

CENTRO DE EDUCACIÓN Y TECNOLOGIA.

INFORME TECNICO FINAL

Proyecto.

“PRODUCCIÓN Y UTILIZACIÓN DE Trichoderma sp. EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES FUNGOSAS EN SISTEMAS DE PRODUCCION DE FRUTA ORGANICA DE EXPORTACIÓN EN LA ZONA CENTRAL DE CHILE”

CODIGO: C00-1-A-156-

Coordinador del Proyecto: Raúl A. Venegas Valdebenito.

I) ANTECEDENTES GENERALES DEL PROYECTO

“PRODUCCIÓN Y UTILIZACIÓN DE Trichoderma sp. EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES FUNGOSAS EN SISTEMAS DE PRODUCCION DE FRUTA ORGANICA DE EXPORTACIÓN EN LA ZONA CENTRAL DE CHILE”

Fecha de Adjudicación 11 Septiembre de 2000.

CODIGO: C00-1-A-156-

AGENTE EJECUTOR:

Nombre : Centro de Educación y Tecnología
Dirección : Europa 2008 Providencia Santiago. Chile
RUT : 71 787 200-2
Teléfono : 2341141 Fax: 2337239

AGENTES ASOCIADOS:

Huertos Orgánicos de Chile-RUT-96887190-0
Agrícola Mira Ríos S.A. RUT: 96813040-4
Frutícola Viconto S.A. RUT: 96512190-0
Viñedos Emiliana S.A. RUT: 96512200-1

Coordinador del Proyecto: Raúl Venegas Valdebenito.

COSTO TOTAL DEL PROYECTO: \$ 156.649.745

APORTE FIA (En pesos, %del costo total) \$ 63.611.731

% 40.6

Periodo De ejecución 20/12/2000-15/10/2004

II). Resumen ejecutivo del Proyecto.

El proyecto ejecutado tuvo como objetivo la producción masiva de un organismo antagonista, controlador de enfermedades producidas por hongos en especies frutales. Estos organismos son habitantes normales del suelo y materia orgánica en descomposición. Existen en Chile, se aislaron, se identificaron y se evaluaron en huertos frutales de manzano, (*Malus pumila*); viña y parronal (*Vitis vinifera*) estableciéndose la capacidad de control sobre patologías de origen micótico en frutales. Para el logro de los resultados obtenidos se estableció una alianza estratégica con las empresas Frutícola Viconto S.A., Viñedos Emiliana S.A. Agrícola Mira-Ríos S.A. y Huertos Orgánicos de Chile S.A. con la Corporación Centro de Educación y Tecnología

La idea para plantear este proyecto a la Fundación para la Innovación Agraria, surgió a partir de un trabajo previo de tipo experimental en laboratorio y en pequeñas parcelas que indicaban la posibilidad de desarrollar una iniciativa nacional sustentable en el tiempo con utilización de insumos locales y que generara controladores biológicos a empresas Frutícolas en la zona Central.

En el proyecto se logro desarrollar un método de producción de *Trichoderma* spp. y un producto biológico en tres presentaciones; líquido, pasta y en sustrato en polvo deshidratado, este último como forma de conservación.

La búsqueda de cepas se realizó en predios de la zona central pertenecientes a las empresas que participaron en el estudio, lográndose aislados en bosque nativo, madera, suelo y compost.

Los preparados obtenidos se evaluaron en su efecto controlador sobre *V. inaequalis*, *P. cactorum* y *B. cinerea*.

Las evaluaciones se realizaron sobre 42 cepas aisladas en laboratorio, definiéndose 8 especies diferentes, clasificación realizada en la Cátedra de micología de Facultad de Medicina de la U. de Valparaíso.

Las cepas aisladas se sometieron a temperaturas de crecimiento de 10, 15 y 25 °C encontrándose tasas de crecimiento diferenciadas para cada cepa en las condiciones indicadas, esto permite afirmar que localmente se desarrollan

ecotipos ajustadas ambientalmente, situación que se debe considerar en el desarrollo de las formulaciones comerciales que se utilicen en el país.

Complementariamente se determinó la capacidad antagonica de las cepas aisladas de acuerdo a la escala de Bell, 1987, eligiéndose para evaluar en las pruebas de campo, todas aquellas que en relación al patógeno en estudio, presentara o perteneciera a la clase 1 o 2 de antagonismo.

Las evaluaciones de campo indican que las cepas evaluadas en estas condiciones son capaces de lograr un control en el caso de *B. cinerea* mayor al 80 %, frenar el avance de *P. cactorum* y provocar un estímulo sobre la producción de fruta en los huertos de manzano. En el caso del uso de *Trichoderma spp.* para el control de *V. inaequalis* se lograron resultados variables que indican que *Trichoderma* en este caso se debe usar dentro de un programa de manejo integrado de enfermedades fungosas.

Finalmente se obtuvieron y evaluaron 3 formulaciones de *Trichoderma*, una pasta para el control de *P. cactorum*, una formulación en suspensión acuosa y un formulado en polvo utilizables en el control de *B. cinerea*.

III). TEXTO PRINCIPAL

1. **Breve resumen de la propuesta original y modificaciones contenidas en el Plan Operativo, con énfasis en objetivos, justificación del proyecto, metodología y resultados e impactos esperados.**

Resumen de propuesta original

Identificación del problema a resuelto

En la agricultura convencional moderna, los fungicidas son la principal herramienta empleada para el control de hongos fitopatógenos. El uso continuado de estos productos químicos para el control de estos microorganismos, a provocado a través del tiempo, el desarrollo de resistencia a los fungicidas utilizados. Por ello, la tendencia actual ha sido racionalizar el uso de agroquímicos y desarrollar nuevas alternativas de control a través del uso de agentes de control biológico que actúen sobre patógenos vegetales, los cuales tienen como principio activo a un microorganismo. Por otra parte, se a desarrollado a nivel mundial en

los mercados mundiales una demanda creciente productos hortofrutícolas obtenidos en procesos limpios de producción, es decir, generados en sistemas agrícolas que no utilizan pesticidas sintéticos de ningún tipo, durante todo el proceso de producción. Esta situación está drásticamente controlada por la aplicación de una compleja normativa que se aplica corrientemente tanto en la Unión Europea, sobre los productos orgánicos, como en Norteamérica y que está encargada en su aplicación a empresas certificadoras que inspeccionan tanto el proceso de producción como las plantas de embalaje de frutas y hortalizas. Esta situación determina que para abastecer este mercado, es necesario contar con herramientas de control de hongos patógenos, que sean aceptadas en esta normativa y que permitan producciones en niveles técnica y económicamente aceptables. En este marco se pueden utilizar diversos biopreparados de *Trichoderma* spp. Este hongo es un organismo antagonista que permite el control de diversas patologías fungosas en árboles frutales y hortalizas, es posible aislarlo localmente y reproducirlo en forma masiva para su aplicación en el control de patógenos de plantas. El problema a resolver en este proyecto, consistió en el aislamiento de cepas nativas, identificación de ellas y obtención masiva del hongo antagonista *Trichoderma* spp. de manera estable en el tiempo y en formulaciones que permitieron tanto su aplicación en función de las necesidades y modalidades de aplicación como su almacenamiento prolongado, permitiendo el abastecimiento de empresas frutícolas en la Zona Centro sur de Chile.

MARCO GENERAL DEL PROYECTO

El proyecto ejecutado se concibió como una forma de viabilizar técnicamente la producción de fruta orgánica, uva de mesa y manzanas, que realizan diversas empresas en la Zona Central de Chile. Este grupo de empresas conformado por Frutícola Viconto S.A. ; Agrícola Mira Ríos S.A., Bodegas y Viñedos Santa Emilianita S.A., y Huertos orgánicos S.A, conforman el grupo de mayor importancia en producción de fruta orgánica de exportación. Todas ellas envían sus productos a diversos mercados en el extranjero.

Desde el año 1997 el Centro de Educación y Tecnología a colaborado a nivel experimental en el control de enfermedades fungosas en frutales en las empresas que mencionadas. En esos trabajos a nivel experimental y en pequeñas superficies se utilizaron dos cepas de *Trichoderma* aislados localmente, que han sido reproducidas y evaluadas en parcelas de experimentación. En estos casos se aplicaron suspensiones con 10^8 conidios por ml en forma de líquida en aplicación foliar para el control de *V. inaequalis*, en el caso de *P. cactorum* se desarrolló en esa etapa una mezcla de *Trichoderma* y compost para aplicación local.

Para el control de *Botrytis cinerea* en Uva de mesa se evaluaron aplicaciones foliares de suspensiones de *Trichoderma* que se realizaron entre la floración y hasta 3 semanas antes de la cosecha. Como resultado de estas experiencias se pudo exportar a Europa fruta orgánica certificada, originada en huertos frutales tratados a nivel experimental con el antagonista *Trichoderma* spp. Esta fruta se obtuvo en buenas condiciones sanitarias con certificación de la empresa IMO.

La demanda sobre el Centro de Educación Tecnología y el objetivo del proyecto ejecutado fue la producción y evaluación de cepas nativas de *Trichoderma* spp. que permitieran abastecer inicialmente la necesidad de la superficie bajo producción orgánica que manejan las empresas mencionadas y que alcanza una superficie de 809 has. Estas empresas están impulsando la agricultura orgánica de exportación a nivel nacional y requieren del abastecimiento permanente de insumos para el control de plagas y enfermedades, en el caso del proyecto ejecutado se trató de desarrollar el abastecimiento con cepas locales de *Trichoderma*. Las empresas asociadas contribuyeron con los predios y huertos para experimentación, y evaluación de los diversos preparados aplicados en el campo. Por otra parte aportaron profesionales, técnicos y mano de obra calificada, para realizar la evaluación de las aplicaciones de controladores que se realizaron durante el desarrollo del proyecto

Modificaciones al plan operativo del proyecto.

Objetivos del proyecto.

O. General.

Aislamiento producción y abastecimiento con *Trichoderma spp* a empresas agrícolas en la zona central de Chile para el control de enfermedades fungosas, en producción orgánica de uva de mesa y manzanas de exportación

O. Específicos.

- 1) Aislamiento de variedades locales de *Trichoderma sp.* tolerantes a bajas Temperaturas
- 2) Evaluación de las cepas locales de *Trichoderma* aisladas, frente a enfermedades fungosas en frutales de exportación provocadas por *V. inaequalis*, *B. cinerea* y *P. cactorum*.
- 3) Producción masiva de variedades de *Trichoderma sp.* Aislados y evaluados por el Centro de Educación y Tecnología Cepa 1 y Cepa 2, para el abastecimiento de productores de fruta orgánica en la Zona Centro Sur.
- 4) Diseño y evaluación de tres presentaciones de *Trichoderma* para su aplicación en producción de fruta orgánica, estas son presentación líquida para aplicación foliar, en el control de *B.cinerea* en Uva de mesa, *V.inaequalis* en manzano, producción de pasta de *Trichoderma* para su aplicación local en lesiones ocasionadas por *P. cactorum* y producción de sustrato sólido deshidratado para su conservación.
- 5) Aplicación y evaluación de los biopreparados de *Trichoderma spp.* a nivel de campo en manzano y uva.

Objetivos modificados o incorporados al Proyecto

- 3) En el objetivo 3 se plantea la producción masiva de dos cepas de Trichoderma, previamente aisladas por el CET, sin embargo, sólo se trabajo con la cepa CET-1 (*T. longibrachiatum*), porque presentó los mejores resultados en las pruebas in vitro, temperatura y antagonismo, lo que no ocurrió con la cepa CET-2 (*T. viride*).

- 6) En el caso de los objetivos se agregó la evaluación de las diversas cepas de Trichoderma en viña, *Vitis vinífera*, Trabajo desarrollado en el predio Cordillera de Viñedos Emiliana, en la localidad de Casablanca.

Variaciones metodológicas.

a) Aislamiento de Trichoderma.

Esta actividad se prolongó durante todas las etapas del proyecto. No se mantuvo en los 2 primeros años del proyecto como estaba considerado en la propuesta original, con el objetivo de aislar y conocer el comportamiento de un mayor número de cepas de Trichoderma.

b) Evaluación de las cepas a distintas temperaturas.

Inicialmente se planteo la evaluación del comportamiento de las cepas aisladas a temperaturas de 10 y 15 °C, rango que fue ampliado a 25°C con el objetivo de tener cepas de Trichoderma con capacidad de respuesta en un rango mas amplio de condiciones climáticas.

c) Producción del antagonista.

En este plano se introdujeron variaciones en el método de producción del antagonista, inicialmente se había propuesto la obtención de los hongos sustrato dolido en bolsas de polipropileno, esta forma se modifiko posteriormente realizándose el cultivo en frascos, lo que determinó una reducción radical en la contaminación de los cultivos con flora secundaria.

d) **Obtención de y evaluación patógenos.**

Aislamiento de *Phytophthora cactorum*.

Inicialmente la detección y aislamiento de *P. cactorum* se realizaría en ensayos con cotiledones de manzana como cebo, de acuerdo a (Jeffers and Aldwinckle, 1987,1988), Finalmente el método realmente usado fue la obtención del patógeno a partir del tronco y raicillas infectadas las que se sometieron a un lavado y desinfectadas con hipoclorito de sodio, nuevamente lavadas con agua estéril, posteriormente picadas y puestas sobre Medio CMA, (Agar harina de Maíz), hasta la aparición del patógeno.

e) **Prueba in vitro del antagonismo de *Trichoderma vls V.inaequalis*.**

Esta prueba se planteo inicialmente como un método de campo, este método era errático ya que existían muchas variables fuera de control, como son contaminación, anegamiento o desecamiento de las muestras o perdida de ellas, finalmente se implementó un método de laboratorio, en placas Petri. Venturia se aisló de hojas dañadas por este patógeno incubándose en medio PDA (papa, dextrosa, agar). Posteriormente se realizaron las pruebas de antagonismo descritas en la metodología.

Impactos del Proyecto:

Los impactos esperados del proyecto al comenzar la ejecución de el correspondían básicamente a:

- 1) Viabilización de la producción de fruta orgánica al obtener un controlador biológico de las principales enfermedades fungosas de esta actividad, este objetivo se cumplió, ya que se logró el aislamiento e identificación de cepas nativas de *Trichoderma* con alta capacidad de control sobre las principales

enfermedades de la fruta orgánica de exportación que el proyecto consideraba.

- 2) Completar el desarrollo de una unidad de producción del antagonista *Trichoderma* spp. que sea sustentable en el tiempo y que abastezca la demanda de empresas exportadoras de fruta orgánica en la zona Central de Chile.
- 3) Obtención de mayores ingresos por ha. de tierra en producción de fruta orgánica, estos precios premio pueden alcanzar hasta un 15-20% de mayor valor, lo que permite desarrollar las normas técnicas que este tipo de producción involucra, como es el reciclaje de material orgánico y su utilización, lo que determina un mayor uso de mano de obra.
- 4) Permitir la estabilización de un sistema de producción de fruta orgánica en la zona central que contribuye a la absorción de mano de obra ya que estos sistemas utilizan un mayor número de personas por ha. de producción.
- 5) Disminución del riesgo de intoxicación del personal que trabaja en estos sistemas.
- 6) Articulación interinstitucional para superar el problema de obtención de insumos biológicos viables técnica y económicamente.

2) Cumplimiento de los objetivos del Proyecto

Descripción breve de los resultados obtenidos, comparación con los objetivos planteados y razones que explican sus discrepancias.

- 1) El proyecto ejecutado tuvo como objetivo la producción masiva de un organismo antagonista, controlador de enfermedades producidas por hongos en especies frutales de exportación, manzanos (*Malus pumila*) y uva de mesa *Vitis vinifera*, Variedad Red Globe a este primer objetivo se agrego la evaluación de los controladores en viña, la razón de esta modificación fue el incremento que tuvieron las empresas en la producción de vino orgánico, rubro que se inicio en

paralelo con el proyecto y dada la importancia económica de él, para las empresas participantes en el proyecto, se incorporó como objetivo.

2) La búsqueda de cepas se realizó en predios de la zona central pertenecientes a las empresas que participaron en el estudio, lográndose aislados en bosque nativo, madera, suelo y compost.

3) Los preparados obtenidos se evaluaron en su efecto controlador sobre *V. inaequalis*, *P. cactorum* y *B. cinerea*.

4) Se evaluaron 42 cepas aisladas en laboratorio, definiéndose 8 especies diferentes, clasificación realizada en la Cátedra de micología de Facultad de Medicina de la U. de Valparaíso.

5) Las cepas aisladas se evaluaron a temperaturas de crecimiento de 10, 15 y 25 °C encontrándose tasas de crecimiento diferenciadas para cada cepa en las condiciones indicadas.

6) Las evaluaciones de campo indican que las cepas evaluadas en estas condiciones son capaces de lograr un control en el caso de *B. cinerea* mayor al 80 %, frenar el avance de *P. cactorum* y provocar un estímulo sobre la producción de fruta en los huertos de manzano. En el caso del uso de *Trichoderma spp.* para obtener el control de *V. inaequalis* se lograron resultados variables que indican que *Trichoderma* en este caso se debe usar dentro de un programa de manejo integrado de enfermedades fungosas.

7) Se obtuvieron y evaluaron 3 formulaciones de *Trichoderma*, una pasta para el control de *P. cactorum*, una formulación en suspensión acuosa y un formulado en polvo utilizables en el control de *B. cinerea*.

Descripción breve de los impactos obtenidos.

- 1) Viabilización de la producción de fruta orgánica al obtener un controlador biológico de las principales enfermedades fungosas de esta actividad, este objetivo se cumplió ya que se logró el aislamiento e identificación de cepas nativas de *Trichoderma* con alta capacidad de control sobre las principales enfermedades de la fruta orgánica de exportación que el proyecto consideraba.
- 2) Se dio inicio a la generación de una empresa ITAS S.A. (Instituto Tecnológico para la Agricultura Sustentable), destinada a la asesoría de productores de fruta orgánica y a la producción de insumos biológicos. En la actualidad se produce Jabón potásico para el control de insectos, *B. bassiana*, y *Trichoderma* en suspensión y pasta. Se realizan análisis de compost y de alimentos animales.
- 3) Las empresas han logrado desarrollar paulatinamente los sistemas de producción, con la contribución tecnológica incremental del proyecto, lo que significa mejores precios mayor contratación de mano de obra y mayor rentabilidad de la tierra por ha.
- 4) Se desarrollo una exitosa articulación interinstitucional pública privada que resolvió un problema tecnológico.
- 5) Se eliminó en estas empresas el uso de químicos en el control de enfermedades y se logro la obtención de fruta orgánica de exportación.

3) Aspectos metodológicos del proyecto.

Descripción de la metodología efectivamente usada.

METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTOS

1.0- Aislamiento y selección de cepas locales *Trichoderma spp.*

Durante todo el periodo del proyecto se realizaron aislamientos de cepas locales de *Trichoderma spp* a partir de diferentes sustratos; suelo, hojarasca de bosque nativo y material compostado, las cuales fueron seleccionadas en relación a su grado de tolerancia a bajas temperaturas.

1.1- Aislamiento de cepas locales de *Trichoderma*. de suelo y mantillo.

a) Se colectaron muestras de suelo de los huertos frutales en estudio, un total de 5 muestras de suelo por hectárea, las que consistían en 20 –25 submuestras tomadas con barreno a 20 cm. de profundidad. Las submuestras de cada hectárea se mezclaron en una muestra compuesta que fueron tamizadas y almacenadas en bolsas de polipropileno a 5°C hasta su uso.

De cada una de las muestras de suelo, se tomó una submuestra de 10 g. para preparar dos diluciones 10^3 y 10^6 , de cada una de ellas se extrajo 0,1 ml, se sembraron en medio selectivo para *Trichoderma spp* (TSM) modificado por Smith et al. (1990) o en Papa dextrosa agar, se incubaron a 25° C por una semana.

Se realizaron 6 repeticiones para cada muestra.

b) Se realizaron colectas periódicas de mantillo del bosque nativo de cada uno de los predios en estudio, el material colectado se guardó en bolsas de polipropileno a 5°C hasta su uso, de cada muestra se realizaron diluciones seriadas, igual que en el caso anterior y se sembraron directamente sobre PDA. Otra modalidad utilizada fue colocar submuestras de mantillo previamente humedecidos con agua estéril, en placas petri abiertas y estas depositadas en bandejas con tapa, las que se dejan a temperatura ambiente por 2 semanas,

observando periódicamente el crecimiento de micelio fungoso sobre el material vegetal, el cual es retirado con asa de siembra y depositado sobre medio PDA, llevando a incubación a 25°C.

Los aislados de *Trichoderma spp* obtenidos, se sembraron en papa dextrosa agar (PDA) y se identificarán de acuerdo a Bissett (1984), agrupándose de acuerdo a ciertas características similares; color, textura y patrones de esporulación.

Una vez examinadas y obtenidas las diferentes cepas de *Trichoderma*, se almacenan en sílica gel para su posterior uso.

1.2 Aislamiento de cepas locales de *Trichoderma* desde material compostado.

Se tomaron muestras compuestas de cada una de las pilas de compost maduro presente en los diferentes huertos en estudio, se pasaron por tamiz de 3mm y se almacenaron en bolsas de polipropileno a 5°C hasta su uso.

De cada muestra se efectuaron diluciones seriadas, las que se sembraron en placas con PDA y se incubarán a 25°C por una semana. Se realizaron 10 repeticiones para cada muestra.

Los aislados de *Trichoderma spp* obtenidos, se repicaron en agar harina de maíz (CMA) y se agruparon de acuerdo a ciertas características similares; color, textura y patrones de esporulación.

Una vez examinadas y obtenidas las diferentes cepas de *Trichoderma*, se almacenaron en sílica gel para su posterior uso.

La totalidad de las cepas de *Trichoderma* aisladas de los diferentes sustratos fueron enviadas al Departamento de Micología de la Universidad de Valparaíso, para su identificación taxonómica a nivel específico.

1.3 Evaluación y selección de cepas locales de *Trichoderma* tolerantes a bajas temperaturas

A partir de las diferentes cepas de *Trichoderma* aisladas, se efectuó la selección de aquellas tolerantes a bajas temperaturas, de acuerdo a los indicados por (Smith et al., 1990). Se toman discos de 0,5 cm. de diámetro, provenientes de cultivos madre en papa dextrosa agar (PDA) de una semana y se transfieren a un extremo de placas Petri con medio. Estos cultivos se incuban a 10, 15 y 25° C por 6 - 9 días.

Se realizan cinco réplicas de cada aislado y temperatura, el ensayo se repite tres veces.

Los resultados se determinan midiendo el radio de crecimiento de la colonia. Aquellas cepas que resulten con un mayor crecimiento a menor temperatura son utilizadas en las pruebas de antagonismo.

2.0 Aislamiento de hongos patógenos desde el suelo.

Se realizaron aislamientos de los hongos patógenos en estudio a través, de aislamientos directos de material vegetal infectado, para realizar pruebas de antagonismo con cada una de las cepas aisladas y seleccionadas de *Trichoderma spp.*

2.1 Aislamiento de *Phytophthora cactorum* desde el suelo mediante sistema de trampas (bioensayo).

a) Se colectan de los diferentes huertos de manzanos en estudio, un total de 5 muestras de suelo por hectárea, las que consisten en 20 -25 submuestras tomadas con barreno a 20 cm. de profundidad, próximas al tronco de árboles con evidente daño de *Phytophthora*. Las submuestras de cada hectárea se mezclan en una muestra compuesta, pasada por tamiz de 3 mm y almacenada en bolsas de polipropileno a 5°C hasta su uso.

b) El aislamiento se realiza mediante la extracción de raicillas y corteza de árboles dañados por el patógeno, el material vegetal se lava reiteradamente con agua para eliminar toda la tierra, luego se esterilizan en solución de hipoclorito de sodio al 5% y se enjuaga repetidas veces en agua destilada estéril. Luego se realizan finos cortes del material y se siembran sobre placas con agar harina de maíz (CMA), se incuban a 25°C por una semana. Al momento de la aparición de colonias de hongos, estas se siembran nuevamente en CMA para tener colonias puras y proceder a su identificación.

2.2 Aislamiento de *Botrytis cinerea* de bayas de vid y *Venturia inaequalis* de hojas y frutos de manzana.

B. cinerea:

Se toman muestras de frutos infestados con *B. cinerea*, de las diferentes plantaciones de vid en estudio, se lavan y agitan por 5 minutos en agua destilada estéril en proporción al peso de los frutos. El agua resultante del lavado se diluye hasta 10^5 , se toma 0.1 ml de esta dilución y se siembra en papa dextrosa agar (PDA), se incubará por 8 días a 23°C.

Los cultivos puros de *B. cinerea* se mantendrán en PDA hasta su utilización.

V. inaequalis:

Venturia fue aislada directamente desde hojas y fruta infectada, se tomaron colonias germinadas de Venturia desde el material vegetal con una asa de siembra la que se deposita en un tubo de ensayo con agua estéril, se procedió a efectuar diluciones seriadas (10^6) y sembrar 0,1ml en placas con PDA, una vez crecida Venturia se repica hasta tener cultivo puro, que se mantiene en PDA hasta su uso para las pruebas de antagonismo.

2.3 Pruebas de antagonismo con las cepas seleccionadas de *Trichoderma* spp. v/s los patógenos.

Se realizan pruebas de antagonismo con cada una de los aislados de *Trichoderma* seleccionados a bajas temperaturas y los patógenos en estudio. Esto nos permite tener una evaluación a nivel de laboratorio de la actividad inhibitoria de cada cepa del antagonista.

Estas pruebas se basan en dos pruebas; una definida por el grado o nivel de antagonismo de acuerdo a una escala de valores definida por Bell et al, (1982), la otra prueba se establece mediante el uso de un índice de inhibición, del crecimiento de los patógenos en presencia de *Trichoderma*. Cada prueba fue repetida tres veces con tres replicas por tratamiento

2.3.1 Prueba in vitro del antagonismo de *Trichoderma* v/s *P. cactorum*

Prueba de antagonismo: Se toman discos de 0,5 cm. de diámetro, tanto de *P. cactorum* como de cada uno de los aislados locales de *Trichoderma*, seleccionados, provenientes de cultivos madre en agar de harina de maíz (CMA) de una semana. Y se realizan cultivos dobles del patógeno con cada uno de los antagonistas seleccionados en PDA, ubicando estos discos, uno del patógeno y el otro de *Trichoderma*, en cada extremo de una placa. El área ocupada por cada colonia se evaluará después de 5 días de incubación a 20°C. Se determina el grado de antagonismo sobre la base de una escala de valores definida por Bell et al, (1982).

Tabla N°1

Grado de antagonismo de Trichoderma (Bell, 1982)	
Escala de antagonismo	Característica
1	Trichoderma cubre totalmente la superficie del medio y el patógeno
2	Trichoderma cubre al menos dos tercios de la superficie del medio
3	Trichoderma y el patógeno, cada uno coloniza aproximadamente la mitad de la superficie del medio (más de un tercio y menos de dos tercios) y ninguno de los organismos aparece dominando al otro
4	El patógeno coloniza al menos dos tercios de la superficie del medio
5	El patógeno cubre completamente la superficie del medio y a Trichoderma.

Índice de inhibición: Se siembra en el centro de una placa con PDA, un disco de 5mm de diámetro con micelio del patógeno, proveniente de un cultivo madre, se incuba a 25°C por 5- 6 días, luego se siembra a cada extremo del patógeno un disco de 5mm de diámetro de la cepa de Trichoderma en estudio proveniente de un cultivo madre. La evaluación se realiza después de 4 a 5 días, midiendo el radio de crecimiento del patógeno, hacia ambos lados en la zona frente a su antagonista (a y A), igual medición se efectúa a ambos lados de crecimiento del patógeno sin el antagonista (b y B). En ambos casos se calcula el promedio de crecimiento del patógeno con el antagonista y sin el, de acuerdo a la siguiente formula: Índice de inhibición: X/Y

$$X = a + A/2$$

$$Y = b + B/2$$

Los valores del índice se mueven entre 1 y 0, aquellos valores más cercanos a este último reflejan un nivel de inhibición mayor por el antagonista

2.3.2 Prueba in vitro del antagonismo de *Trichoderma* vs *B. cinerea*

Antagonismo: Se siembran en cultivos dobles del patógeno *B. cinerea* con cada una de los aislados locales de *Trichoderma*, seleccionados, en PDA. Se utilizan discos de 0,5 cm. de diámetro, provenientes de cultivos madres de 5 a 7 días. El área ocupada por cada colonia se evalúa después de 5 días de incubación a 23°C. Se determina el grado de antagonismo sobre la base de una escala de valores definida por Bell et al, (1982).

El índice de inhibición se obtuvo sembrando el patógeno en el centro de una placa con PDA, en un disco de 5mm de diámetro, se incubó por 3 días a 25°C, luego se siembran en ambos extremos el antagonista en estudio, de igual forma que el patógeno, se incuban por 5 días y se procede a medir el radio de crecimiento del patógeno frente al antagonista y sin el.

2.4 Prueba in vitro del antagonismo de *Trichoderma* vs *V. inaequalis*.

Al igual que para las situaciones anteriores, se realizó un cultivo dual del patógeno con el antagonista, determinando el nivel de antagonismo de los distintos *Trichoderma* frente a *Venturia*, de acuerdo a la escala anteriormente señalada. El índice de inhibición se obtuvo de igual manera que para el caso de los otros patógenos, sembrando a *Venturia* en el centro de una placa con PDA e incubándola por 3 días a 25° C, luego se siembran los antagonistas, se incuban por una semana y se procede a la obtención del índice

3.0 Producción masiva de *Trichoderma spp*

Inicialmente para la producción masiva del hongo antagonista se emplearon dos cepas nativas de *Trichoderma spp* aisladas directamente de suelos y material compostado en el Centro de Educación y Tecnología (Colina), conservada en medio agar-papa-dextrosa acidulado con ácido láctico 1N (0.5 ml/L) (APD).

La metodología usada para la reproducción masiva del hongo *Trichoderma spp*, y las normas de control de calidad, se basan en lo descrito por (Aulud, 1991; Alves, 1986; Roberts and Sweeney, 1982; Soper, 1982).

3.1 Preparación del sustrato sólido

Se utiliza como sustrato, avena partida, la que se humedece con agua destilada por intervalo de 1 hora. Luego se extiende sobre tamices y se deja secar al aire, hasta obtener una humedad interna de los granos de un 10-12%.

Una vez seca la avena, se llenan bolsas de polipropileno con 200 g por bolsa y se esterilizan en autoclave por 1 hora a 1,5 atm.

Otra metodología empleada fue la utilización de avena partida humedecida, depositada en envases de vidrio esterilizables hasta un 50% de su capacidad y cerrados con tapones que permitan el intercambio de aire, estos envases se llevan a esterilización igual que en el punto anterior.

3.2 Preparación del inóculo y siembra

Se prepara en Erlenmeyer, una suspensión de esporas de *Trichoderma*, proveniente de placas con PDA, en agua destilada estéril, a una concentración de 10^{10} esporas/ml. A partir de esta solución madre, se realiza la siembra de las bolsas o botellas con el sustrato estéril.

A cada una de las bolsas o frascos se le inyecta 15 ml de la solución/ 200 g de avena con jeringa automática WALMUR. Se sellan las bolsas o frascos y se incuban a 25-28°C por 15 días.

3.3 Control de calidad del biopreparado.

Se realiza el control de calidad del biopreparado en cada una de las etapas de producción, para lograr una adecuada estandarización del producto antes de su aplicación a nivel de campo.

3.3.1 Determinación de la pureza

Durante todo el tiempo de incubación de las bolsas o frascos se observa el 100% de la producción para la detección de agentes contaminantes, principalmente otros hongos. Al inicio y final del periodo de incubación se examina el 2% de la producción, tomando muestras de granos de avena, sembrándolos directamente en medio papa dextrosa agar (PDA), se incuba a 25°C por 5 días observando la presencia de contaminantes, principalmente bacterias.

Se debe obtener 100% de pureza.

3.3.2 Determinación de la concentración de esporas

Del 2% de las bolsas o frascos en producción, se toman pequeñas submuestras de avena que se mezclan y homogeneizan con espátula. Se pesa un gramo de la muestra, se suspende en 10ml de agua estéril y se deja una hora. Luego se agita y se deja en reposo 30min, se extrae el sobrenadante y se agrega una gota de

algún tensoactivo (Tween 80, 0,1%) y se procede al conteo de esporas en cámara de Neubauer. Se debe obtener una concentración no menor a 10^8 esporas/ml.

3.3.3 Determinación de la viabilidad de las esporas

A partir de la muestra líquida anterior, se suspende 1 ml en 9ml de agua estéril. Se deposita una gota de medio de cultivo (PDA) en el centro de un porta objeto. Al solidificarse se añade una gota de la suspensión anterior, se incuba a 25°C por 24-48horas y se cuenta al microscopio 100 conidias y de éstos, los germinados, esto se repite dos veces. Se debe tener un 85-100 % de germinación.

4.0 Preparación de tres formulaciones de *Trichoderma spp.*

En esta etapa se desarrollaron tres formulaciones de *Trichoderma spp.*, pasta, suspensión y polvo.

4.1 Preparación en suspensión líquida

Con las bolsas o frascos con *Trichoderma* completamente esporuladas, después de 15 días de incubación y una vez realizado el control de calidad, se prepara una suspensión líquida con concentración de 10^{10} esporas/ml. Para ello se mezcla 170 gramos del biopreparado en 1200 ml de agua, se agita por 10minutos, se deja reposar por una hora y se filtra, el producto final, 1 litro de biopreparado, se somete a control de calidad, se envasa y se almacena a 5°C o en lugar fresco evitando la radiación solar directa, por no más de una semana hasta su aplicación en el campo.

4.2 Preparación de *Trichoderma* en pasta

En este caso se ha logrado desarrollar una pasta de aplicación local para el control de las lesiones y efectos de *Phytophthora cactorum* en plantas de manzano.

Para ello se considera la utilización de arcillas inertes que permitan realizar de forma aséptica la mezcla del agente antagonista con la arcilla, que corresponde al excipiente, permitiendo la aplicación local del preparado.

La producción de la pasta consiste en preparar una dilución de *Trichoderma* en agua destilada estéril a una concentración de 10^8 y 10^{10} esporas/ml la que se mezclará con 48% de bentonita como excipiente, 51% agua destilada, 1% colorante inerte. La bentonita se ha incorporado en el preparado para adsorber las conidias, protegerlas de la luz ultravioleta y conservar las esporas en un medio que retiene agua protegiéndolas y liberándolas en la medida que se incrementa la humedad en el sistema, en este caso en la base del árbol.

