderma*: Trichonativa® (ingrediente activo: *Trichoderma virens*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma parceramosum*).

Considerando los resultados obtenidos en las pruebas de antagonismo directo, las cepas de los basidiomycotas que se siguieron evaluando se restringieron a aquellas que fueron más inhibidas, menos inhibidas, y el promedio dentro del resultado total de inhibición de las cepas, por los antagonistas.

3.2) Metabolitos difusibles (Dennis y Webster, 1971b)

- Bacterias

Se utilizaron placas de Petri con medio APD, en las que se depositó un filtro milipórico (Millipore™) de 0,22 μm de tamaño de poros y de un diámetro menor al de la placa. Sobre el filtro milipórico se depositó 30 μL de suspensión bacteriana del antagonista (5×10^8 ufc·mL⁻¹), la que se obtuvo desde un cultivo puro de 24 horas de edad en medio B de King (Schaad *et al*, 2001). Ésta suspensión se distribuyó homogéneamente en gotas de manera circundante en el centro del filtro milipórico (ver Figura 3, B), sobre el filtro milipórico en forma de gotas. Para la preparación de la suspensión bacteriana se utilizó un Espectrofotómetro.

Posteriormente, a las 48 horas se retiró el filtro milipórico junto con el antagonista. Luego, en la misma placa y en la zona donde se había depositado el filtro milipórico, se colocó un disco de 5 mm de diámetro de las cepas evaluadas, tomado de la zona de avance de un cultivo de 11 días aproximadamente. El procedimiento se explica en la Figura 3.

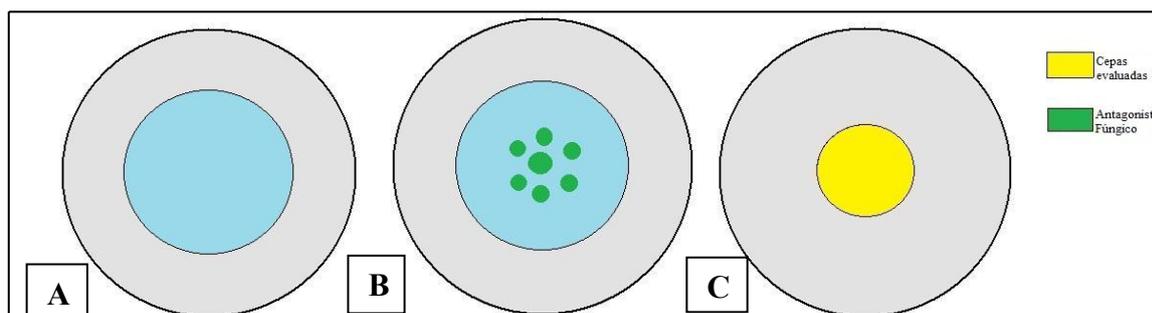


Figura 3: Esquema de antagonismo bacteriano por medio de metabolitos difusibles. **A:** postura del filtro milipórico. **B:** deposito del antagonista bacteriano. **C:** posterior retiro del filtro milipórico con el antagonista y siembra de las cepas evaluadas.

El tratamiento Testigo consistió en depositar ADE sobre el filtro milipórico en vez del antagonista. Transcurridas las 48 horas, se retiró el filtro milipórico y se puso un disco de APD de las cepas de basidiomycotas. La evaluación se efectuó cuando las cepas alcanzaron el borde de la placa, mediante la medición del crecimiento de éstas. Posteriormente se calculó el porcentaje de inhibición causado por el antagonista.

En el caso del producto Actinovate® (en base a *Streptomyces lydicus* WYEC108), el tiempo de incubación luego de depositada la suspensión del producto (1×10^7 ufc/g de producto comercial) en el filtro milipórico fue de 96 horas (Montealegre, 2010)⁵. Posteriormente, se procedió a continuar con el mismo procedimiento realizado con los otros antagonistas bacterianos.

- **Hongos**

Las placas de Petri con medio APD se tapizaron con papel celofán (sin film impermeabilizante) con forma de círculo pero de diámetro menor al de la placa de Petri. El papel celofán se esterilizó previamente en autoclave entre trozos de gasa a 121°C por 5 minutos.

En el centro de la placa de Petri con APD y el papel celofán, se depositó un disco de APD de 5 mm de diámetro del hongo antagonista. Cuando este creció lo suficiente, antes de llegar al borde del papel celofán, se procedió a retirar el papel con el antagonista por medio de una pinza, teniendo la precaución de que no existiera ningún contacto entre el bioantagonista y la superficie del agar y que tampoco se encontrara esporulado. Luego se colocó un disco de 5 mm de diámetro extraído de un cultivo de las cepas basidiomycotas, procedimiento que se presenta en la Figura 4.

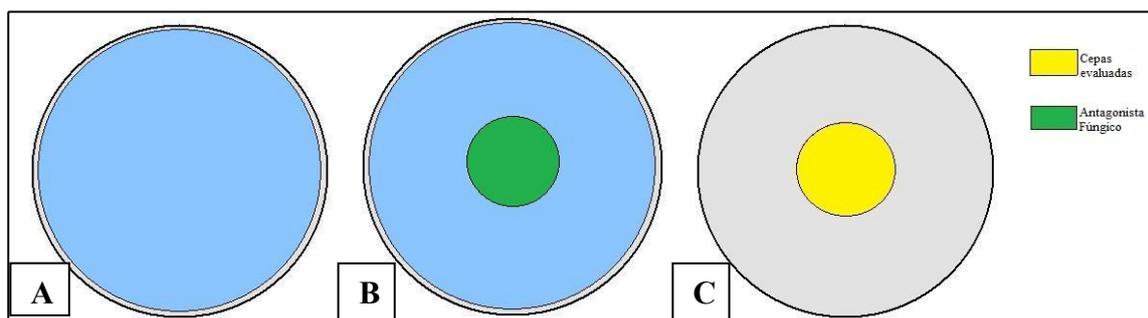


Figura 4: Determinación de antagonismo fúngico de metabolitos difusibles. **A:** Ubicación del papel celofán. **B:** Siembra del antagonista fúngico. **C:** Posterior retiro del papel celofán con el antagonista antes que esporule, para luego proceder a sembrar las cepas lignícolas.

El tratamiento Testigo correspondió a placas de Petri en las cuales el antagonista fue reemplazado por un disco de APD sobre el papel celofán. Luego se retiró el papel junto con el disco de APD y posteriormente se sembró un disco de APD de las cepas basidiomycotas. Se midió con un pie de metro el crecimiento radial de las cepas cuando estas cubrieron toda la superficie de la placa Petri.

⁵ Jaime Montealegre. Ingeniero Agrónomo Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Departamento de Sanidad Vegetal. 2010. (Comunicación personal).

Análisis estadístico

Luego de realizados los ensayos, los resultados de las inhibiciones correspondientes (valores en porcentaje) fueron transformados mediante la Transformación Angular de Bliss y los valores obtenidos sometidos a un ANDEVA y posteriormente a una prueba de comparación múltiple LSD de Fisher.

Los datos correspondientes al análisis para determinar a los biocontroladores más efectivos en relación al porcentaje de inhibición micelial de las cepas basidiomycotas (porcentaje de inhibición versus antagonistas utilizados), fueron analizados considerando los promedios obtenidos por estos en cada uno de los ensayos realizados. Posteriormente fueron sometidos a un ANDEVA y luego a una comparación múltiple LSD de Fisher.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Caracterización de las cepas aisladas

- Determinación de la temperatura óptima de crecimiento

A continuación se presentan los resultados por cepa, de crecimiento miceliar a diferentes temperaturas, de los basidiomycotas evaluados.

Cuadro 1. Crecimiento miceliar de las cepas evaluadas, expresado en mm, a distintas temperaturas.

Cepas evaluadas	Temperaturas / Crecimiento miceliar (mm)			
	19°C	22°C	25°C	28°C
M1	47,600 c	70,467 b	82,900 a	86,000 a
M2	43,867 c	49,900 b	71,667 a	74,800 a
M3	43,667 c	55, 633 b	76,700 a	86,000 a
M4	55,833 c	62,900 b	84,000 a	86,000 a
LL1	24,900 c	44,167 b	66,033 a	69,300 a
LL2	35,100 b	35,967 b	65,867 a	65,567 a
LL3	31,500 d	53,133 c	66,133 b	77,367 a
LSPB1	40,433 d	58,233 c	77,133 b	84,067 a
LSPB2	42,033 c	60,500 b	73,433 a	76,333 a
LSPB3	57,800 c	73,400 b	84,533 a	84,200 a
LSPB4	52,200 c	64,400 b	77,167 a	78,467 a
LSNR1	36,667 c	52,933 b	68,600 a	73,867 a
LSNR2	41,800 c	53,433 b	69,400 a	75,600 a
Promedio	42,569 c	56,619 b	74,120 a	78,274 a

Letras iguales en la fila indican que no difieren significativamente entre sí, según la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher, $p \leq 0,05$.

Como se puede observar en el Cuadro 1, para todas las cepas evaluadas el óptimo de crecimiento miceliar se obtuvo a los 28°C, indistintamente de que entre los valores promedio de crecimiento a los 25°C y 28°C no existieron diferencias estadísticas entre sí. Esta razón, además de la inexistencia de datos en la literatura referentes a la temperatura de desarrollo de hongos degradadores de madera, como *F. vitis*, permite determinar que la temperatura óptima de crecimiento *in vitro* de las cepas de los

basidiomycotas asociados a síntomas de degradación de la madera de la vid, se encuentran entre los 25 y 28°C; por lo tanto, en los ensayos posteriores, se consideró la temperatura que permitió obtener un mayor desarrollo fungoso (28°C) (Figura 5). En la Figura 5, se puede observar gráficamente el crecimiento micelial promedio por temperatura, de todas las cepas evaluadas.

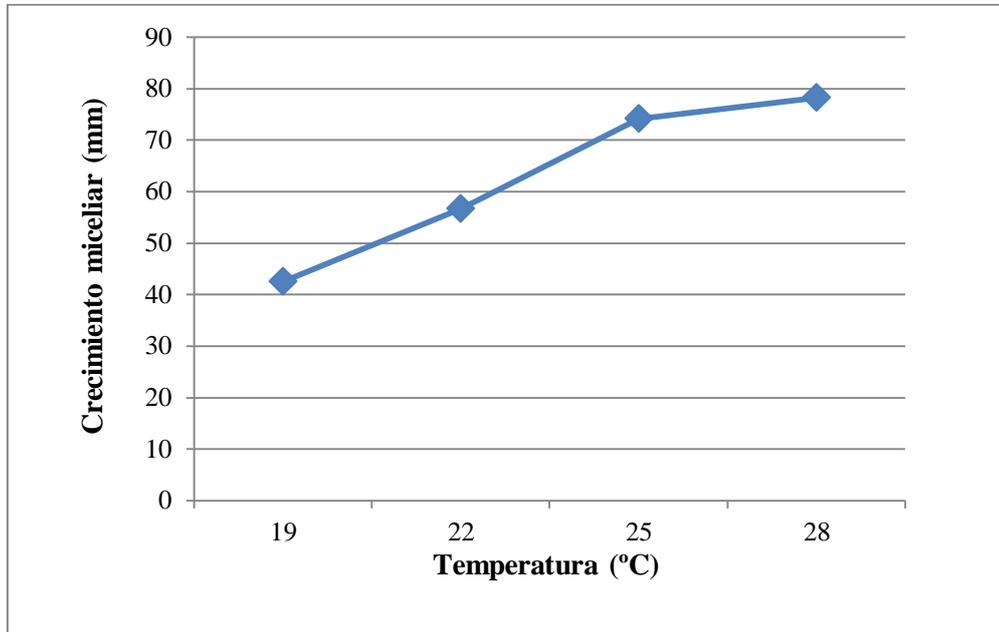


Figura 5: Crecimiento promedio de las cepas evaluadas a diferentes temperaturas.

En la Figura 6 se presentan fotografías de crecimiento a los 11 días de la cepa LSPB4, creciendo a distintas temperaturas.

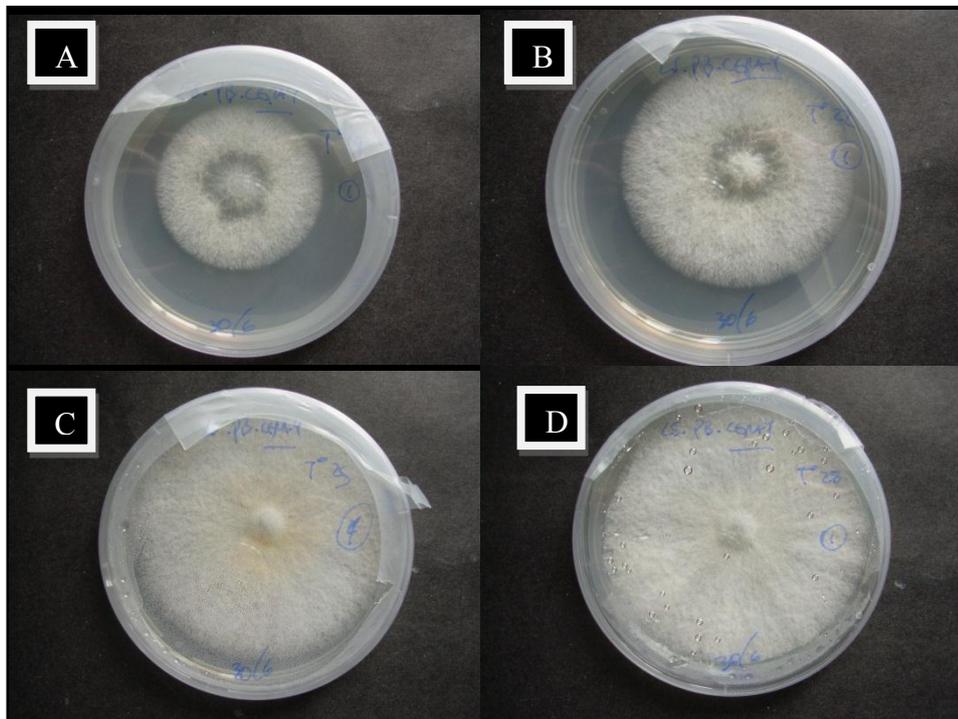


Figura 6: Cepa LSPB 4 a distintas temperaturas, a los 11 días de crecimiento. **A)** Tratamiento a 19°C. **B)** Tratamiento a 22°C. **C)** Tratamiento a 25°C. **D)** Tratamiento a 28°C.