4.3 Producción de *Trichoderma* en sustrato sólido deshidratado

A partir del sustrato sólido completamente esporulado se realiza la reducción del contenido de agua en cámara de secado o bandejas de secado a 60° C por 24 horas, para alcanzar un rango de humedad de 5-7% en la formulación, posteriormente este sustrato seco es tamizado en un Rot- Ap. Retirando las partículas más toscas y conservando en lugar frasco para su posterior aplicación ya sea como presentación líquida o como pasta.

La evaluación del sistema de secado del sustrato sólido, se realizó rehidratando las esporas y conociendo su germinación en placas una vez reactivadas. El sentido de esta actividad es llegar a establecer una reserva del preparado que permita conservar y abastecer con el hongo de manera homogénea.

4.4 Control de calidad de las presentaciones

El objetivo fundamental de este control es lograr una adecuada estandarización de los productos, que permita asegurar la acción del preparado y la ausencia de contaminación potencialmente dañina para el cultivo.

4.4.1 Determinación de la pureza

Se examina el 2% de la producción, tomando muestras de la solución de *Trichoderma*, del preparado en pasta y del deshidratado, sembrándolos directamente en medio papa dextrosa agar (PDA), se incuba a 25°C por 5 días observando la presencia de contaminantes. Se debe obtener 100% de pureza

4.4.2 Determinación de la concentración de esporas

Del 2% de la producción, se realizan diluciones seriadas, las que se siembran en placas Petri con PDA y se incuban a 25°C 24 a 72 horas, para el recuento de unidades formadoras de colonia por gramo en caso de la preparación en pasta y deshidratado. Para el medio líquido se hace recuento de esporas por ml en cámara de Neubauer.

Se debe obtener una concentración no menor a 10^8 esporas/ml y 10^8 ufc/g en caso de la pasta y deshidratado

4.4.3 Determinación de la viabilidad de las esporas

A partir de la muestra líquida anterior, se suspende 1 ml en 9ml de agua estéril. Se deposita una gota de medio de cultivo (PDA) en el centro de un porta objeto. Al solidificarse se añade una gota de la suspensión anterior, se incuba a 25°C por 18-24 horas y se cuenta al microscopio 100 conidias y de éstos, los germinados. Esto se repite dos veces. Se debe obtener un 85-100 % de germinación.

4.4.4 Determinación de la viabilidad de las presentaciones del biopreparado en el tiempo

Una vez realizado el control de calidad de cada una de las presentaciones, se almacenan por 3-4 meses a temperatura ambiente, en un lugar fresco evitando la radiación directa del sol. Mensualmente se extraen muestras para realizar control de pureza y viabilidad de las esporas. De esta forma obtendremos el tiempo máximo de almacenamiento de los diferentes preparados sin afectar la viabilidad de las esporas.

5.0 Aplicación y evaluación de las presentaciones del biopreparado en el campo

Para evaluar el efecto de las cepas de *Trichoderma* aisladas y seleccionadas se realizan ensayos para cada una de las presentaciones del biopreparado y en cada una de las especies frutales de interés para el proyecto. Hay que hacer la salvedad que en el primer año se aplicó en forma masiva la cepa -1 (*T. longibrachiatum*), probada en la temporada anterior, con buenos resultados en las pruebas de temperatura y antagonismo.

5.1 Aplicación de *Trichoderma spp* en manzano para el control de *V. inaequalis*

Las aplicaciones de *Trichoderma* se realizaron en variedad Pink.Ladie en parcelas de 80 árboles , durante los dos primeros años, luego estas se redujeron a 44

árboles en promedio, por parcela, además a partir del 2003 se incorporó al ensayo otra variedad de manzano Golden Reinders, menos sensible a Venturia, las parcelas fueron en promedio de 45 árboles. Se realizaron aplicaciones foliar cada 10 y 15 días en suspensión de 10^8 conidias/ml (1500 – 1800 L/ha) con dos aplicaciones otoñales, y cuatro aplicaciones primaverales, para cada frecuencia, alternando con aplicaciones de azufre. Se utilizó un diseño de bloques al azar con tres repeticiones por tratamiento

Los resultados se contrastaron sólo en el primer año con un control tratado sólo con aplicación de azufre. En los años siguientes y en ambas variedades de manzano el testigo consistió en el resto del huerto, el cual fue manejado de forma integrada con otros productos autorizados por la normativa orgánica

5.1.1 Evaluación del efecto de *Trichoderma spp* aplicado en manzano sobre *V. inaequalis*.

El efecto de la acción de *Trichoderma* en suspensión, se evaluó en 6 árboles por hilera (4 hileras por tratamiento) seleccionados al azar. Al momento de la cosecha se pesó y contó el número total de frutos por cada árbol previamente marcado y de ellos el porcentaje con presencia de *Venturia*. Las evaluaciones se realizaron para cada uno de los tratamientos y se compararon con el testigo.

Se utilizó un diseño de bloques al azar con tres repeticiones. Los datos se procesaron a través de análisis de varianza y las medias se separaron mediante prueba de Duncan (5%).

5.2 Aplicación de *Trichoderma* en manzano para control de *P. cactorum*

Los ensayos en huertos de manzano variedad Green Fuji se realizaron en parcelas de tres hileras, cada hilera con 77 árboles, cada parcela recibió un

determinado tratamiento, evaluando a final de temporada, para cada tratamiento seis árboles por hilera, previamente identificados de acuerdo al nivel de daño que exhibían

En el primer caso, en suspensión, se realizaron aplicaciones a nivel de suelo, de *T. longibrachiatum*, alrededor de los árboles, cada 10 y 15 días de una suspensión de 10^8 conidias/ml (1200 – 1500 L/ha) durante los dos primeros años del ensayo, para aumentar la dosis a 10^{10} en el año siguiente, aumentando consecutivamente los tratamientos con la adición de nuevas cepas de Trichoderma (Tabla 1). Los diferentes ensayos se realizaron en parcelas de tres hileras, cada una con 77 árboles, seleccionando en cada hilera tres árboles con daño alto, tres con medio y tres con bajo daño, los que fueron evaluados al momento de la cosecha.

Los tratamientos se realizaron con dos aplicaciones otoñales, y cuatro aplicaciones primaverales, para cada frecuencia (10 y 15 días). Se utilizó un diseño de bloques al azar con tres repeticiones por tratamiento

En el caso de la pasta, ésta se pondrá a manera de pintura fungicida, en dos concentraciones

10^8 y 10^{10} , durante los dos primeros años del ensayo, quedando los dos últimos con la mayor concentración. (Tabla 2). La pasta sólo se aplicó sobre las lesiones del cuello del tronco de los árboles, en igual período que en el ensayo anterior (otoño y primavera). Se utilizarán tres repeticiones en cada tratamiento, evaluando los resultados con análisis de varianza

Esta pasta fue evaluada en términos de la concentración de esporas que contiene por gramo del producto.

Tabla N° 2

Aplicaciones de <i>Trichoderma</i> para control de <i>P. cactorum</i> en manzanos				
Año	Formulación	Trichoderma	Concentración	Épocas de aplicación
				2 aplicaciones en otoño y 4 en

2001	Suspensión	<i>T. longibrachiatum</i> (Tcet)	10 ⁸ esporas/ml	primavera, cada 10 y cada 15 d'as
	Pasta	<i>T. longibrachiatum</i> (Tcet)	10 ⁸ esporas/g y 10 ¹⁰ esporas/g	2 aplicaciones; una en otoño, otra en primavera
2002	Suspensión	<i>T. longibrachiatum</i> (Tcet) <i>T. harzianum</i> (T3)	10 ⁸ esporas/ml	2 aplicaciones en otoño y 4 en primavera, cada 10 y cada 15 d'as
	Pasta	<i>T. longibrachiatum</i> (Tcet) <i>T. harzianum</i> (T3)	10 ⁸ esporas/g y 10 ¹⁰ esporas/g	4 aplicaciones; 2 en otoño y 2 en primavera
2003	Suspensión	<i>T. longibrachiatum</i> (Tcet) <i>T. harzianum</i> (T3) <i>T. harzianum</i> (T7) <i>T. harzianum</i> (T Rboldo)	10 ¹⁰ esporas/ml	2 aplicaciones en otoño y 4 en primavera, cada 10 y cada 15 d'as
	Pasta	<i>T. longibrachiatum</i> (Tcet) <i>T. harzianum</i> (T3) <i>T. harzianum</i> (T7) <i>T. harzianum</i> (T Rboldo)	10 ¹⁰ esporas/g	2 aplicaciones; una en otoño, otra en primavera
2004	Pasta	<i>T. longibrachiatum</i> (Tcet) <i>T. harzianum</i> (T3) <i>T. harzianum</i> (T7) <i>T. harzianum</i> (T Rboldo) <i>T. aureoviride</i> (T SFelipe)	10 ¹⁰ esporas/g	2 aplicaciones; una en otoño, otra en primavera

5.2.1 Evaluación del efecto de *Trichoderma* en suspensión aplicado en manzano sobre *P. cactorum*

La evaluación del efecto de *Trichoderma* se realizó mediante los datos recopilados de un número definido de árboles por tratamiento, los que fueron clasificados en

relación a su intensidad de daño (alto, medio, bajo), de acuerdo observaciones visuales de los síntomas aéreos; vigor, senescencia, desfoliación, brotación.

A cada árbol se le evaluó el número de frutos, peso promedio de frutos y diámetro.

Se uso un diseño de bloques al azar con tres repeticiones por tratamiento y los datos se procesarán por análisis de varianza y las medias se separarán por test de Duncan (5%).

5.2.2 Evaluación del efecto de *Trichoderma* en pasta aplicado en manzano sobre *P. cactorum*.

Al igual que en el caso anterior, la evaluación del efecto de *Trichoderma* se realizó mediante los datos recopilados de un número definido de árboles por tratamiento, los que fueron clasificados en relación a su intensidad de daño (alto, medio, bajo)

A cada árbol se le evaluó el número de frutos, peso promedio de frutos y diámetro.

Se uso un diseño de bloques al azar con tres repeticiones por tratamiento y los datos se procesarán por análisis de varianza y las medias se separarán por test de Duncan (5%).

5.3 Aplicación de *Trichoderma* en suspensión para control de *B. cinerea*.

En este caso se evaluó la acción de los diferentes aislados de *Trichoderma spp.* en el control de *B.cinerea*. en viña variedad Chardonay y en uva de mesa variedad Red Globe

En el caso de viña se trabajó con parcelas de experimentación constituidas por 4 hileras y 62 plantas cada una, cada parcela fue tratada con una suspensión de esporas con 10^{10} conidias/ ml de *Trichoderma* (800-1200L/ha), considerando un testigo, sin tratamiento con *Trichoderma*

En Parrón, variedad Red Globe, las parcelas de experimentación comprendían 4 hileras 38 plantas, cada parcela fue tratada con una suspensión de esporas con 10^{10} conidias/ ml de *Trichoderma* (800-1200L/ha).

Los aislados de *Trichoderma* empleados en ambas variedades, fueron aumentando en cada temporada, hasta llegar en el último periodo con la utilización de una formulación en polvo de *Trichoderma* (Tabla N°3)

Las aplicaciones básicas se realizaron en período de floración, grano de 4-5 mm, compactación del racimo, pinta y tres semanas antes de la cosecha. Si las condiciones ambientales son las propicias para el desarrollo de los patógenos, (temperatura, humedad) se realizan aplicaciones del antagonista.

Se utilizó un diseño de bloques al azar con tres repeticiones por tratamiento. Los datos se procesarán a través de análisis de varianza y las medias se separarán mediante prueba de Duncan (5%).

Tabla N°3

Aplicaciones de <i>Trichoderma</i> para control de <i>B. cinerea</i> en vid		
Ensayo: <i>Vitis vinifera</i> var. Chardonay		
Año	<i>Trichoderma</i> en suspensión a concentración de 10^{10} conidias/ml	Número de Aplicaciones
2001	<i>T. longibrachiatum</i> (Tcet)	3 (floración, compactación de racimo, precosecha)
2002	<i>T. longibrachiatum</i> (Tcet) <i>T. harzianum</i> (T3) <i>T. harzianum</i> (T7)	5 (prefloración, flor, grano 4-5mm, pinta y precosecha)

2003	T. longibrachiatum (Tcet) T. harzianum (T3) T. harzianum (T7) T. harzianum (T Rboldo)	5 (prefloración, flor, grano 4-5mm, pinta y precosecha)
2004	T. longibrachiatum (Tcet) T. harzianum (T3) T. harzianum (T7) T. aureoviride (T Sfelipe) T. longibrachiatum (POLVO) T. harzianum (T7) (POLVO)	5 (prefloración, floración, grano 4-5 mm, apriete de racimo o pinta y precosecha)

Ensayo: <i>Vitis vinifera</i> var. Red Globe		
2001	T. longibrachiatum (Tcet)	4 (floración, compactación de racimo, pinta, precosecha)
2002	T. longibrachiatum (Tcet) T. harzianum (T3)	7 (prefloración, flor, grano 4-5mm, compactación de racimo, pinta y dos en precosecha)
2003	T. longibrachiatum (Tcet) T. harzianum (T3) T. harzianum (T7)	7(prefloración, flor, grano 4-5mm compactación de racimo, pinta y dos en precosecha)
2004	T. longibrachiatum (Tcet) T. harzianum (T3) T. harzianum (T7) T. aureoviride (T Sfelipe) T. longibrachiatum (POLVO) T. harzianum (T3) (POLVO)	6(prefloración, flor, grano 4-5mm compactación de racimo, pinta y precosecha)

5.3.1 Evaluación del efecto de *Trichoderma* en suspensión aplicado a viña y parrón para el control de *B. cinerea*.

De cada ensayo y parcela se toman al azar 100 racimos, evaluando la presencia o ausencia de daño de forma visual, conjuntamente se tomaron al azar 100 bayas aparentemente sanos, los que se esterilizan superficialmente con hipoclorito de sodio al 2% por 2 min. Posteriormente se lavan con agua estéril, se seca el exceso de agua con toalla de papel esterilizada y se coloca en placas Petri estériles, contenidas en recipientes plásticos, con papel filtro en el fondo. Los recipientes se cubren y se mantienen a temperatura ambiente, los frutos se examinan y evalúan a los 3 –5 d'as, contabilizando los frutos que manifiesten estar afectados por *B. cinerea*. Los datos son analizados por análisis de varianza y las medias separadas por test de Duncan (%5)

5.4 Aplicación de suspensión de *Trichoderma* en el conjunto de los huertos

Se aplicó en el primer año, en forma masiva las cepas de *Trichoderma* aisladas por el Centro de Educación y Tecnología, *T longibrachiatum* .Estas aplicaciones se realizaron y evaluaron en una superficie total de 10 ha. En los años siguientes se aplicaron aquellos aislados que dieron los mejores resultados en las parcelas de experimentación *T. longibrachiatum* y *T. harzianum*. Las evaluaciones se realizaron en las mismas parcelas de experimentación donde se aplicaron estas cepas

5.4.1 Evaluación del efecto de *Trichoderma* aplicado para el control de *B. cinerea*, *P. cactorum* y *V. inaequalis*.

Las evaluaciones de las mejores cepas aplicadas en el resto de los huertos, T3 y T7 (*T. harzianum*), Tcet (*T longibrachiatum*), se realizaron en las mismas parcelas de experimentación donde se aplicaron estas cepas, para lo cual fue ampliado el tamaño de las parcelas de los ensayo y los muestreos, lo que nos permitió tener datos más representativos del sistema de manejo.

6.0- Difusión de las técnicas empleadas tanto en producción masiva como en el control de enfermedades fungosas, dentro de un sistema de manejo orgánico.

Estas dos actividades comprenden la realización de dos seminarios de difusión de las experiencias obtenidas en relación a la producción masiva de *Trichoderma* sp. y sobre el control de *B. cinerea* en vid y *P. cactorum* y *V. inaequalis* en manzano, mediante el uso de cepas locales y aisladas de predios con manejo orgánico. El objetivo principal es dar a conocer las técnicas empleadas tanto en producción masiva como en el control de estas enfermedades dentro de un sistema de manejo orgánico.

Estos seminarios, se realizaron en octubre y diciembre del 2004, tocando los temas sobre; producción, usos, aplicación y nivel de control de los antagonistas sobre los diferentes patógenos en estudio.

4) Descripción de las actividades y tareas ejecutadas para la consecución de los objetivos, comparación con las programadas y razones que explican las discrepancias.

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Tareas Ejecutadas	Discrepancias
1	1.0	<p>Aislamiento de cepas locales de <i>Trichoderma spp.</i></p> <p>Durante los dos primeros años del proyecto, a partir de suelo y material compostado, las que se seleccionarán en su grado de tolerancia a bajas temperaturas (10 y 15°C)</p>	<p>Se realizaron aislamientos de cepas locales durante todo el período del proyecto, de suelo, mantillo y material compostado. Las cepas aisladas se seleccionaron y evaluaron en relación a su comportamiento a tres diferentes temperaturas, 10, 15 y 25°C</p>	<p>Se amplió el período de aislamiento de cepas locales, a los cuatro años del proyecto, así como las temperaturas de evaluación. La finalidad de estas modificaciones fue aislar un mayor número de cepas en diferentes sustratos y condiciones ambientales, así como evaluar su nivel de crecimiento en un rango mayor de temperaturas, más cercanas a las condiciones del medio</p>

				ambiente.
	1.1	<p>Aislamiento de cepas locales de <i>Trichoderma</i> spp. desde suelo.</p> <p>Se tomaran muestras de suelo de los diferentes huertos en estudio con un barreno a 20 cm. de profundidad, se tamizaran y guardaran a 5°C hasta su uso. De cada muestra se pesa un gramo y se siembra por dilución seriada en medio selectivo para <i>Trichoderma</i> spp (TSM) modificado por Smith et al. (1990) y se incuban a 25° C por una semana. Se realizaran seis repeticiones para cada muestra.</p>	<p>Se tomaron muestras de suelo de los huertos y de bosque nativo de cada predio en estudio, se pesó un gramo de cada muestra y se sembró por dilución seriada en placas con PDA.</p> <p>También fueron tomadas submuestras de mantillo las que se montaron en cámara húmeda, hasta la aparición de <i>Trichoderma</i> sobre el material vegetal, éste fue retirado y sembrado en PDA, para su posterior identificación. Se realizaron seis repeticiones para cada muestra.</p>	<p>Se amplió la toma de muestras a áreas con baja intervención humana, como mantillo de bosque nativo, donde <i>Trichoderma</i> crece y se encuentra con mayor facilidad.</p> <p>El aislamiento de los diferentes antagonistas, se realizó en medio selectivo (TSM) para <i>Trichoderma</i>, sólo en un comienzo, pero al adquirir experiencia en el reconocimiento de estos antagonistas en los diversos sustratos, el aislamiento se efectuó por diluciones seriadas en medio papa dextrosa agar (PDA)</p>

	<p>1.2</p>	<p>Aislamiento de cepas locales de <i>Trichoderma</i> spp. desde material compostado.</p> <p>Las muestras se tomarán de pilas de compost maduro en los diferentes huertos en estudio. Cada muestra será sembrada por dilución seriada en medio selectivo para <i>Trichoderma</i> (TMS) y se incubaran a 25° C por una semana. Los aislamientos se repicarán en placas con PDA y se identifican de acuerdo a características morfológicas de acuerdo a Bissett (1984)</p>	<p>Se tomaron muestras de pilas de compost de los diferentes predios en estudio, de cada muestra se tomó un gramo y se sembró por dilución seriada en placas con PDA, se incubaron a 25°C por una semana, observando la aparición de <i>Trichoderma</i>, el cual fue retirado, aislado y sembrado en PDA, para su identificación.</p>	<p>No se utilizó medio selectivo para aislar <i>Trichoderma</i>, sino que PDA por las razones indicadas en el punto anterior.</p>
	<p>1.3</p>	<p>Evaluación y selección de cepas locales de <i>Trichoderma</i> tolerantes a bajas temperaturas.</p> <p>A partir de las diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> aisladas, se efectuó</p>	<p>La evaluación se realizará a 10 y 15 °C además, se realizaron pruebas a 25°, para las tres temperaturas, se tomaron discos de 0,5 mm de diámetro</p>	<p>Se incorporó a la evaluación de las cepas una tercera temperatura, 25°C, con el objeto de tener un rango mayor de</p>

		<p>la selección de aquellas tolerantes a bajas temperaturas, de acuerdo a los indicados por (Smith et al., 1990). Se toman discos de 0,5 cm. de diámetro, provenientes de cultivos madre en papa dextrosa agar (PDA) de una semana y se transfieren al centro de placas Petri con medio. Estos cultivos se incuban a 10 y 15°C por 6 - 9 días.</p> <p>Se realizan cinco réplicas de cada aislado y temperatura, el ensayo se repite tres veces.</p> <p>Los resultados se determinan midiendo el diámetro mayor de crecimiento de la colonia. Aquellas cepas que resulten con un mayor crecimiento a menor temperatura son utilizadas en las pruebas de antagonismo.</p>	<p>provenientes de cultivos madre en PDA, y se siembran en el extremo de una placa petri con PDA, se incuban a las diferentes temperaturas (10 15 y 25°C) por una semana, midiendo el radio de crecimiento de la colonia.</p> <p>Se realizaron tres repeticiones por aislamiento y temperatura</p>	<p>sus comportamientos de crecimiento, los más próximos a lo observado en el campo.</p> <p>Además, las evaluaciones se realizaron midiendo el radio de crecimiento de las colonias, con la ubicación del antagonista en un extremo de la placa y no con su diámetro mayor y ubicación en el centro de la placa. Se optó por el primer punto porque permitió medir una mayor distancia de crecimiento de las colonias y calcular fácilmente la tasa diaria de crecimiento para cada cepa y temperatura.</p>
--	--	---	--	--

	2.1	<p>Aislamiento de <i>P. cactorum</i> desde el suelo en huertos de manzano, mediante sistema de trampa (bioensayo).</p> <p>Se toman muestras de suelo en huertos infectados con el patógeno, se depositan 30ml de suelos en placas, se humedecen e incuban por 3 días a 20°C, luego cada cápsula se inunda con agua destilada y se depositan 5 cotiledones de semillas de manzana var. Grimes Golden o McIntosh. Las cápsulas se incuban por 7 días observando bajo aumento los cotiledones para identificar los esporangios de <i>P. cactorum</i>. Estos son sembrados en medio selectivo (PAR) y mantenidos en medio agar harina</p>	<p>El aislamiento se realiza mediante la extracción de raicillas y corteza de árboles dañados por el patógeno, el material vegetal se lava reiteradamente con agua para eliminar toda la tierra, luego se esterilizan en solución de hipoclorito de sodio al 5% y se enjuaga repetidas veces en agua destilada estéril. Luego se realizan finos cortes del material y se siembran sobre placas con agar harina de maíz (CMA), se incuban a 25°C por una semana. Al momento de la aparición de colonias de hongos, estas se siembran nuevamente en CMA para tener colonias puras y proceder a su</p>	<p>Se realizó el aislamiento a partir de material vegetal infectado por el patógeno, debido a la dificultad de encontrar manzanas de la variedad Grimes Golden o McIntosh. Para usar sus semillas como cebo, además los antibióticos empleados como medio selectivo (PAR), son de uso intrahospitalario, en consecuencia su uso y adquisición se encuentran restringidos a personal autorizado.</p>
--	-----	--	---	---

		de maíz (CMA) hasta su uso.	identificación.	
	2.2	<p>Aislamiento de <i>B. cinerea</i> desde bayas de vid.</p> <p>Se toman muestras de bayas infectadas por el patógeno, se lavan en agua estéril y esta agua se diluye cinco veces, tomando 0,1ml para sembrarlo en PDA e incubar por una semana a 23°C, una vez crecido Botrytis este se siembra en cultivo puro sobre PDA</p>	<p>Aislamiento de <i>B. cinerea</i> desde bayas de vid y <i>V. inaequalis</i> desde hojas y frutos de manzano</p> <p>a) El aislamiento de Botrytis se efectuó desde bayas con el patógeno, se agitaron en agua estéril y se extrajo 1ml el que se diluyó hasta 10⁶, luego se tomó 0,1 ml y se sembró en PDA, se incubó y se sembró en cultivo puro en PDA.</p> <p>b) Venturia fue aislada directamente desde hojas y fruta infectada, se tomaron colonias germinadas de Venturia desde el material vegetal con una asa de siembra</p>	<p>Dentro del aislamiento de los patógenos, se incluyó el aislamiento de <i>Venturia inaequalis</i>, debido a que era necesario tenerlos a disposición para realizar las pruebas de antagonismo con los Trichoderma. En el caso de Venturia se había planteado realizar esta prueba in vivo, directamente en las hojas infectadas en el huerto, pero debido a que los ensayos montados en el campo se perdieron porque fueron rustridos, se optó por el método in vitro,</p>

			<p>la que se depositó en un tubo de ensayo con agua estéril, se procedió a efectuar diluciones seriadas (10^6) y sembrar 0,1ml en placas con PDA, una vez crecida <i>Venturia</i> se replica hasta tener cultivo puro, que se mantiene en PDA.</p>	<p>más seguro y controlado.</p>
	<p>2.3</p>	<p>Pruebas de antagonismo con las cepas seleccionadas de <i>Trichoderma</i> v/s patógenos.</p> <p>Se realizan pruebas de antagonismo, mediante crecimiento dual, con cada uno de los aislados de <i>Trichoderma</i> seleccionados a diferentes temperaturas y los patógenos en estudio, de manera de tener una evaluación de la actividad antagónica de cada cepa de antagonista.</p>	<p>Las pruebas de antagonismo se realizaron a través de crecimiento dual del patógeno con cada uno de los antagonistas seleccionados, en placas con PDA, se siembran discos de 5mm de diámetro, uno del patógeno y otro del antagonista, en cada extremo opuesto de la placa, el área ocupada por cada colonia se evalúa después de una semana de incubación y se</p>	<p>Se incorporó a la evaluación de antagonismo, el índice de inhibición, como una forma de ampliar los test de evaluación de los diferentes antagonistas aislados</p>

			<p>determina el grado de antagonismo en base a una escala de valores definida. (Bell, 1982)</p> <p>Otra evaluación sobre el efecto antagónico de las distintas cepas de Trichoderma aisladas, fue la aplicación de un índice de inhibición. En placas petri con PDA se siembra en el centro un disco de 5mm de diámetro proveniente de un cultivo con patógeno, luego a cada lado equidistante a él, se siembran un disco con el antagonista en estudio, se incuban por una semana y se determina el índice de inhibición, dividiendo el crecimiento del micelio del patógeno en presencia de los</p>	
--	--	--	---	--

			antagonistas, por el crecimiento del micelio del patógeno sin ellos.	
	2.3.1	Pruebas in vitro de antagonismo de Trichoderma v/s P. cactorum. Se realizaron pruebas de crecimiento dual entre el patógeno y cada uno de los aislados de Trichoderma, determinando el grado de antagonismo en relación a la escala de Bell, (1982).	Se efectuaron las pruebas in vitro de crecimiento dual entre <i>P. cactorum</i> y cada uno de los aislados de Trichoderma y se determino el grado de antagonismo de acuerdo a Bell (1982). Se calcularon los índices de inhibición de cada uno de los antagonistas aislados frente al patógeno	Se incorporó la evaluación del antagonismo de los diferentes Trichoderma frente a <i>P. cactorum</i> a través, del índice de inhibición, para contar un conjunto de datos mayor que permitieran efectuar una selección más acuciosa de la acción de los antagonistas en el control de <i>P. cactorum</i>
	2.3.2	Pruebas in vitro de antagonismo de Trichoderma v/s B.cinerea. Se realizaron pruebas de crecimiento dual entre el patógeno y cada uno de los aislados de Trichoderma, determinando el	Se efectuaron las pruebas in vitro de crecimiento dual entre <i>B.cinerea</i> y cada uno de los aislados de Trichoderma y se determinó el grado de antagonismo de acuerdo a Bell	Se agregó la evaluación in vitro del antagonismo de los diferentes aislados del antagonista frente al patógeno <i>V. inaequalis</i> , por las razones indicadas

		<p>grado de antagonismo en relación a la escala de Bell, (1982).</p>	<p>(1982).</p> <p>Se calcularon los índices de inhibición de cada uno de los antagonistas aislados frente al patógeno</p> <p>b) Se efectuaron las pruebas in vitro de crecimiento dual entre <i>V. inaequalis</i> y cada uno de los aislados de Trichoderma y se determinó el grado de antagonismo de acuerdo a Bell (1982).</p> <p>Se calcularon los índices de inhibición de cada uno de los antagonistas aislados frente al patógeno</p>	<p>en el punto 2.2</p>
	2.3.3	Pruebas in vivo de antagonismo de Trichoderma v/s V.	<p>Se efectuaron las pruebas <u>in vitro</u> de crecimiento dual entre</p>	<p>Se remplazo la prueba in vivo por una in vitro, por la</p>

	<p><i>inaequalis</i>.</p> <p>En otoño se colectan hojas infectadas con el patógeno, un grupo de estas hojas se asperja con los <i>Trichoderma</i> aislados, a concentración conocida 10^8 esporas/ml) y otro grupo, control, se asperja con agua estéril. Las hojas se mantienen en los mismos huertos durante el invierno, en bandejas cubiertas por malla. La evaluación de la colonización de las hojas y control de los diferentes antagonistas, se evalúa desde agosto ha octubre, mediante observaciones visuales y por aislamiento. Para cada cepa evaluada, se toma una muestra de las hojas en el campo, se colocan en discos petri con agar agua más 100 mg/l de tetraciclina para inhibir</p>	<p><i>V. inaequalis</i> y cada uno de los aislados de <i>Trichoderma</i>, determinando su antagonismo por la escala de Bell (1982). Conjuntamente se determinó el índice de inhibición de los antagonistas frente a este patógeno</p>	<p>pérdida del material dispuesto en el campo y por la dificultad de realizar una evaluación in vivo de estas características, en predios tan alejados (Parral) lo que dificulta el control y seguimiento constante del ensayo.</p>
--	--	---	---

		<p>crecimiento de bacteria. SE mantienen a temperatura ambiente y se observan cada tres días por 1 a 6 semanas. Cuando se observe presencia de hongos, se siembran en medio selectivo para <i>Trichoderma</i>. Para cada muestra y aislado se registra la colonización, proporción de hojas colonizadas y presencia de pseudotecios de <i>Venturia</i>.</p>		
3	3.0	<p>Producción masiva de <i>Trichoderma spp.</i> Inicialmente se usaran dos cepas nativas de <i>Trichoderma</i>, (cepa 1 y cepa 2) aisladas de suelo y material compostado en el Centro de educación y tecnología, para emplearlas en reproducción masiva. En los años siguientes se reproducen y evalúan a nivel de</p>	<p>La Producción masiva de <i>Trichoderma</i> se realizó el primer año del proyecto, con una sola cepa aislada en el CET (<i>T. longibrachiatum</i>), para ir aumentando en las temporadas siguiente el número de cepas reproducidas y evaluadas a nivel de campo. Llegando al último año con la producción y</p>	<p>El número de cepas producidas masivamente, para el primer año, fue de sólo una <i>T. longibrachiatum</i>, debido a que la otra cepas propuesta, Th (<i>T. viride</i>), no dio buenos resultados en las pruebas de crecimiento a diferentes</p>

		campo las cepas aisladas y seleccionadas en base a temperatura y antagonismo, para finalmente terminar con el empleo de aquellas de mejor resultado en los ensayos	evaluación de seis aislados tanto para vid como manzano.	temperaturas y en los test de antagonismo
	3.1	Preparación de sustrato sólido para inoculación. Se usó como sustrato sólido avena partida y humedecida con agua, hasta obtener una humedad interna de los granos de 10-12%. Con la avena húmeda se llenan bolsas de polipropileno con 200 g por bolsa y se esterilizan por 1 hora a 1,5 atm.	Se usó como sustrato sólido avena partida (85%) y machacada (15%), humedecida con agua destilada, la que se colocó en bolsas de polipropileno (200 g por bolsa) y recipientes de vidrio (llenos hasta su 50% de capacidad) tapados con tapones de algodón, los que se llevaron a esterilización por 1 hora a 1,5 atm.	Se introdujo el uso de envases de vidrio como recipientes para la reproducción de Trichoderma, principalmente como una forma de eliminar la contaminación observada en el sistema con bolsas.
	3.2	Preparación del inóculo de	El inóculo fue preparado a partir	

		<p>Trichoderma y siembra de sustrato.</p> <p>En un Erlenmeyer estéril se prepara una suspensión de esporas de Trichoderma, proveniente de placas con PDA, en agua destilada estéril a una concentración de 10^{10} esporas/ml. A partir de esta solución madre se siembran las bolsas con jeringa automática (15ml) por bolsa, las que se cierran y se incuban a 25°C por 15 días</p>	<p>de una suspensión de Trichoderma proveniente cultivos sembrados en placas con PDA. La suspensión se realizó en agua estéril a una concentración de 10^{10} esporas/ml y a partir de ésta, se siembra el sustrato estéril con jeringa automática a razón de 15ml por 200g de sustrato.</p>	
	3.3	<p>Control de calidad del biopreparado.</p> <p>Se realiza el control de calidad en cada una de las etapas de producción, para lograr una estandarización del producto</p>	<p>Para cada lote de producción y cada cepa de Trichoderma reproducida, se le realiza su correspondiente control de calidad</p>	
	3.3.1	<p>Determinación de pureza del</p>	<p>Al inicio y final del período de</p>	

		<p>biopreparado.</p> <p>Al inicio y final del período de incubación, se examina el 2% de la producción, tomando muestras de granos de avena y sembrando directamente en medio PDA, se incuban a 25°C por 5 días, observando la presencia de contaminantes. Se debe obtener un 100% de pureza.</p>	<p>incubación, se examina el 2% de la producción, sembrando directamente sobre placas con PDA, grano de avena de los recipientes, se incuba a 25°C por 5 días, observando la presencia de contaminantes. Se debe obtener un 100% de pureza.</p>	
	3.3.2	<p>Determinación de concentración de esporas del biopreparado.</p> <p>Al 2% de la producción, se extraen submuestras de avena, se mezclan y se pesa un gramo el que se suspende en 10ml de agua estéril, se mezcla y se deja reposar por una hora, luego se extrae el sobrenadante y se agrega una gota de Tween 80 y se procede al conteo de esporas en</p>	<p>Al 2% de la producción, se extraen submuestras de avena, las que se mezclan. Luego se pesa un gramo y se suspende en 10ml de agua estéril, se mezcla y se deja reposar por una hora, luego se extrae el sobrenadante y se agrega una gota de Tween 80 y se procede al conteo de esporas en cámara de Neubauer.</p>	

		cámara de Neubauer. Se debe obtener una concentración no menor a 10^8 esporas/ml.	Se debe obtener una concentración no menor a 10^8 esporas/ml.	
	3.3.3	Determinación de viabilidad de las esporas A partir de la suspensión anterior, se suspende 1ml en 9ml de agua estéril. En el centro de un porta objeto se deposita una gota de medio (PDA). Al solidificarse se añade una gota de la suspensión anterior, se incuba a 25°C por 24-48 horas y se cuenta en microscopio 100 conidias y de éstas el número de germinadas. Se debe tener un 85-100% de germinación	A partir de la suspensión anterior, se suspende 1ml en 9ml de agua estéril y se deposita una gota sobre PDA previamente solidificado sobre un porta objeto. Se incuba a 25°C por 18-24 horas y se cuenta en microscopio 100 conidias y de éstas el número de germinadas. Se debe tener un 85-100% de germinación.	El tiempo de incubación debe ser menor, para poder contar con facilidad las esporas germinadas, debido a que una vez que los tubos germinativos de las esporas crecen, comienzan a entrelazarse y se hace muy difícil su recuento
4	4.0	Desarrollo de tres presentaciones de Trichoderma. Se elaborarán tres formulaciones de Trichoderma; suspensión	Se desarrollaron tres formulaciones comerciales; suspensión líquida de Trichoderma, pasta y polvo	

		líquida, pasta y sustrato sólido deshidratado (polvo)		
	4.1	<p>Preparación en suspensión líquida.</p> <p>Con las bolsas con Trichoderma completamente esporuladas, después de 15 días de incubación y una vez realizado el control de calidad, se prepara una suspensión líquida con concentración de 10^8 esporas/ml. Para ello se mezcla 1kilos del biopreparado en dos litros de agua, se agita por 10minutos, se deja reposar por una hora y se filtra, el producto final, 1 litro de biopreparado, se somete a control de calidad, se envasa y se almacena a 5°C por no más de una semana hasta su aplicación</p>	<p>La suspensión líquida se realizó a partir de bolsas y frascos bien esporulados, después de 15 días de incubación y de haber efectuado el control de calidad. Se toman 170g de el sustrato y se mezclan con 1200 ml de agua, se agita y se deja reposar por una hora, se filtra y el producto final, 1 litros con concentración de 10^{10} esporas/ml, se somete a control de calidad y se envasa, se almacena por no mas de una semana en lugar fresco, hasta su aplicación en el campo.</p>	<p>La cantidad de avena requerida para esta concentración de esporas se redujo a 170 gramos, debido a que la esporulación y concentración de esporas en estos sustratos sólidos es alta, en consecuencia se requiere menos cantidad de sustrato para alcanzar 10^{10} esporas/ml</p>

		en el campo.		
	4.2	<p>Preparación de pasta de Trichoderma.</p> <p>La producción de pasta se realizará en base a una dilución de Trichoderma en agua estéril a una concentración de 10^8 y 10^{10} esporas/ml, la que se mezclará con bentonita (arcilla inerte) como excipiente a razón de 1.3 : 1.0 v/v</p>	<p>La producción de la pasta se realizó con una dilución de <i>Trichoderma</i> en agua destilada estéril a una concentración de 10^8 y 10^{10} esporas/ml la que se mezcló con 48% de bentonita como excipiente, 51% agua destilada, 1% colorante inerte</p>	<p>A la mezcla original de la pasta se agregó un porcentaje de tierra de color para que fuera fácil su detección, al momento de realizar las aplicaciones y evaluaciones en el campo</p>
	4.3	<p>Preparación de sustrato sólido inoculado deshidratado.</p> <p>A partir del sustrato sólido completamente esporulado se realiza la reducción del contenido de agua en cámara de secado o bandejas de secado a 40°C por 9-12 horas, de acuerdo a lo indicado por Awad (1993), posteriormente este es tamizado para retirar las</p>	<p>A partir del sustrato sólido completamente esporulado se realiza la reducción del contenido de agua en cámara de secado o bandejas de secado a 60° C por 24 horas, posteriormente este es tamizado en un Rot-Ap para retirar las partículas más toscas y conservarla con un bajo</p>	<p>Se aumentó la temperatura y tiempo de secado, para lograr un contenido de humedad entre 5- 7 % en el producto final, rango necesario para evitar dos situaciones; un mayor contenido de humedad y en consecuencia</p>

		<p>partículas más toscas y conservarla con un bajo contenido de humedad para su posterior aplicación ya sea como presentación líquida o como pasta. La evaluación del sistema de secado del sustrato sólido, se realizará rehidratando las esporas y conociendo su germinación en placas una vez reactivadas. El sentido de esta actividad es llegar a establecer una reserva del preparado que permita conservar y abastecer a los productores orgánicos con el hongo de manera homogénea a lo largo de todo el año.</p>	<p>contenido de humedad para su posterior aplicación ya sea como presentación líquida o como pasta. La evaluación del sistema de secado del sustrato sólido, se realizará rehidratando las esporas y conociendo su germinación en placas una vez reactivadas. El sentido de esta actividad es llegar a establecer una reserva del preparado que permita conservar y abastecer a los productores orgánicos con el hongo de manera homogénea a lo largo de todo el año.</p>	<p>germinación de las esporas, por otro lado, una falta de humedad que cause la deshidratación y muerte de las esporas</p>
	4.4	<p>Control de calidad de las presentaciones Se realiza el control de calidad de</p>	<p>Se efectúa el control de calidad para las tres formulaciones de Trichoderma</p>	

		los diferentes biopreparado, para lograr una adecuada estandarización del producto antes de su aplicación a nivel de campo.		
	4.4.1	<p>Determinación de la pureza</p> <p>Se examina el 2% de la producción, tomando muestras de la solución de <i>Trichoderma</i>, del preparado en pasta y del deshidratado, sembrándolos directamente en medio papa dextrosa agar (PDA), se incuba a 25°C por 5 días observando la presencia de contaminantes. Se debe obtener 100% de pureza</p>	Se realiza la determinación de pureza para cada una de las formulaciones de <i>Trichoderma</i>	
	4.4.2	<p>Determinación de concentración de esporas del biopreparado.</p> <p>Del 2% de la producción, se</p>	Se realizan diluciones seriadas del 2% de la producción, se siembran en PDA y se incuban	El tiempo de incubación de las placas para el recuento de unidades

		<p>realizarán diluciones seriadas, las que se siembran en placas Petri con PDA y se incubarán a 25°C por una semana, para el recuento de unidades formadoras de colonia por gramo, en caso de la preparación en pasta y deshidratado y se hará recuento de esporas por ml en cámara de Neubauer para el medio líquido.</p> <p>Se debe obtener una concentración no menor a 10^8 esporas/ml y 10^8 ufc/g en caso de la pasta y deshidratado</p>	<p>a 25°C por 48 a 72 horas, para el recuento de unidades formadoras de colonia, esta metodología se empleó para pasta y polvo, además se realizó recuento de esporas por ml en cámara de Neubauer para el medio líquido (suspensión)</p>	<p>formadoras de colonia se redujo a un máximo de 72 horas, porque con periodos mayores se corre el riesgo que las colonias en su crecimiento alcancen a tocarse lo que hace imposible diferenciarlas y contarlas como unidades</p>
	4.4.3	<p>Determinación de viabilidad de las esporas</p> <p>A partir de la muestra líquida anterior, se suspende 1 ml en 9ml de agua estéril. Se deposita una</p>	<p>A partir de la muestra líquida anterior, se suspende 1 ml en 9ml de agua estéril. Se deposita una gota de medio de cultivo (PDA) en el centro de un porta</p>	<p>Se redujo el tiempo de incubación por la rapidez en que crecen los tubos germinativos de las esporas, las que</p>

		<p>gota de medio de cultivo (PDA) en el centro de un porta objeto. Al solidificarse se añade una gota de la suspensión anterior, se incuba a 25°C por 24-48 horas y se cuenta al microscopio 100 conidias y de éstos, los germinados. Se debe obtener un 85-100 % de germinación.</p>	<p>objeto. Al solidificarse se añade una gota de la suspensión anterior, se incuba a 25°C por 18-24 horas y se cuenta al microscopio 100 conidias y de éstos, los germinados.</p> <p>Se debe obtener un 85-100 % de germinación.</p>	<p>comienzan a formar una red que dificulta su recuento</p>
	4.4.4	<p>Determinación de la viabilidad de las presentaciones del biopreparado en el tiempo</p> <p>Una vez realizado el control de calidad de cada una de las presentaciones, se almacenan por 5, 10, 20, 30, 40 y 45 días a temperatura ambiente y a 5°C. Para cada temperatura e intervalo de tiempo se realizará</p>	<p>Una vez realizado el control de calidad de cada una de las presentaciones, se almacenan por 4-5 meses a temperatura ambiente, en un lugar fresco, evitando la radiación directa. Mensualmente se toman muestras de cada formulado y se procede a su control de calidad.</p>	<p>Se prolongó el periodo de evaluación y las condiciones de almacenaje fueron aquellas con las que habitualmente se manejan los productos de uso agrícola con el fin de tener una visión general del comportamiento de las</p>

		nuevamente el control de la pureza y viabilidad de las esporas. De esta forma obtendremos el tiempo máximo de almacenamiento de los diferentes preparados sin afectar la viabilidad de las esporas		esporas en relación a su viabilidad en los diferentes medios de formulación, a través del tiempo. Las condiciones de almacenaje fueron aquellas con las que habitualmente se manejan los productos de uso agrícola.
	4.4.5	Asesoría Técnico científica de experto Cubano en conservación y estabilización de las diferentes presentaciones de Trichoderma.	Se contó con la asesoría de una profesional Cubana. En la conservación y estabilización de las presentaciones de Trichoderma	
5	5.0	Aplicación y evaluación de las presentaciones a nivel de campo. Para evaluar el efecto de las cepas de <i>Trichoderma</i> aisladas y seleccionadas se realizan ensayos	Se aplicó y evaluó las diferentes formulaciones de trichoderma, en manzano y vid, usando aquellas cepas con mejores resultados en las pruebas de temperatura y antagonismo. El	Se inició el ensayo en el campo, con la aplicación en suspensión y pasta , sólo de una cepa de Trichoderma, aislada previamente por CET

		<p>para cada una de las presentaciones del biopreparado y en cada una de las especies frutales de interés para el proyecto. El primer año se aplicarán en forma masiva las cepas que ya se han probado en los dos años anteriores por el CET. En este caso se conseguirá una calidad estándar y un volumen adecuado de producción.</p>	<p>primer año se partió con aplicaciones de sólo una cepa, previamente aislada por el CET, para en las temporadas siguiente ir incorporando nuevos aislados provenientes de los predios en estudio</p>	<p>(Tcet-1) (<i>T.longibrachiatum</i>), no se usó la cepa Th (Tcet-2) (<i>T. viride</i>), porque no dio buenos resultados en las pruebas de temperatura y antagonismo</p>
	<p>5.1</p>	<p>Aplicación de Trichoderma en manzano para control de <i>V. inaequalis</i></p> <p>En el caso de la evaluación en huertos de manzano se utilizan parcelas de experimentación de 20 árboles cada una. Se realizarán aplicaciones foliar cada 10 y 15 días de una suspensión de 10^8</p>	<p>Las aplicaciones de Trichoderma se realizaron en variedad Pink. lady en parcelas de 80 árboles, distribuidos en tres hileras, durante los dos primeros años, luego estas se redujeron a 44 árboles en promedio, distribuidos en tres hileras, por parcela, además a</p>	<p>Los ensayos se realizaron en dos variedades de manzanas Pink Lady, planteada originalmente para el trabajo, y Golden Reinders, incorporada en el 2003, esta modificación se debió principalmente a que en el segundo periodo</p>

		<p>conidias/ml (1500 – 1800 L/ha) Se utiliza un diseño de bloques al azar con tres repeticiones por tratamiento</p> <p>Este tratamiento se realiza con dos aplicaciones otoñales, y cuatro aplicaciones primaverales, para cada frecuencia (10 y 15 días), cada una de éstas se alternarán con aplicaciones de azufre. Los resultados se contrastarán con un control que tendrá sólo aplicación de azufre</p>	<p>partir del 2003 se incorporó al ensayo otra variedad de manzano Golden Reinders, menos sensible a Venturia, las parcelas fueron en promedio de 45 árboles en tres hileras. Se realizaron aplicaciones foliar cada 10 y 15 días en suspensión de 10^8 conidias/ml (1500 – 1800 L/ha) con dos aplicaciones otoñales, y cuatro aplicaciones primaverales, para cada frecuencia, alternando con aplicaciones de azufre. Se utilizo un diseño de bloques al azar con tres repeticiones por tratamiento</p> <p>Los resultados se contrastaron sólo en el primer año con un control tratado sólo con aplicación de azufre. En los</p>	<p>del ensayo, 2002, no se pudo mantener el formato del ensayo propuesto, porque Venturia sobrepaso el control ejercido por Trichoderma, en consecuencia fue necesario intervenir con otros productos como, polisulfuro, planteándose el manejo en adelante, de manera integrada, con las mismas aplicaciones y épocas, pero reduciendo las parcelas en Pink Lady y ampliando a G. Reinders, donde pudimos ensayar dos cepas más de Trichoderma, pero siempre bajo un manejo integrado.</p>
--	--	---	--	---

			años siguientes y en ambas variedades de manzano el testigo consistió en el resto del huerto, el cual fue manejado de forma integrada con otros productos autorizados por la normativa orgánica	
	5.1.1	<p>Evaluación del efecto del Trichoderma aplicado en manzano sobre <i>V. Inaequalis</i>.</p> <p>Para determinar el nivel de daño por el patógeno, se examinarán las hojas de los dardos frutales y las hojas terminales de 10 ramillas en 5 árboles de cada parcela, hasta un poco antes de la cosecha, conjuntamente se evaluarán 25 frutas de cada árbol, seleccionadas al azar, antes de</p>	<p>El efecto de la acción de Trichoderma en suspensión, se evaluó en 6 árboles por hilera, al momento de la cosecha, pesando y contando el número total de frutos por árbol y de ellos el porcentaje con presencia de Venturia Las evaluaciones se realizaron para cada uno de los tratamientos y se compararon con el testigo. Se utilizó un diseño de bloques al azar con tres repeticiones.</p>	<p>En la evaluación del efecto de Trichoderma en el control de Venturia se realizaron las mediciones de peso, número de frutos por árbol y porcentaje de fruta con Venturia, no se evaluó el daño en ramillas y hojas, debidos a que a partir del segundo año del ensayo comenzaron las aplicaciones de polisulfuro como estrategia integrada</p>

		<p>cosecha, en ambos casos se determinará el porcentaje de daño o lesiones de hojas y frutos para cada frecuencia de aplicación, resultados que se compararán con el control.</p> <p>Se utilizará un diseño de bloques al azar con tres repeticiones. Los datos se procesarán a través de análisis de varianza y las medias se separarán mediante prueba de Duncan (5%).</p>	<p>Los datos se procesaron a través de análisis de varianza y las medias se separaron mediante prueba de Duncan (5%).</p>	<p>de control, este producto provoca manchas en hojas lo que hace muy difícil el diferenciar directamente en el campo, el daño provocado por <i>Venturia</i> o la marca dejada por el producto.</p>
	5.2	<p>Aplicación de <i>Trichoderma</i> en manzano para control de <i>P.cactorum</i></p> <p>La evaluación se realizará en 16 árboles enfermos y sanos del huerto, la mitad se someterá a</p>	<p>Los ensayos en huertos de manzano variedad Green Fuji se realizaron en parcelas de tres hileras, cada parcela recibió un determinado tratamiento, evaluando al final de</p>	<p>Se amplió el número de árboles a evaluar y se definió el nivel de daño por <i>P. cactorum</i>; alto, medio y bajo o sin daño, con el objetivo de tener una</p>

		<p>aplicaciones del biopreparado en suspensión y la otra mitad en pasta. Para la suspensión se harán aplicaciones al ruedo del árbol cada 10 y 15 días a concentración de 10^8 esporas/ml (1200 – 1500 L/ha), con dos aplicaciones otoñales y cuatro primaverales.</p> <p>Para la pasta esta se usará a concentración de 10^8 y 10^{10} esporas/g, en la base del tronco, en igual periodo que en el caso de la suspensión</p> <p>Se usará un diseño de bloques al azar con tres repeticiones, utilizando análisis de varianza.</p>	<p>temporada, para cada tratamiento seis árboles por hilera, previamente identificados de acuerdo al nivel de daño que exhibían</p> <p>En el primer caso, en suspensión, se realizaron aplicaciones a nivel de suelo, de <i>T. longibrachiatum</i>, alrededor de los árboles, cada 10 y 15 días de una suspensión de 10^8 conidias/ml (1200 – 1500 L/ha) durante los dos primeros años del ensayo, para aumentar la dosis a 10^{10} en el año siguiente, aumentando consecutivamente los tratamientos con la adición de nuevas cepas de Trichoderma. Los diferentes ensayos se realizaron en parcelas de tres hileras, cada</p>	<p>muestra más representativa del efecto de las diferentes formulaciones del antagonista sobre el patógeno.</p>
--	--	--	---	---

			<p>una con 77 árboles, seleccionando en cada hilera tres árboles con daño alto, tres con medio y tres con bajo daño, los que fueron evaluados al momento de la cosecha.</p> <p>Los tratamiento se realizaron con dos aplicaciones otoñales, y cuatro aplicaciones primaverales, para cada frecuencia (10 y 15 días). Se utilizo un diseño de bloques al azar con tres repeticiones por tratamiento</p> <p>En el caso de la pasta, ésta se pondrá a manera de pintura fungicida, en dos concentraciones 10^8 y 10^{10}, durante los dos</p>	
--	--	--	--	--

			<p>primeros años del ensayo, quedando los dos últimos con la mayor concentración. La pasta sólo se aplicó sobre las lesiones del cuello del tronco de los árboles, en igual período que en el ensayo anterior (otoño y primavera). Se utilizarán tres repeticiones en cada tratamiento, evaluando los resultados con análisis de varianza</p>	
	5.2.1	<p>Evaluación del efecto de Trichoderma en suspensión aplicado en manzano sobre <i>P.cactorum</i>.</p> <p>En cada uno de los tratamientos se evaluará el total de los árboles, a través de observaciones visuales de los síntomas aéreos, vigor,</p>	<p>La evaluación del efecto de Trichoderma se realizó mediante los datos recopilados de un número definido de árboles por tratamiento, los que fueron clasificados en relación a su intensidad de daño (alto, medio, bajo), de acuerdo</p>	<p>La evaluación se realizó en base a parámetros cuantificables, como peso, número, diámetro de la fruta. No se evaluó de acuerdo a lo programado debido a que el tipo de manejo que se efectúa en</p>

		senescencia, defoliación, brotación y fructificación.	<p>observaciones visuales de los síntomas aéreos; vigor, senescencia, defoliación y brotación</p> <p>A cada árbol se le evaluó el número de frutos, peso promedio de frutos y diámetro.</p> <p>Se uso un diseño de bloques al azar con tres repeticiones por tratamiento y los datos se procesarán por análisis de varianza y las medias se separarán por test de Duncan (5%).</p>	el huerto, como poda y raleo, hacían poco confiable las evaluaciones visuales de los síntomas.
	5.2.2	<p>Evaluación del efecto de Trichoderma en pasta aplicado en manzano sobre <i>P. cactorum</i> .</p> <p>Al igual que en el caso anterior, se</p>	<p>Al igual que en el caso anterior, la evaluación del efecto de Trichoderma se realizó mediante los datos recopilados</p>	Se realizaron evaluaciones de parámetros cuantificables, por las razones indicadas

		<p>evaluará el total de los árboles, a través de observaciones visuales de los síntomas aéreos, vigor, senescencia, defoliación, brotación y fructificación</p>	<p>de un número definido de árboles por tratamiento, los que fueron clasificados en relación a su intensidad de daño (alto, medio, bajo)</p> <p>A cada árbol se le evaluó el número de frutos, peso promedio de frutos y diámetro.</p> <p>Se uso un diseño de bloques al azar con tres repeticiones por tratamiento y los datos se procesarán por análisis de varianza y las medias se separarán por test de Duncan (5%).</p>	<p>en el punto anterior</p>
	5.3	<p>Aplicación de Trichoderma en suspensión para control de <i>B.cinerea</i> en uva de mesa.</p>	<p>En este caso se evaluó la acción de los diferentes aislados de <i>Trichoderma spp.</i> en el</p>	<p>Dada la importancia de la incorporación cada vez mayor de la producción</p>

		<p>Se evaluará la acción de los diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> en el control de <i>B. cinerea</i>. En parcelas de experimentación constituidas por 40 plantas cada una, se aplicará una suspensión de esporas de 10^8 esporas/ml (800-1200L/ha). Las aplicaciones se realizarán en periodos de floración, compactación de racimo, pinta y tres semanas antes de cosecha. Se usará un diseño de bloques al azar con tres repeticiones. Los datos se evaluarán a través de análisis de varianza y las medias se separarán por prueba de Duncan (5%)</p>	<p>control de <i>B. cinerea</i>. en viña variedad Chardonay (variedad incorporada al sistema de ensayos) y en uva de mesa variedad Red Globe. En el caso de viña se trabajó con parcelas de experimentación constituidas por 4 hileras y 62 plantas cada una, cada parcela fue tratada con una suspensión de esporas con 10^{10} conidias/ ml de <i>Trichoderma</i> (800-1200L/ha), considerando un testigo, sin tratamiento con <i>Trichoderma</i> En Parrón, variedad Red Globe, las parcelas de experimentación comprendían 4 hileras con 38 plantas, cada parcela fue tratada con una suspensión de esporas con 10^{10} conidias/ ml</p>	<p>vitivinícola en la producción orgánica se planteo, ampliar el ensayo a uva vinífera Var. Chardonay. Conjuntamente se aumentó el la concentración de conidias en las suspensiones, principalmente por la presión que ejerce este patógeno en las zonas del ensayo, por las condiciones ambientales favorables para su desarrollo.</p>
--	--	---	---	---

de *Trichoderma* (800-1200L/ha).

Los aislados de *Trichoderma* empleados en ambas variedades, fueron aumentando en cada temporada, hasta llegar en el último periodo con la utilización de una formulación en polvo de *Trichoderma*.

Las aplicaciones básicas se realizaron en período de floración, grano de 4-5 mm, compactación del racimo, pinta y tres semanas antes de la cosecha.

Se utilizará un diseño de bloque al azar con tres repeticiones por tratamiento. Los datos se procesarán a través de análisis de varianza y las medias se

			separarán mediante prueba de Duncan (5%).	
	5.3.1	<p>Evaluación del efecto de Trichoderma en suspensión aplicado a uva para el control de <i>B. cinerea</i>.</p> <p>De cada parcela se tomarán 10 racimos, evaluando presencia o ausencia de daño, visualmente, conjuntamente se tomarán al azar 30 bayas sanos, los que se lavarán con hipoclorito de sodio al 2% por 2 min. Se lavarán con agua estéril, se secarán y se dispondrán en cámara húmeda. Estas se cubrirán y mantendrán a temperatura ambiente por una semana, las bayas se evaluarán en base a presencia o ausencia de Botrytis</p>	<p>Para cada ensayo, viña y parrón, en cada parcela se toman al azar 100 racimos, evaluando la presencia o ausencia de daño de forma visual, conjuntamente se tomaron al azar 100 bayas aparentemente sanas, los que se esterilizan superficialmente con hipoclorito de sodio al 2% por 2 min. Posteriormente se lavan con agua estéril, se seca el exceso de agua con toalla de papel esterilizada y se coloca en placas Petri estériles, contenidas en recipientes plásticos, con papel filtro en el fondo. Los recipientes se cubren</p>	<p>Se ampliaron los muestreos para tener datos más representativos y acordes con el tamaño de las parcelas en experimentación.</p>

			<p>y se mantienen a temperatura ambiente, los frutos se examinan y evalúan a los 3 –5 días, contabilizando los frutos que manifiesten estar afectados por <i>B. cinerea</i>. Los datos son analizados por análisis de varianza y las medias separadas por test de Duncan (%5)</p>	
	<p>5.4.0</p>	<p>Aplicación de suspensión de Trichoderma en el conjunto de los huertos.</p> <p>En este caso, en el primer año se aplican en forma masiva las cepas de Trichoderma aisladas por el Centro de Educación y Tecnología, que han sido probadas a nivel experimental en la temporada previa a los ensayos.</p>	<p>Se aplicó en el primer año, en forma masiva las cepas de Trichoderma aisladas por el Centro de Educación y Tecnología, <i>T longibrachiatum</i>. Estas aplicaciones se realizaron y evaluaron en una superficie total de 10 ha. En los años siguientes se aplicaron aquellos aislados que dieron los</p>	<p>Las aplicaciones en el resto de los huertos, fueron de tres cepas T3, T7 y Tcet, correspondientes a dos especies de Trichoderma, <i>T. harzianum</i> (T3 y T7) y <i>T. longibrachiatum</i> (Tcet).</p>

		<p>Estas aplicaciones se realizan y evalúan en una superficie total de 10 ha. En los años siguientes se aplican aquellos aislados que dieron los mejores resultados en las parcelas de experimentación. El diseño para las evaluaciones, se mantiene igual que en el caso de los ensayos correspondientes para cada patógeno, con bloques al azar y análisis estadístico.</p>	<p>mejores resultados en las parcelas de experimentación <i>T. longibrachiatum</i> y <i>T. harzianum</i>. Las evaluaciones se realizaron en las mismas parcelas de experimentación donde se aplicaron estas cepas</p>	
	<p>5.4.1</p>	<p>Evaluación del efecto de Trichoderma en suspensión aplicado para el control de <i>B. cinerea</i>, <i>P. cactorum</i>, y <i>V. inaequalis</i>.</p>	<p>Las evaluaciones de las mejores cepas aplicadas en el resto de los huertos, T3 y T7 (<i>T. harzianum</i>), Tcet (<i>T. longibrachiatum</i>), se realizaron en las mismas parcelas de experimentación donde se aplicaron estas cepas, para lo cual fue ampliado el tamaño de</p>	<p>Las evaluaciones fueron realizadas en las mismas parcelas de experimentación donde se aplicaron estas mejores cepas.</p>

			las parcelas de los ensayo y los muestreos, lo que nos permitió tener datos más representativos del sistema de manejo.	
	6.0	Realización de dos seminarios de difusión de las experiencias obtenidas en producción masiva de <i>Trichoderma</i> sp. y control de <i>B. cinerea</i> en vid y <i>P. cactorum</i> y <i>V. inaequalis</i> mediante el uso de cepas locales y aisladas de predios con manejo orgánico. Estos seminarios, el primero programado para el 2002 será sobre usos y aplicación de <i>Trichoderma</i> y el segundo a realizar el año 2004, sobre producción masiva de <i>Trichoderma</i> , estarán dirigidos a	Realización de dos seminarios de difusión de las experiencias obtenidas en producción masiva de <i>Trichoderma</i> sp. y control de <i>B. cinerea</i> en vid y <i>P. cactorum</i> y <i>V. inaequalis</i> mediante el uso de cepas locales y aisladas de predios con manejo orgánico. Estos seminarios, se realizaron en octubre y diciembre del 2004, sobre producción, usos, aplicación y evaluación de su control sobre los diferentes patógenos en estudio.	Los seminarios se realizaron al término del período del proyecto, con los resultados finales en producción, aplicación y nivel de control de los patógenos en estudio.

		técnicos y profesionales, relacionados con la producción frutícola de la zona central y de las empresas participantes en el proyecto.		
--	--	---	--	--

- 5) **Resultados del proyecto:** descripción detallada de los principales resultados del proyecto, incluyendo su análisis y discusión; utilizando gráficos, tablas, esquemas y figuras y material gráfico que permitan poder visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones relevantes del desarrollo del proyecto.

a) CEPAS DE TRICHODERMA AISLADAS DURANTE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO.

Diferentes cepas de Trichoderma y sus nombres a nivel específicos	
Cepa	Nombre científico
T-3	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai aggr.
T-7	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai aggr.
T cet	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai
T cbl	<i>Trichoderma viride</i> Pers.aggr.
TH	<i>Trichoderma viride</i> Pers.aggr.
T-13	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai aggr.
T-4	<i>Trichoderma viride</i> Pers.aggr.
T-10	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai
T compost	<i>Trichoderma</i> sp.
T roble roble	<i>Trichoderma viride</i> Pers.aggr.
T roble boldo	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai aggr.
T roble nuevo	<i>Trichoderma viride</i> Pers.aggr.
T Cbl hojarasca (quebrada)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai
T Cbl estero	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai
T espino colina	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai aggr.
T roble verde	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai
T Cbl madera	<i>Trichoderma viride</i> Pers.aggr.
T Cbl 1' (Cbl ladera)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai

T roble viejo	<i>Trichoderma atroviride</i> P.Karsten
T placilla mantillo	<i>Trichoderma viride</i> Pers.aggr.
T placilla madera	<i>Trichoderma viride</i> Pers.aggr.
T SF hoja	<i>Trichoderma aureoviride</i> Rifai
T mira ríos madera	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai
T álamo	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai aggr.
T SF madera	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai aggr.
T placilla hoja roble	<i>Trichoderma inhamatum</i> Veerkamp & W.Gams
T Cbl compost	<i>Trichoderma anomorfo</i> de <i>Hypocrea orientalis</i> Samuels & O.Petrini
T maitén	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai aggr.
T hoja Cbl	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai aggr.
T mora	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai aggr.
T acacia	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai aggr.
T Cbl quebrada	<i>Trichoderma parceramosus</i> Bisset
T Cbl quillay	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai aggr.
T Cbl boldo	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai aggr.
T Cbl canelo	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai aggr.
T Cbl canelillo	<i>Trichoderma viride</i> Pers.aggr.
T Casa blanca	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai
T Los robles	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai aggr.
T Hualle	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai aggr.
T HC boldo	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai aggr.
T madera nativa	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai aggr.
T lampa	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai aggr.

Listado de especies aisladas de *Trichoderma*

<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai aggr.
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai
<i>Trichoderma viride</i> Pers.aggr.
<i>Trichoderma parceramosus</i> Bisset
<i>Trichoderma anomorfo</i> de <i>Hypocrea orientalis</i> Samuels & O.Petrini
<i>Trichoderma inhamatum</i> Veerkamp & W.Gams
<i>Trichoderma aureoviride</i> Rifai
<i>Trichoderma atroviride</i> P.Karsten

En el cuadro anterior se identifican cuales son las especies aisladas por el proyecto, estas identificaciones se realizaron en la Cátedra de micología de la Facultad de Medicina de la U. de Valparaíso por el Dr. Eduardo Piontelli.

c) Evaluación de las mejores cepas de *Trichoderma* spp. en su efecto antagonista frente a los patógenos en estudio.

Evaluación del grado de antagonismo de los diferentes aislados de *Trichoderma* frente al patógeno *Botrytis cinerea*

Grado de antagonismo de los diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> frente al patógeno <i>Botrytis cinerea</i> de acuerdo a la escala de Bell (1982)		
Antagonista	Escala de antagonismo	Características
(<i>T. harzianum</i>) T3	1	Trichoderma cubre completamente al patógeno y toda la superficie del medio
(<i>T. harzianum</i>) T7	1	Trichoderma cubre completamente al patógeno y toda la superficie del medio
(<i>T. longibrachiatum</i>) Tcet	2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. No se observan crecimiento de micelio sobre el patógeno. Hay formación de un marcado halo de inhibición entre ambos.
(<i>T. harzianum</i>) T Roble hoja boldo	2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio No se observan límites definidos entre el patógeno y el antagonista por un crecimiento parcial del micelio del antagonista sobre <i>Botrytis</i>
(<i>T. longibrachiatum</i>) T Cbl hojarazca	2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio No se observan límites definidos entre el patógeno y el antagonista

		por un crecimiento parcial del micelio del antagonista sobre Botrytis
(<i>T. viride</i>) T Roble Roble	2	Trichoderma crece cubriendo al menos dos tercios del medio. Se observan límites definidos entre el patógeno y el antagonista
(<i>T. viride</i>) T Roble nuevo	2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. No se observan límites definidos entre el patógeno y el antagonista por crecimiento parcial del micelio del antagonista sobre Botrytis
(<i>T. harzianum</i>) T Álamo	2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. Se observa crecimiento parcial y agregado de micelio sobre los bordes del patógeno. Hay formación de un delgado halo de inhibición entre ambos.
(<i>T. aureoviride</i>) T San Felipe hoja	2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. No se observan límites definidos entre el patógeno y el antagonista por crecimiento parcial del micelio del antagonista sobre botrytis
(<i>T. longibrachiatum</i>) T Mira Ríos Madera	2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. No se observan límites definidos entre el patógeno y el antagonista por crecimiento parcial del micelio del antagonista sobre Botrytis

<i>(T. viride)</i> T Placilla Mantillo	2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. No se observa crecimiento de micelio sobre el patógeno. Hay formación de un marcado halo de inhibición entre ambos
<i>(T. inhamatum)</i> T Placilla H Roble	2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. No se observa crecimiento de micelio sobre Botrytis. Hay formación de un marcado halo de inhibición entre ambos.
<i>(T. harzianum)</i> TH Boldo	2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. No se observan límites definidos entre el patógeno y el antagonista por un crecimiento en forma agregada del antagonista sobre los bordes del patógeno.
<i>(T. harzianum)</i> T Madera nativa casablanca	2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. Se observan límites definidos entre el patógeno y el antagonista.
<i>(T. harzianum)</i> T Canelo	2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. No se observan límites definidos entre el patógeno y el antagonista por un crecimiento en forma agregada del antagonista sobre los bordes del patógeno.
<i>(T. longibrachiatum)</i> T Casablanca	2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. Se observan límites definidos

		entre el patógeno y el antagonista por la formación de un fino halo de inhibición entre ambos
--	--	---

Grado de antagonismo de los diferentes aislados de Trichoderma frente al patógeno <i>Phytophthora cactorum</i> de acuerdo a la escala de Bell (1982)		
Antagonista	Escala de antagonismo	Características
<i>(T. harzianum)</i> T3	1	Trichoderma cubre completamente al patógeno y toda la superficie del medio
<i>(T. harzianum)</i> T7	1	Trichoderma cubre completamente al patógeno y toda la superficie del medio
<i>(T. longibrachiatum)</i> Tcet	2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. No se observa crecimiento de micelio sobre el patógeno. Hay formación de un marcado halo de inhibición entre ambos
<i>(T. harzianum)</i> T Roble hoja boldo	1 y 2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. No se observan límites definidos entre ambos, con crecimiento en forma agregada sobre el patógeno, el que aumenta en el tiempo hasta cubrir gran parte de <i>Phytophthora</i>
<i>(T. longibrachiatum)</i> T Cbl hojarazca	2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. No se observan límites definidos entre el patógeno y el antagonismo por un crecimiento parcial del micelio del antagonista

		sobre Phytophthora
(<i>T. viride</i>) T Roble Roble	2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. Se observan límites definidos entre el patógeno y el antagonista
(<i>T. viride</i>) T Roble nuevo	2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. Se observan límites definidos entre el patógeno y el antagonista
(<i>T. harzianum</i>) T Alamo	1	Trichoderma cubre completamente al patógeno y toda la superficie del medio
(<i>T. aureoviride</i>) T San Felipe hoja	1	Trichoderma cubre completamente al patógeno y toda la superficie del medio
(<i>T. longibrachiatum</i>) T Mira Ríos Madera	1 y 2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. Se observa en un comienzo, un fino halo de inhibición entre antagonista y patógeno, el que luego desaparece por el crecimiento y cubrimiento total de Trichoderma sobre el patógeno
(<i>T. viride</i>) T Placilla Mantillo	2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. Se observan límites definidos entre el patógeno y el antagonista
(<i>T. inhamatum</i>) T Placilla H Roble	1	Trichoderma cubre completamente al patógeno y toda la superficie del medio
(<i>T. harzianum</i>) TH Boldo	1	Trichoderma cubre completamente al patógeno y toda la superficie del medio

<i>(T. harzianum)</i> T Madera nativa casablanca	2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. Se observan límites definidos entre el patógeno y el antagonista
<i>(T. harzianum)</i> T Canelo	1	Trichoderma cubre completamente al patógeno y toda la superficie del medio
<i>(T. longibrachiatum)</i> T Casablanca	2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. Se observan límites definidos, por un fino halo de inhibición entre ambos.