- Determinación de pH óptimo de crecimiento

A continuación se presentan los resultados de crecimiento miceliar por cepa, correspondiente al ensayo de pH.

Cuadro 2. Crecimiento miceliar a diferentes pH de las cepas evaluadas, expresado en mm.

Cepas evaluadas	pH / Crecimiento miceliar (mm)			
	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
M1	80,500 a	80,633 a	79,000 ab	77,000 b
M2	80,800 a	78,233 ab	76,667 b	76,433 b
M3	76,133 b	79,300 a	76,233 b	76,300 b
M4	70,933 ab	74,600 a	72,267 a	67,367 b
LL1	74,000 b	78,400 a	71,167 b	71,333 b
LL2	71,700 b	75,300 a	74,333 ab	72,467 ab
LL3	75,933 a	76,467 a	73,700 a	75,,133 a
LSPB1	77,233 ab	80,567 a	72,833 ab	66,800 b
LSPB2	84,767 a	84,800 a	78,333 a	65,567 b
LSPB3	84,900 a	81,633 ab	80,700 ab	73,700 b
LSPB4	86,000 a	86,000 a	84,633 a	67,733 b
LSNR1	82,467 a	83,600 a	82,100 a	65,367 b
LSNR2	84,733 a	86,000 a	83,433 a	72,067 b
Promedio	79,238 a	80,426 a	77,338 a	71,328 b

Letras iguales en la fila indican que no difieren significativamente entre sí, según la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher, $p \leq 0,05$.

En el Cuadro 2, se observa que el mayor crecimiento miceliar de las diferentes cepas evaluadas se obtuvo a pH 6 (Figura 7), independientemente de que no se detectaron diferencias estadísticas respecto de pH 5 y 7.

En base a los resultados obtenidos con las diferentes cepas, se consideró como pH 6 al valor óptimo de crecimiento de las cepas evaluadas. Al igual que para la temperatura, no existen datos en la literatura respecto al pH óptimo de desarrollo *in vitro* de hongos basidiomycotas relacionados con la degradación de la madera de la vid. Por lo tanto, se utilizó este valor de pH para realizar los ensayos de antagonismo

posteriores.

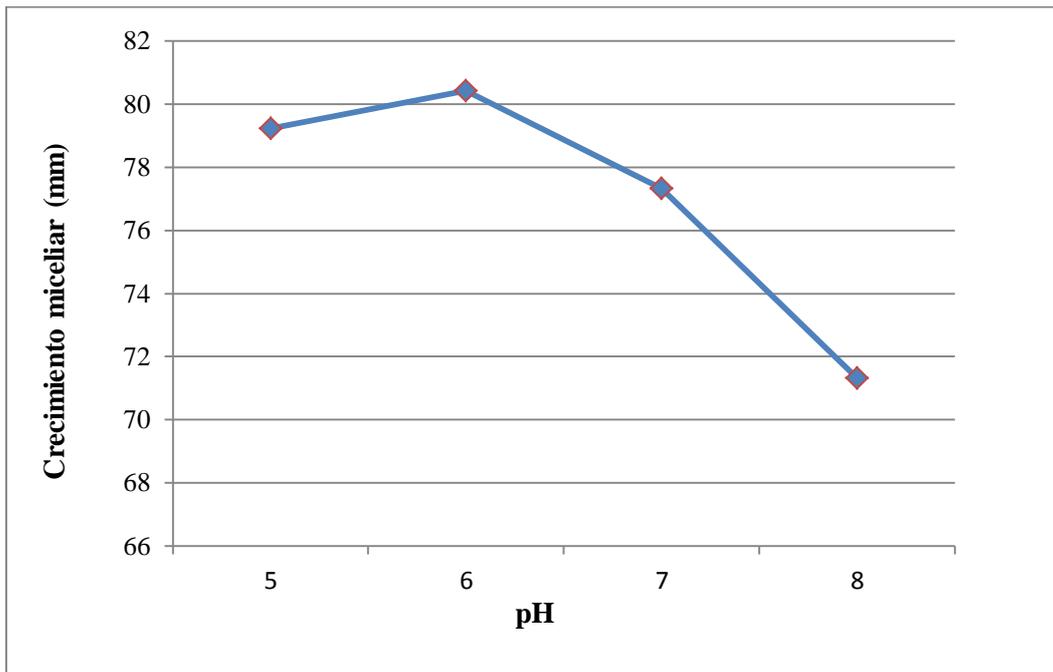


Figura 7: Crecimiento promedio de las cepas evaluadas a diferentes pH.

En la Figura 8, se presentan fotografías de crecimiento a diferentes pH, de la cepa LL2.

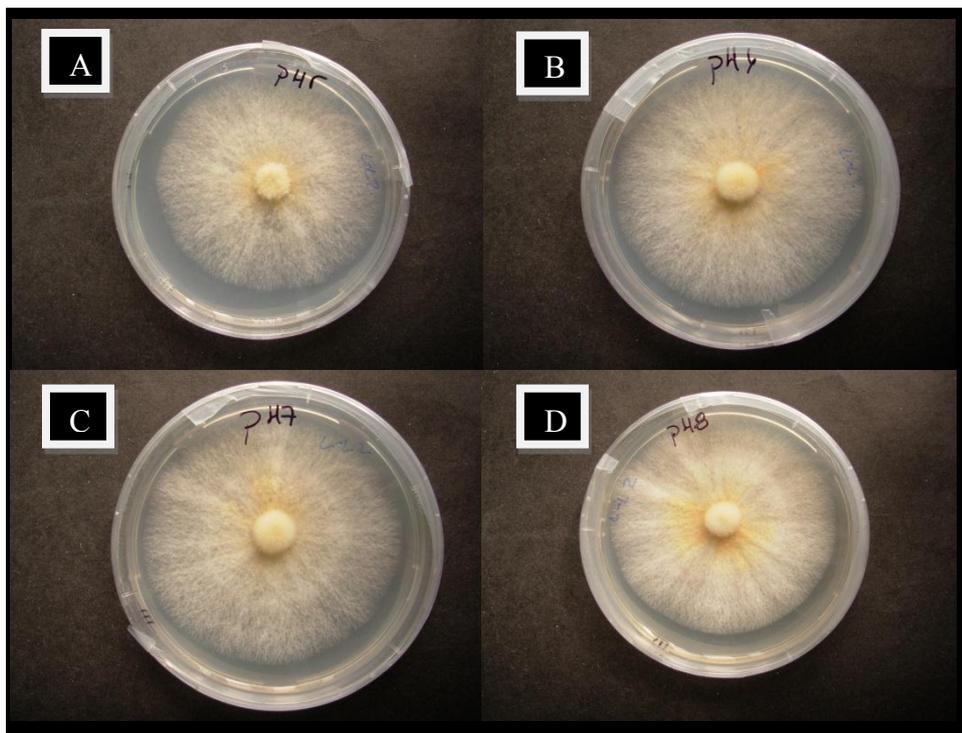


Figura 8: Crecimiento de la cepa LL2, a distintos pH. A) pH 5. B) pH 6. C) pH 7. D) pH 8.

2. Pruebas de Antagonismo

2.1. Antagonismo Directo

- Bacterias

En el Cuadro 3 se presentan los resultados de antagonismo directo de las bacterias *Bacillus* sp. y *Paenibacillus* sp.

Cuadro 3. Antagonismo directo medido como el porcentaje de inhibición del crecimiento miceliar por *Bacillus* sp. y *Paenibacillus* sp. sobre las cepas evaluadas.

Bioantagonistas bacterianos y Porcentaje de Inhibición (%)					
Cepas evaluadas	<i>Bacillus</i> sp. (cepa 1)	Cepas evaluadas	<i>Paenibacillus</i> sp. (cepa 1)	Cepas evaluadas	<i>Paenibacillus</i> sp. (cepa 2)
LSPB1	38,97 a	LL2	70,47 a	LL3	54,83 a
LSPB4	22,75 b	LL1	70,14 a	LL2	53,19 ab
LSNR2	21,08 bc	LSNR2	69,47 ab	M3	49,50 bc
LSPB2	21,11 bc	LSNR1	66,64 bc	M2	48,78 cd
LL1	20,86 bc	LL3	66,19 c	LL1	48,36 cd
LSPB3	19,75 bc	LSPB3	65,53 c	M1	48,17 cd
M2	16,56 bcd	LSPB1	61,67 d	LSPB1	45,06 de
M3	16,08 bcd	LSPB4	60,92 d	M4	44,97 de
M1	15,94 cd	M3	60,86 d	LSNR2	42,69 ef
M4	15,28 cd	LSPB2	60,56 d	LSBP4	39,83 fg
LSNR1	13,19 d	M1	59,19 d	LSPB2	39,47 fg
LL3	12,97 d	M4	59,00 d	LSNR1	39,47 fg
LL2	11,67 d	M2	55,44 e	LSPB3	37,17 g
Promedio	18,94 c		63,54 a		45,50 b

Letras iguales en columnas indican que no difieren significativamente entre sí, según la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher, $p \leq 0,05$. En el caso de los valores en casilla Promedio, esto rige en la fila.

Como se observa en el Cuadro 3, existen niveles de antagonismo diferentes acorde con los biocontroladores utilizados y las cepas de hongos degradadores de la madera. Existe una clara diferencia entre los bioantagonistas utilizados, observándose una mayor inhibición con las dos cepas de *Paenibacillus*, siendo la cepa 1 la más activa, logrando incluso hasta un 70,47% de inhibición de crecimiento miceliar en una de las cepas evaluadas. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Reyes (2000) para *Rhizoctonia solani*, en donde la cepa que mostró el mayor grado de inhibición en las pruebas de antagonismo correspondió a la cepa 2.

En relación a *Bacillus* sp., Ferreira *et. al* (1991) indican que éste genera cierta inhibición en el crecimiento miceliar y germinación de ascosporas de *Eutypa lata*, hongo causante de la “Eutipiosis” de la vid, debido a antibióticos desarrollados por la bacteria que impiden el desarrollo normal del hongo. El mismo autor señala que la inhibición miceliar que generó la bacteria sobre el hongo es considerada como mecanismo de acción de “antibiosis”, en el cual los metabolitos tóxicos pueden penetrar a la célula e inhibir su actividad por toxicidad química.

En la Figura 9, se presentan fotografías de los resultados, observándose el grado de inhibición de la especie de *Bacillus* sp. cepa 1, reflejado en el crecimiento micelial de las cepas evaluadas. Se puede advertir que en este caso, no se genera un “halo” inhibitorio alrededor de estas.

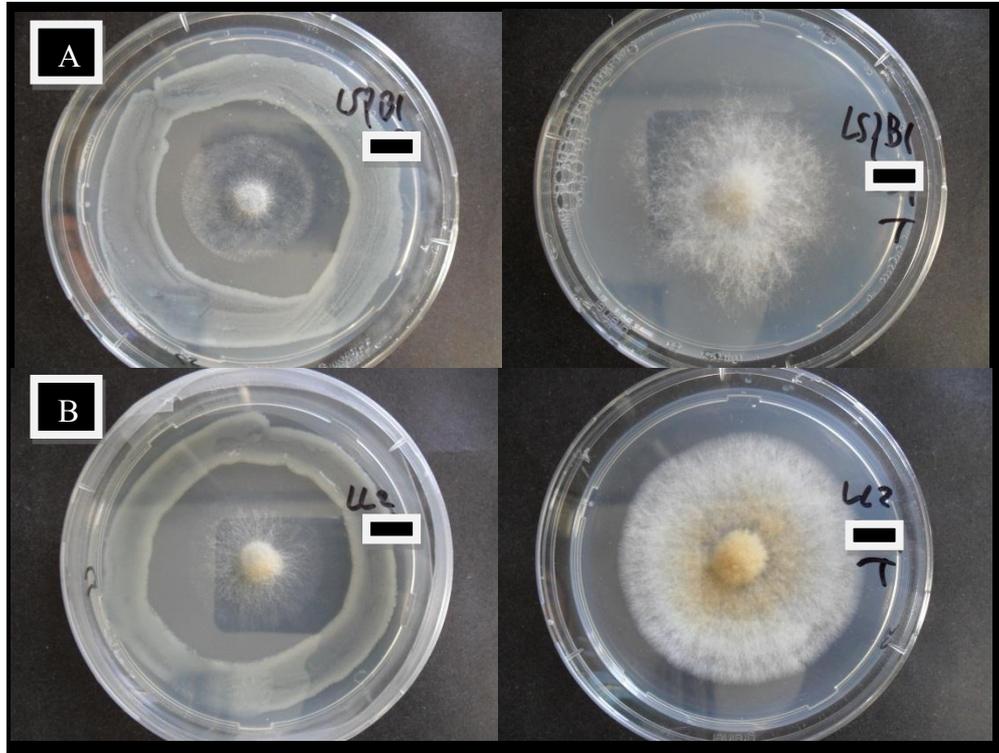


Figura 9: Inhibición del crecimiento micelial de cepas de hongos degradadores de la madera de la vid, por medio de antagonismo directo de *Bacillus* sp. cepa 1 (Izq: Tratamiento con la bacteria. Der: Tratamiento Testigo.). **A)** Cepa LSPB1, correspondiente a la más inhibida. **B)** Cepa LL2, correspondiente a la cepa menos inhibida.

Con respecto a los mecanismos de biocontrol utilizados por la cepa 1 de *Paenibacillus* sp., Montealegre *et al.* (2005) indican que el mecanismo más probable para este bioantagonista es la secreción de antibióticos.

En la Figura 10 se observa el grado de inhibición generado por las dos cepas de *Paenibacillus* sp. sobre el crecimiento de las cepas evaluadas. Existe una clara diferencia entre ambas cepas comparadas con la cepa de *Bacillus*, observándose en algunos casos incluso el “halo” inhibitorio que se genera al entrar en contacto las hifas del hongo con los metabolitos producidos por las bacterias, indicando que ambas poseen el mismo mecanismo de acción frente al hongo, pero probablemente generaría una mayor cantidad de metabolitos distintos a los que produce *Bacillus* sp.