Grado de antagonismo de los diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> frente al patógeno <i>Venturia inaequalis</i> de acuerdo a la escala de Bell (1982)		
Antagonista	Escala de antagonismo	Características
(<i>T. harzianum</i>) T3	1	Trichoderma cubre completamente al patógeno y toda la superficie del medio
(<i>T. harzianum</i>) T7	1	Trichoderma cubre completamente al patógeno y toda la superficie del medio
(<i>T. longibrachiatum</i>) Tcet	1	Trichoderma cubre completamente al patógeno y toda la superficie del medio
(<i>T. harzianum</i>) T Roble hoja boldo	1	Trichoderma cubre completamente al patógeno y toda la superficie del medio
(<i>T. longibrachiatum</i>) T Cbl hojarazca	1 y 2	Trichoderma cubre parcialmente al patógeno, con crecimiento en forma agregada sobre el patógeno
(<i>T. viride</i>) T Roble Roble	1 y 2	Trichoderma cubre parcialmente al patógeno, con crecimiento en forma agregada sobre el patógeno
(<i>T. viride</i>) T Roble nuevo	1 y 2	Trichoderma cubre parcialmente al patógeno, con crecimiento en forma agregada sobre el patógeno
(<i>T. harzianum</i>) T Alamo	1	Trichoderma cubre completamente al patógeno y toda la superficie del medio
(<i>T. aureoviride</i>) T San Felipe hoja	1 y 2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio, formando un fino halo de inhibición entre ambos,

		que luego desaparece por el cubrimiento casi total de <i>Venturia</i>
<i>(T. longibrachiatum)</i> T Mira Os Madera	1	Trichoderma cubre completamente al patógeno y toda la superficie del medio
<i>(T. viride)</i> T Placilla Mantillo	1	Trichoderma cubre completamente al patógeno y toda la superficie del medio
<i>(T. inhamatum)</i> T Placilla H Roble	1 y 2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio, formando un fino halo de inhibición entre ambos, que luego desaparece por el cubrimiento casi total de <i>Venturia</i>
<i>(T. harzianum)</i> TH Boldo	1	Trichoderma cubre completamente al patógeno y toda la superficie del medio
<i>(T. harzianum)</i> T Madera nativa casablanca	1	Trichoderma cubre completamente al patógeno y toda la superficie del medio
<i>(T. harzianum)</i> T Canelo	1	Trichoderma cubre completamente al patógeno y toda la superficie del medio
<i>(T. longibrachiatum)</i> T Casablanca	1	Trichoderma cubre completamente al patógeno y toda la superficie del medio

Índice de antagonismo de *Trichoderma spp* respecto de *Botrytis cinerea*

Efecto antagónico de diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Botrytis cinerea</i> , medido como radio promedio de crecimiento del patógeno en presencia y ausencia del antagonista	
Antagonista	Índice de antagonismo
(<i>T. harzianum</i>) T3	0.35
(<i>T. harzianum</i>) T7	0.36
(<i>T. longibrachiatum</i>) Tcet	0.32
(<i>T. harzianum</i>) T Roble hoja boldo	0.37
(<i>T. longibrachiatum</i>) T Cbl hojarazca	0.62
(<i>T. viride</i>) T Roble Roble	0.49
(<i>T. viride</i>) T Roble nuevo	0.53
(<i>T. harzianum</i>) T Alamo	0.48
(<i>T. aureoviride</i>) T San Felipe hoja	0.40
(<i>T. longibrachiatum</i>) T Mira Ríos	0.46
Madera	
(<i>T. viride</i>) T Placilla Mantillo	0.55
(<i>T. inhamatum</i>) T Placilla H Roble	0.45
(<i>T. harzianum</i>) TH Boldo	0.30
(<i>T. harzianum</i>) T Madera nativa	0.39
casablanca	
(<i>T. harzianum</i>) T Canelo	0.32
(<i>T. longibrachiatum</i>) T Casablanca	0.39

Índice de antagonismo de *Trichoderma spp* respecto de *Phytophthora cactorum*

Efecto antagónico de diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Phytophthora cactorum</i> , medido como radio promedio de crecimiento del patógeno en presencia y ausencia del antagonista	
Antagonista	Índice de antagonismo
(<i>T. harzianum</i>) T3	0.45
(<i>T. harzianum</i>) T7	0.47
(<i>T. longibrachiatum</i>) Tcet	0.48
(<i>T. harzianum</i>) T Roble hoja boldo	0.58
(<i>T. longibrachiatum</i>) T Cbl hojarazca	0.78
(<i>T. viride</i>) T Roble Roble	0.80
(<i>T. viride</i>) T Roble nuevo	0.71
(<i>T. harzianum</i>) T Alamo	0.52
(<i>T. aureoviride</i>) T San Felipe hoja	0.75
(<i>T. longibrachiatum</i>) T Mira Ríos	0.55
Madera	
(<i>T. viride</i>) T Placilla Mantillo	0.44
(<i>T. inhamatum</i>) T Placilla H Roble	0.66
(<i>T. harzianum</i>) TH Boldo	0.44
(<i>T. harzianum</i>) T Madera nativa casablanca	0.57
(<i>T. harzianum</i>) T Canelo	0.46
(<i>T. longibrachiatum</i>) T Casablanca	0.62

Índice de antagonismo de *Trichoderma spp* respecto de *Venturia inaequalis*

Efecto antagónico de diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Venturia inaequalis</i> , medido como radio promedio de crecimiento del patógeno en presencia y ausencia del antagonista	
Antagonista	Índice de antagonismo
(<i>T. harzianum</i>) T3	0.43
(<i>T. harzianum</i>) T7	0.43
(<i>T. longibrachiatum</i>) Tcet	0.42
(<i>T. harzianum</i>) T Roble hoja boldo	0.44
(<i>T. longibrachiatum</i>) T Cbl hojarazca	0.57
(<i>T. viride</i>) T Roble Roble	0.45
(<i>T. viride</i>) T Roble nuevo	0.54
(<i>T. harzianum</i>) T Alamo	0.50
(<i>T. aureoviride</i>) T San Felipe hoja	0.47
(<i>T. longibrachiatum</i>) T Mira Rios Madera	0.47
(<i>T. viride</i>) T Placilla Mantillo	0.42
(<i>T. inhamatum</i>) T Placilla H Roble	0.55
(<i>T. harzianum</i>) TH Boldo	0.32
(<i>T. harzianum</i>) T Madera nativa casablanca	0.36
(<i>T. harzianum</i>) T Canelo	0.33
(<i>T. longibrachiatum</i>) T Casablanca	0.37

**Índice de antagonismo de las cepas con mejor crecimiento
en los tres niveles de temperatura que se consideraron en el proyecto.**

Índices de antagonismo de diferentes cepas de Trichoderma frente a los patógenos en estudio, de acuerdo a la escala de Bell (1982)			
Cepa de Trichoderma	Patógenos		
	<i>B. cinerea</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>V. inaequalis</i>
<i>(T. harzianum)</i> T3	1	1	1
<i>(T. harzianum)</i> T7	1	1	1
<i>(T. longibrachiatum)</i> Tcet	2	2	1
<i>(T. harzianum)</i> T Roble hoja boldo	2	1 y 2	1
<i>(T. harzianum)</i> T Alamo	2	1	1
<i>(T. aureoviridae)</i> T San Felipe hoja	2	1	1 y 2
<i>(T. longibrachiatum)</i> T Mira Ríos Madera	2	1 y 2	1
<i>(T. longibrachiatum)</i> T Cbl hojarasca	2	2	1 y 2
<i>(T. viride)</i> T Roble Roble	2	2	1 y 2
<i>(T. viride)</i> T Roble nuevo	2	2	1 y 2
<i>(T.harzianum)</i> T Colina espino	3	3	2
<i>(T. artroviride)</i> T Roble viejo	4	4	4

Escala de antagonismo (Bell, 1982)	
1	Trichoderma cubre completamente al patógeno y toda la superficie del medio
1 y 2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. No se observan límites definidos entre ambos, con crecimiento en forma agregada sobre el patógeno.
2	Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. Se observan límites definidos entre el patógeno y el antagonista
3	Trichoderma y el patógeno, cada uno coloniza aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno aparece dominando al otro.
4	El patógeno coloniza al menos dos tercios de la superficie del medio

De acuerdo a las pruebas de antagonismo, las cepas que arrojaron los mejores resultados frente a los distintos patógenos en estudio fueron (T3, T7, Tcet, T álamo, T Rboldo, T Sfelipe) las cuales, también, exhibieron las mayores tasas de

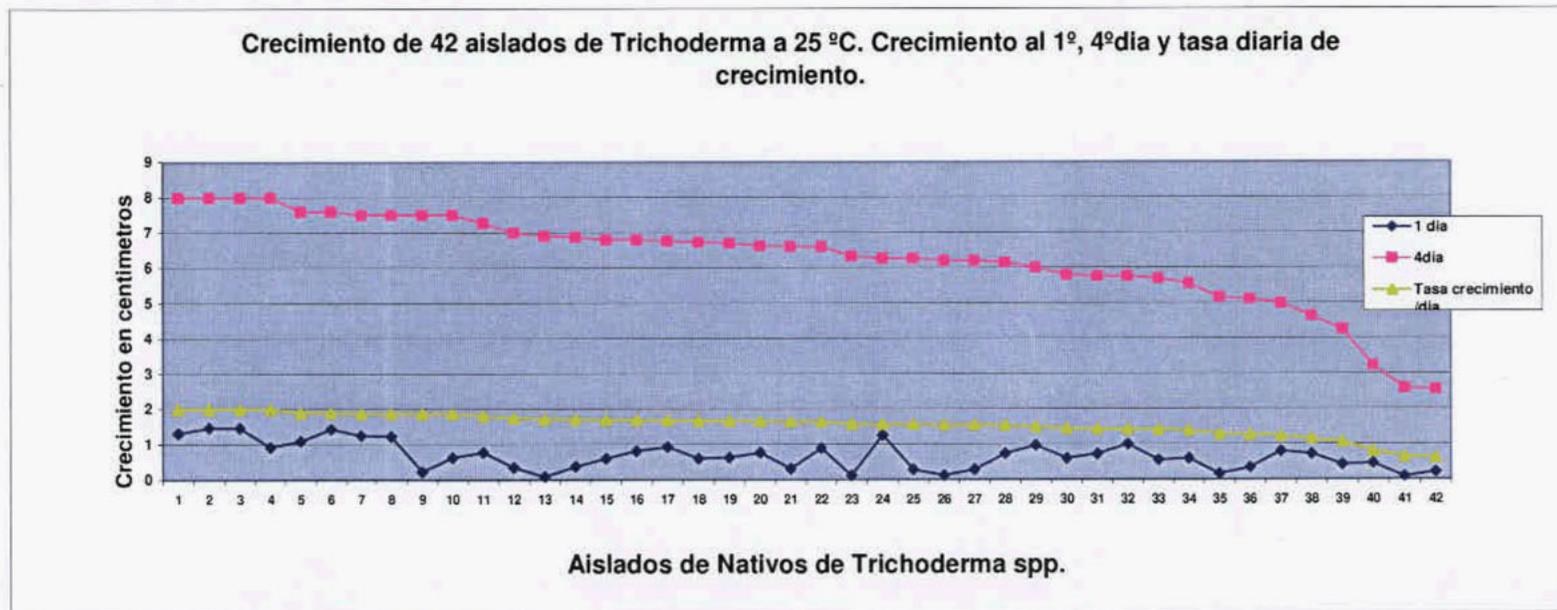
crecimientos diarios frente a las diferentes temperaturas evaluadas. (el análisis de las temperaturas se realiza en los gráficos siguientes.)

Estas cepas correspondieron a las especies, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* y *T. aureoviride* y fueron seleccionadas para su aplicación a nivel de campo, con resultados satisfactorios en el control de los patógenos. En consecuencia ambos test de evaluación (temperatura y antagonismo) como forma de seleccionar cepas antagónicas a patógenos específicos, para su posterior uso a nivel de campo, son altamente representativas y concordantes con los resultados de campo. Sin embargo, la prueba de índice de inhibición usada en este proyecto, si bien desde un punto matemático es correcta, en la práctica no reflejaron exactamente los mismo resultados, aun cuando se observó una tendencia similar en las cepas T3, T7 y Tcet, con respecto a los test anteriores, no sucedió lo mismo con las otras cepas, donde sus resultados fueron erráticos, incluso, con valores en su capacidad inhibitoria frente a los patógenos muy inferiores a lo realmente observado a nivel de campo, en consecuencia esta prueba constituiría un elemento de apoyo para la selección de cepas, recomendando su aplicación en conjunto con otros test de evaluación.

b) Aislamiento de cepas nativas de Trichoderma y selección por crecimiento en cámara de incubación a 10, 15 y 25°C.

El número total de cepas promisorias que fueron evaluadas durante el desarrollo del presente proyecto, fue de 42 aislados los que se incubaron en tres niveles de T°, 25°C, 15°C y 10°C, para conocer su crecimiento en estos rangos de temperatura, estableciéndose con ellos un ranking de crecimiento.

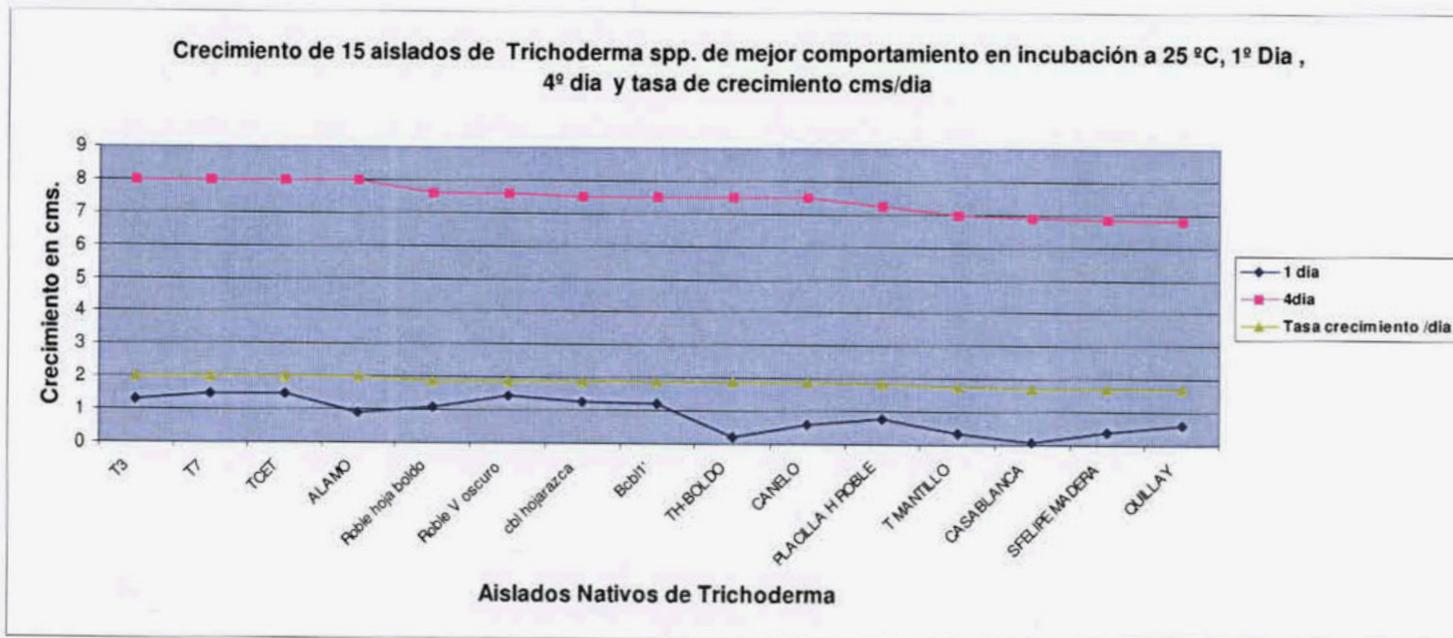
Grafico N° 1.



En el gráfico **N° 1** se han ordenado las cepas aisladas de acuerdo a su nivel de crecimiento a 25°C. En este cuadro se aprecia que los distintos aislados presentan diferentes rendimientos a 25 °C. Con esta información se obtuvo una tasa diaria de crecimiento en centímetros/día, apreciándose tasas para cada aislado, El nivel máximo de crecimiento alcanza a los 2 centímetros por día.

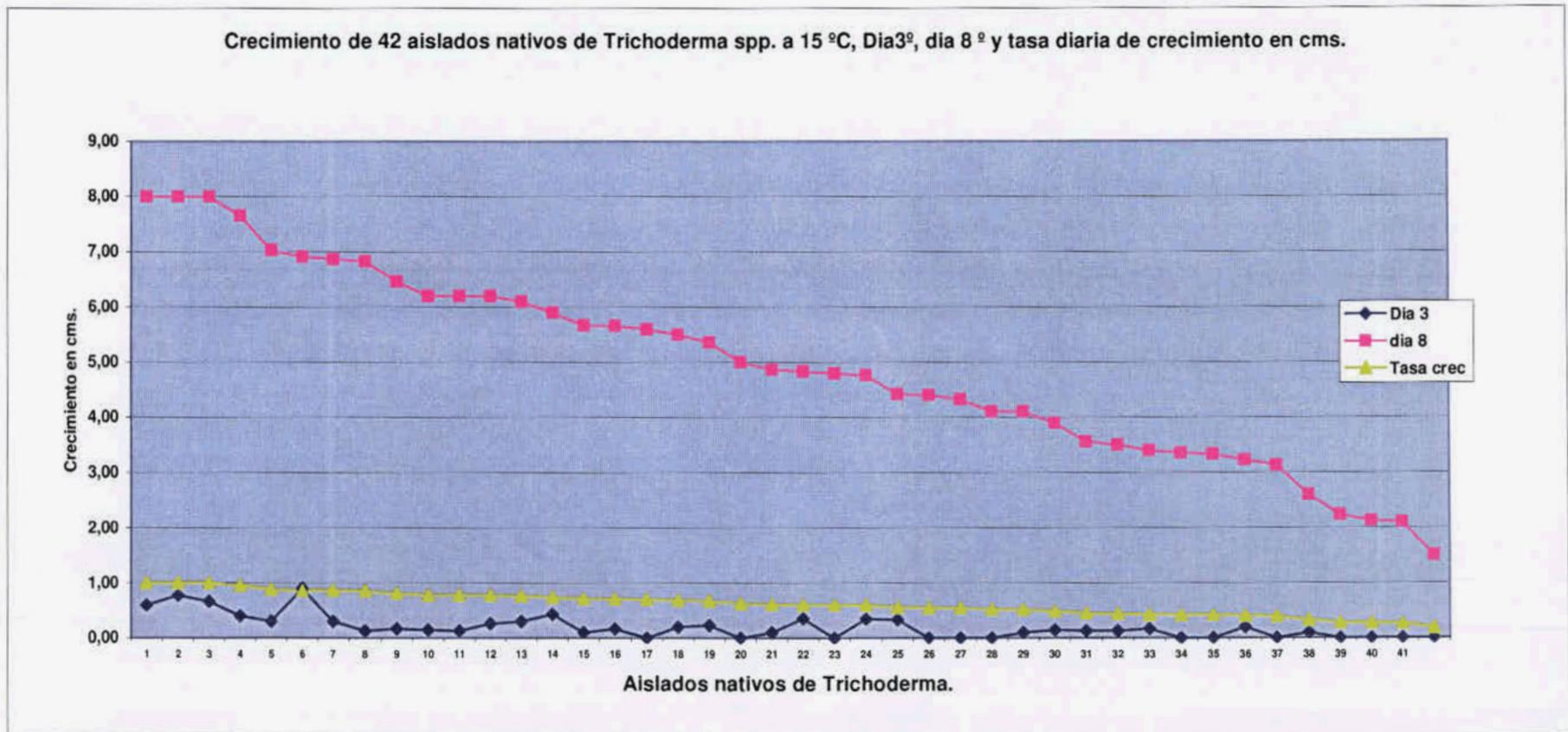
En el gráfico **Nº 2** se han ordenado los 15 aislamientos de mejor comportamiento a 25°C, se aprecian las diferentes cepas de mayor crecimiento por día a 25 °C, identificándose claramente las cepas **T-3** (*T. harzianum*); **T-7** (*T. harzianum*); **T-CET** (*T. longibrachiatum*); **T-Álamo** (*T. harzianum*); que presentan el mayor crecimiento a esta temperatura.

Gráfico -2.



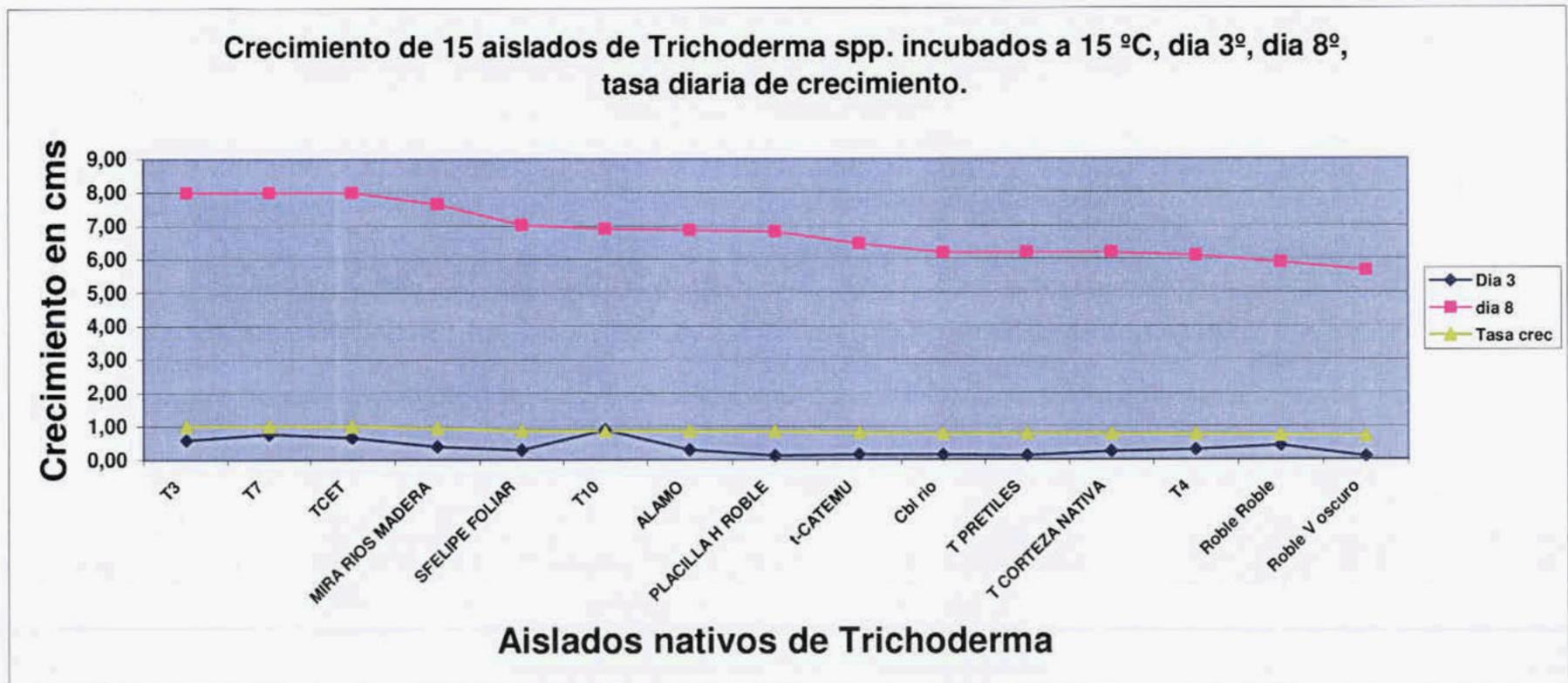
En el **grafico N° 3**, se aprecia el crecimiento de 42 aislados de hongos del género *Trichoderma* a 15°C, apreciándose un descenso en las tasas de crecimiento de todas las cepas, las tasas diarias caen a la mitad y algunas cambian su comportamiento desplazando a otras de los primeros lugares del gráfico. Esta situación se aprecia con mayor claridad en el grafico N° 4.

Gráfico N°3.



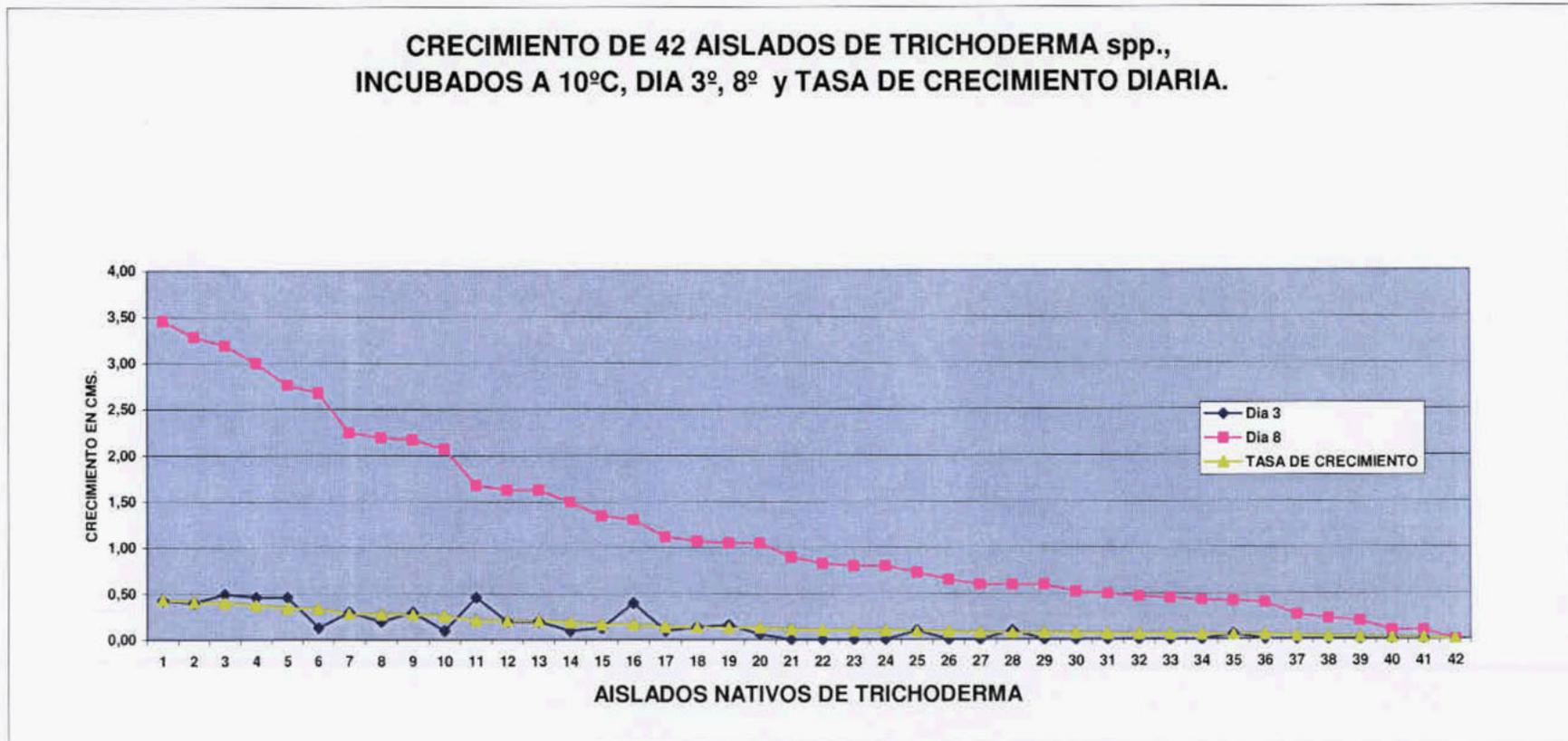
En el **gráfico N°4**, se aprecian las tasas de crecimiento de las cepas con mejor comportamiento a 15 °C, en este cuadro se identifica nuevamente a las cepas **T-3** (*T. harzianun*); **T-7** (*T. harzianum*); **T-CET** (*T. longibrachiatum*); en los primeros tres lugares de este ranking y se destaca el cambio de T. Álamo por T Mira-Ríos madera y el descenso en el crecimiento diario de T. Álamo al 7º lugar de esta tabla.

Gráfico N°4.



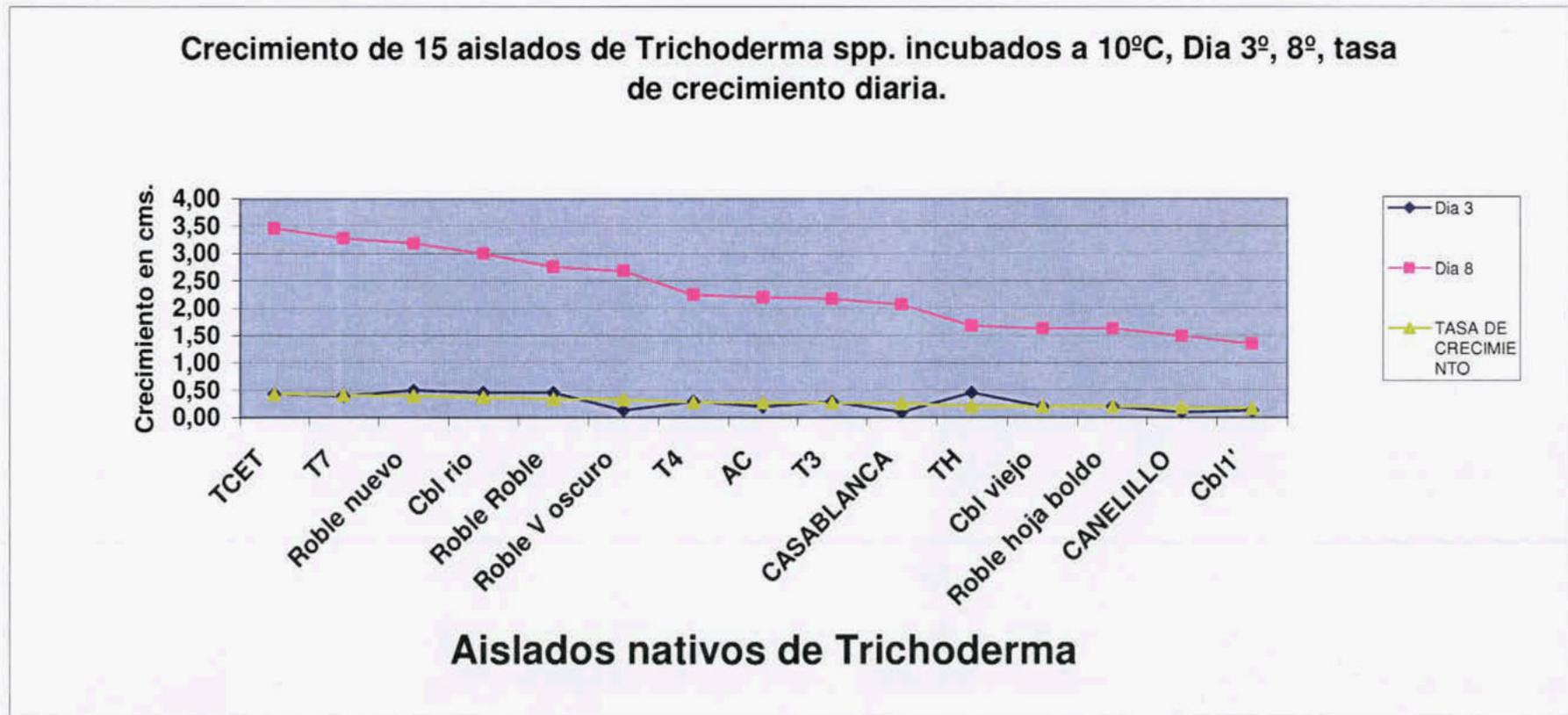
En el gráfico **Nº 5** se han ordenado las cepas aisladas de acuerdo al nivel de crecimiento diario a 10°C. En este cuadro se aprecia que los diferentes aislados presentan un franco descenso en la tasa diaria de crecimiento. En el gráfico **Nº 6** se identifican las cepas de mayor relevancia desde el punto de vista del desarrollo de ellas, a esta temperatura.

Gráfico Nº 5



En el gráfico N°6, se aprecian las tasas de crecimiento de las cepas con mejor comportamiento a 10 °C, en este cuadro se identifica a las cepas **T-CET** (*T. longibrachiatum*); **T-7** (*T. harzianum*); que aún tienen los mejores crecimientos sobre el conjunto de aislados realizados por el proyecto. Se aprecia también que las cepas **Cbl-Río** (*T.harzianum*) y **Roble-Roble** (*T. harzianun*) presentan crecimientos superiores dentro del ranking de cepas, en esta temperatura en comparación a los niveles anteriores de 15 °C y 25 °C.

Grafico N° 6.



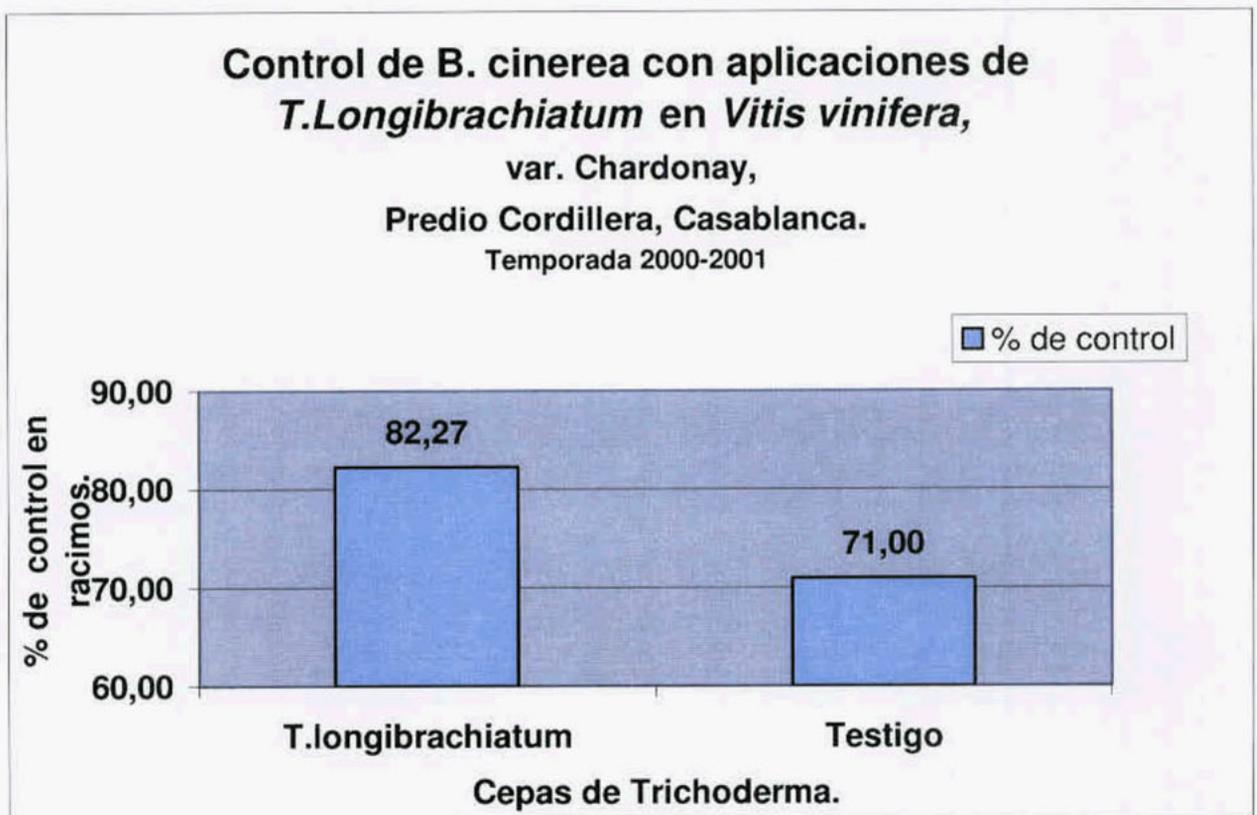
Estos resultados permiten concluir que las diversas cepas de *Trichoderma* responden de manera distinta a condiciones variables de T° y por lo tanto, las formulaciones utilizadas en control biológico de enfermedades de las plantas deben considerar esta condición de manera de hacer más específico el uso de las distintas cepas. Por otra parte es posible pensar que las presentaciones comerciales debieran considerar mezclas de cepas que se complementen desde el punto de vista de su respuesta en términos de crecimiento en los distintos rangos de temperatura en las que deben actuar.

En los informes parciales desarrollados a lo largo del proyecto se entrega la totalidad de la información recopilada respecto del efecto de la temperatura sobre el crecimiento de las distintas cepas de *Trichoderma* aisladas durante el presente trabajo.

d) Evaluación de Cepas nativas de *Trichoderma* en el control de *B. cinerea* en *Vitis vinifera* Var. Chardonay. Predio Cordillera, Viñedos Orgánicos Emiliana.

Los resultados que se entregan a continuación se obtuvieron entre los años 2001 y 2004 evaluándose en los distintos ensayos de campo, las cepas de mejor comportamiento in vitro, es decir las que presentaron mejores índices de antagonismo (Bell, 1987).

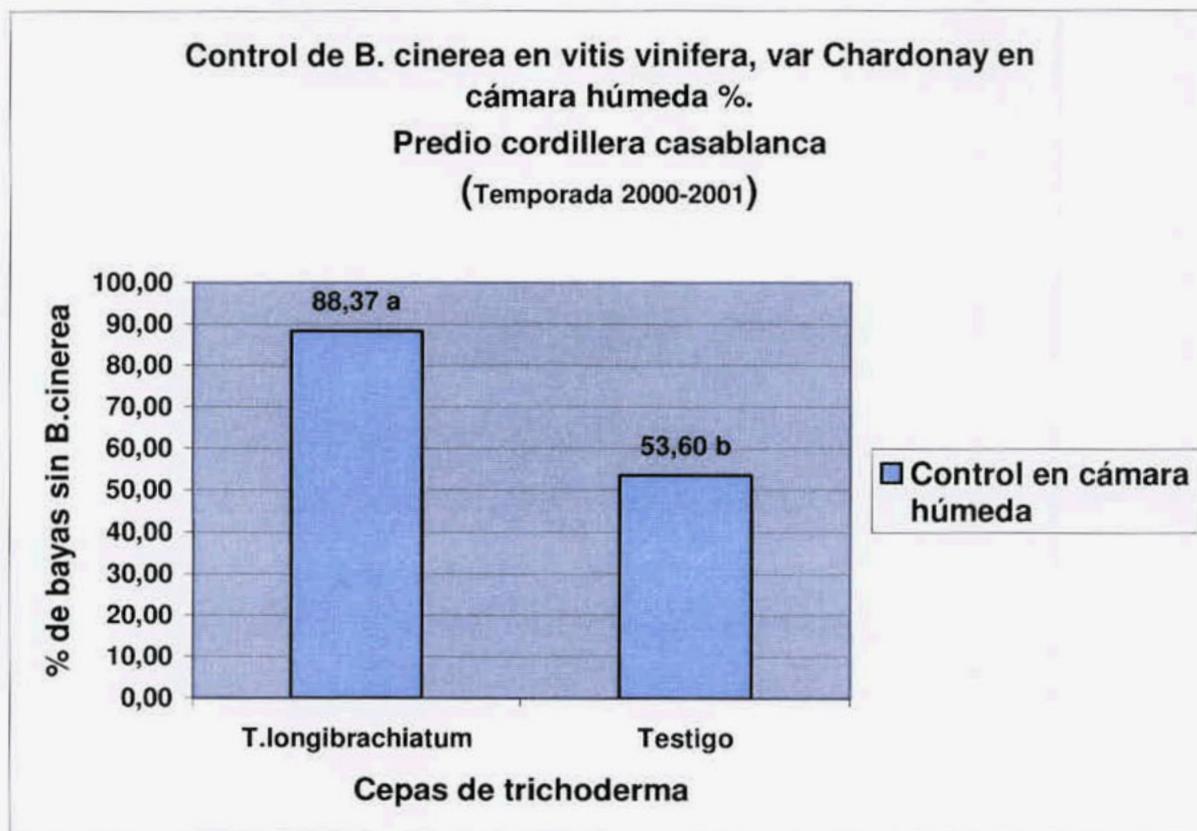
Grafico N° 7.



En el gráfico anterior se aprecia el nivel de control logrado el primer año de trabajo, durante el cual se evaluó en el predio Cordillera de Viñedos Orgánicos Emiliana, en un sistema de producción orgánico de *vitis vinifera* var. Chardonay, un aislado de *Trichoderma* identificado como *T. longibrachiatum*. En el gráfico se aprecia un porcentaje de control, evaluado como ausencia/presencia de *B. cinerea*, de un 82,27% respecto del testigo que solo alcanzó un 71%. Cabe destacar que la cepa utilizada en esta primera temporada fue aislada en el Centro

de Educación y Tecnología en la etapa previa al inicio de esta investigación y que en el texto del proyecto original se identifica como T-CET1.

Grafico N° 8.

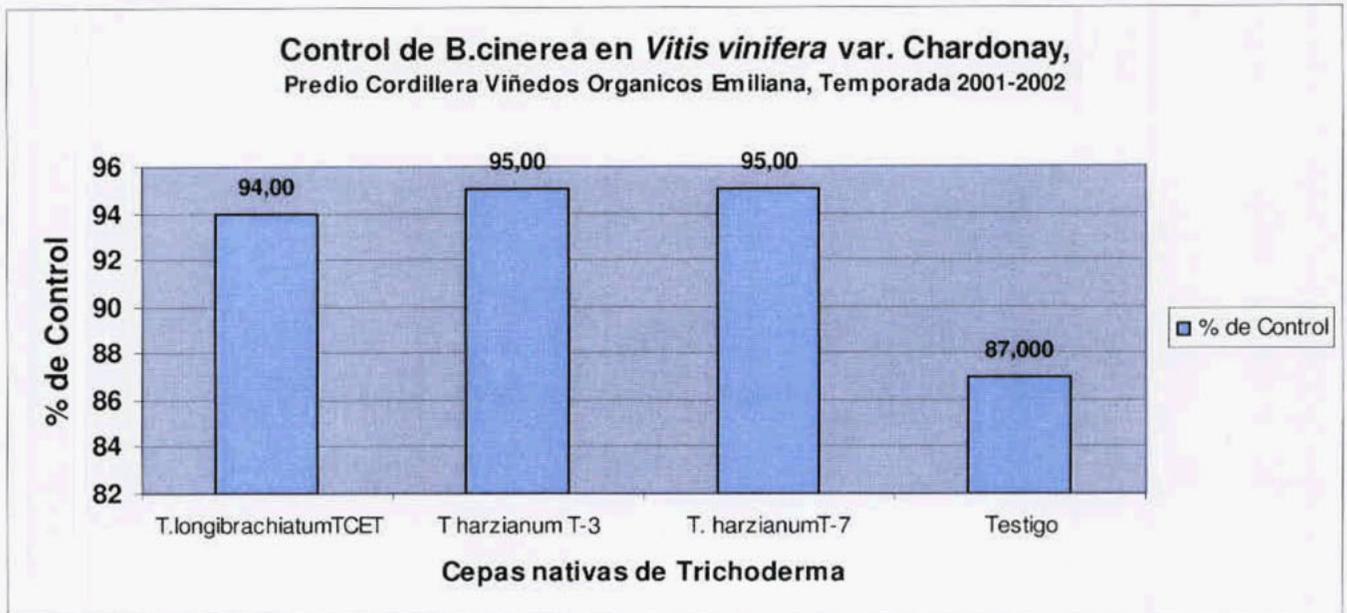


Letras distintas indican diferencia significativa.

En el gráfico N° 8, se aprecia el nivel de control alcanzado en cámara húmeda, en el análisis realizado el primer año de trabajo. En este sistema se evalúa la capacidad de control de *Trichoderma* en post cosecha, disponiendo bayas de vid en cámara húmeda en la que se dan las mejores condiciones para el desarrollo de *B. cinerea*. En esa condición se logró un 88,37% de control en las bayas provenientes del tratamiento con *T. longibrachiatum*, presentando una diferencia respecto del testigo estadísticamente significativa.

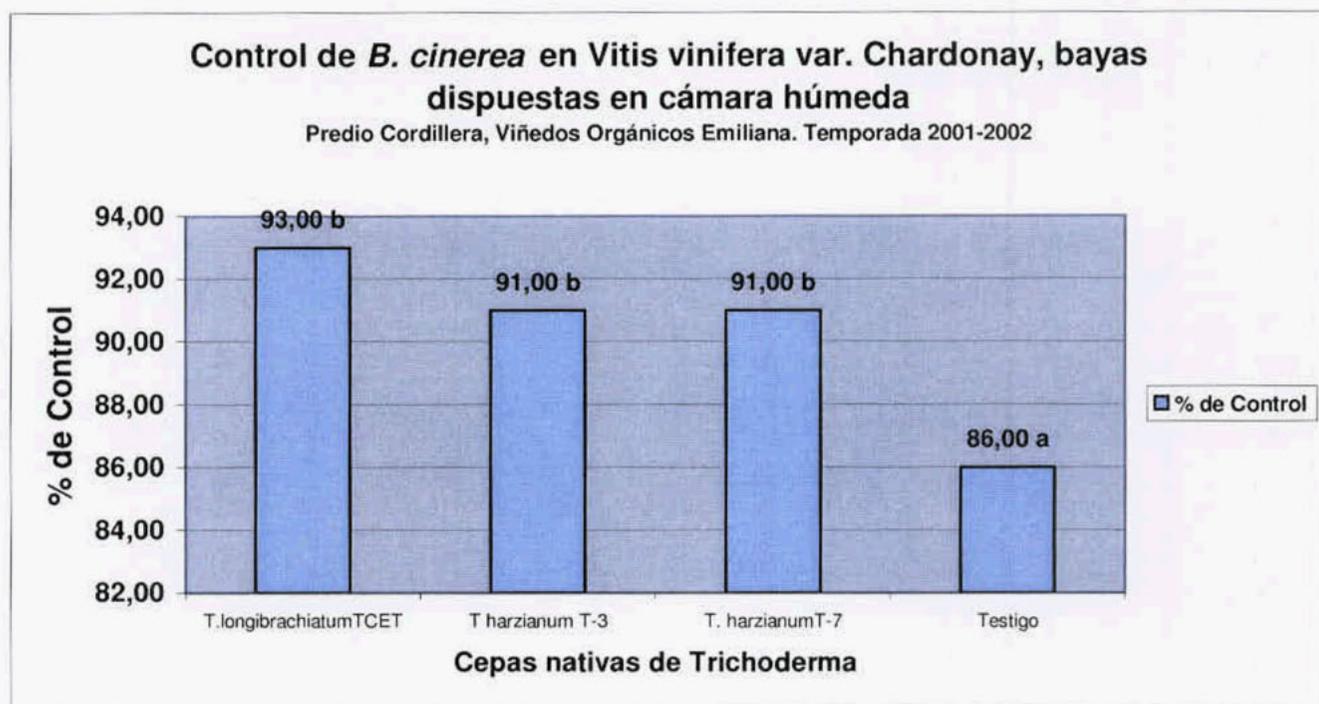
En el gráfico siguiente se exponen los resultados de campo obtenidos en la temporada 2001-2002.

Grafico 9.



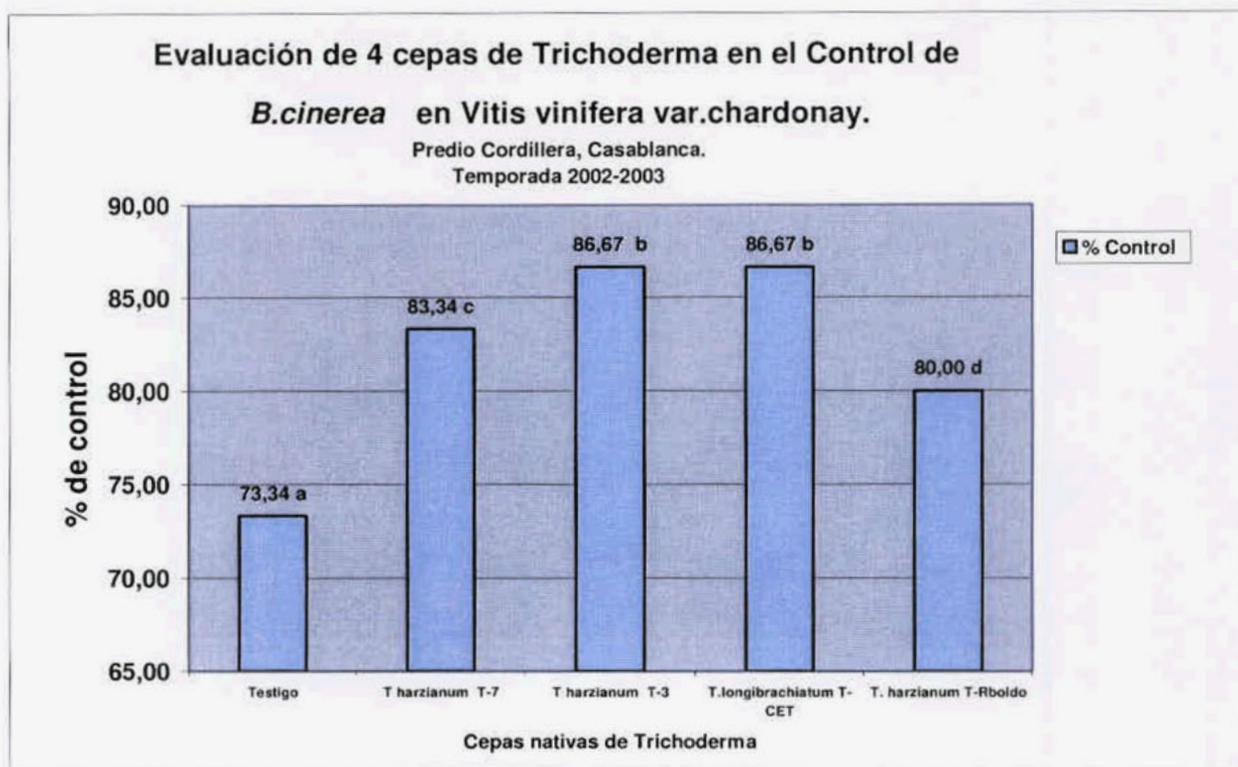
En el gráfico anterior se aprecia el nivel de control logrado el segundo año de trabajo durante el cual se evaluaron en *Vitis vinifera* var. Chardonay 3 aislados de Trichoderma identificados como T-CET (*T. longibrachiatum*), T3 (*T.harzianum*) y T7 (*T.harzianum*). En el gráfico se aprecia que se logró un porcentaje de control evaluado como ausencia/presencia de *B. cinerea* de un 94.0% en el caso de *T. longibrachiatum*, 95.0% de control con las 2 cepas de *T.harzianum* (T-3 y T7). El testigo alcanzó solo un 87.00% de control. En este ensayo no hay diferencia significativa con el testigo, debe destacarse en este punto que el testigo es el tratamiento que habitualmente realiza la viña utilizando *B. subtilis*, y que no corresponde a testigo absoluto.

Gráfico N° 10.



En el gráfico N° 10, se aprecia el nivel de control alcanzado en cámara húmeda, en el análisis realizado el segundo año de trabajo. En este sistema se evalúa la capacidad de control de Trichoderma en post cosecha, disponiendo bayas de vid en cámara húmeda en la que se dan las mejores condiciones para el desarrollo de *B.cinerea*. En esa condición se logró un 94 % de control en las bayas provenientes del tratamiento con *T. longibrachiatum*, y 91% de control con las dos cepas de *T. harzianum* (T-3 y T-7) presentándose una diferencia entre los tratamientos respecto del testigo estadísticamente significativa.

Gráfico-11.

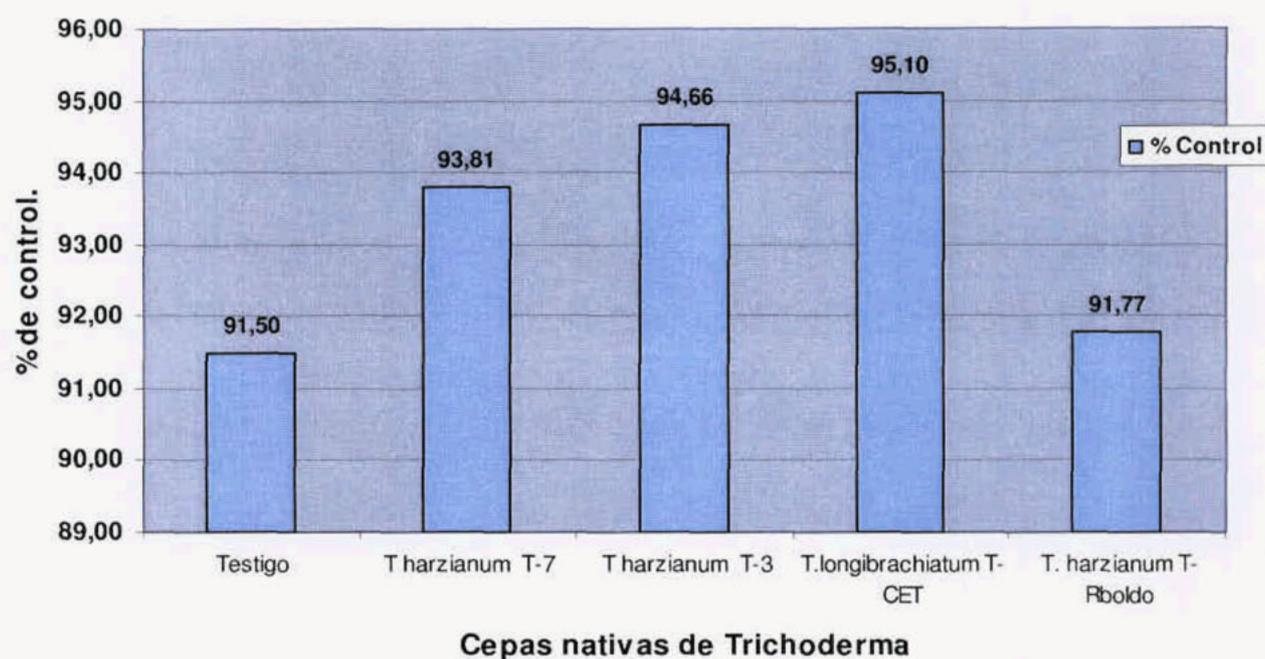


En el gráfico anterior se aprecia el nivel de control logrado el tercer año de trabajo durante el cual se evaluaron en *Vitis vinifera* var. Chardonay 4 aislados de Trichoderma identificados como T-CET (*T. longibrachiatum*), T3 (*T. harzianum*), T7 (*T. harzianum*) y Rboldo (*T. harzianum*). En el gráfico se aprecia que se logró un porcentaje de control evaluado como ausencia/presencia de *B. cinerea* de un 86,67% en el caso de *T. longibrachiatum* y *T. harzianum* (T-3), 83,34% de control con la cepa de *T. harzianum* (T7) y 80,00% de control con las cepas de *T. harzianum* (Rboldo), El testigo alcanzó un 73,34 % de control. En este ensayo hay diferencia estadísticamente significativa con el testigo.

Grafico N° 12.

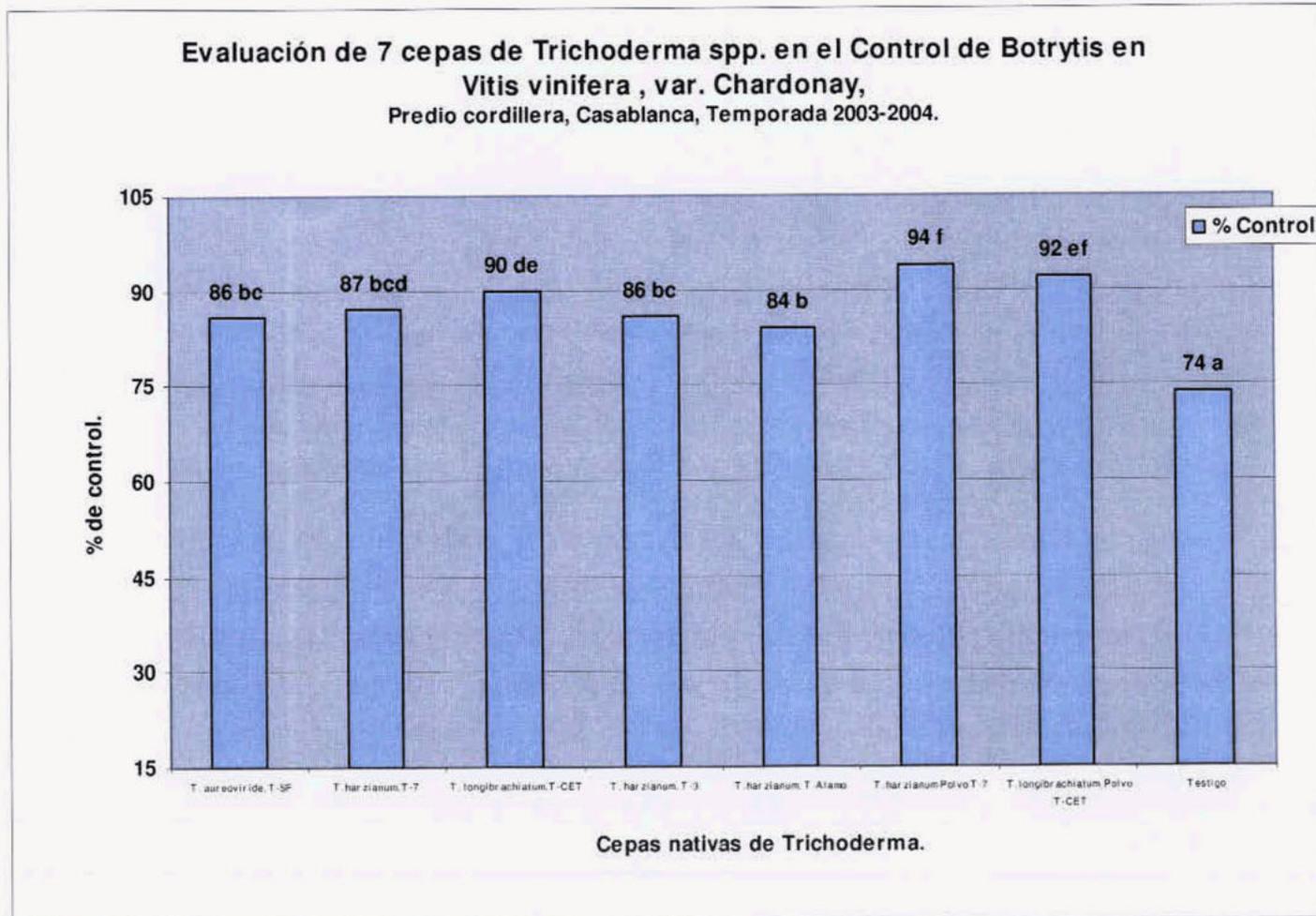
**Control de *B.cinerea* en bayas de *Vitis vinifera*, var Chardonay, en
cámara húmeda,**

Predio Cordillera Casablanca. Temporada 2002-2003



En el gráfico N° 12, se aprecia el nivel de control alcanzado en cámara húmeda, en el análisis realizado el tercer año del ensayo en el predio Cordillera. En este sistema se evalúa la capacidad de control de Trichoderma en post cosecha, disponiendo bayas de vid en cámara húmeda en la que se dan las mejores condiciones para el desarrollo de *B.cinerea*. En esa condición se logró un 95,10% de control en las bayas provenientes del tratamiento con *T. longibrachiatum*, 93,31 % de control con la cepa de *T. harzianum* (T-7), 94,66 % de control con la cepa de *T. harzianum* (T-3) y 94,66 % de control con la cepa de *T. harzianum* (Rboldo). En este caso los tratamientos fueron iguales al testigo con tratados con *B. subtilis*.

Gráfico Nº 13.



En el gráfico 13 se entrega la información correspondiente a los resultados del año 2003-2004, esta temporada se evaluaron 5 cepas, las mejores de los años anteriores y 2 de ellas se evaluaron en la presentación en polvo, desarrollada deshidratando sustratos inoculados y esporulados a partir de los cuales se obtuvieron las conidias secas.

En el gráfico 13, se aprecia que las formulaciones en polvo tuvieron el mejor nivel de control, lográndose un 94,00% con *T. Harzianum* T-7 y un 92,00% con *T. longibrachiatum* T-CET.

Las formulaciones líquidas lograron un 90%, 87%, 86%, 86%, y 84 % para *T. longibrachiatum* (TCET), *T. harzianum* (T7), *T. aureoviride* (San Felipe) , *T. harzianum* (T-álamo) respectivamente, presentándose diferencias significativas entre los tratamientos y entre los tratamientos y el testigo.

En el grafico **14** se aprecia el efecto de los tratamientos con Trichoderma en post cosecha al introducir las bayas cosechadas en cámara húmeda y constatar el nivel de aparición de *B. cinerea*. Del mismo modo que en el ensayo de campo el mejor nivel de control en cámara húmeda se logró con *T.harzianum*, (T7) y con *T. longibrachiatum* (T-CET) con un 88% y un 89% respectivamente.

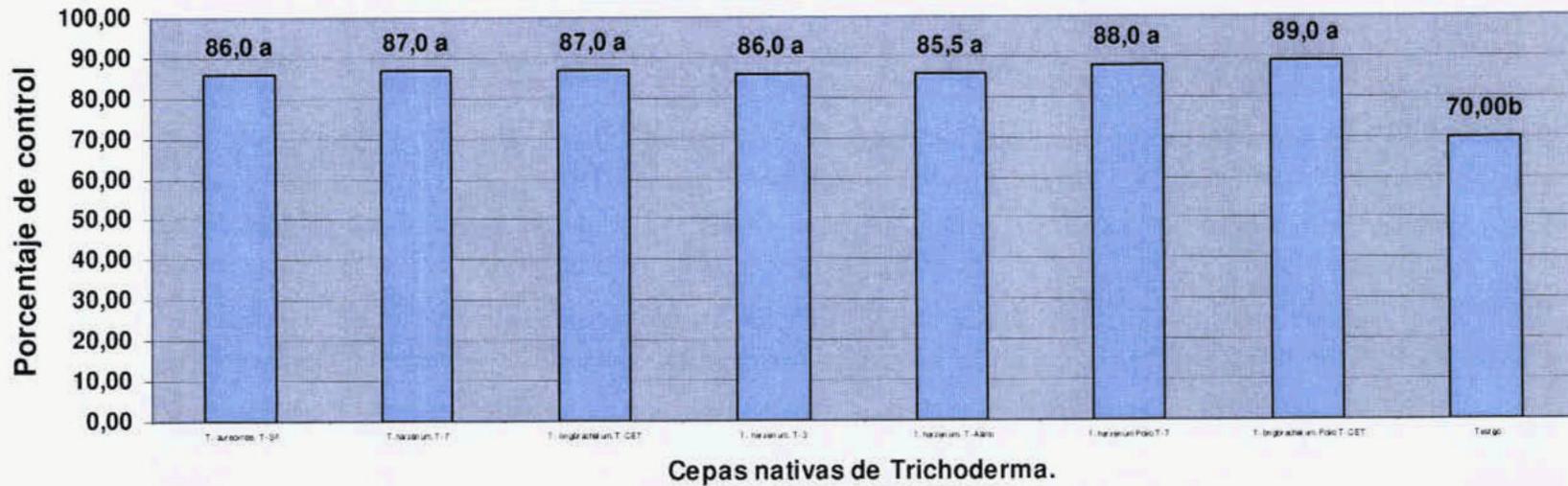
En la formulación líquida *T.harzianum* (T-7) y *T. longibrachiatum* (T-CET) lograron un 87% de control. *T.harzianum* (T-Álamo) presentó un 85,5 %; *T. aureoviride* (TSF) y *T harzianum* (T-3) alcanzaron un 86 % de control presentándose en todos los caso diferencias estadísticamente significativas respecto del testigo.

Grafico N° 14

Control de *B. cinerea* en bayas de *Vitis vinifera*, var. Chardonay, dispuestas en cámara húmeda.

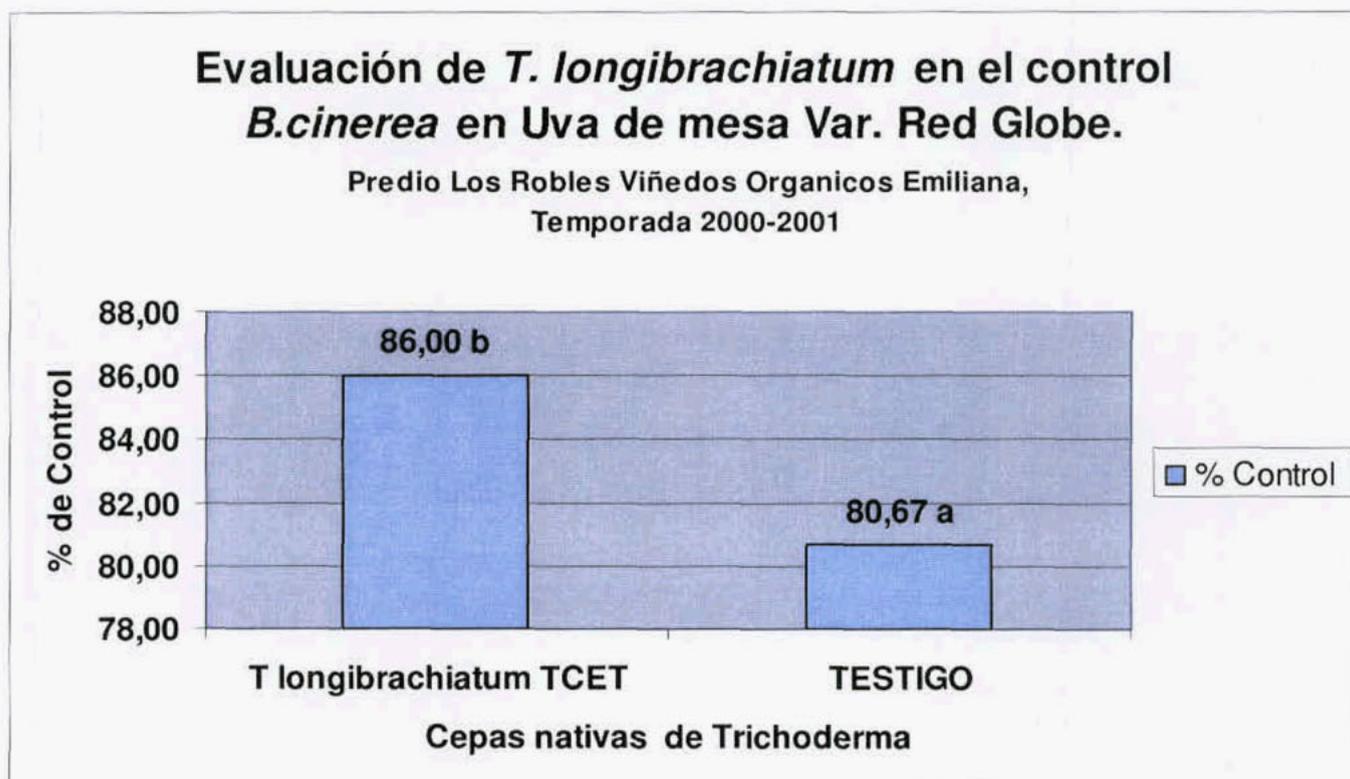
Predio Cordillera, Casablanca.
Temporada 2003-2004.