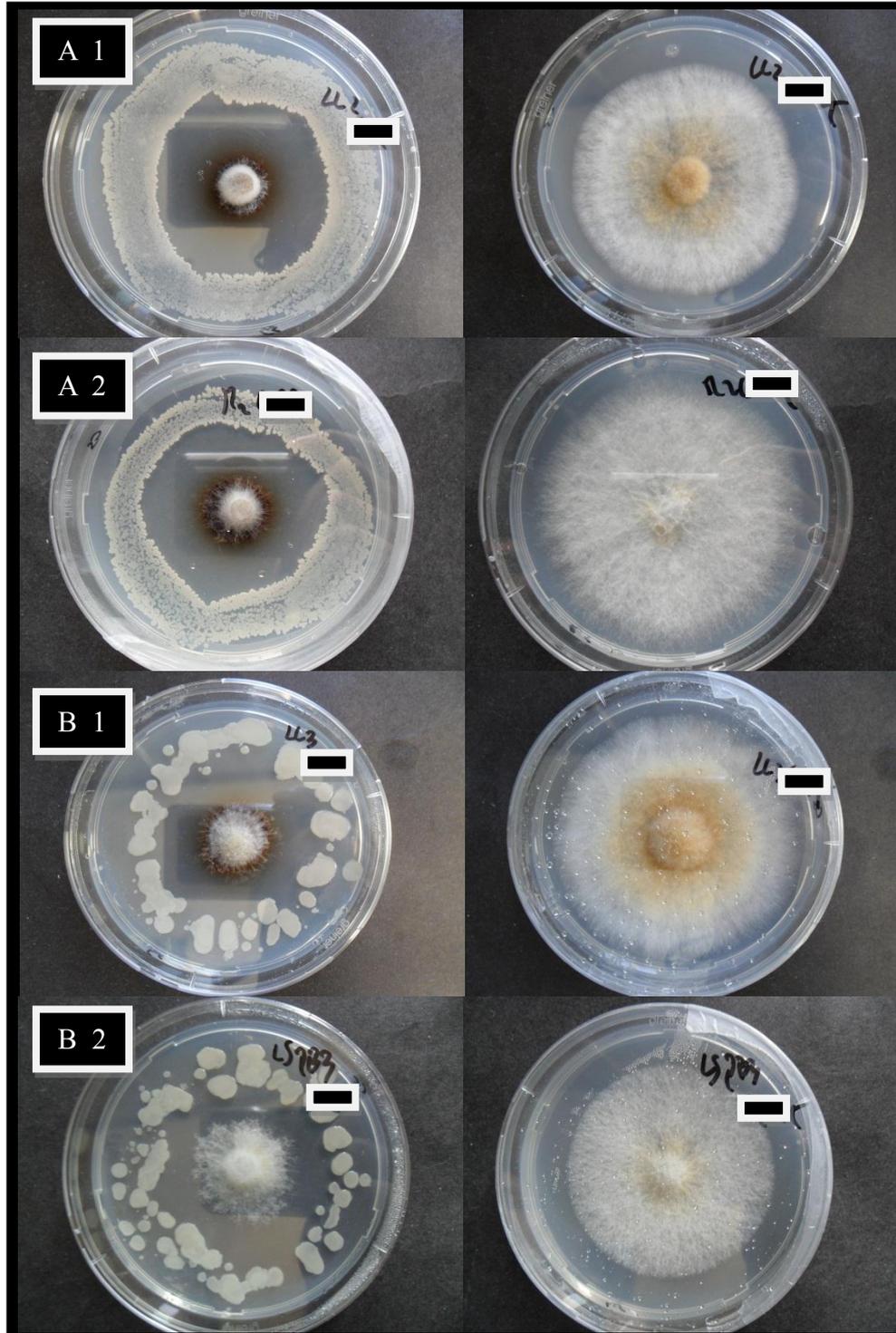


Figura 10: Inhibición del crecimiento micelial de cepas de hongos degradadores de la madera de la vid, por medio de antagonismo directo de las cepas 1 y 2 de *Paenibacillus* sp.. (Izq: Tratamiento con la bacteria. Der: Tratamiento Testigo.). **A)** Cepa 1: **1.** Cepa LL2, correspondiente a la más inhibida. **2.** Cepa M2, correspondiente a la cepa menos inhibida. **B)** Cepa 2 **1.** Cepa LL3, correspondiente a la más inhibida. **2.** Cepa LSPB3, correspondiente a la cepa menos inhibida.

Los resultados obtenidos al utilizar el producto Actinovate®, mostrados en el Cuadro 4, indican un 100% de inhibición del crecimiento miceliar de todas las cepas del hongo evaluadas, siendo el único bioantagonista capaz de lograrlo. Probablemente, estos resultados podrían haber sido variables si en lugar de 4 días de espera para la producción de sus metabolitos, se hubiera inoculado en el mismo momento, como con las otras bacterias utilizadas en los ensayos. Lo anterior permite especular que si este producto se aplicara para el control de estos hongos en el campo, debiera hacerse en forma preventiva.

Cuadro 4. Antagonismo directo medido como el porcentaje de inhibición del crecimiento miceliar de Actinovate®, sobre las cepas evaluadas.

Cepas del patógeno	Nombre del producto y Porcentaje de Inhibición
	Actinovate® (<i>S. lydicus</i> WYEC 108)
LL1	100 a
LL2	100 a
LL3	100 a
LSNR1	100 a
LSNR2	100 a
LSPB1	100 a
LSPB2	100 a
LSPB3	100 a
LSPB4	100 a
M1	100 a
M2	100 a
M3	100 a
M4	100 a

Letras iguales en las columnas indican que no difieren significativamente entre sí, según la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher, $p \leq 0,05$.

Resultados obtenidos por Sarro *et al.* (s.a.) en ensayos realizados sobre distintos patógenos de importancia agrícola, indican que aplicando el producto Actinovate® en la placa 3 a 7 días previo a inoculación del patógeno, inhibe totalmente tanto el crecimiento miceliar como la esporulación de *Pythium ultimum* y *Botrytis cinerea*.

Kumar y Gupta (2006) mencionan a especies del género *Streptomyces* que son productoras no solo de antibióticos, sino también de enzimas extracelulares activas (Quitinasas y β -1,3-glucanasas) en la degradación de la pared celular fungosa. Yuan y Crawford (1995) indican que *S. lydicus* WYEC108, independientemente de tener la capacidad de parasitar hifas de hongos, pareciera no requerir tener contacto directo con la estructura fungosa para afectarla, ya que demuestra una fuerte actividad antifúngica lo que concuerda y explicaría los resultados obtenidos en este trabajo.

En la Figura 11 se muestran los efectos del producto Actinovate® sobre el crecimiento miceliar de las cepas evaluadas, observándose una alta inhibición del

mismo. Las fotografías fueron elegidas al azar del total de cepas evaluadas.

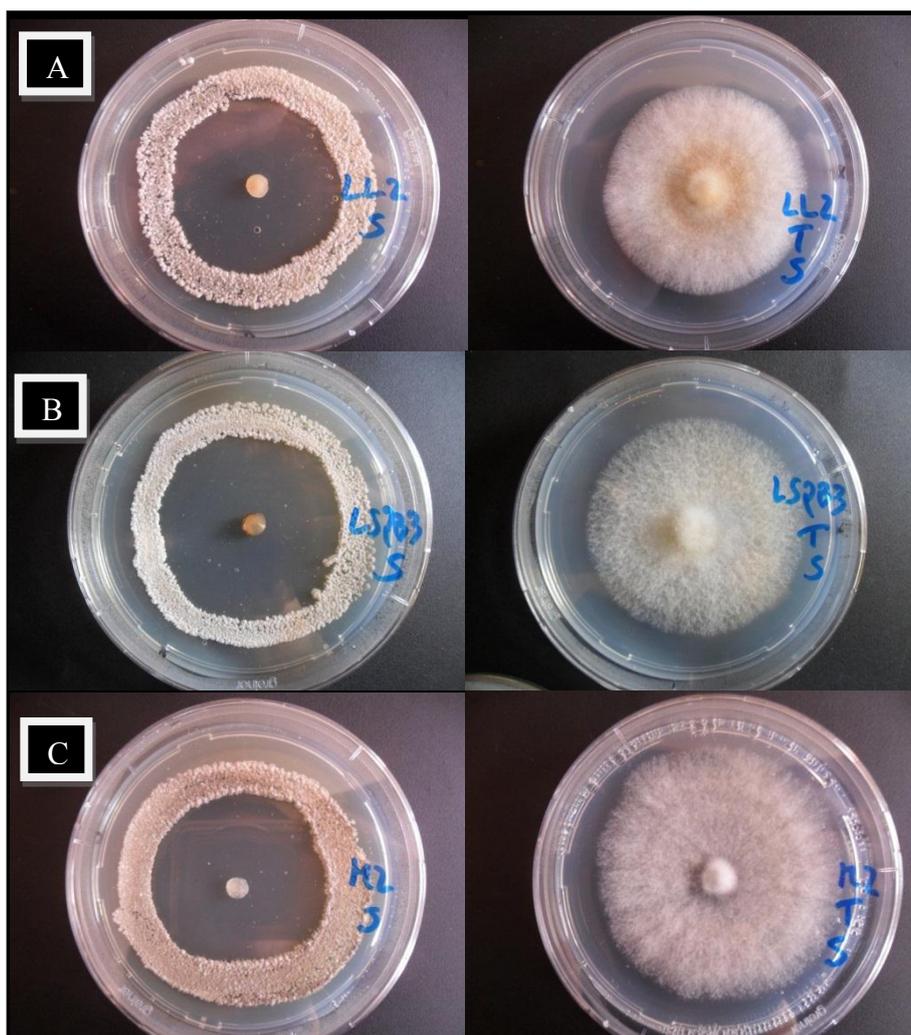


Figura 11: Inhibición del crecimiento micelial de cepas de hongos degradadores de la madera de la vid, por medio de antagonismo directo de la cepa WYEC108 de la *S. lydicus*, obtenida del producto Actinovate® (Foto Izq: Tratamiento con el producto. Foto Der: Tratamiento Testigo.). **A)** Cepa LL2. **B)** Cepa LSPB3. **C)** Cepa M2.

En la Figura 12 se presentan microfotografías, en donde se observa un claro efecto sobre las hifas de las cepas de hongos evaluados por parte de las diferentes bacterias antagonistas que se utilizaron posteriormente, en los ensayos de antagonismo de Metabolitos Difusibles. Las flechas en las fotografías (A, B y C, en la Figura 12) indican tanto el engrosamiento de los ápices de las hifas, como también adelgazamiento y deformación de estas, siendo comparadas con hifas de crecimiento normal (Fotografía D), indicando que es en base a la producción de sus metabolitos difusibles sus mecanismos de acción. Se puede observar que los daños mencionados se observan a lo largo de toda la hifa, y no solo afectando el ápice. Al hacer la comparación entre los daños generados por cada bacteria, se puede comparar el efecto que generan la cepa 1 de *Paenibacillus* sp. (Fotografía A) y *S. lydicus* WYEC108 (Fotografía B), comenzando antes los daños mencionados, observándose primero el crecimiento normal de las hifas del hongo para luego comenzar a adelgazarse, en cambio con la cepa 1 de *Bacillus* sp. (Fotografía C) no ocurre este adelgazamiento prematuro.

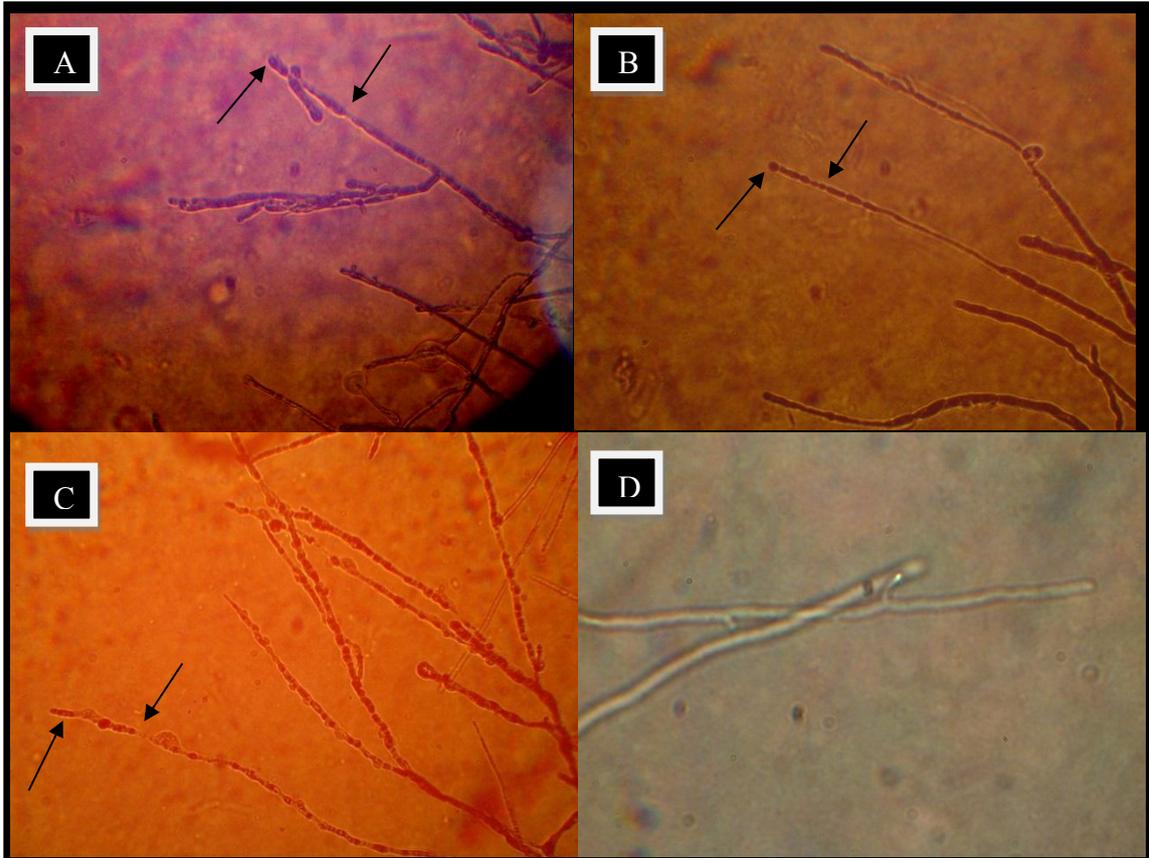


Figura 12: Efecto a nivel microscópico (40X) de antagonismo directo de las diferentes bacterias antagonistas, en una de las cepas evaluadas de hongos degradadores de la madera de la vid. **A)** *Bacillus* sp. cepa 1. **B)** *Paenibacillus* sp. cepa 1. **C)** *S. lydicus* WYEC108 (inoculado de la misma manera que las otras bacterias en el ensayo de antagonismo Directo). **D)** Testigo presentando hifas normales.

- Hongos

En el Cuadro 5, se presentan los resultados de antagonismo directo de las cepas 24-A y 24-B de *Clonostachys rosea*, sobre los hongos basidiomycotas.

Cuadro 5. Antagonismo directo medido como el porcentaje de inhibición de crecimiento miceliar de las cepas antagonistas de *C. rosea* sobre las cepas de los hongos basidiomycotas degradadores de la madera de la vid.

Bioantagonistas fungosos y Porcentaje de Inhibición (%)			
Cepas evaluadas	<i>C. rosea</i> (24-A)	Cepas evaluadas	<i>C. rosea</i> (24-B)
LL2	14,33 a	LSPB3	16,26 a
LL3	12,79 ab	LSNR1	16,05 ab
M2	12,90 ab	M3	14,99 abc
M3	11,82 abc	M2	14,75 abcd
LSPB2	11,68 abc	LSNR2	14,38 abcde
LSNR1	11,52 abc	LL3	14,34 abcde
LSPB3	10,79 bcd	LSPB2	14,08 bcde
LSPB4	10,12 bcd	LL2	13,80 cde
M4	9,84 bcd	LL1	13,56 cde
LSNR2	9,62 cd	M1	13,07 cde
LSPB1	9,04 cd	LSPB4	12,84 de
M1	8,57 d	M4	12,37 e
LL1	8,38 d	LSPB1	9,84 f
Promedio	10,88 b		13,87 a

Letras iguales en las columnas indican que no difieren significativamente entre sí, según la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher, $p \leq 0,05$. En el caso de los valores en casilla Promedio, esto rige en la fila.

Las cepas de *C. rosea* ejercieron un bajo control de las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid mediante antagonismo directo, obteniéndose un máximo de 16,26% de inhibición con la cepa 24-B, en una de las cepas evaluadas (LSPB3). Esto se puede deber a que este bioantagonista crece de manera muy lenta, siendo incluso más lento que el hongo degradador de la madera.

No existe información relacionada a inhibición miceliar por parte de este antagonista sobre basidiomycotas, sin embargo Xue *et al.* (2009) mencionan que *C. rosea* ejerce hasta un 52,6% de inhibición miceliar de *Gibberella zeae*. El mismo autor señala que, además de ejercer micoparasitismo, también posee inhibición por compuestos antifúngicos. Rodríguez *et al.* (2011) señalan que el compuesto antifúngico involucrado en la inhibición miceliar de *Sclerotinia sclerotiorum* por parte del antagonista, corresponde a un péptido de la familia de los peptaibióticos.

En la Figura 13 se puede observar el grado de control que ejercen ambas cepas de *C. rosea*, sobre las cepas de basidiomycotas evaluadas, pudiéndose notar que se genera (al igual que con las cepas de *Paenibacillus* sp.) un leve “halo” de inhibición, intuyéndose que *C. rosea* ejerce su control principalmente debido a la producción de metabolitos difusibles.

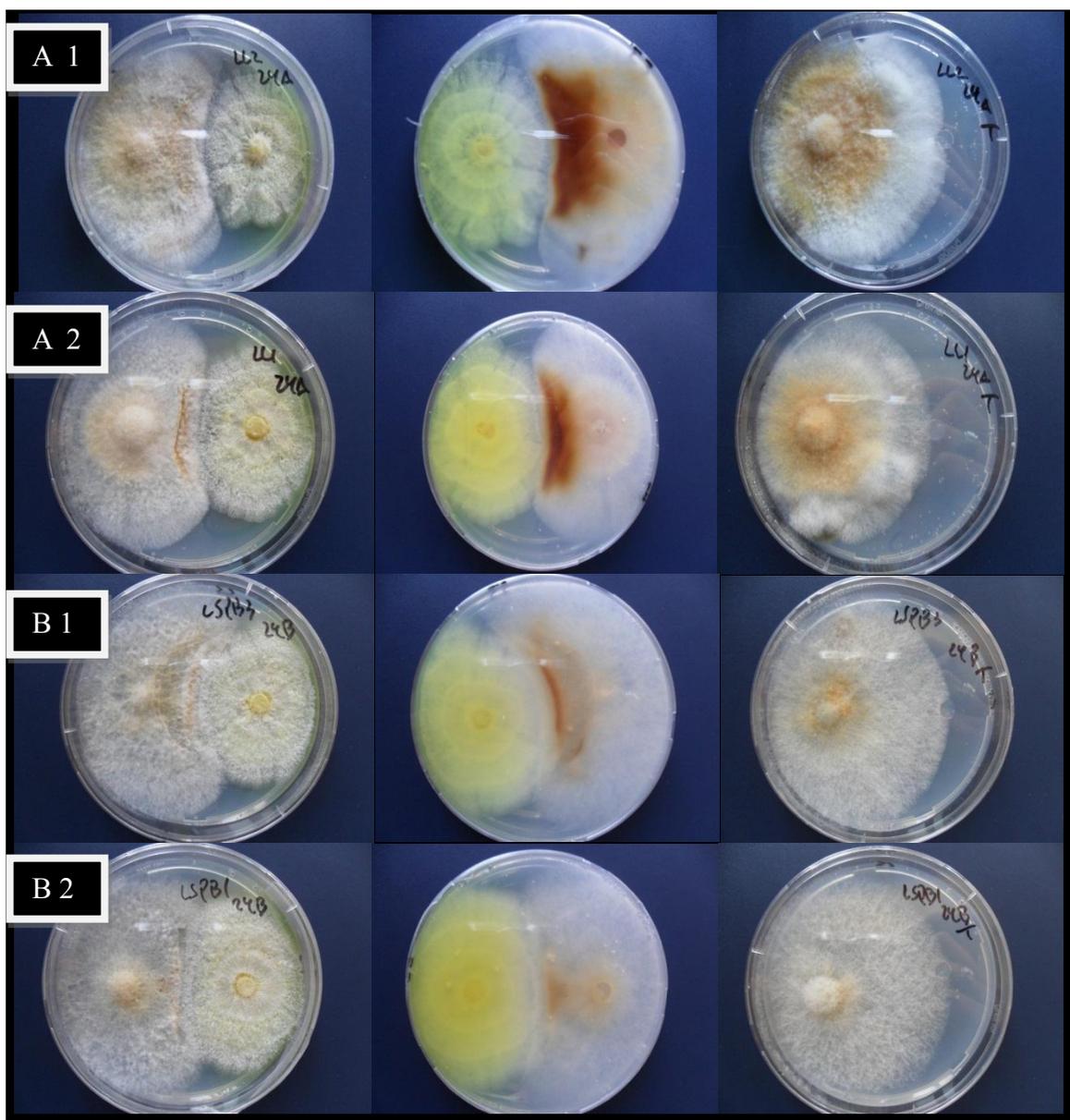


Figura 13: Inhibición del crecimiento micelial de las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid, por medio de antagonismo directo de *C. rosea*, cepas 24-A y 24-B. Disco a la izquierda: Cepas de basidiomycotas evaluadas; Disco a la derecha: Antagonista. (Foto Izq: Tratamiento con el hongo. Foto Der: Tratamiento Testigo.). **A)** Cepa 24-A: **1.** Cepa LL2, correspondiente a la más inhibida. **2.** Cepa LL1, correspondiente a la cepa menos inhibida. **B)** Cepa 24-B: **1.** Cepa LSPB3, correspondiente a la más inhibida. **2.** Cepa LSPB1, correspondiente a la cepa menos inhibida.

En el Cuadro 6, se presentan los resultados correspondientes a las cepas Th 12A 10.1, Th 650 y ThF 2-1 del hongo *Trichoderma harzianum*.

Cuadro 6. Antagonismo directo medido como el porcentaje de inhibición de crecimiento miceliar de las cepas antagonistas de *T. harzianum*. sobre las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid.

Bioantagonistas fungosos y Porcentaje de Inhibición (%)					
Cepas evaluadas	<i>T. harzianum</i> (Th 12A 10.1)	Cepas evaluadas	<i>T. harzianum</i> (Th 650)	Cepas evaluadas	<i>T. harzianum</i> (ThF 2-1)
LL2	86,15 a	LL2	87,77 a	LL2	91,23 a
LSPB4	86,14 a	LSNR2	87,64 a	LSPB4	89,54 ab
LL1	85,23 ab	M2	87,37 ab	M1	89,20 bc
LSPB1	84,49 abc	M3	87,29 ab	M3	88,94 bc
LL3	84,35 bc	M1	86,54 ab	LL3	88,22 bc
LSNR2	84,12 bc	M4	85,70 bc	M4	87,71 bcd
LSPB2	83,54 bc	LSPB2	84,55 cd	M2	87,62 bcde
M1	83,24 cd	LL1	83,85 d	LL1	87,52 cde
M2	82,75 cd	LSNR1	83,59 de	LSNR1	87,41 cde
M3	81,75 de	LSPB3	82,8 def	LSNR2	86,08 def
M4	80,93 e	LSPB4	81,91 ef	LSPB2	85,68 ef
LSNR1	76,31 f	LL3	81,11 fg	LSPB3	85,25 f
LSPB3	75,95 f	LSPB1	80,1 g	LSPB1	85,00 f
Promedio	82,69 b		84,63 b		87,65 a

Letras iguales en las columnas indican que no difieren significativamente entre sí, según la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher, $p \leq 0,05$. En el caso de los valores en casilla Promedio, esto rige en la fila.

Como se observa en el Cuadro 6, los resultados de las cepas de *Trichoderma* reflejan un alto grado de control en comparación con sus símiles de *C. rosea*, obteniéndose un máximo de control en la cepa LL2 con Th 12A 10.1 (86,15%) y ThF 2-1 (91,23%), superando incluso el porcentaje de control que generó la cepa 1 de *Paenibacillus*, bacteria con la cual se obtenía el mayor porcentaje de inhibición.

Se puede advertir que los porcentajes más altos de control, en las 3 cepas de *Trichoderma*, se obtienen sobre la cepa LL2. Esto mismo sucedió al utilizar la cepa 1 de *Paenibacillus*. Por otro lado, las cepas de basidiomycotas con las que se logró un menor porcentaje de control, fue la cepa LSPB1 y LSPB3, obteniéndose un control de entre un 80,1 y 85%, y de un 75,95%, respectivamente. Comparado con la cepa 24-B de *C. rosea*, la cepa LSPB3 es la más inhibida, con un 16,26% de control, y es la cepa LSPB1 la menos inhibida con un 9,84%.

Dentro de los mecanismos utilizados por las diversas especies de *Trichoderma* se encuentran el micoparasitismo y producción de antibióticos, producción de enzimas, y competencia, entre otros (Howell, 2003; Humeres, 2004). A través de los resultados observados, se pueden intuir que todos estos mecanismos estarían presentes en las cepas de *T. harzianum* utilizadas, por lo que con el ensayo de antagonismo por metabolitos difusibles se podría dilucidar más cuál sería la cepa más apropiada para el control de las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid

Al hacer un análisis estadístico de los promedios de inhibición de crecimiento de todas las cepas utilizadas, la mejor fue ThF 2-1 (Cuadro 6). Con respecto a esta cepa,

Ochoa (2008) indica que es una de las cepas que inhibió en mayor medida el crecimiento micelial del hongo *Rhizoctonia solani* cepa 509 y 618, alcanzando un 89,79% y 60,19% respectivamente. Arias (2005) obtuvo similares resultados de inhibición micelial sobre cepas de *R. solani* (cepa 509), utilizando la cepa de *Trichoderma* Th 12A 10.1; y por el contrario, utilizando la cepa Th 650, obtuvo porcentajes de inhibición bastante bajos (12,22%).

Como se observa en las Figuras 14, 15 y 16, en ninguno de los tres casos se generó un halo inhibitorio en las hifas de las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid. Por lo que se puede intuir, que el antagonismo generado por los biocontroladores fue ocasionado por competencia más que por cualquier otro mecanismo de acción de las especies de *Trichoderma*.

Al igual que con las bacterias, en las pruebas de antagonismo por metabolitos difusibles se podría dilucidar el mecanismo de acción de parte de *T. harzianum* sobre las cepas de los basidiomycotas evaluadas.

En la Figura 14 se presentan los resultados del efecto de la cepa Th 12A 10.1, con la cual se obtuvo el menor control dentro de las cepas de *T. harzianum* utilizadas.