■ % Control



Evaluación de cepas nativas de *Trichoderma* en el control de *B. cinerea* en uva de mesa var. Red Globe.
Predio los Robles Viñedos Orgánicos Emiliana.

Gráfico N° 15.

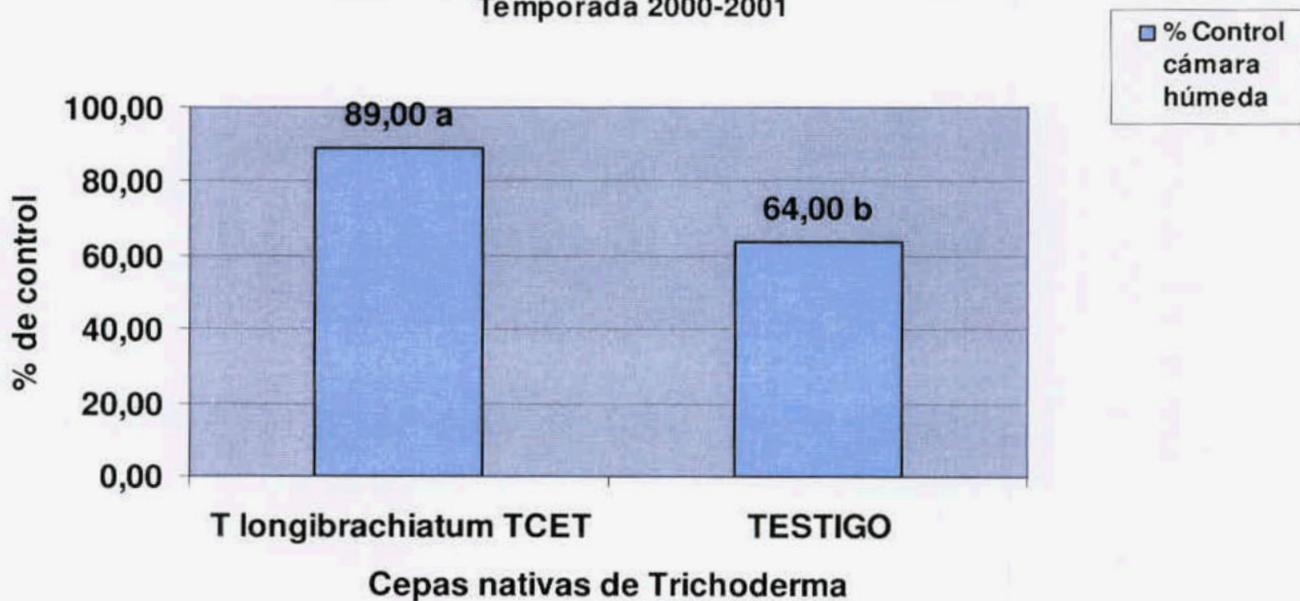


En el gráfico anterior se aprecia el nivel de control logrado el primer año de trabajo, en el predio Los Robles de Viñedos Orgánicos Emiliana, en este se evaluó un sistema de producción orgánico de vitis vinífera var. Red Globe, respecto del control de *B. cinerea* con una cepa de *Trichoderma*, identificado como *T. longibrachiatum*. En el gráfico se aprecia el porcentaje de control, evaluado como ausencia/presencia de *B. cinerea*, se alcanzó un 86,00% respecto del testigo que alcanzó un 80,67%.

Gráfico N°16.

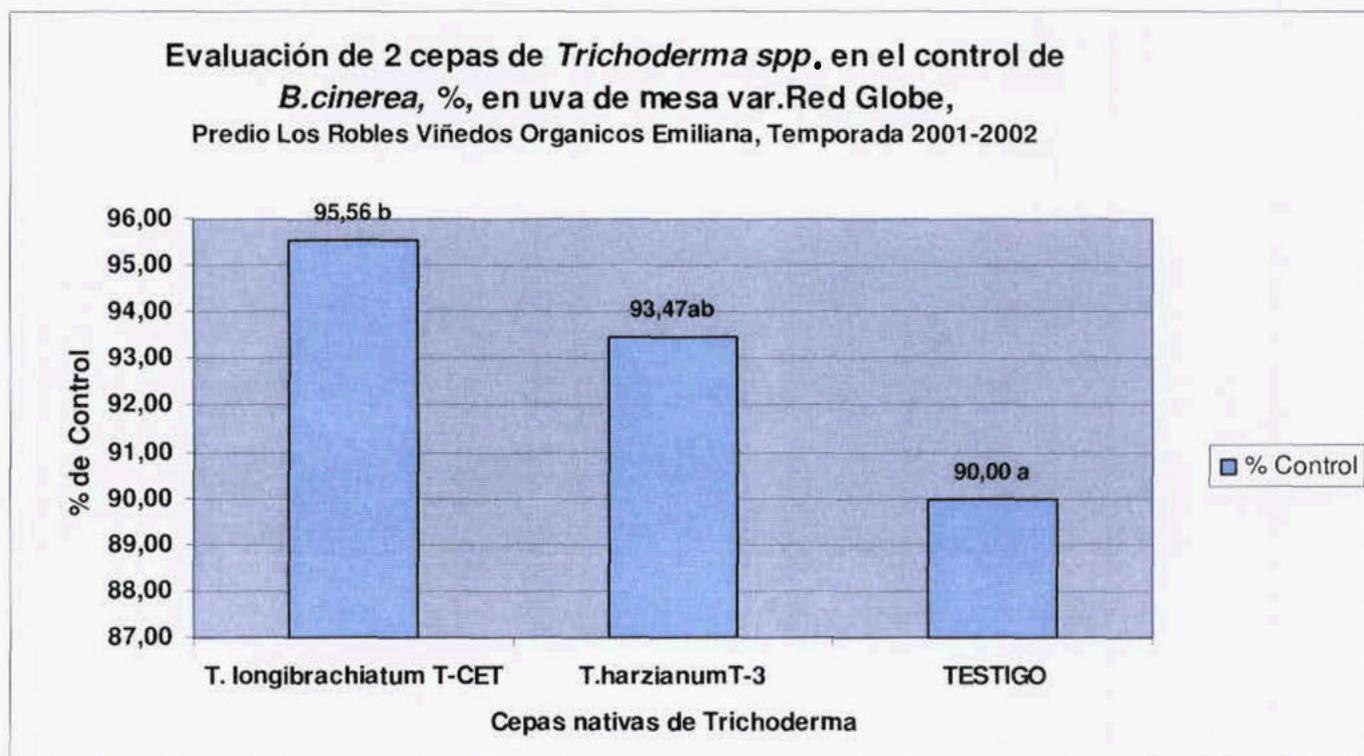
Control de *B. cinerea* sobre bayas dispuestas en cámara húmeda. Uva de mesa Var. Red Globe.

Predio Los Robles, Viñedos Organicos Emiliana
Temporada 2000-2001



En el gráfico N° 16, se aprecia el nivel de control alcanzado en cámara húmeda, en la temporada 2000-2001. En este sistema se evalúa la capacidad de control de Trichoderma en post cosecha. En esa condición se logró un 89,00% de control en las bayas provenientes del tratamiento con *T. longibrachiatum*, presentando una diferencia respecto del testigo (64%) estadísticamente significativa.

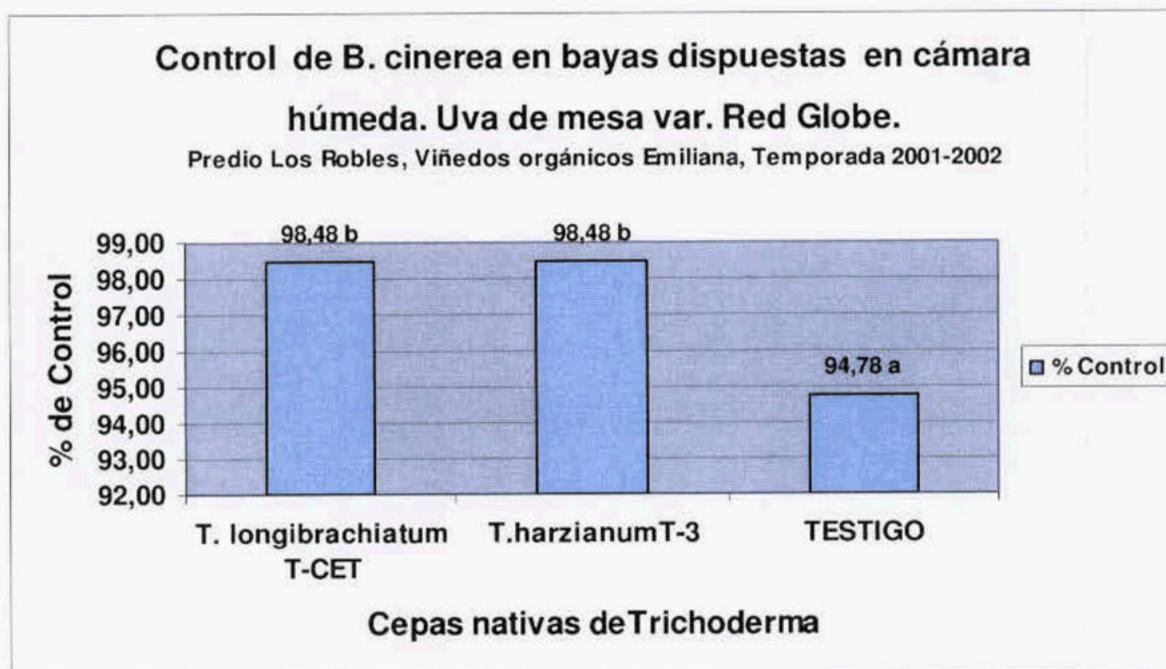
Grafico N° 17



En el gráfico anterior se aprecia el nivel de control logrado el segundo año de trabajo durante el cual se evaluaron en *Vitis vinífera* var. Red Globe 2 aislados de *Trichoderma* identificados como T-CET (*T. longibrachiatum*) y T3 (*T.harzianum*).

En el gráfico se aprecia que se logró un porcentaje de control evaluado como ausencia/presencia de *B. cinerea* de un 95.56% en el caso de *T. longibrachiatum*, 93,47% de control con la cepa de *T.harzianum* (T-3). El testigo alcanzó un 90.00% de control. En este ensayo hay diferencia significativa con el testigo. En este caso el testigo recibe el tratamiento que habitualmente realiza la viña utilizando *B. subtilis*, y no corresponde a testigo absoluto.

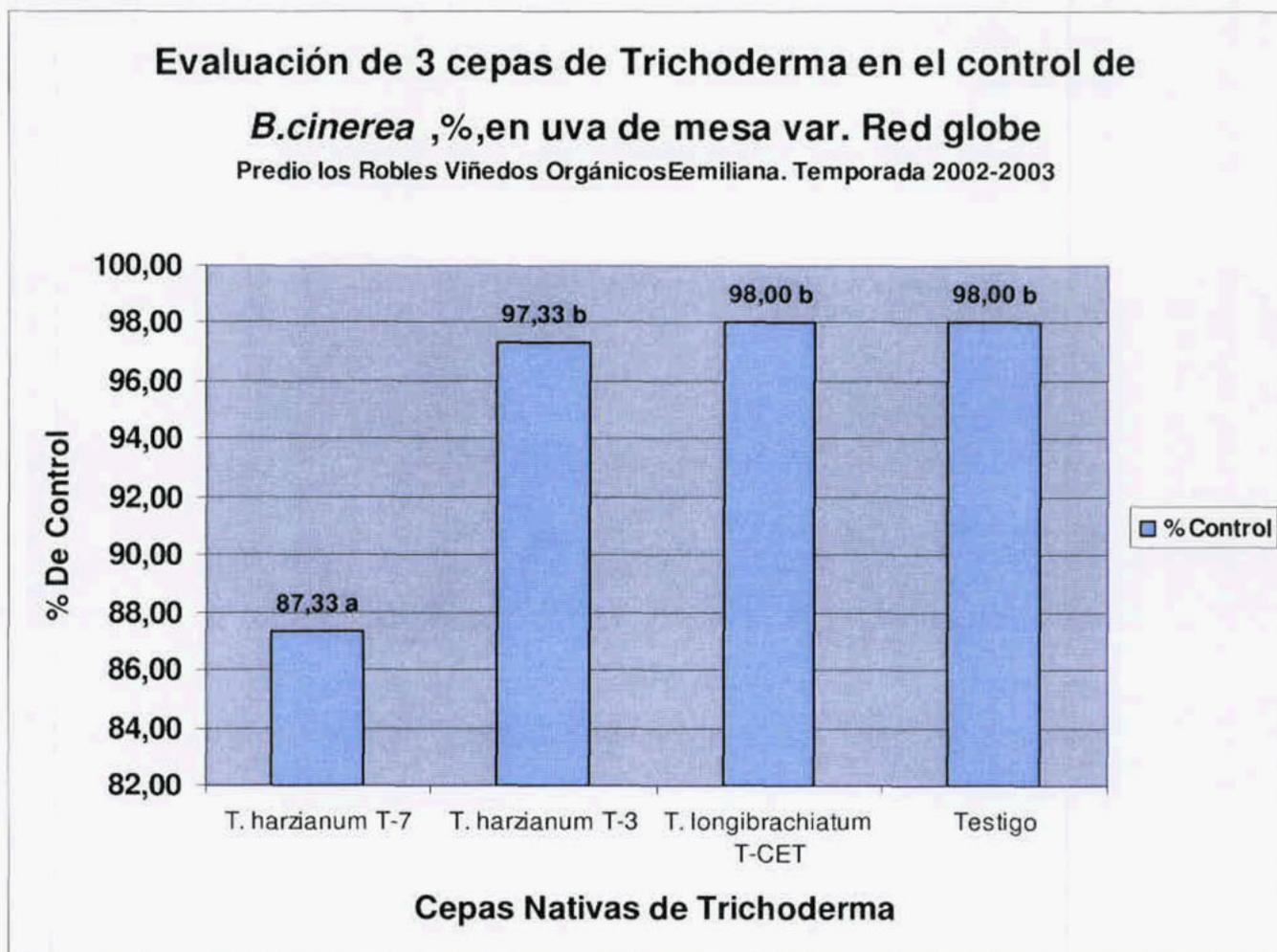
Gráfico N° 18.



a y b son estadísticamente distintos

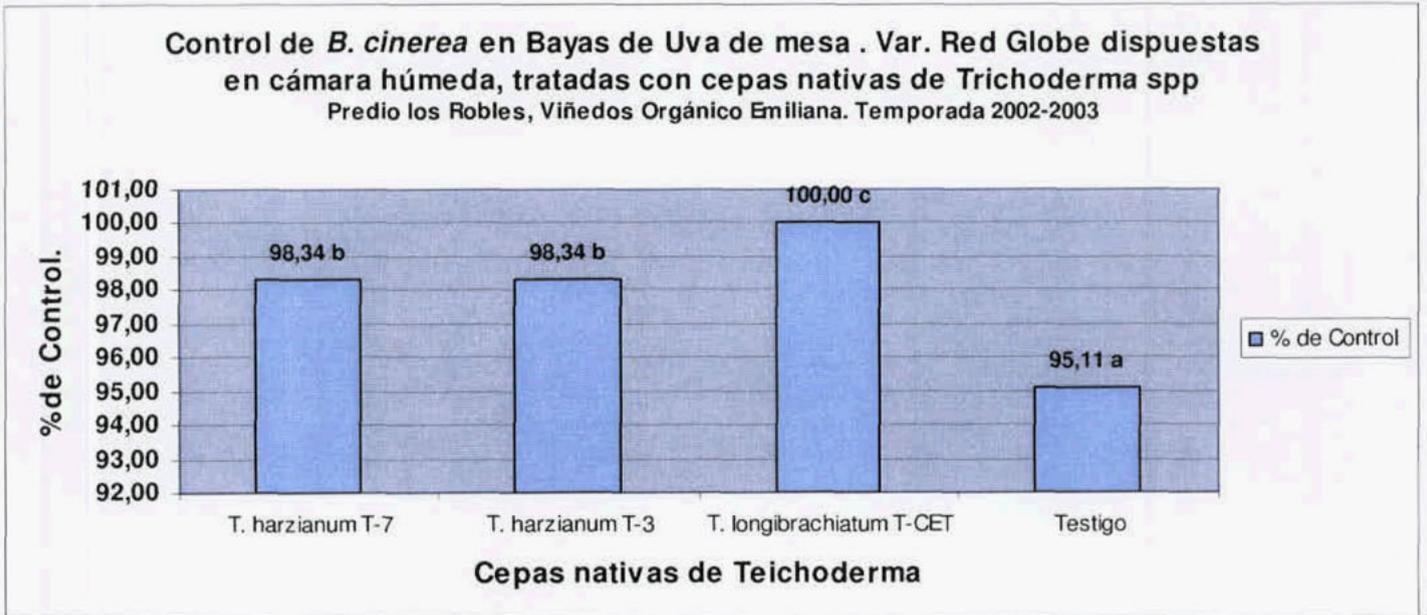
En el gráfico N° 18, se aprecia el nivel de control alcanzado en cámara húmeda, en el ensayo realizado la temporada 2001-2002. En esa condición se logró un 98,48% de control en las bayas provenientes del tratamiento con *T. longibrachiatum*, y 98,48 de control con las dos cepas de *T. harzianum* (T-3).

Grafico N° 19.



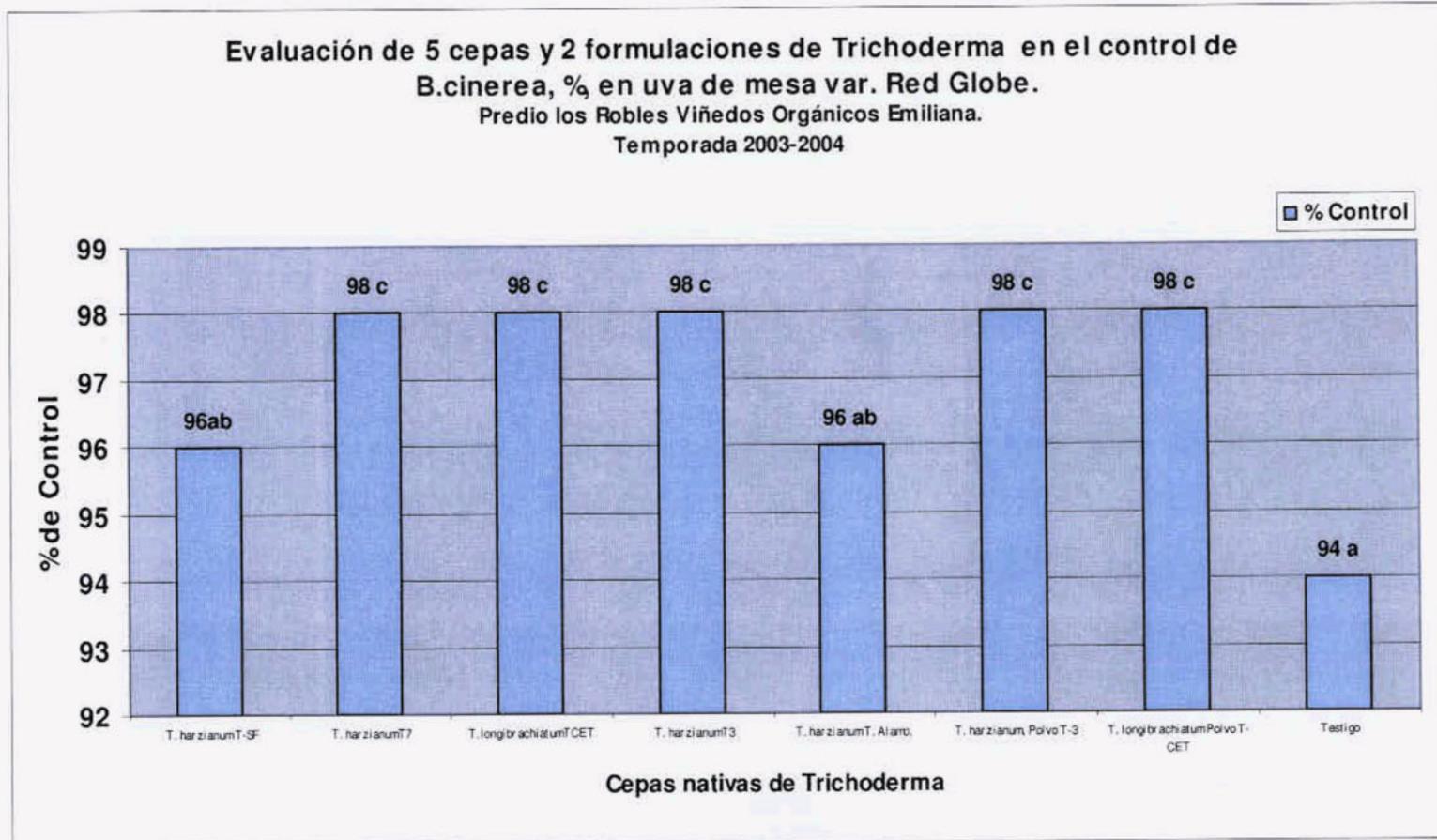
En el grafico anterior se aprecia el nivel de control logrado en la temporada 2002-2003 en ella se evaluaron 3 cepas del genero Trichoderma en *Vitis vinífera* var. Red Globe identificados como T-CET (*T. longibrachiatum*), T3 (*T.harzianum*) y T7 (*T.harzianum*). En el gráfico se aprecia que se logro un porcentaje de control evaluado como ausencia/presencia de *B. cinerea* de un 98.0% en el caso de *T. longibrachiatum*, 97,33.% de control con la cepa de *T.harzianum* (T-3) y de 87,33 con *T harzianum* (T-7). El testigo alcanzó un 98.00% de control. En este ensayo no hay diferencia significativa entre el testigo, T7 y TCET. El testigo es el tratamiento que habitualmente realiza la viña utilizando *B. subtilis*, y que no corresponde a testigo absoluto.

Gráfico N° 20.



En el gráfico N° 20, se aprecia el nivel de control alcanzado en cámara húmeda, en el ensayo realizado la temporada 2002-2003. En esa condición se logró un 100% de control en las bayas provenientes del tratamiento con *T. longibrachiatum*, 98,54 % de control con la cepa de *T. harzianum* (T-7), 98,54 % de control con la cepa de *T. harzianum* (T-3). En este caso los tratamiento fueron estadísticamente diferentes al testigo tratados con *B. subtilis*.

Gráfico N° 21.

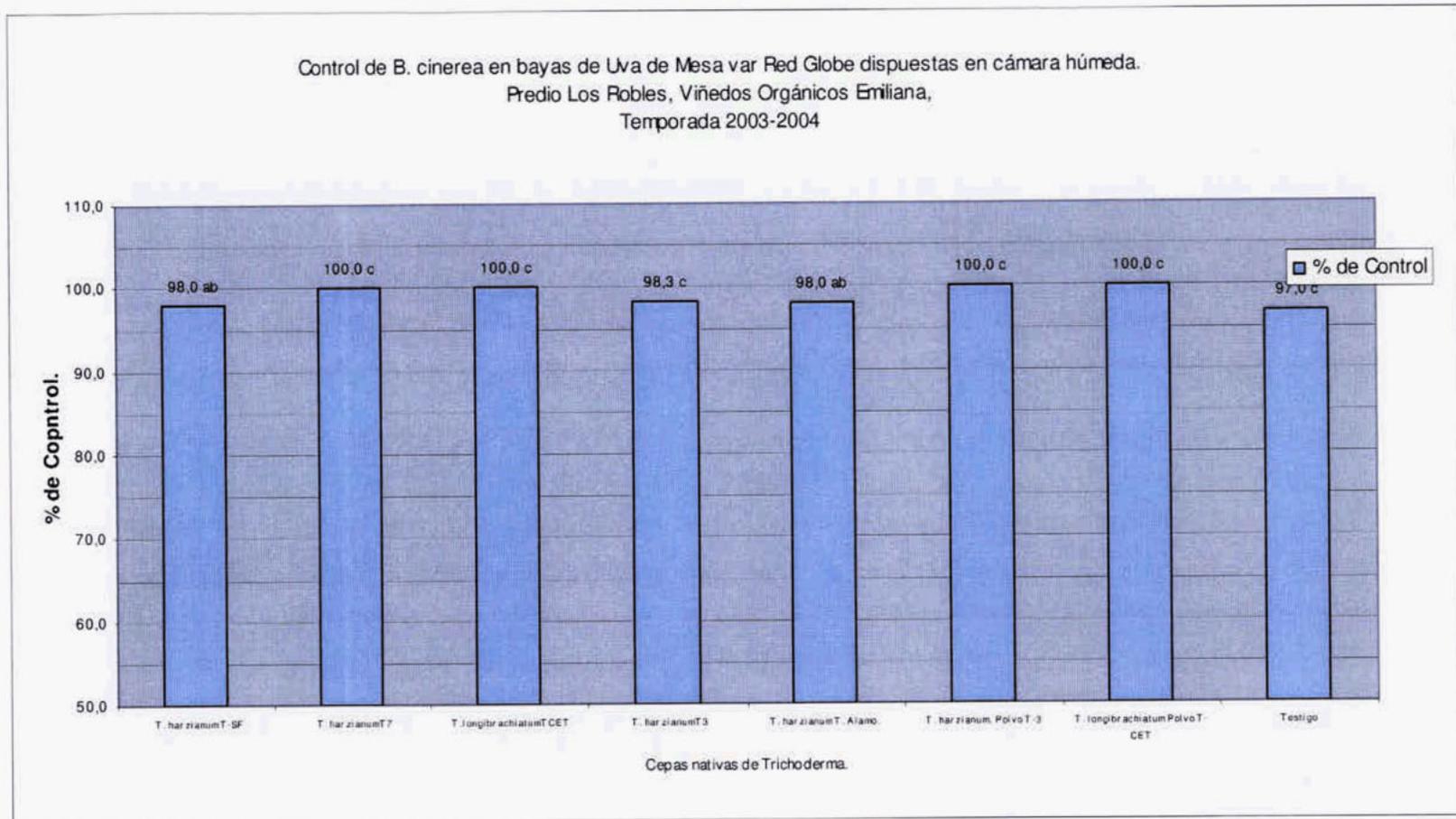


En el gráfico 21 se entrega la información correspondiente a los resultados del año 2003-2004, esta temporada se evaluaron 5 cepas, las mejores de los años anteriores y 2 de ellas se evaluaron en una formulación en polvo, desarrollada deshidratando sustratos inoculados y esporulados a partir de los cuales se obtuvieron las conidias secas.

En el gráfico 21, se aprecia que las formulaciones en polvo tuvieron un control de un 98,00% con *T. Harzianum* T-3, *T. longibrachiatum* T-CET.

Las formulaciones líquidas de *T. longibrachiatum* (TCET), *T.harzianum* (T7), *T.harzianum* (T3) lograron un 98 % de control presentándose diferencias significativas entre estos tratamientos y el testigo. *T.harzianum* (T-SF), *T.harzianum* (T- álamo) presentaron un 94 % de control y son estadísticamente distintos del testigo que logro un control de 94%

Grafico Nº 22.



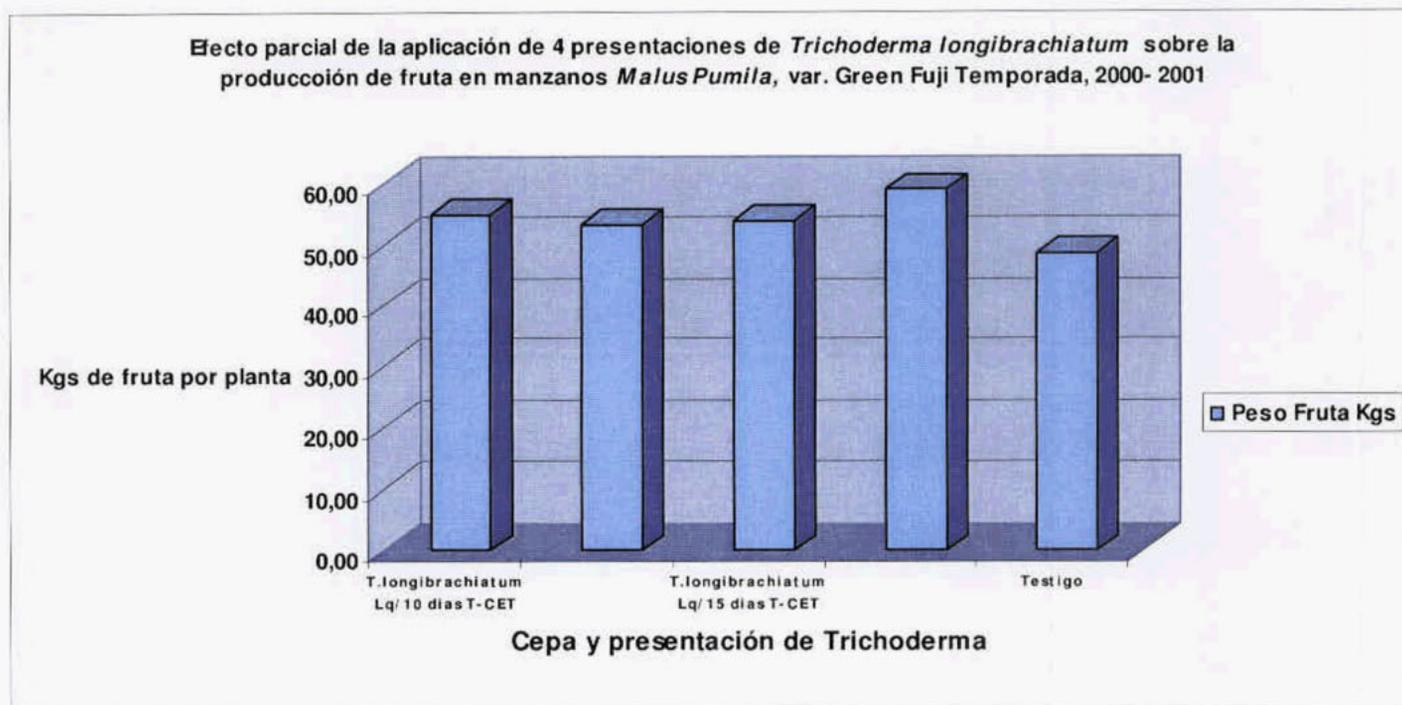
En el grafico N° 22, se observa el efecto de los tratamientos con Trichoderma en post cosecha al introducir las bayas cosechadas, provenientes de los distintos tratamientos en cámara húmeda y constatar el nivel de aparición de *B. cinerea*. El nivel de control logrado en cámara húmeda fue para *T.harzianum*, (T3) en polvo y *T. longibrachiatum* (T-CET) en polvo de un 100%.

En la formulación líquida *T.harzianum* (T-7) y *T. longibrachiatum* (T-CET) lograron un 100% de control.

T.harzianum (T-Álamo) y *T.harzianum* (T-3) y *T. aureoviride* (TSF) presentaron un 98,00% de efecto, El testigo no presentó diferencias respecto de los que tuvieron un 100% de control aunque Presentó un 3% de menor control.

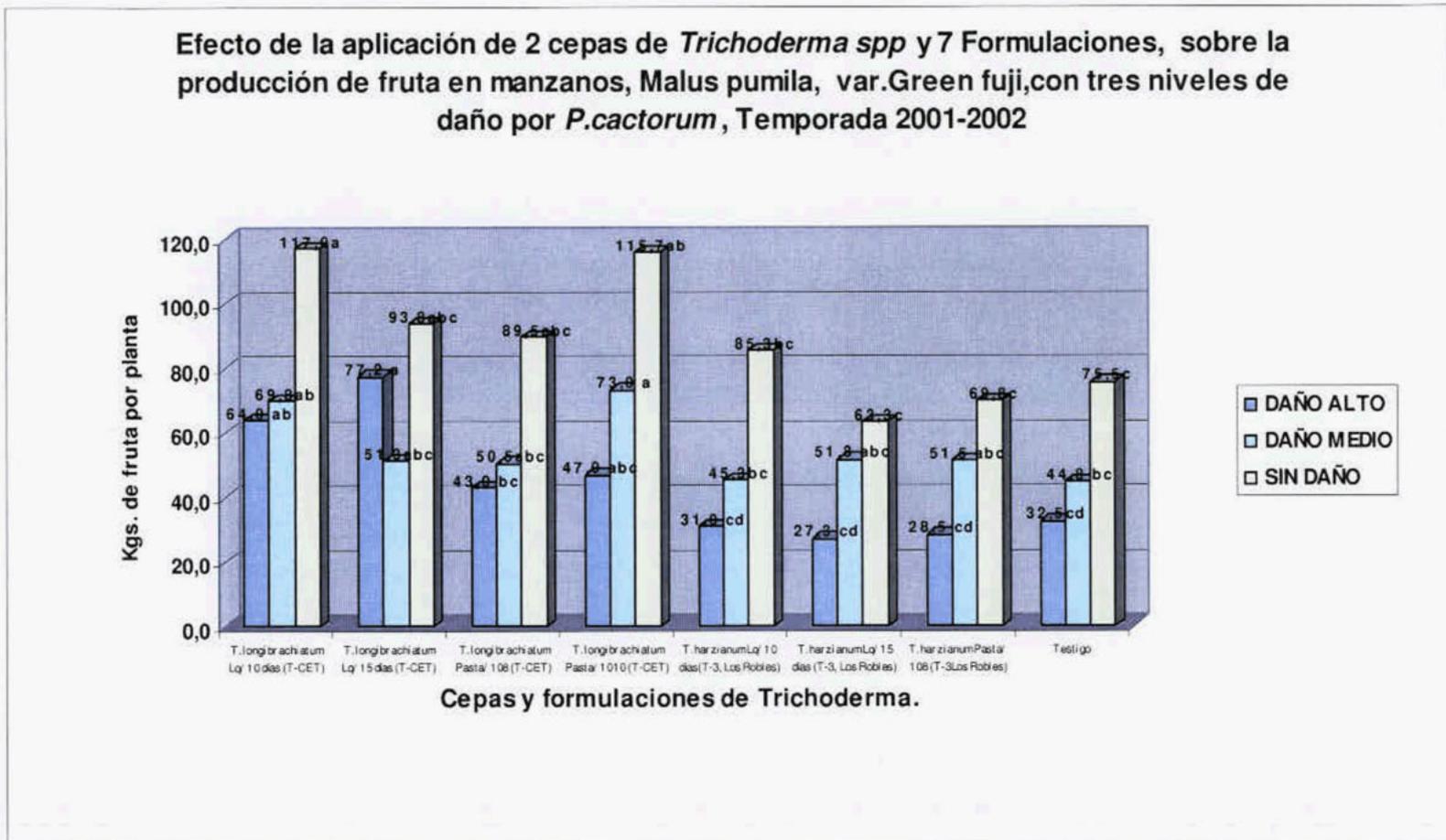
**Efecto de la aplicación de cepas nativas de *Trichoderma* spp. Formulados en pasta y suspensión sobre la producción de plantas de manzano, con distintos niveles de daño por *P. cactorum*.
(Sin daño, daño medio y daño alto)**

Gráfico N° 23.