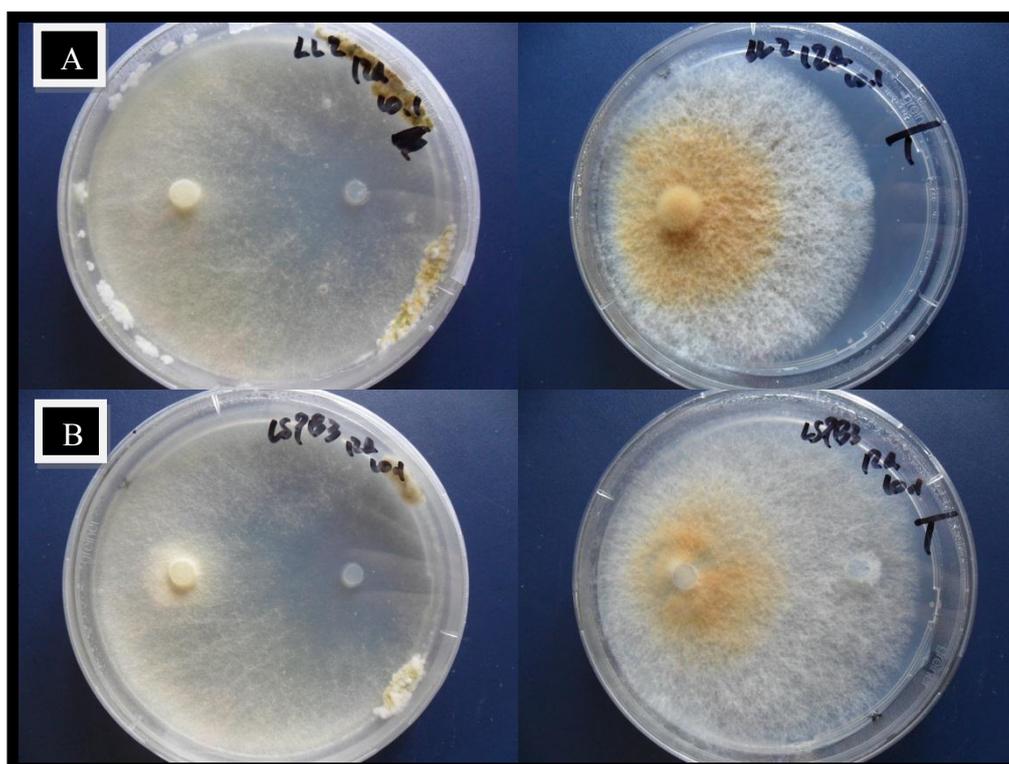


Figura 14: Inhibición del crecimiento micelial de las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid, por medio de antagonismo directo de *T. harzianum* cepa 12A 10.1. Disco de la izquierda: Cepas de basidiomycotas evaluadas; Disco de la derecha: Antagonista. (Foto Izq: Tratamiento con el hongo. Foto Der: Tratamiento Testigo.). **A)** Cepa LL2, correspondiente a la más inhibida. **B)** Cepa LSPB3, correspondiente a la cepa menos inhibida.

En las siguientes Figuras (15 y 16), se presentan los resultados obtenidos con la cepa Th 650 y ThF 2-1, hongos con los que se obtuvieron el segundo y mayor

porcentaje de control, dentro de las cepas de *T. harzianum* utilizadas.

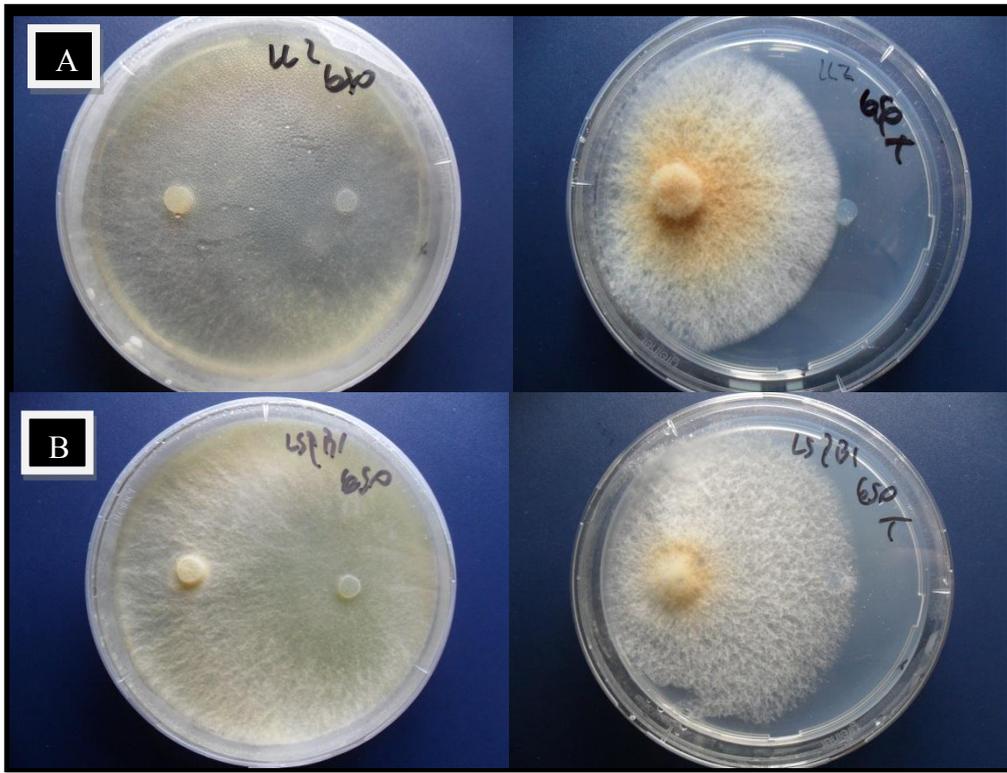


Figura 15: Inhibición del crecimiento micelial de las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid, por medio de antagonismo directo de *T. harzianum* cepa Th 650. Disco de la izquierda: Cepas de basidiomycotas evaluadas; Disco de la derecha: Antagonista. (Foto Izq: Tratamiento con el hongo. Foto Der: Tratamiento Testigo.). **A)** Cepa LL2, correspondiente a la más inhibida. **B)** Cepa LSPB1, correspondiente a la cepa menos inhibida.

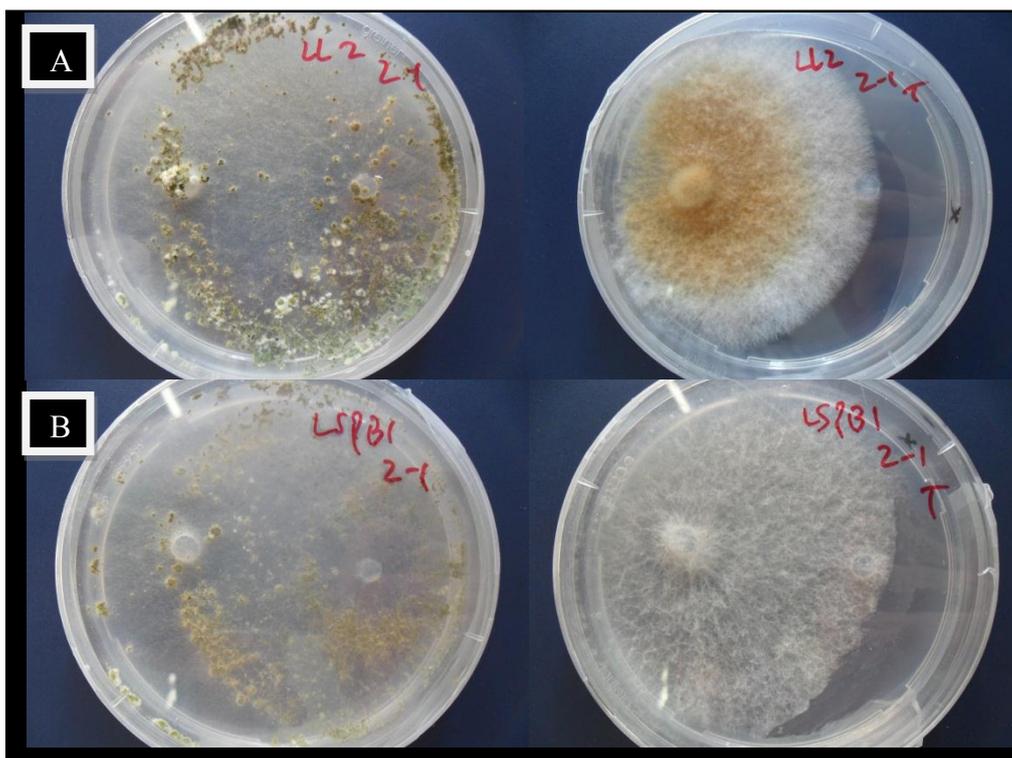


Figura 16: Inhibición del crecimiento micelial de las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid, por medio de antagonismo directo de *T. harzianum* cepa ThF 2-1. Disco de la izquierda: Cepas de basidiomycotas evaluadas; Disco de la derecha: Antagonista. (Foto Izq: Tratamiento con el hongo. Foto Der: Tratamiento Testigo.). **A)** Cepa LL2, correspondiente a la más inhibida. **B)** Cepa LSPB1, correspondiente a la cepa menos inhibida.

En el Cuadro 7, se muestran los resultados obtenidos con el producto comercial Trichonativa® (en base a *Trichoderma* spp.), observándose un buen grado de control pero inferior a logrado con las cepas mejoradas de *Trichoderma* spp. utilizadas en los ensayos anteriores.

Como se puede observar, utilizando Trichonativa® se logró inhibir como máximo en un 62,57% el crecimiento micelial, pero este fue menor en comparación con las cepas de *T. harzianum* y la cepa 1 de *Paenibacillus* sp., evaluadas previamente.

Cuadro 7. Antagonismo directo medido como el porcentaje de inhibición de crecimiento miceliar del producto Trichonativa®, sobre las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid.

Cepas evaluadas	Nombre del producto y Porcentaje de Inhibición (%)
	Trichonativa® (<i>Trichoderma</i> spp.)
LSNR1	62,57 a
LSPB2	62,34 a
LSNR2	62,23 a
M3	62,03 a
M2	61,93 a
M4	61,88 a
LSPB1	61,83 a
M1	61,81 a
LL2	61,65 a
LL1	61,60 ab
LSPB4	60,54 bc
LSPB3	59,68 cd
LL3	58,90 d
Promedio	61,46

Letras iguales en la columna indican que no difieren significativamente entre sí, según la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher, $p \leq 0,05$.

Los resultados obtenidos en el presente estudio fueron inferiores a los detectados en los de ensayos *in vitro* realizados por Humeres (2004) con hongos basidiomycotas aislados de brazos de kiwi y Trichonativa®, en donde los porcentajes de inhibición de crecimiento miceliar fluctuaron entre 25,1% y 85,9%.

En la Figura 17 es posible observar el grado de inhibición logrado por Trichonativa®, observándose también que tampoco se genera el halo inhibitorio en las cepas de basidiomycotas evaluadas (al igual que con las otras cepas de *Trichoderma* utilizadas en los ensayos anteriores), lo cual indicaría que en Trichonativa® también el principal mecanismo de acción sería por competencia.



Figura 17: Inhibición del crecimiento micelial de las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid, por medio de antagonismo directo de las especies de *Trichoderma* del producto Trichonativa®. Disco a la izquierda: Cepas de basidiomycotas evaluadas; Disco a la derecha: Antagonista. (Foto Izq: Tratamiento con el hongo. Foto Der: Tratamiento Testigo.). **A)** Cepa LSNR1, correspondiente a la más inhibida. **B)** Cepa LL3, correspondiente a la cepa menos inhibida.

En la Figura 18, se presentan los resultados de inhibición micelial promedio de todas las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid, por los diferentes antagonistas evaluados mediante antagonismo directo.

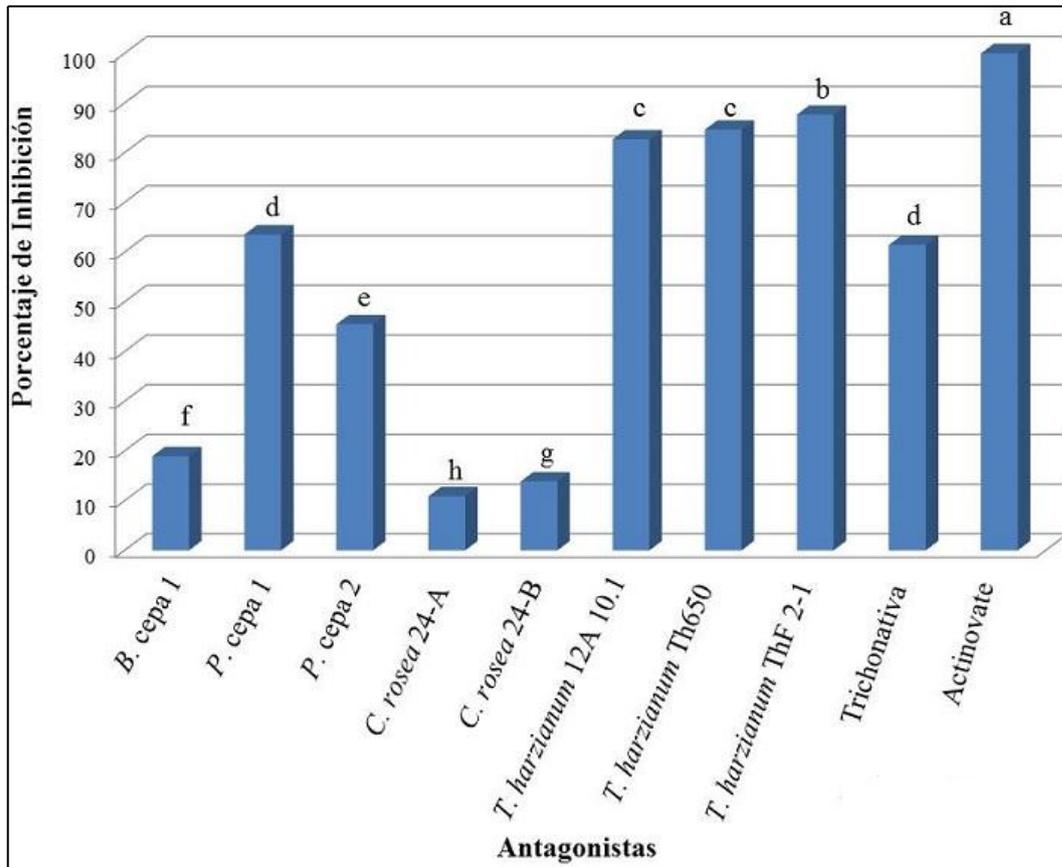


Figura 18: Inhibición del crecimiento micelial promedio de las cepas de hongos degradadores de la vid, por parte de todos los antagonistas utilizados, mediante antagonismo directo. Letras iguales en las columnas indican que no difieren significativamente entre sí, según la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher, $p \leq 0,05$.

Al analizar los resultados, considerando los promedios obtenidos para todas las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid mediante la prueba de Antagonismo Directo y el análisis de estos a través de la Prueba de Fisher, se observa que existen grandes diferencias entre los biocontroladores y el nivel de control. Se alcanzan altos porcentajes de inhibición promedio, presentando el mayor efecto inhibitorio Actinovate® (100%); luego todas las especies de *T. harzianum* pertenecientes al cepario del Laboratorio de Microbiología, destacando entre éstas la cepa ThF 2-1 (87,65%). En las bacterias, la cepa 1 de *Paenibacillus* sp. fue con la que se obtuvo el mayor efecto, pero éste no superó al obtenido con Actinovate® (63,54% v/s 100%). El producto Trichonativa® presentó un nivel aceptable de control, pero inferior a las cepas modificadas de *Trichoderma* (61,46%). Los resultados más bajos de control se obtuvieron con la cepa 1 de *Bacillus* sp. con un 18,94% de control, y con las cepas 24-B y 24-A de *C. rosea*, con un 13,87 y 10,88% respectivamente.

En la Figura 19 se hace la comparación entre los productos Actinovate® y Trichonativa®; se presentan los resultados obtenidos por estos, utilizados en la prueba de antagonismo directo observándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos productos respecto del efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid, resultando más efectivo Actinovate® que Trichonativa®.

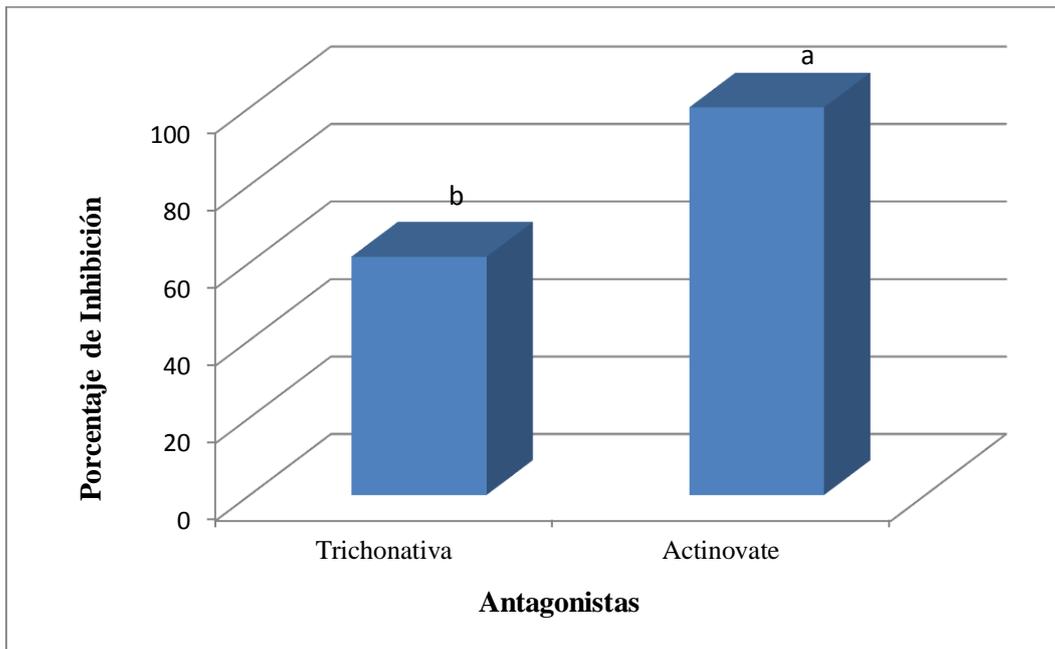


Figura 19: Inhibición promedio del crecimiento micelial de las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid por parte de los antagonistas Trichonativa® y Actinovate®, mediante antagonismo directo. Letras iguales en las columnas indican que no difieren significativamente entre sí, según la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher, $p \leq 0,05$.

2.2. Antagonismo mediante Metabolitos Difusibles

Tal como se mencionó previamente en la sección Materiales y Métodos, para esta prueba se restringió la cantidad de cepas de hongos degradadores de la madera de la vid evaluadas a sólo la cepa más inhibida, menos inhibida, y a la ubicada en el valor promedio de estas. También se utilizaron sólo las cepas de antagonistas con las que se obtuvo los más altos porcentajes de control, ya sea bacteria u hongo, además de ambos productos.

- Bacterias

En el Cuadro 8, se presentan los resultados del ensayo de Metabolitos Difusibles para las cepas *Bacillus* sp. cepa 1 y *Paenibacillus* sp. cepa 1, sobre las cepas de basidiomycotas evaluadas.

Cuadro 8. Antagonismo mediante Metabolitos Difusibles, medido como el porcentaje de inhibición de crecimiento miceliar de las bacterias antagonistas sobre las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid.

Cepas evaluadas	Cepas de bacterias y Porcentaje de Inhibición (%)	
	<i>Bacillus sp.</i> cepa 1	<i>Paenibacillus sp.</i> cepa 1
M2	75,83 a	84,65 a
LL2	72,08 b	82,55 a
LSPB1	62,37 c	80,19 a
Promedio	70,10 b	82,46 a

Letras iguales en las columnas indican que no difieren significativamente entre sí, según la prueba de comparaciones múltiples LSD Fisher, $p \leq 0,05$.

En el Cuadro 8 se observa que con la cepa 1 de *Paenibacillus sp.* se obtuvo el mayor control, alcanzando un porcentaje de inhibición que osciló entre un 80,19% y un 84,65%; por otro lado, con la cepa 1 de *Bacillus sp.* se logró un resultado similar pero levemente inferior al de *Paenibacillus sp.* (Mínimo 62,37%; máximo 75,83%). En relación al porcentaje de control de la cepa 1 de *Paenibacillus sp.*, se logra un mayor porcentaje de inhibición si se compara con el resultado obtenido en la prueba de antagonismo directo por parte de esta misma, infiriéndose que el mecanismo por el cual la bacteria ejerce el control es principalmente vía la producción de metabolitos difusibles. De esta manera se confirma lo mencionado por Montealegre *et al.* (2005), quienes mencionan la secreción de antibióticos como el mecanismo de biocontrol por parte de esta cepa. Con la cepa 1 de *Bacillus sp.* sucede también el mismo efecto, logrando un alto porcentaje de inhibición mediante metabolitos difusibles, advirtiendo que es este también su principal mecanismo de acción.

En las Figuras 20 y 21 se presentan las inhibiciones logradas por las bacterias vía metabolitos difusibles.

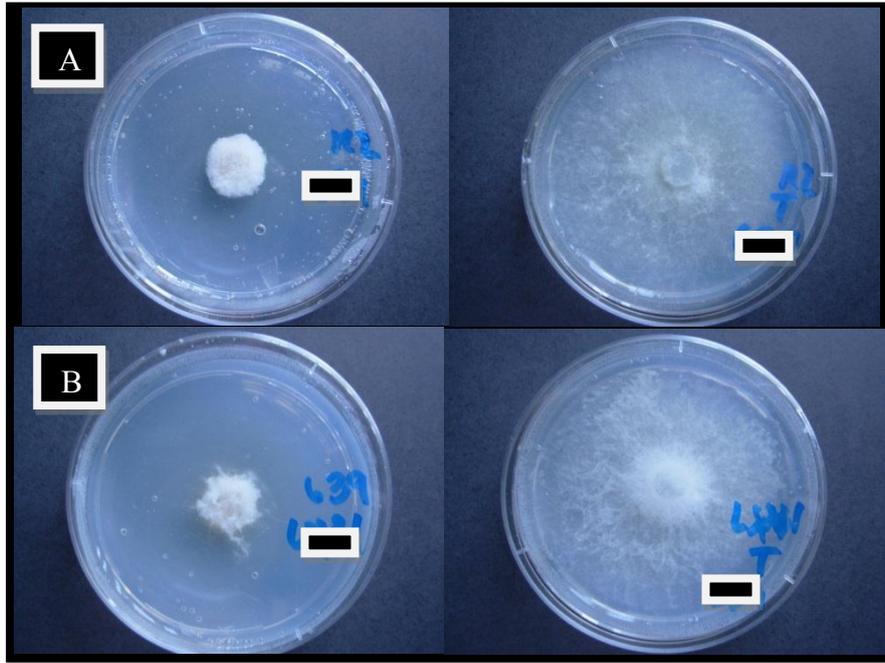


Figura 20: Inhibición del crecimiento micelial de las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid, por medio de metabolitos difusibles de la cepa 1 de *Bacillus* sp., (Izq: Tratamiento con la bacteria. Der: Tratamiento Testigo.). **A)** Ceba M2, correspondiente a la más inhibida. **B)** Ceba LSPB1, correspondiente a la cepa menos inhibida.

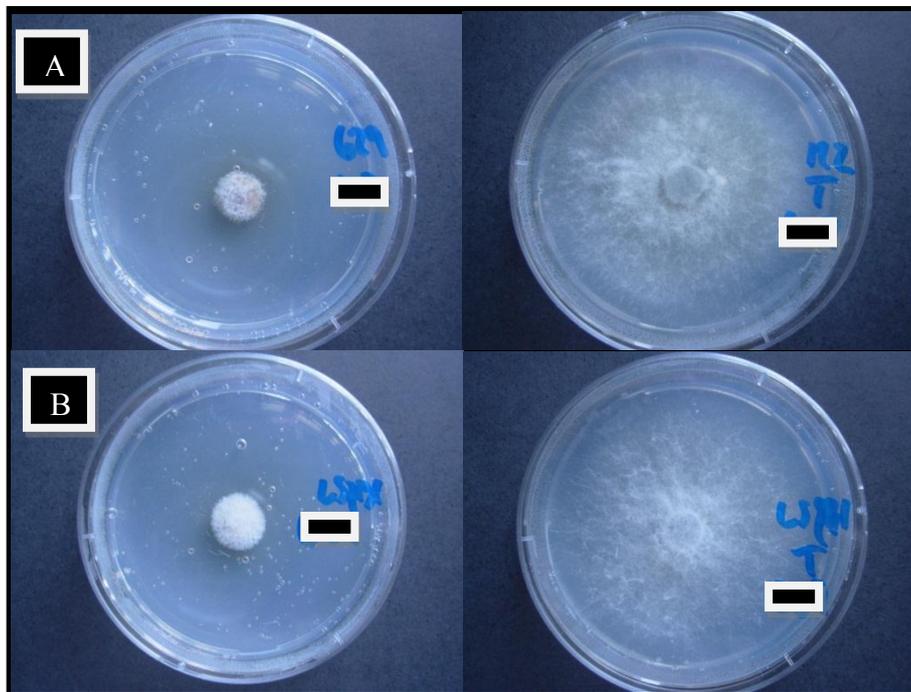


Figura 21: Inhibición del crecimiento micelial de las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid, por medio de metabolitos difusibles de *Paenibacillus* sp. cepa 1, (Izq: Tratamiento con la bacteria. Der: Tratamiento Testigo.). **A)** Ceba M2, correspondiente a la más inhibida. **B)** Ceba LSPB1, correspondiente a la cepa menos inhibida.

Los resultados presentados en el Cuadro 9, demuestran lo que se planteó como hipótesis previamente comentada en la prueba de antagonismo directo para Actinovate®, de que se trataría de una inhibición por difusión de metabolitos difusibles por parte de la bacteria, sobre el crecimiento micelial de las cepas de basidiomycotas evaluados. Es de esta manera, que se define a esta bacteria como el mejor bioantagonista para las cepas de los hongos degradadores de la madera de la vid, evaluadas.

Cuadro 9. Antagonismo mediante Metabolitos Difusibles, medido como el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de Acinovate® sobre las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid.

Cepas del patógeno	Porcentaje de inhibición
	Actinovate® (<i>S. lydicus</i> WYEC108)
LL2	100,00 a
LSPB3	100,00 a
M4	100,00 a

Letras iguales en las columnas indican que no difieren significativamente entre sí, según la prueba de comparaciones múltiples LSD Fisher, $p \leq 0,05$.

En la Figura 22, se observan los resultados obtenidos por Actinovate®, inhibiéndose absolutamente el crecimiento micelial de las cepas basidiomycotas evaluadas, sin siquiera haber presencia de un “halo” inhibitorio alrededor del disco ni tampoco presencia de alguna hifa demostrando algún grado de crecimiento.

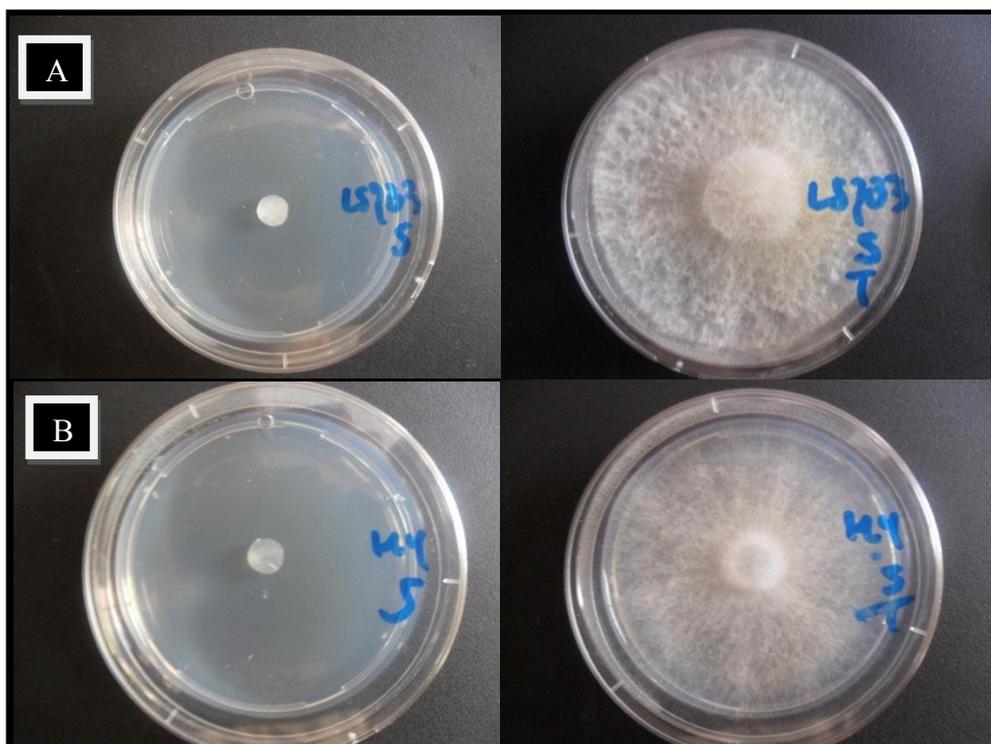


Figura 22: Inhibición del crecimiento micelial de las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid, por medio de metabolitos difusibles de *S. lydicus* WYEC108, proveniente del producto Actinovate® (Izq: Tratamiento con la bacteria. Der: Tratamiento Testigo.). **A)** Cepa LSPB3. **B)** Cepa M4.