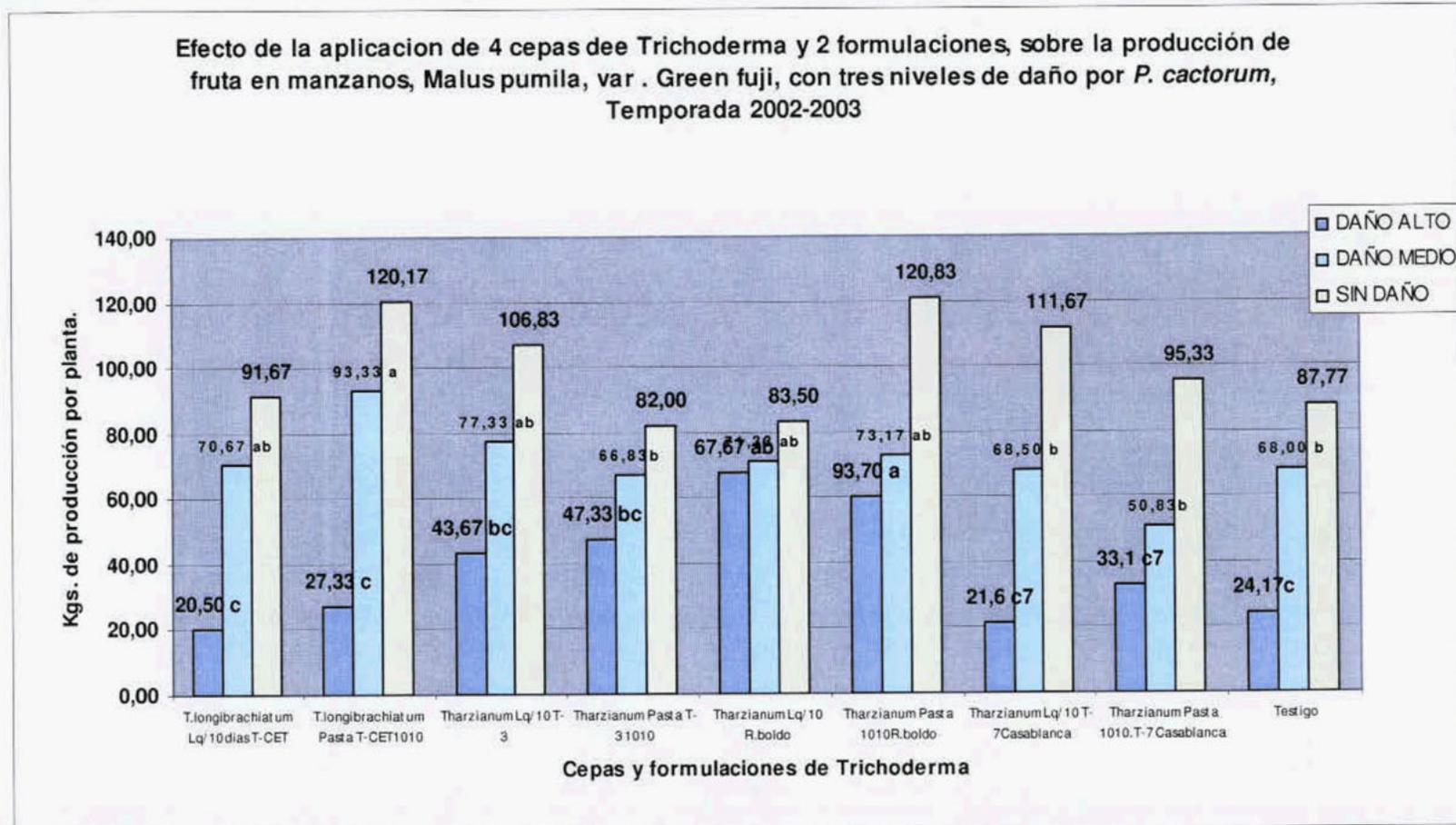
En el gráfico anterior se aprecia el efecto de *Trichoderma* spp. en dos formulaciones aplicado en un huerto de manzanos Green fuji en la temporada 2000-2001 donde no se encontraron diferencias entre los tratamientos para el control de *P. cactorum* y solamente una tendencia respecto del testigo sin tratamiento. Esta tendencia se hizo mas clara en los años siguientes, en que normalmente se pudo establecer que las parcelas testigo siempre tuvieron producciones menores a los árboles tratados.

Gráfico N°24.



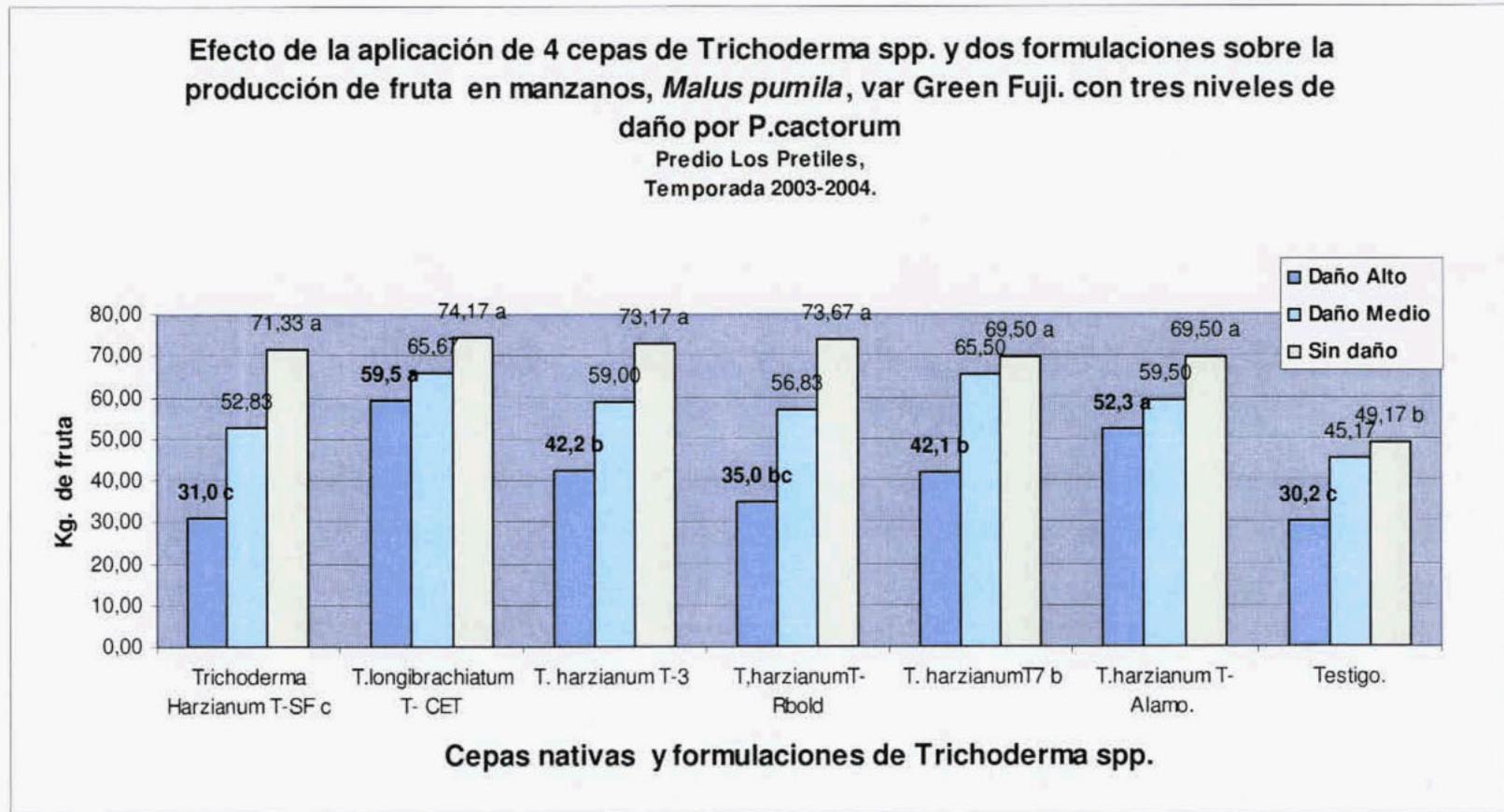
A partir del 2º año de tratamiento se apreció el impacto sobre la producción que ejercía la cepa de *Trichoderma longibrachiatum* que se estaba usando, destacándose que en ese año fueron superiores en su efecto sobre las cepas de *T. harzianum*

Gráfico N° 25.



En el gráfico anterior se aprecia nuevamente que las plantas tratadas con las cepas evaluadas presentan mayores producciones respecto del testigo sin tratamiento, se aprecia que *T. longibrachiatum* tiene un fuerte efecto sobre las plantas con daño medio y sanas y que *T. harziaium* tiene un fuerte efecto sobre las plantas con daño alto.

Gráfico N° 26.



En el gráfico anterior se aprecia nuevamente que *T. longibrachiatum* y *T. harzianum* presentan consistentemente un efecto positivo sobre la producción de fruta en plantas con daño por *P. cactorum* y que permanentemente las plantas tratadas tienen superioridad productiva respecto del testigo. También se puede inferir que las formulaciones para el control de *P. cactorum* deberían llevar mezclas de cepas.

Resultados obtenidos con la aplicación de *Trichoderma* spp. en el control de *V. inaequalis* en huertos de manzanos , (*Malus pumila*)

Cuadro N°1.

Resultados obtenidos en la aplicación de <i>Trichoderma</i> spp, en el control (%) de <i>V. inaequalis</i>						
Tratamiento	AÑO DE TRATAMIENTO					
	2001	2002	2003		2004	
Variedad	Pink Ladie % Control	Pink Ladie % Control	Pink Ladie % Control	G. Reinders % Control	Pink Ladie % Control	G. Reinders % Control
T.longibrachiatum, T-CET c/10 días	95.6	69.75	92.29	96.94	99.68	100.0
T.longibrachiatum, T-CET c/15 días	94.2	75				
T.harzianum, T-3				95.36		100.0
T. Harzianum T7						99.5
T.harzianum T-Álamo						99.6
Testigo	94.0	55.6	88.04	93.25	99.28	99.3

En el cuadro anterior se aprecian los distintos niveles de control alcanzados sobre *V. inaequalis*, durante los cuatro años de trabajo. En el primer año se lograron resultados satisfactorios, esto bajo condiciones climáticas de bajo riesgo, sin embargo en el segundo año en una situación de alta humedad y agua libre se produjo un gran impacto del patógeno. Dada esta situación a partir del tercer año se realizó un manejo integrado, lográndose una alta protección asociando aplicaciones de *Trichoderma* spp con polisulfuro de calcio con protecciones de hasta un 100%

- 6) Fichas técnicas y análisis económico del cultivo, rubro, especie animal o tecnología que se desarrolló en el proyecto, junto con un análisis de las perspectivas del rubro después de finalizado el proyecto.

Fichas técnica Trichoderma longibrachiatum y T. harzianum formulados en suspensión:

Aplicación en Viña:

Agente controlador: *T. longibrachiatum* y *T. harzianum*.

Concentración por de esporas por ml: 10^{10} conidias.

Dosis por ha. 1.1,5 litros por ha.

Dilución del preparado: 800-1200 litros de agua.

Aplicaciones: Flor, 4-5mm., apriete racimo, pinta, precosecha.

Nivel de control: 90-98 %

Presentación: La presentación de este producto puede ser en envases de 1-2-5-10 y 20 litros.

Fichas técnica Trichoderma longibrachiatum y T. harzianum formulados en pasta:

Aplicación en huertos de manzano:

Agente controlador: *T. longibrachiatum* y *T. harzianum*.

Concentración por de esporas por gr. de pasta: 10^{10} conidias.

Dosis por árbol: 15- 35 gramos por ha. Según edad del la plantación

Dilución del preparado: de manera preventiva se puede aplicar diluyendo la pasta en una relación 1:1 en agua.

Aplicaciones: 2 veces al año, primavera y otoño.

Nivel de control: eliminación de la aparición plantas enfermas y reducción del daño en plantas con sintomatología media.

Presentación: La presentación de este producto puede ser en envase de 5-10 y 20 kilogramos.

Perspectivas futuras del rubro y evaluación económica del proyecto.

Las perspectivas del rubro en general de insumos orgánicos y en particular de las formulaciones de *Trichoderma* que se han generado, a partir del proyecto realizado, están muy relacionadas a la evolución de la superficie agrícola nacional, tanto orientada al mercado internacional como interno, bajo manejo orgánico. En la medida que esta área de la economía incrementa su volumen impulsará la producción de insumos ecológicos.

En relación al futuro también es importante destacar la necesidad de concluir con la obtención de los registros sanitarios pertinentes, para el tipo de biocontrolador desarrollado. Sin esta documentación la evolución posterior de esta iniciativa o cualquier otra del mismo tipo, se ve seriamente disminuida.

En cuanto a la evaluación económica del proyecto, en los cuadros siguientes se aprecia la rentabilidad de una planta pequeña como la analizada, y que en un plazo mediano como el considerado puede alcanzar volúmenes importantes de producción y mantener su rentabilidad en función de la demanda de las empresas que han estado asociadas al proyecto. Lo anterior constituiría un comienzo promisorio en la medida que se pueda generar en un plazo corto, el volumen que requerirán las empresas, de acuerdo a la expansión de la superficie en producción orgánica que han expresado en los últimos 2 años. A fines del año 2004 el grupo de empresarios que colaboraron con el proyecto cubrirán aproximadamente una superficie de 1000 has con este tipo de manejo productivo.

EVALUACION PROYECTO PURO (\$/ANO)

	A N O S						
	0	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Flujo de caja situación proyecto puro		30870000	29978000	38104410	47297743	53043887	61352210
INVERSIONES PARA:							
Proyecto Innovación Tecnológica	78908014						
Inversiones para escalamiento	20000000						
Capital de Trabajo para la Producción	10000000						
FLUJO NETO CAJA (\$)	-108908014	30870000	29978000	38104410	47297743	53043887	61352210
VAN (12%)	\$ 54.388.183,90						
TIR	27,5%						

FLUJO DE FONDOS DEL PROYECTO E INDICADORES DE RENTABILIDAD							
ITEM	Año						
	0	2005	2006	2007	2008	2009	2010
INGRESOS							
Venta de trichoderma		56000000	61600000	70832000	81296000	88000000	97600000
Ingresos Totales		56000000	61600000	70832000	81296000	88000000	97600000
EGRESOS							
Costos Fijos de Producción		20200000	20200000	20200000	20200000	20200000	20200000
Costos Variables de Producción		79500000	84500000	9140150	9939938	10596113	11455790
Gastos de Adm. y Ventas		2720000	2972000	3387440	3858320	4160000	4592000
Egresos Totales		30870000	31622000	32727590	33998258	34956113	36247790
UTILIDAD ANTES IMPUESTO		25130000	29978000	38104410	47297743	53043887	61352210
FLUJO NETO CAJA (M\$)		30870000	29978000	38104410	47297743	53043887	61352210

DESGLOSE DETALLADO DEL FLUJO DE CAJA						
FLUJO DE INGRESOS	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Venta de biopreparados (Unidades/kg)	3500	3850	4427	5081	5500	6100

FLUJO DE EGRESOS	2005	2006	2007	2008	2009	2010
COSTOS FIJOS	\$/U					
Gerente producción	1000000	1000000	1000000	1000000	1000000	1000000
Biólogo de producción	7200000	7200000	7200000	7200000	7200000	7200000
Técnicos (2 obreros)	6000000	6000000	6000000	6000000	6000000	6000000
Personal administrativo (2)	6000000	6000000	6000000	6000000	6000000	6000000
SubTotal CF		20200000	20200000	20200000	20200000	20200000
COSTOS VARIABLES						
Sustratos de cultivos	700000	770000	885400	1016200	1100000	1220000
Medio de cultivos	1050000	1155000	1328100	1524300	1650000	1830000
Mantenimiento y recambio activos	1500000	1500000	1500000	1500000	1500000	1500000
Energía para producción	800000	840000	882000	926100	972405	1021025
Fletes	1800000	1800000	1800000	1800000	1800000	1800000
Material de vidrio	800000	920000	1058000	1216700	1399205	1609086
Desinfectantes	500000	575000	661250	760438	874503	1005679
Frascos de vidrio para cultivo	100000	120000	140000	180000	200000	250000
Calefacción	700000	770000	885400	1016200	1100000	1220000
SubTotal CV		7950000	8450000	9140150	9939938	10596113
GASTOS ADM Y VTAS						
Personal (2)	1880000	2048000	2324960	2638880	2840000	3128000
Imprevistos (1,5% de ingresos brutos)	840000	924000	1062480	1219440	1320000	1464000
SubTotal Gtos. Adm y Vtas.		2720000	2972000	3387440	3858320	4592000

INDICES DE CORRECCION	
Precio biopreparado \$/L	16000
Kg de sustratos de cultivos para 1 L de biopreparado	0,5
Precio de sustratos de cultivos	400
Costo de medios de cultivos por kg de biopreparado	300
Costo de botellas por kg de biopreparado	150
calefacción (\$/kg biopreparado)	200

- 7) **Problemas enfrentados durante la ejecución del proyecto (legales, técnicos, administrativos, de gestión) y las medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.**

Durante el transcurso del proyecto no se presentaron problemas importantes de tipo administrativo, legales, técnicos o de gestión. Solamente se realizaron ajustes marginales de métodos experimentales en relación al aislamiento de los patógenos necesarios para realizar las pruebas de antagonismo a las diversas cepas aisladas.

Calendario de ejecución (programado, real) y cuadro resumen de costos (programados, efectivos) del proyecto. El cuadro de costos es el mismo que se presenta en el informe financiero final → financiamiento solicitado más financiamiento total.

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fechas ejecutadas (reales)		Fechas programadas		Observaciones
			Fecha Inicio	Fecha Término	Fecha Inicio	Fecha Término	
1	1.0	Aislamiento de cepas locales de <i>Trichoderma</i> spp.	Diciembre 2000	Septiembre 2004	Nov 2000	Dic 2003	Se prolongo la etapa de aislamiento a todo el proyecto.
	1.1	Aislamiento de cepas locales de <i>Trichoderma</i> spp. desde el suelo y mantillo	Diciembre 2000	Septiembre 2004	Nov 2000	Dic 2003	
	1.2	Aislamiento de cepas locales de <i>Trichoderma</i> spp. desde material compostado	Diciembre 2000	Septiembre 2004	Nov 2000	Dic 2003	
	1.3	Evaluación y selección de cepas locales de <i>Trichoderma</i> tolerantes a diferentes temperaturas (10,15 y 25°C)	Enero 2001	Octubre 2004	Nov 2000	Dic 2003	Se agregó a la evaluación la temperatura de 25°C
2	2.0	<i>Aislamiento de hongos patógenos</i>	Abril 2001	Mayo 2001	Abril 2001	Nov 2001	
	2.1	Aislamiento de <i>P. cactorum</i> desde el suelo en huertos de manzano	Enero 2001	Noviembre 2001	Abril 2001	Nov 2001	
	2.2 a	Aislamiento de <i>B. cinerea</i> desde bayas de vid.	Enero 2001	Marzo 2001	Enero 2001	Mayo 2001	

	2.2 b	Aislamiento de <i>V. inaequalis</i> desde hojas y frutos de manzano.	Enero 2001	Mayo 2001			Se aisló <i>V. inaequalis</i> para realizar las pruebas de antagonismo in vitro
	2.3	Pruebas de antagonismo con las cepas seleccionadas de <i>Trichoderma</i> v/s patógenos	Marzo 2001	Mayo 2004	Marzo 2001	Sept 2002	
	2.3.1	Pruebas in vitro de antagonismo de <i>Trichoderma</i> v/s <i>P.cactorum</i> .	Marzo 2001	Mayo 2004	Marzo 2001	Nov 2002	
	2.3.2	Pruebas in vitro de antagonismo de <i>Trichoderma</i> v/s <i>B.cinerea</i> .	Marzo 2001	Abril 2004	Marzo 2001	Sept 2002	
	2.3.3	Pruebas in vitro de antagonismo de <i>Trichoderma</i> v/s <i>V. inaequalis</i> .	Abril 2001	Mayo 2004			Se cambió la prueba in vivo por una in vitro para la evaluación de antagonismo
3	3.0	Producción masiva de cepas de <i>Trichoderma</i>, con los mejores comportamientos en las pruebas de temperatura y antagonismo.	Enero 2001	Octubre 2004	Nov 2000	Oct 2004	
	3.1	Preparación de sustrato sólido para inoculación.	Enero 2001	Octubre 2004	Nov 2000	Oct 2004	
	3.2	Preparación del inóculo de <i>Trichoderma</i> y siembra de sustrato	Enero 2001	Octubre 2004	Nov 2000	Oct 2004	
	3.3	Control de calidad del biopreparado	Enero 2001	Octubre 2004	Nov 2000	Oct 2004	
	3.3.1	Determinación de pureza del biopreparado	Enero	Octubre	Nov	Oct	

			2001	2004	2000	2004	
	3.3.2	Determinación de concentración de esporas del biopreparado	Enero 2001	Octubre 2004	Nov 2000	Oct 2004	
	3.3.3	Determinación de viabilidad de las esporas	Enero 2001	Octubre 2004	Nov 2000	Oct 2004	
4	4.0	Desarrollo de tres presentaciones de Trichoderma	Enero 2001	Octubre 2004	Nov 2000	Oct 2004	
	4.1	Preparación en suspensión líquida	Enero 2001	Octubre 2004	Nov 2000	Oct 2004	

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término	Fecha Inicio	Fecha Término	
	4.2	Preparación de pasta de Trichoderma	Enero 2001	Septiembre 2004	Nov 2000	Oct 2004	
	4.3	Preparación de sustrato sólido inoculado deshidratado.	Marzo 2001	Octubre 2004	Nov 2000	Oct 2004	
	4.4	Control de calidad de las presentaciones	Enero 2001	Octubre 2004	Nov 2000	Oct 2004	
	4.4.1	Determinación de pureza del biopreparado	Enero 2001	Octubre 2004	Nov 2000	Oct 2004	
	4.4.2	Determinación de concentración de esporas del biopreparado	Enero 2001	Octubre 2004	Nov 2000	Oct 2004	
	4.4.3	Determinación de viabilidad de las esporas	Enero 2001	Octubre 2004	Nov 2000	Oct 2004	
	4.4.4	Determinación de la viabilidad de las presentaciones del biopreparado en el tiempo	Enero 2001	Octubre 2004	Nov 2000	Oct 2004	
	4.4.5	Asesoría Técnico científica de experto Cubano en conservación y estabilización de las diferentes presentaciones de Trichoderma.	Septiembre 2001	Octubre 2001	Sep 2001	Oct 2004	
5	5.0	Aplicación y evaluación de las presentaciones a nivel de campo.	Marzo 2001	Diciembre 2004	Nov. 2000	Oct 2004	
	5.1	Aplicación de Trichoderma en manzano para control de V. inaequalis	Noviembre a Enero 2001	Noviembre 2004	Nov. 2000	Nov 2003	
	5.1.1	Evaluación del efecto del Trichoderma aplicado en manzano sobre V. inaequalis.	Marzo a Abril 2001	Marzo a Mayo 2004	Nov. 2000	Marzo 2004	
	5.2	Aplicación de Trichoderma en manzano para control de P.cactorum	Marzo a Junio y Septiembre a Diciembre	Marzo a Junio y Septiembre a Diciembre	Nov. 2000	Nov 2004	

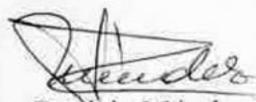
			2001	2004			
	5.2.1	Evaluación del efecto de Trichoderma en suspensión aplicado en manzano sobre <i>P.cactorum</i> .	Marzo a Abril 2001	Marzo a Abril 2004	Nov. 2000	Marzo 2004	
	5.2.2	Evaluación del efecto de Trichoderma en pasta aplicado en manzano sobre <i>P. cactorum</i> .	Marzo a Junio y Septiembre a Diciembre 2001	Marzo a Junio y Septiembre a Diciembre 2004	Nov. 2000	Marzo 2004	
	5.3	Aplicación de Trichoderma en suspensión para control de <i>B.cinerea</i> en Uva.	Noviembre a Marzo 2001	Noviembre a Marzo 2004	Nov. 2000	Enero 2004	
	5.3.1	Evaluación del efecto de Trichoderma en suspensión aplicado en Uva en el control de <i>B. Cinerea</i> .	Febrero a Marzo 2001	Febrero a Marzo 2004	Nov. 2000	Marzo 2004	
	5.4.0	Aplicación de suspensión de Trichoderma como controlador en el conjunto de los huertos frutales. Cepas C1 y C2	Diciembre 2001	Enero 2005	Marzo 2001	Enero 2005	
	5.4.1	Evaluación del efecto de Trichoderma en suspensión aplicado para el control de <i>B. cinerea</i> , <i>P. cactorum</i> , y <i>V. inaequalis</i> .	Marzo 2001	Octubre 2004	Marzo 2001	Marzo 2005	
	6.0	Difusión de las técnicas empleadas tanto en producción masiva como en el control de enfermedades fungosas, dentro de un sistema de manejo orgánico.	Noviembre 2004	Diciembre 2004	Sep 2002	Sep 2004	

- 8) Difusión de los resultados obtenidos adjuntando las publicaciones realizadas en el marco del proyecto o sobre la base de los resultados obtenidos, el material de difusión preparado y/o distribuido, las charlas, presentaciones y otras actividades similares ejecutadas durante la ejecución del proyecto.

RESUMEN FINAL INFORME FINANCIERO

**Proyecto "Producción y utilización de Trichoderma sp. en el control de enfermedades
fungosas en sistemas de producción de fruta orgánica de exportación en la zona
central de Chile", COO-1-A-156**

ITEM	Aporte FIA			Aporte Contraparte		
	Programado	Efectivo	Saldo	Programado	Efectivo	Saldo
1. Personal de Investigación	32.585.824	32.585.818	6	50.867.414	49.868.438	1.000.976
2. Sub Contratos	5.040.263	5.040.263	0			
3. Materiales e Insumos	10.024.366	9.826.334	257.982	11.580.184	10.958.184	624.000
4. Equipos e Infraestructura	0	0	0	30.590.416	30.293.392	297.024
5. Difusión	3.283.400	2.438.447	844.953			
6. Movilización	7.482.554	7.320.744	161.810			
7. Gastos Generales	3.673.405	3.722.971	-49.566			
8. Imprevistos	1.481.919	619.739	842.130			
Total	63.611.731	61.554.416	2.057.315	93.038.014	91.116.014	1.922.000



Patricia Méndez U.
Gerente Administración CET

Santiago, 15 de Diciembre de 2004



"Producción y utilización de *Trichoderma* sp. en el control de enfermedades fúngicas en sistemas de producción de fruta orgánica de exportación en la Zona Central de Chile."

Agrícola Mira-Ríos.
Huertos orgánicos de Chile.
Frutícola Vicento S.A.
Viñedos Orgánicos Emiliana S.A.

2004

Objetivo General del Proyecto:

Aislamiento, evaluación, producción y abastecimiento de *Trichoderma* spp. a empresas agrícolas en la zona central de Chile, para el control de enfermedades fúngicas, en producción orgánica de Vid, (*Vitis vinifera*) y manzanas de exportación (*Mallus pumila*).

Objetivos específicos:

- Aislamiento de variedades locales de *Trichoderma* sp. tolerantes a 3 niveles de temperatura, 10-15 y 25 °C.
- Evaluación in vitro de cepas locales de *Trichoderma*, en el control de *B. cinerea* en parronal y viña; *V. inaequalis* y *P. cactorum* en manzanos de exportación.
- Producción masiva de variedades de *Trichoderma* sp.
- Diseño y evaluación de tres presentaciones de *Trichoderma*:
Líquida: para aplicación foliar en control de *B. cinerea* y *V. inaequalis*.
Pasta: para aplicación local en lesiones ocasionadas por *P. cactorum*.
Polvo: deshidratado para conservación.
- Aplicación y evaluación de los biopreparados de *Trichoderma* spp. a nivel de campo en huertos de manzano, viña y parronal.

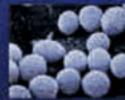
Introducción

- El género *Trichoderma* es un grupo de hongos que por sus características microbiológicas se utiliza como controlador de patologías vegetales. Se ha probado su viabilidad técnica, económica, y es aceptado por la normativa que regula la producción orgánica a nivel mundial.



Clasificación.

- Pertenecce a la subdivisión Deuteromycotina (hongos imperfectos), se caracterizan por carecer de estructuras o reproducción sexual.
- *Trichoderma* es un hongo anaerobio facultativo que se encuentra naturalmente en diversos sistemas agrícolas y naturales (materia orgánica).



Características del género

- Se encuentra en diversos hábitat naturales, suelo, madera en descomposición, superficie de raíces
- Crece saprofiticamente
- Crece como parásito hacia las hifas de otros hongos, alrededor de ellas y atacando el micelio del hospedero
- Actúa como promotor de crecimiento de las plantas (complejo enzimático)



Búsqueda de *Trichoderma* en Zonas de baja intervención.

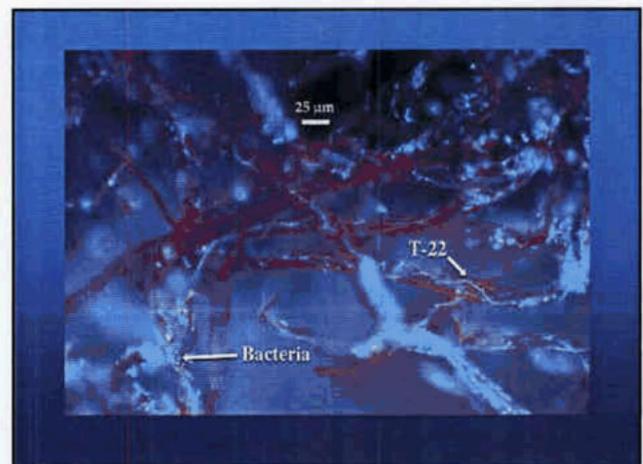


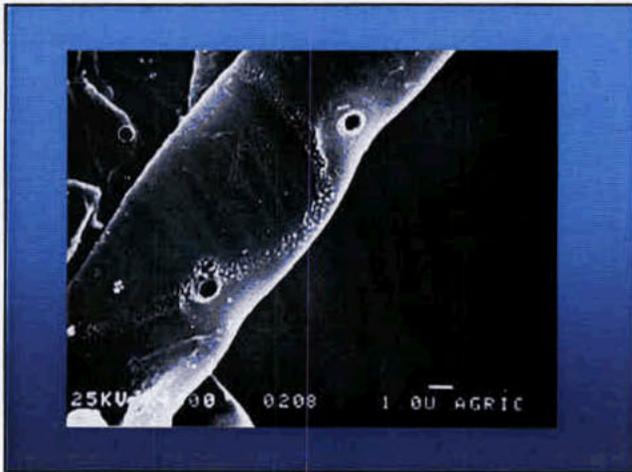
Busqueda de aislados en sistemas sin uso de químicos



MECANISMOS DE ACCIÓN

- **COMPETENCIA** (espacio-sustratos-nutrientes) exudados de semillas estirulantes de zarzaparrós.
- **ANTIBIOSIS** (micotoxinas) kradin, glicoxin, glioviridol, trichodermin.
- **MICOPARASITISMO** (enzimas líticas) B1,3 glucanasa, quitinasa, proteasas (control de B. cinerea).
- **Inducción de resistencia en las plantas.**
Relación simbiótica subepidérmica, espacios intercelulares desencadena producción de terpenos, terpenoides peroxidasa (fungitóxicos) etileno.





REPRODUCCION

Fermentación líquida

Medio de cultivo en movimiento.
Componentes solubles en agua.
Menor concentración producto final.
Conidios con paredes delgadas.
Menor resistencia sobre 30 °C

Fermentación sólida :

Medio de cultivo estático.
Medio Insoluble en agua.
Mayor concentración del producto final (conidias).
Conidias de Paredes gruesas.
Mayor resistencia sobre 30°C.

- Las conidias son el principal componente viable, por lo que cualquier producto en base a este organismo debe contener la mayor proporción de estas en su formulación.
- Existen diversos mecanismos para extraer y conservar las conidias de *T. harzianum*, siendo el secado spray el método que mejor resultados ha dado para mantener las condiciones de viabilidad (cerca al 100%), esterilidad y características físicas necesarias para su comercialización.