- Hongos

En el Cuadro 10, se presentan los resultados correspondientes a los hongos *C. rosea* cepa 24-B, y *T. harzianum* cepa ThF 2-1.

Cuadro 10. Antagonismo mediante Metabolitos Difusibles, medido como el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de los hongos antagonistas sobre las cepas hongos degradadores de la madera de la vid.

Cepas evaluadas	Cepa del antagonista y Porcentaje de Inhibición (%)	
	<i>C. rosea</i> (24-B)	<i>T. harzianum</i> (ThF 2-1)
LL2	16,35 a	14,17 a
LSPB1	9,57 a	14,13 a
LSPB3	7,21 a	12,98 a
Promedio	11,04 a	13,76 a

Letras iguales en las columnas indican que no difieren significativamente entre sí, según la prueba de

comparaciones múltiples LSD de Fisher, $p \leq 0,05$.

Los resultados de *C. rosea* cepa 24-B, a pesar de no ser auspiciosos en el sentido de una eventual elección del antagonista, permiten intuir que como controlador fungoso, posee compuestos antifúngicos difusibles que utiliza para inhibir el crecimiento micelial de las cepas de los hongos degradadores de la madera de la vid evaluadas.

En el caso de la cepa ThF 2-1 de *T. harzianum*, los resultados de inhibición a través de metabolitos difusibles son bastante bajos y similares a los obtenidos por Ochoa (2008), quien para el mismo ensayo menciona que sobre *R. solani* 509 (Grupo de Anastomosis 2-1), este antagonista ejerce un bajo control (16,25% de inhibición micelial) sobre esta, mientras que para la cepa 618 (Grupo de Anastomosis 4), el control es nulo. Se puede inferir que el mayor poder inhibitorio que posee esta cepa de *Trichoderma*, es gracias a otros mecanismos de biocontrol, como por ejemplo competencia por espacio y nutrientes, y no precisamente a la producción de metabolitos difusibles que inhiban el crecimiento micelial de los patógenos.

En las Figura 23 y 24, se pueden observar los niveles de inhibición ejercidos por los metabolitos difusibles de *C. rosea* 24-B y *T. harzianum* ThF 2-1, respectivamente.

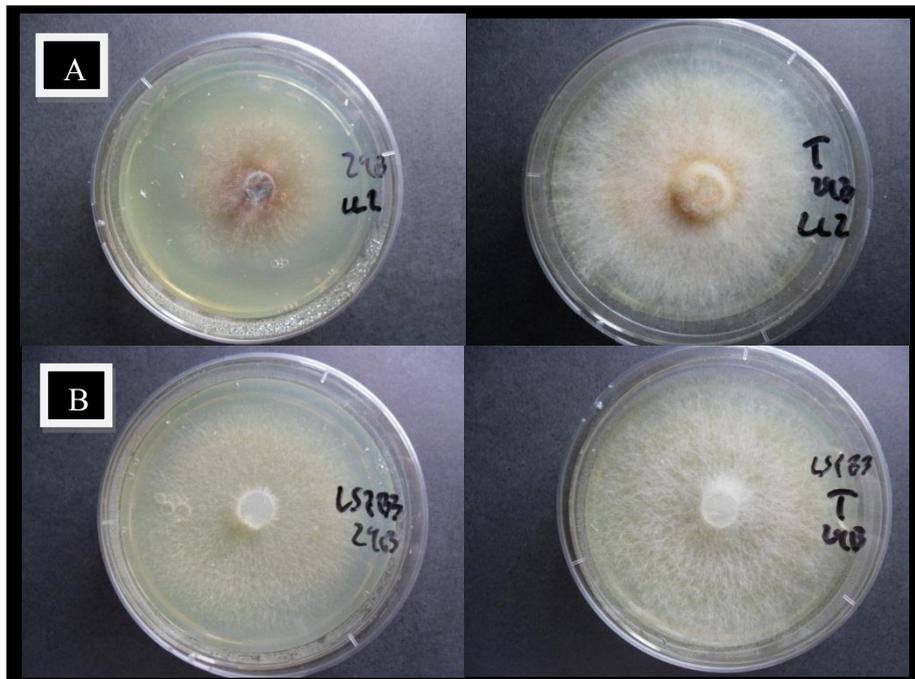


Figura 23: Inhibición del crecimiento micelial de las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid, por medio de metabolitos difusibles de *C. rosea*, cepa 24-B (Izq: Tratamiento con el hongo. Der: Tratamiento Testigo.). **A)** Cepa LL2, correspondiente a la más inhibida. **B)** Cepa LSPB3, correspondiente a la cepa menos inhibida.

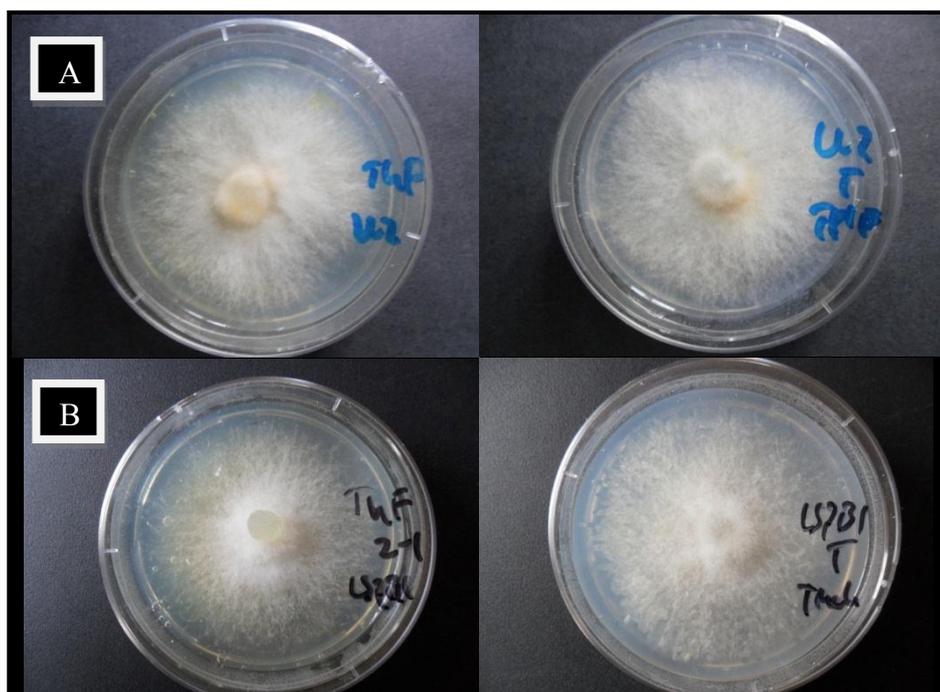


Figura 24: Inhibición del crecimiento micelial de las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid, por medio de metabolitos difusibles de *T. harzianum*., cepa ThF 2-1 (Izq: Tratamiento con el hongo. Der: Tratamiento Testigo.). **A)** Cepa LL2, correspondiente a la más inhibida. **B)** Cepa LSPB1, correspondiente a la cepa menos inhibida.

A continuación, se presentan los resultados correspondientes al producto Trichonativa®.

Cuadro 11. Antagonismo mediante Metabolitos Difusibles, medido como el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid evaluadas, por parte de Trichonativa®.

Cepas evaluadas	Nombre de Producto y Porcentaje de inhibición (%)
	Trichonativa® (<i>Trichoderma</i> spp.)
LSPB4	25,93 a
LL3	14,23 ab
LSNR1	10,00 b
Promedio	16,72

Letras iguales en la columna indican que no difieren significativamente entre sí, según la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher, $p \leq 0,05$.

Los resultados obtenidos con el producto muestran similares grados de inhibición de los logrados con la cepa modificada ThF 2-1, indicando con ello que los metabolitos difusibles, como endoquitinasas β -1,3-glucanasas y proteasas (Montealegre *et al.*, 2005), generados por las especies de *Trichoderma* no ejercen un buen control sobre las cepas de basidiomycotas evaluadas, indicando así que este definitivamente no es el mecanismo de acción de *Trichoderma* spp. frente a las cepas de hongos que producen la sintomatología de degradación de la madera de la vid.

En la Figura 25 se presenta el grado de inhibición logrado con el producto, sobre las cepas evaluadas.

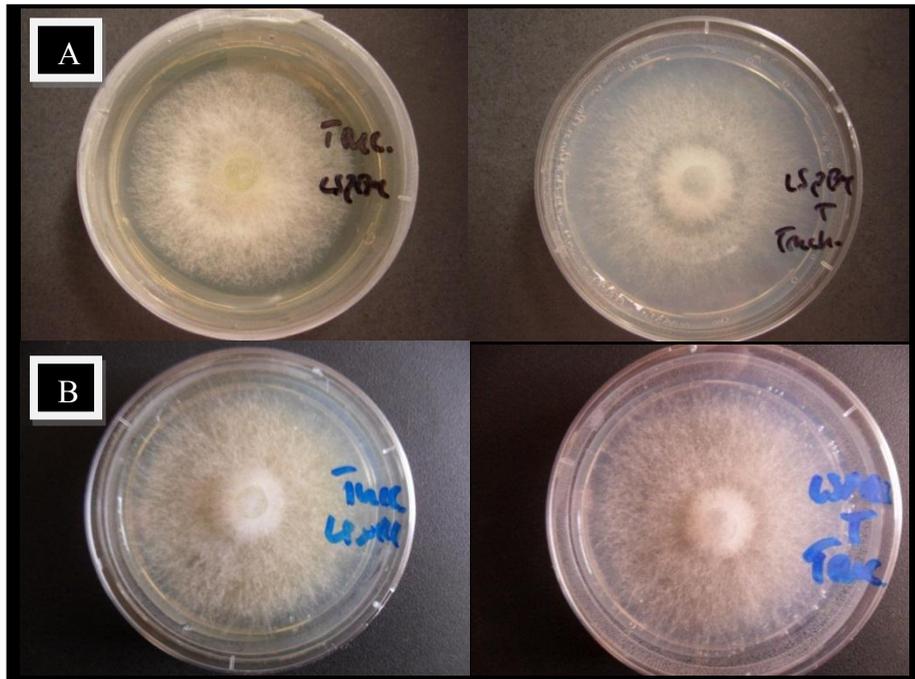


Figura 25: Inhibición del crecimiento micelial de las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid, por medio de metabolitos difusibles de *Trichoderma* spp., provenientes del producto Trichonativa® (Izq: Tratamiento con el hongo. Der: Tratamiento Testigo.). **A)** Cepa LSPB4, correspondiente a la más inhibida. **B)** Cepa LSNR1, correspondiente a la cepa menos inhibida.

En la Figura 26, se presentan los resultados promedios totales obtenidos con las diferentes cepas de hongos degradadores de la madera de la vid evaluadas en el ensayo de antagonismo mediante metabolitos difusibles, reflejadas en el porcentaje de inhibición micelial.

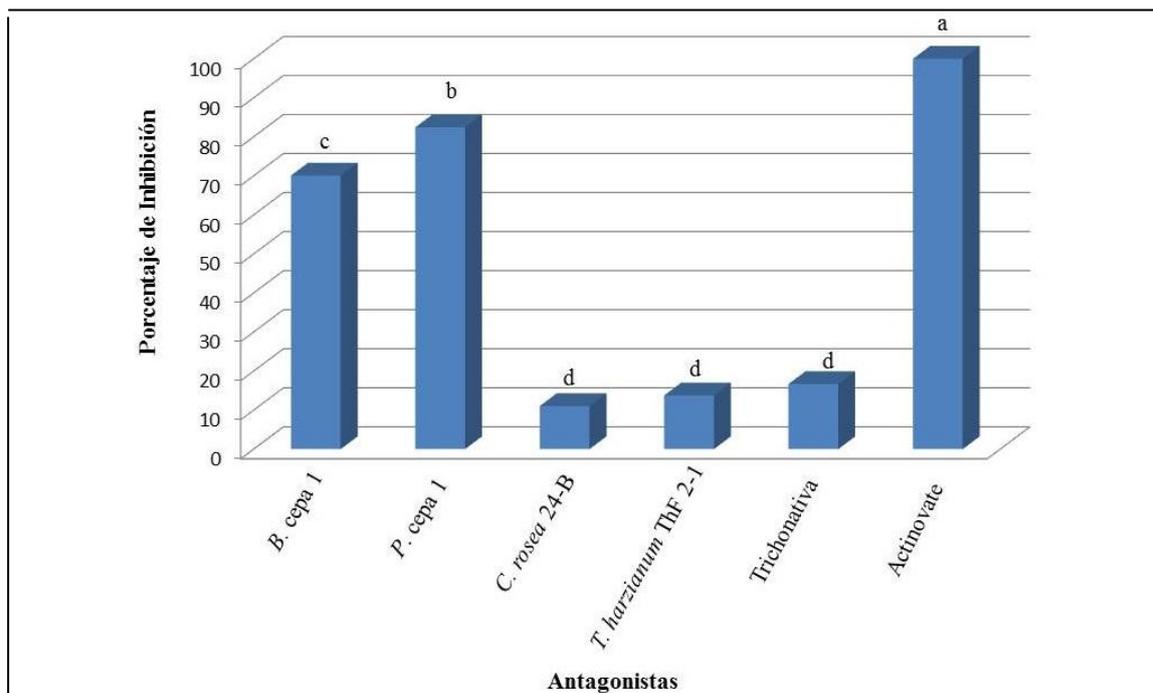


Figura 26: Inhibición promedio del crecimiento micelial de las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid por parte de los antagonistas, mediante Antagonismo por Metabolitos Difusibles. Letras iguales en las columnas indican que no difieren significativamente entre sí, según la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher, $p \leq 0,05$.

Al analizar los promedios de inhibición para las cepas de basidiomycotas evaluadas a través de metabolitos difusibles, en la Figura 26 se observa que el producto comercial Actinovate® formulado en base a *S. lydicus* WYEC108, es el antagonista que logró el mayor efecto de control, alcanzando una completa inhibición micelial. Con la cepa 1 de *Paenibacillus* sp. se logra un alto control, alcanzando un 82,46%, porcentaje alto, que corrobora las capacidades antagónicas que posee. Resulta interesante observar el resultado de *Bacillus* sp. cepa 1 (70,10% de inhibición micelial), observándose un buen efecto biocontrolador junto a sus similares bacterianos, determinándose también que el mecanismo utilizado por estas básicamente sería el de antibiosis.

En relación a los hongos, debido a que el principal mecanismo de acción que éstos presentan sobre los patógenos y en este caso en particular sobre hongos degradadores de la madera de la vid es por competencia, ocurre lo contrario.

Con respecto a los resultados obtenidos entre productos formulados, se observa una gran diferencia entre el porcentaje de inhibición micelial (Figura 27), recalcando la efectividad del producto Actinovate® por sobre Trichonativa® en el control de las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid.

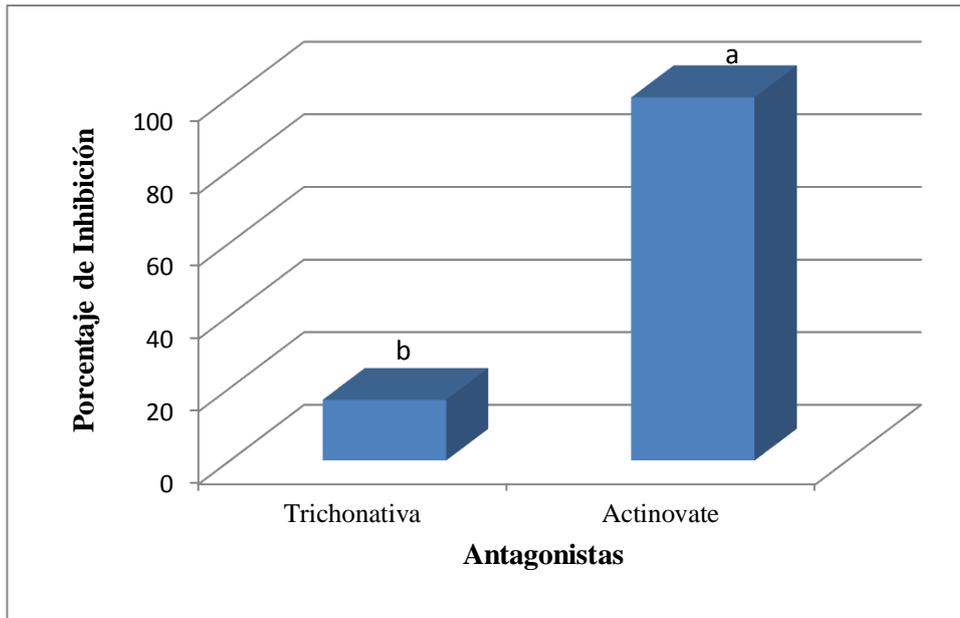


Figura 27: Inhibición promedio del crecimiento micelial de las cepas de hongos degradadores de la madera de la vid, por parte de los antagonistas Trichonativa® y Actinovate®, mediante Antagonismo por Metabolitos Difusibles. Letras iguales en las columnas indican que no difieren significativamente entre sí, según la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher, $p \leq 0,05$.

CONCLUSIONES

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

Según la caracterización de las cepas de hongos basidiomycotas degradadores de la madera de la vid evaluadas, sus óptimos de crecimiento miceliar se obtuvieron a una temperatura de 28°C y pH 6.

Se concluye que todos los bioantagonistas utilizados en las pruebas *in vitro* ejercen un cierto grado de control de las cepas de hongos basidiomycotas que generan síntomas de degradación de la madera de la vid; no obstante, existen biocontroladores que son más eficientes en la inhibición del crecimiento miceliar que otros. Por lo tanto, en vista de los resultados obtenidos gracias a la investigación realizada, se concluye que se cumple la hipótesis planteada previamente en éste trabajo.

Con respecto a los resultados de la prueba de antagonismo directo, dentro del grupo de las bacterias, *Streptomyces lydicus* WYEC108 (Actinovate®) logró el 100% de inhibición. Las dos cepas de *Paenibacillus* sp. utilizadas ejercieron un control aceptable del hongo, logrando un máximo de control de 70,47% (cepa 1) y 54,83% (cepa 2).

En la prueba de antagonismo mediante metabolitos difusibles, todas las bacterias mencionadas ejercieron un nivel de control. Sin embargo *S. lydicus* WYEC108 de Actinovate® fue el más efectivo (100%); le siguen en orden de efecto inhibitorio *Paenibacillus* sp. cepa 1 (82,46%) y *Bacillus* sp. cepa 1 (70,10%).

En el grupo de los hongos antagonistas, las especies de *Trichoderma* nativas (Th 650) y modificadas (ThF 2-1 y Th 12A 10.1) ejercieron un muy buen control, alcanzando un máximo de control por sobre el 80% de inhibición miceliar de las cepas evaluadas en los ensayos de antagonismo directo. De todas las cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas, la más efectiva fue ThF 2-1 con un máximo de 91,23%. Para *Trichoderma* spp. de Trichonativa®, el máximo de control logrado no superó el 63% de inhibición.

Las cepas de hongos antagonistas evaluados en la prueba de metabolitos difusibles obtuvieron un pobre resultado, concluyendo que las especies de *Trichoderma* actúan fundamentalmente por medio de competencia sobre las cepas de basidiomycotas evaluadas.

Tanto en antagonismo directo como en metabolitos difusibles, la bacteria *S. lydicus* WYEC108, del producto Actinovate® fue la que mostró el mayor grado de inhibición, superando a *Trichoderma* spp. de Trichonativa®

Los antecedentes obtenidos en esta memoria de Título servirán de base para realizar trabajos posteriores en la búsqueda de un control efectivo a nivel de campo de los hongos basidiomycotas asociados a síntomas de degradación de la madera de la vid.

BIBLIOGRAFIA

- AGUILERA, N. 2004. Identificación de la especie Hymenomycete (Basidiomycota) asociada a síntomas de Enrollamiento Clorótico de la vid (*Vitis vinifera* L.) en Chile. Tesis Magister. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 73 p.
- ARIAS, M. 2005. Efecto *in vitro* de mutantes de *Trichoderma* spp. en el control de *Rhizoctonia solani* (Kühn) y *Phytophthora nicotianae* (Breda de Haan) aislados de tomate. Memoria de Título. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 45 p.
- AUGER, J. 1983. El Enrollamiento Clorótico de la hoja de la vid. Aconex 3:28-31.
- AUGER, J. y ESTERIO, M. 1991. La excoriosis cortical de la Vid en variedades de uva de mesa en Chile: Epidemiología y control. Aconex 32: 18-21.
- AUGER, J.; ESTERIO, M y PEREZ, I. 2004. La declinación y muerte de planta joven de la vid en Chile. Aconex 85: 15-21.
- AUGER, J.; ESTERIO, M.; PEREZ, I. RICKE, G. y RAMOS, C. 2005. El síndrome de declinación y brazo muerto de la Red Globe en Chile. Aconex 89: 30-36.
- AUGER, J. 1995. Hongos de la madera: Reconocimiento y control. Plateado, Enrollamiento Clorótico, Eutipiosis y Escoriosis de la Vid. In: Sanidad Vegetal en Frutales y Vides. Publicaciones misceláneas número 41, artículo 19. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Santiago, Chile. En línea: <http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/miscelaneasagronomicas41/c19.html>
- AUGER, J.; AGUILERA, N.; ESTERIO, M. y DROGUETT, A. 2002. Diferenciación del hongo Hymenomycete (Basidiomycota) asociada a síntomas de Enrollamiento Clorótico de la Vid de las especies Hymenomycetes asociadas a síntomas de Esca y Black Measles. In: Resúmenes de presentaciones orales del XII Congreso Nacional de Fitopatología. Puerto Varas, X Región, Chile 1-4 de Octubre, 2002. En línea: <<http://www.fitopatologiachile.cl/trabajos02/PDF/XII.pdf>>
- AUGER, J.; PEREZ, I. and ESTERIO, M. 2010. Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wood protectants against the main grapevine trunk disease pathogens associated with grapevine in Chile. In: Book of Abstracts, Session IV: Disease Management Poster Presentations. 7th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases. Santa Cruz, VI Región, Chile 17-21 January, 2010. p 94.
- BANFI, S. 2011. Boletín de vinos y pisco: producción, precios y comercio exterior. ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias). En línea: <http://www.odepa.gob.cl//odepaweb/servicios-informacion/Boletines/BVinos_1211.pdf;jsessionid=23F68EDD2602ED34FFA094D68E212C34> p 5-9.

BESOAIN X.; PÉREZ L.; ARAYA A.; LEFEVER L.; SANGUINETTI M. and MONTEALEGRE J. 2007. New strains obtained after UV treatment and protoplast fusion of native *Trichoderma harzianum*: their biocontrol effect on *Pyrenochaeta lycopersici*. *Electronic Journal of Biotechnology* 10(4): 604-617.

BESTER, W.; CROUS, P. W. and FOURIE, P. H. 2007. Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species. *Australasian Plant Pathology* 36: 73-77.

BRAVO, J. 2010. Mercado de la Uva de Mesa. ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias). En línea: < <http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/publicaciones/doc/2405.pdf> >. p 1-6.

CRUZ, M. 2004. Enfermedades de la vid en el Secano Interior de la VI y VIII Regiones de Chile: Manejo Integrado. Boletín INIA N° 111.

DENNIS, C. and WEBSTER, J. 1971a. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* III. Hyphal interaction. *Transaction of the British Mycological Society* 57: 363-369.

DENNIS, C. and WEBSTER, J. 1971b. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* I. Production of non volatile antibiotics. *Transaction 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. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 78 p.

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

GATICA, M; CÉSARI, C.; ESCORIAZA, G. y LONGONE, V. s.a.. Hoja de malvón de la vid. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). En línea: < <http://www.inta.gov.ar/imyza/info/bol/mip/06/bol4/gatica.pdf> >

GIOGIA, G.; BRIGANDO, C.; GÁLVEZ, P.; NÚÑEZ, D. y KUSCH, C. 2006. Efectividad del uso de BINAB T® Pellet, para el control de Enrollamiento Clorótico en vides de mesa var. Thompson Seedless. In: Resúmenes del XVI Congreso Nacional de Fitopatología. La Serena, IV Región, Chile, 2006. En línea: < <http://www.fitopatologiachile.cl/trabajos02/PDF/XVI.pdf> >

HALLEEN, F.; WHITE, C.; FISCHER, M. and MOSTERT, L. 2010. Basidiomycetes and other fungi associated with esca diseased grapevines in South Africa. In: Book of Abstracts, Session I: Pathogen Identification and Characterization Oral Presentations. 7th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases. Santa Cruz, VI Región, Chile 17-21 January, 2010. p 10.

HOWELL, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the

Biological control of Plant Diseases: The History and Evolution of current concepts. *Plant Disease* 87: 4-10.

HUMERES, C. 2004. Evaluación de la capacidad biocontroladora de dos cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre aislados de hongos Basidiomycetes asociados a muerte de brazos en Kiwi. Memoria de Título. Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agronómicas. Talca, Chile. 43 p.

KUMAR, D. y GUPTA, R. K.. 2006. Biocontrol of Wood-rotting fungi. *Indian Journal of Biotechnology*, 5: 20-25.

MONTEALEGRE, J. 2005. Perspectivas y situación del uso de biofungicidas en Chile. En: Control biológico e integrado de enfermedades y nematodos en frutales y hortalizas. Santiago, Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. En línea: < http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/1.html >

MONTEALEGRE, J.; HERRERA, R.; VELASQUEZ, J. C.; SILVA, P.; BESOAIN, X. and PEREZ, L. M. 2005. Biocontrol of root and crown rot in tomatoes under greenhouse conditions using *Trichoderma harzianum* and *Paenibacillus lentimorbus*. Additional effect of solarization. *Tomato diseases biocontrol, effect of solarization. Electronic Journal of Biotechnology*: 247-257.

OCHOA, F. 2008. Efecto *in vitro* y en invernadero de cepas mejoradas de *Trichoderma* spp. en el control de *Rhizoctonia solani* (Kühn). Memoria de Título. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 49 p.

ODEPA. s.a. Superficie y producción de vides para vinificación, de mesa y pisqueras.

En línea: <

<http://www.odepa.cl/servlet/articulos.ServletMostrarDetalle;jsessionid=F45405C593E2B06C7159CBC081942C7C?idcla=12&idn=1739> >

PEREZ, L. M. 2005. Bases moleculares del control biológico de fitopatógenos. Experiencia chilena. Control biológico e integrado de enfermedades y nematodos en frutales y hortalizas. Santiago, Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. En línea: < http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/2.html >

REYES, R. 2000. Control biológico de *Rhizoctonia solani* (Kühn) en tomate (*Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten) mediante el empleo de antagonistas bacterianos. Memoria de Título. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 81p.

RODRIGUEZ, M. A.; CABRERA, G.; GOZZO, F. C.; EBERLIN, M. N. y GODEAS, A. 2011. *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. En línea: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21385290> >

SARRO, A.; GARCIA, E.; LARA, J.M. y FERNANDEZ, C. s. a. Efectividad de

Actinovate, Biofungicida basado en esporas de *Streptomyces lydicus* WYEC108. Departamento de Investigación y Desarrollo, FUTURECO BIOSCIENCE SL.

SCHAAD, N.; JONES, J. and CHUN, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Third Ed. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 373 p.

XUE, A.G.; VOLDENG, H. D.; SAVARD, M.E. ; FEDAK, G; TIAN, X. y HSIANG, T. 2009. Biological control of fusarium head blight of wheat with *Clonostachys rosea* strain ACM941. Plant Pathology, 31: 169-179.

YUAN, W. M. and 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: 3119-3128.