Conidias germinando



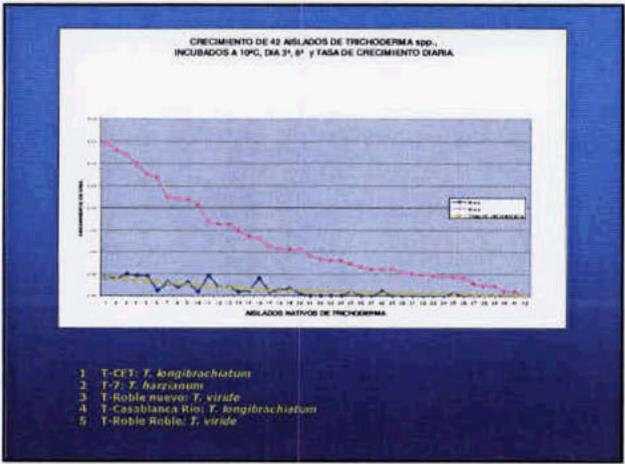
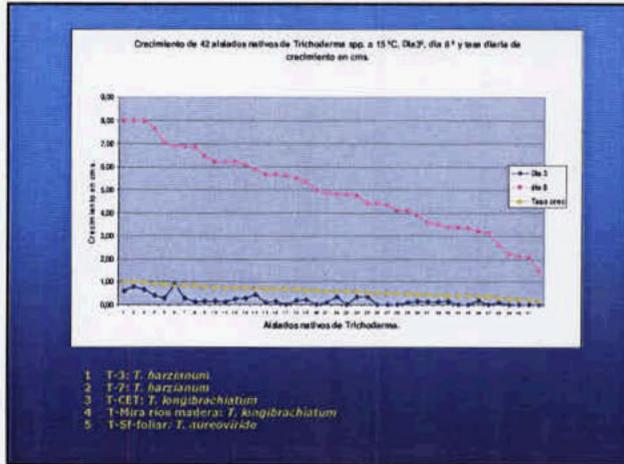
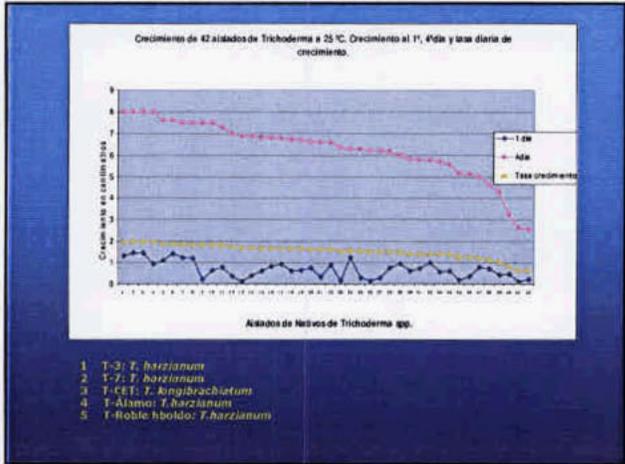
Producción en medio sólido



Aislamiento y evaluación "in vitro" de Cepas nativas de Trichoderma.

Especies y cepas del Genero Trichoderma que se aislaron en el Proyecto	
Especies aisladas	Nº Cepas
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai aggr.	15
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai	8
<i>Trichoderma anomorfo de Hypocrea orientalis</i> Samuels & O.Petrini	1
<i>Trichoderma viride</i> Pers.aggr.	9
<i>Trichoderma parceramosus</i> Bisset	1
<i>Trichoderma aureoviride</i> Rifai	1
<i>Trichoderma inhamatum</i> Veerkamp & W.Gams	1
<i>Trichoderma atroviride</i> P.Karsten	1

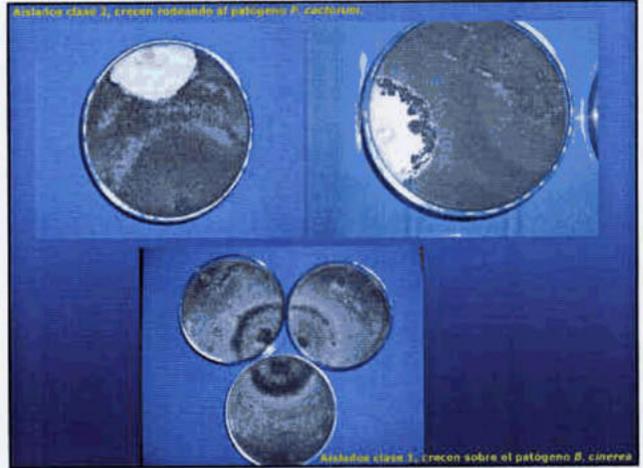
Aislamiento de cepas nativas de *Trichoderma* sp. y selección por crecimiento en cámara de incubación a 10, 15 y 25°C.



Evaluación de la capacidad antagonica de las cepas aisladas.

Escala de antagonismo (Bell, 1982)

- 1 Trichoderma cubre completamente al patógeno y toda la superficie del medio
- 1 y 2 Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. No se observan límites definidos entre ambos, con crecimiento en forma agregada sobre el patógeno.
- 2 Trichoderma crece cubriendo más de dos tercios del medio. Se observan límites definidos entre el patógeno y el antagonista
- 3 Trichoderma y el patógeno, cada uno coloniza aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno aparece dominando al otro.
- 4 El patógeno coloniza al menos dos tercios de la superficie del medio



Productos desarrollados por el Proyecto

Productos desarrollados por el Proyecto

	Concentración esporas/ml o gramo	Control	Aplicación
Trichoderma Suspensión	10^{10}	<i>B. cinerea</i>	Viña y parrón Flor, 4-5 mm, aprete racimo, pinta, precosecha.
Pasta Trichoderma	10^{12}	<i>P. Cactorum</i>	Manzanos Dos veces al año, primavera y otoño base del árbol
Polvo seco formulado	10^{10}	<i>B. cinerea</i>	Viña y parrón Flor, 4-5 mm, aprete racimo, pinta, precosecha.

Productos Finales



Polvo Seco, Pasta y Suspensión

Efecto de la aplicación de cepas nativas de *Trichoderma spp.* formulado en pasta y suspensión, sobre la producción de fruta en plantas de manzano, con distintos niveles de daño por *P. cactorum*, Frutícola VICONTO, Predio Los Pretiles

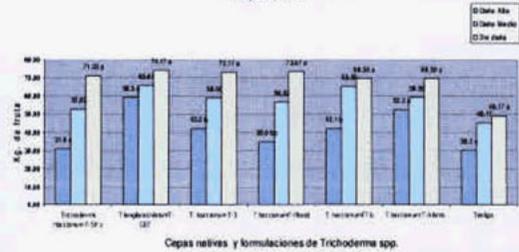
Predio Los Pretiles

Efecto de la aplicación de 4 presentaciones de *Trichoderma longibrachium* sobre la producción de fruta en manzanos Malus Plumla, var Green Fuji Temporal, 2000-2001

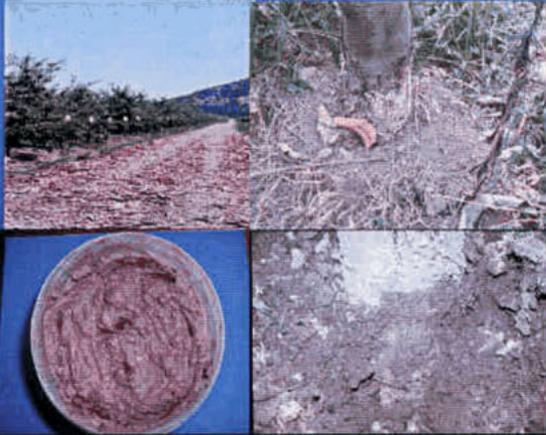


Gr. de estadística

Efecto de la aplicación de 4 cepas de *Trichoderma spp.* y dos formulaciones sobre la producción de fruta en manzanos, Malus pumila, var Green Fuji, con tres niveles de daño por *P.cactorum*
Predio Los Pretiles, Temporada 2000-2001



Aplicación de pasta de *Trichoderma* para control de *P. cactorum*
Frutícola VICONTO



Frutícola VICONTO

Efecto de la aplicación de cepas nativas de *Trichoderma* spp. formulado en suspensión, en el control de *V. inaequalis* en huertos de manzano.
Agrícola Mira-Rios



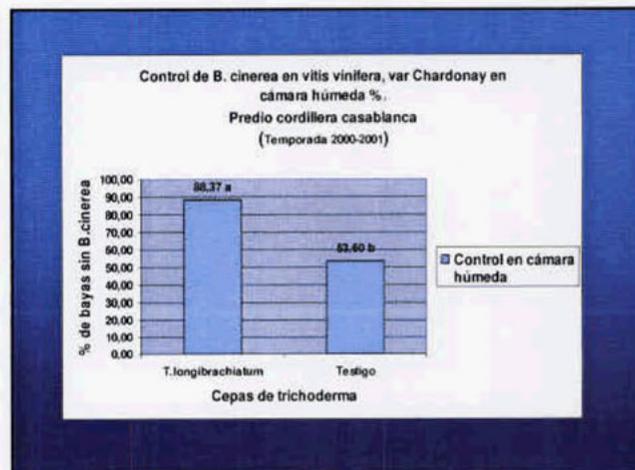
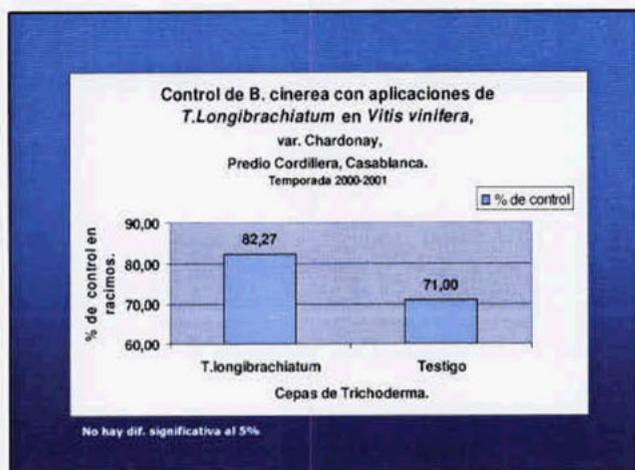
Agrícola Mira-Rios



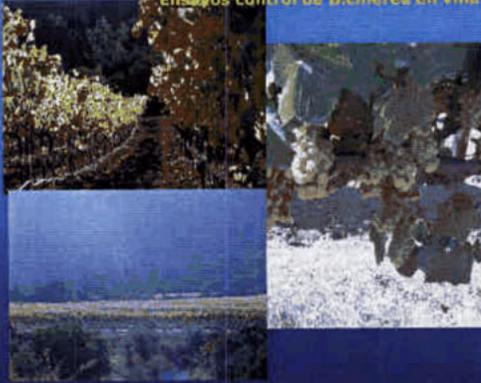
Resultados obtenidos en la aplicación de *Trichoderma* spp. en el control (%) de *V. maculata*.

Tratamiento	AÑO DE TRATAMIENTO					
	2001	2002	2003		2004	
Variedad	Pink Lady- no Control	Pink Lady- no Control	Pink Lady- no Control	O. Reinolera % Control	Pink Lady- % Control	O. Reinolera % Control
<i>T. longibrachiatum</i> , T-CET c/10 días	95.8	88.25	92.20	86.94	98.68	100.0
<i>T. longibrachiatum</i> , T-CET c/15 días	95.2	75				
<i>T. harzianum</i> , T-3				95.36		100.0
<i>T. harzianum</i> T7						99.5
<i>T. harzianum</i> T-Alamo						99.6
Testigo	94.0	55.6	88.04	93.25	98.28	99.3

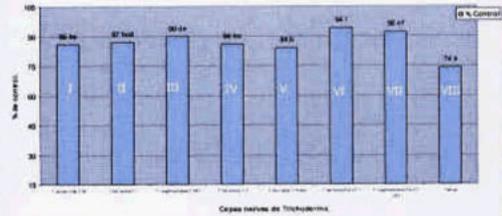
Evaluación de Cepas nativas de *Trichoderma* spp. en el control de *B. cinerea* en *Vitis vinifera* Var. Chardonay. Viñedos Orgánicos Emiliana, Predio Cordillera



Ensayos control de *B.cinerea* en viña

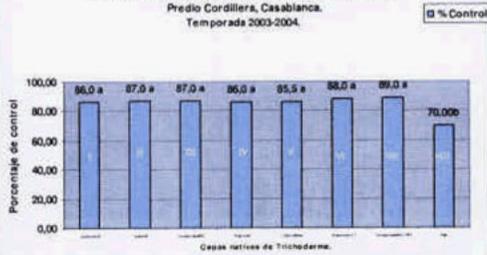


Evaluación de 5 cepas de *Trichoderma* spp. y 2 formulaciones en el Control de *Borys* en *Vitis vinifera*, var. Chardonay, Predio Cordillera, Casablanca, Temporada 2003-2004



- | | |
|--------------------------------|---------------------------|
| I. <i>T. Shilpige Sibirica</i> | I. <i>T. versicolor</i> |
| II. T-2 | I. <i>harzianum</i> |
| III. TCEP | I. <i>longibrachiatum</i> |
| IV. T-3 | I. <i>harzianum</i> |
| V. T-8000 | I. <i>harzianum</i> |
| VI. T-2 Pulvis | I. <i>harzianum</i> |
| VII. TCEP Pulvis | I. <i>longibrachiatum</i> |
| VIII. Testigo | |

Control de *B. cinerea* en bayas de *Vitis vinifera*, var. Chardonay, dispuestas en cámara húmeda. Predio Cordillera, Casablanca, Temporada 2003-2004.



- | | |
|--------------------------------|---------------------------|
| I. <i>T. Shilpige Sibirica</i> | I. <i>T. versicolor</i> |
| II. T-2 | I. <i>harzianum</i> |
| III. TCEP | I. <i>longibrachiatum</i> |
| IV. T-3 | I. <i>harzianum</i> |
| V. T-8000 | I. <i>harzianum</i> |
| VI. T-2 Pulvis | I. <i>harzianum</i> |
| VII. TCEP Pulvis | I. <i>longibrachiatum</i> |
| VIII. Testigo | |

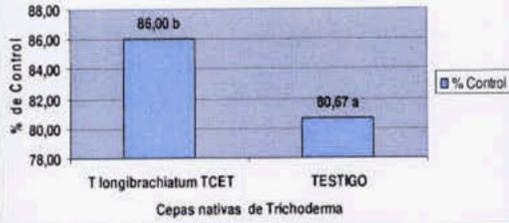
Evaluación de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en el control de *B. cinerea* en uva de mesa var. Red Globe.

Viñedos Orgánicos Emiliana.

Predio Los Rubles.

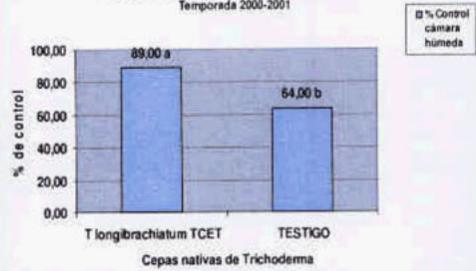
Evaluación de *T. longibrachiatum* en el control de *B. cinerea* en Uva de mesa Var. Red Globe.

Predio Los Robles Viñedos Orgánicos Emiliana, Temporada 2000-2001



Control de *B. cinerea* sobre bayas dispuestas en cámara húmeda. Uva de mesa Var. Red Globe.

Predio Los Robles, Viñedos Orgánicos Emiliana, Temporada 2000-2001

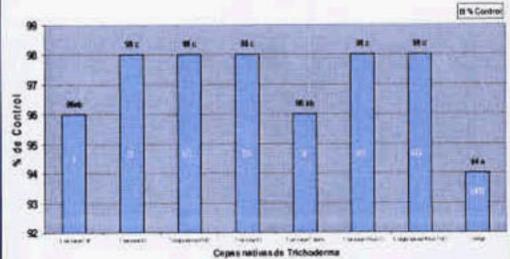


Control de *B. cinerea* en Parronal



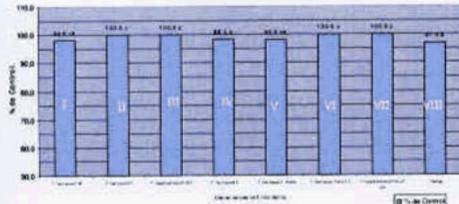
Evaluación de 5 cepas y 2 formulaciones de Trichoderma en el control de *B. cinerea*, % en uva de mesa Var. Red Globe.

Predio Los Robles Viñedos Orgánicos Emiliana, Temporada 2003-2004



- | | |
|-----------------------------|---------------------------|
| I. <i>T. Shilpae holzii</i> | <i>T. autotrophicum</i> |
| II. <i>T. 2-7</i> | <i>T. longibrachiatum</i> |
| III. TCET | <i>T. longibrachiatum</i> |
| IV. <i>T. 3</i> | <i>T. longibrachiatum</i> |
| V. <i>T. 4</i> | <i>T. longibrachiatum</i> |
| VI. <i>T. 5</i> | <i>T. longibrachiatum</i> |
| VII. TCET Polvo | <i>T. longibrachiatum</i> |
| VIII. Testigo | |

Control de *B. cinerea* en cepas de Uva de Mesa var Red Globe, después de cámara fumada.
Prado Los Roldos, Vinateria Organica Española,
Temporada 2003-2004



I - T. thalysa isolado	T. aurantiacum
II - T-2	T. harzianum
III - TCE1	T. longibrachiatum
IV - T-3	T. abramsii
V - T-1000	T. harzianum
VI - T-2 Polvo	T. harzianum
VII - TCE1 Polvo	T. longibrachiatum
VIII - T-1000	

Conclusiones

- Se aislaron y evaluaron 8 especies y 42 cepas de Trichoderma.
- Se definieron cepas con comportamientos diferenciados a 10-15 y 25 °C.
- Se evaluó en viña; parronal y huertos de manzano el comportamiento de 6 cepas de Trichoderma.
- Se lograron adecuados niveles de control de *B. cinerea* con *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*.
- Se controló la aparición de *P. cactorum* en huertos de manzano con una formulación en pasta de *T. longibrachiatum* y *T. harzianum*.
- Se lograron 3 productos finales formulados, pasta, suspensión y polvo.



TRICHODERMA *spp.*

CONTROLADOR BIOLÓGICO
DE ENFERMEDADES FUNGOSAS DE LAS PLANTAS

Los Robles 2004

Introducción

- El género *Trichoderma* es un grupo de hongos que por sus características microbiológicas se utiliza como controlador de patologías vegetales. Se ha probado su viabilidad técnica y económica, y es aceptado por la normativa que regula la producción orgánica.
- El uso del *Trichoderma* no presenta contraindicaciones y es inocuo tanto para el hombre como para animales domésticos y silvestres.

Clasificación.

- Trichoderma* es un hongo anaerobio facultativo que se encuentra naturalmente en diversos sistemas agrícolas y naturales (materia orgánica.)
- Pertenece a la subdivisión Deuteromycotina (hongos imperfectos), se caracterizan por carecer de estructuras o reproducción sexual.

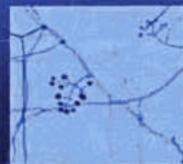
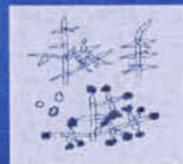
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Conidióforos erectos con ramificaciones usualmente opuestas

Las ramas se estrechan hacia el ápice donde se ubican las conidias

Las conidias son ovoides y se producen sucesivamente desde las puntas de las filídes

Colonias con crecimiento rápido filamentosos esporulantes de color blanco, amarillo o verde



Otras Características del género

- Se encuentra en diversos hábitat naturales, suelo, madera en descomposición, superficie de raíces
- Crece saprofiticamente
- Crece como parásito hacia las hifas de otros hongos, alrededor de ellas y atacando el micelio del hospedero
- Actúa como promotor de crecimiento de las plantas (complejo enzimático)

- Las conidias son el principal componente viable, por lo que cualquier producto en base a este organismo debe contener la mayor proporción de estas en su formulación.
- Existen diversos mecanismos para extraer y conservar las conidias de *T. harzianum*, siendo el secado spray el método que mejor resultados ha dado para mantener las condiciones de viabilidad (cerca al 100%), esterilidad y características físicas necesarias para su comercialización (Awad, 1993).

- La capacidad protectora del género *Trichoderma* sobre las plantas ocurre a través de una relación simbiótica muy similar a la que ocurre entre las bacterias fijadoras de nitrógeno y las raíces de plantas leguminosas.

- El agente biocontrolador *Trichoderma* spp. presenta antagonismo hacia diversos hongos fitopatógenos como:

Sclerotium solfii, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora cactorum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae*, *Fusarium dianthi* y *Chondostereum purpureum*, *Venturia inaequalis*, *Phytophthora* spp.,

MECANISMOS DE ACCIÓN

- **COMPETENCIA** (espacio-sustratos-nutrientes) exudados de semillas estimulantes de parásitos

- **ANTIBIOSIS** (micotoxinas) viridin, gliotoxin, glioviridin, trichodermin

- **MICOPARASITISMO** (enzimas líticas) B1,3 glucanasa, quitinasa, proteasas (control de *B. cinerea*)

- **Inducción de resistencia en las plantas.** Relación simbiótica subepidérmica, espacios intercelulares desencadena producción de terpenos, terpenoides peroxidasa (fungitóxicos) etileno.

REPRODUCCION

Fermentación líquida

Medio de cultivo en movimiento libre

Componentes solubles en agua

Menor concentración producto final

Conidios con paredes delgadas

Menor resistencia sobre 30 °C

Fermentación sólida

No fluye libremente

Insolubles en agua

Mayor concentración

Paredes gruesas

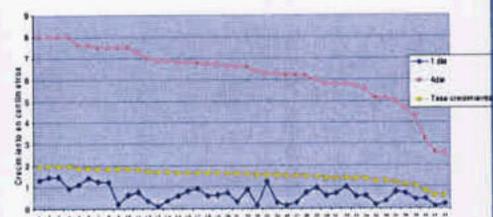
Mayor resistencia

Ventajas Y Desventajas

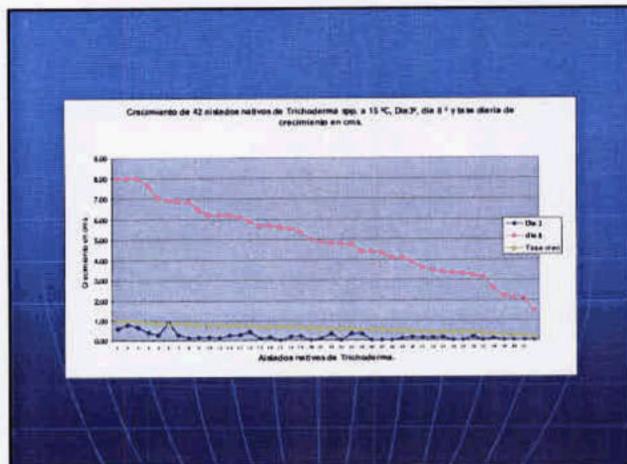
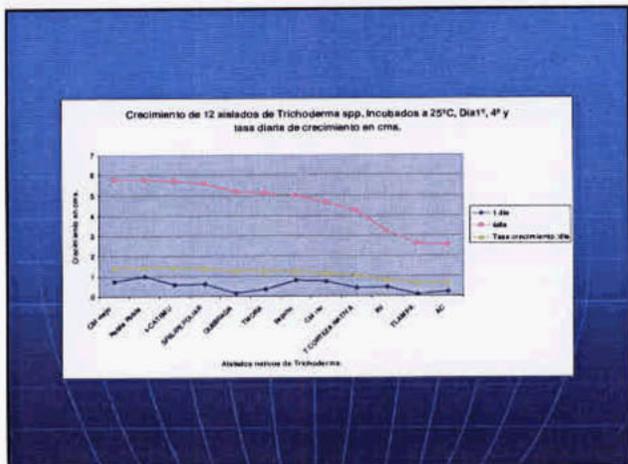
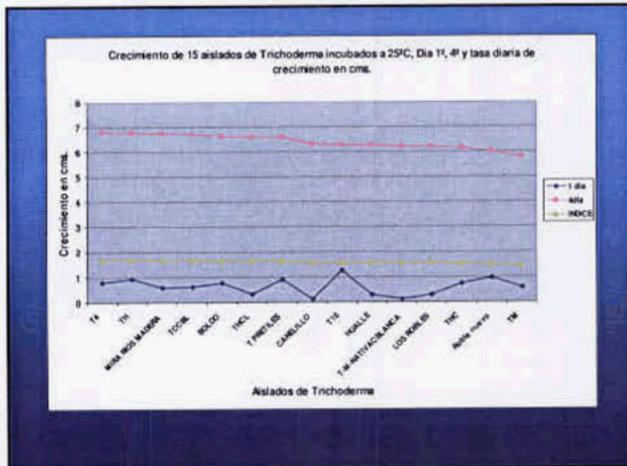
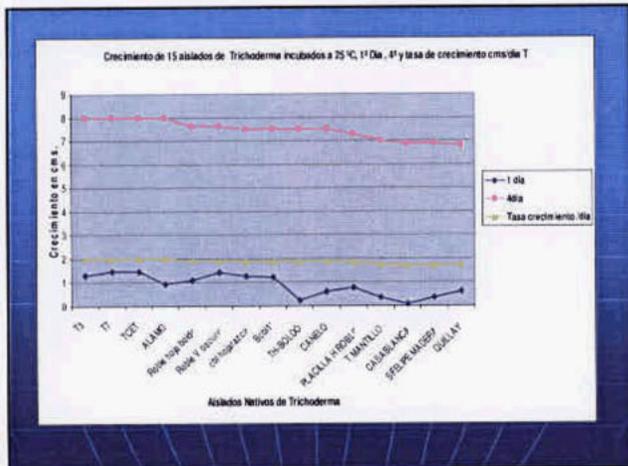
- Los biofungicidas son inocuos o provocan un mínimo efecto en el medio ambiente.
- Las cepas de controladores naturales obtenidas localmente están más adaptadas a las condiciones locales de cada zona o país.

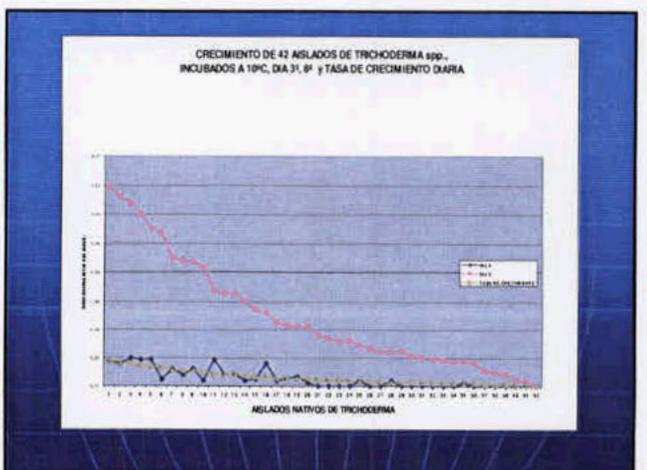
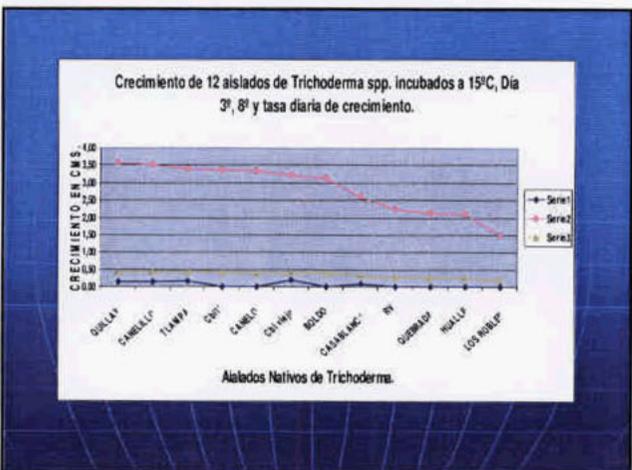
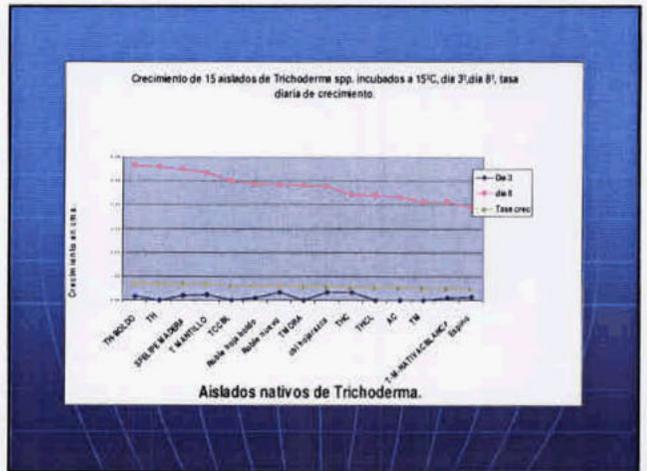
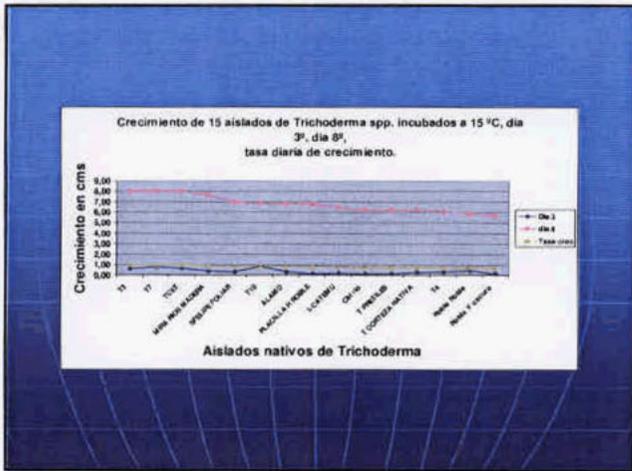
Aislamiento de cepas nativas de *Trichoderma* y selección por crecimiento en cámara de incubación a 10, 15 y 25°C.

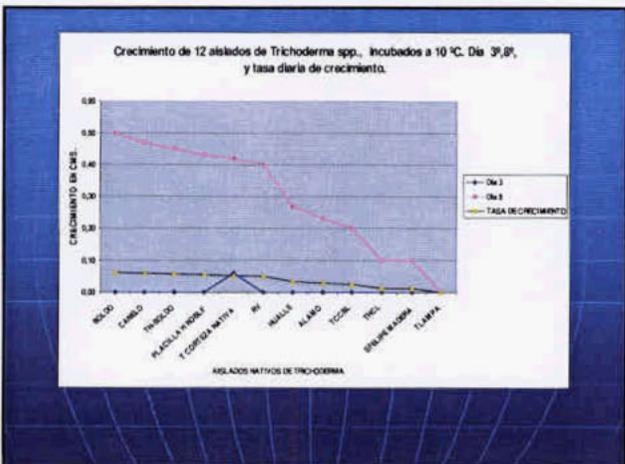
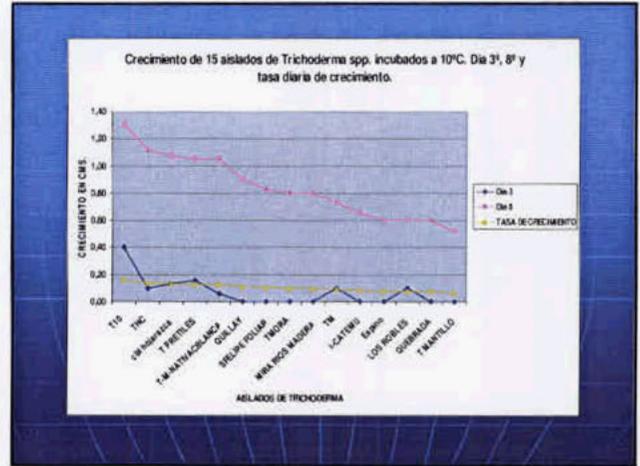
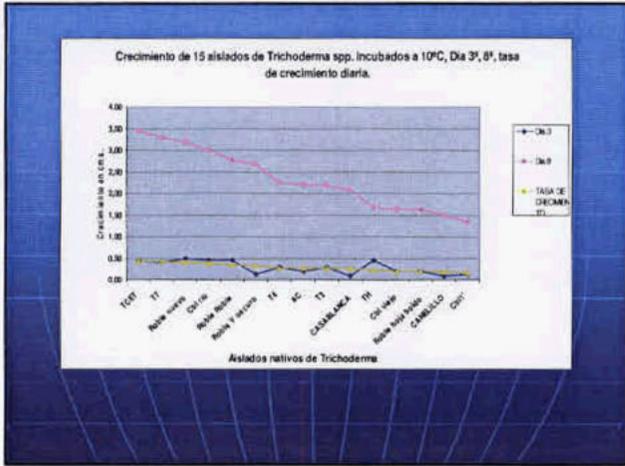
Crecimiento de 42 aislados de *Trichoderma* a 25 °C. Crecimiento al 1^o, 4^{to} y 10^{to} día de crecimiento.



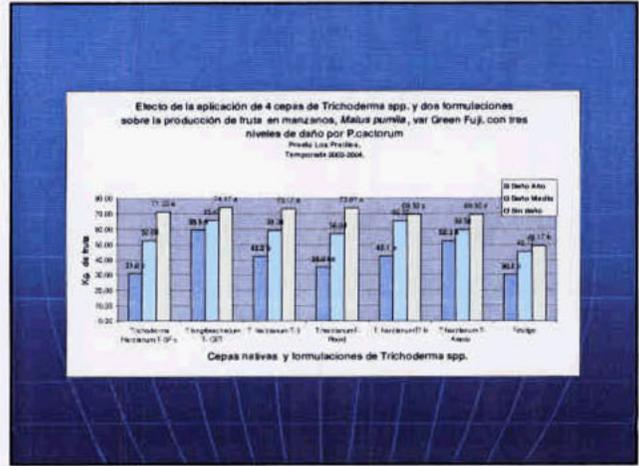
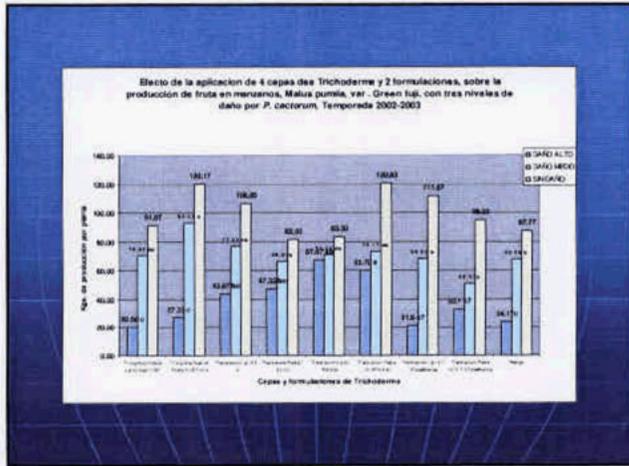
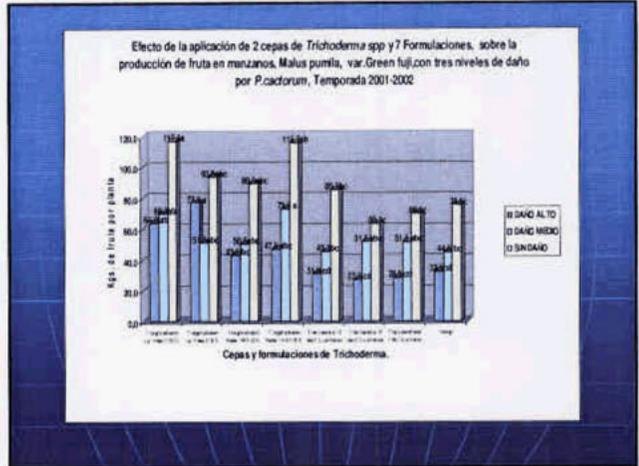
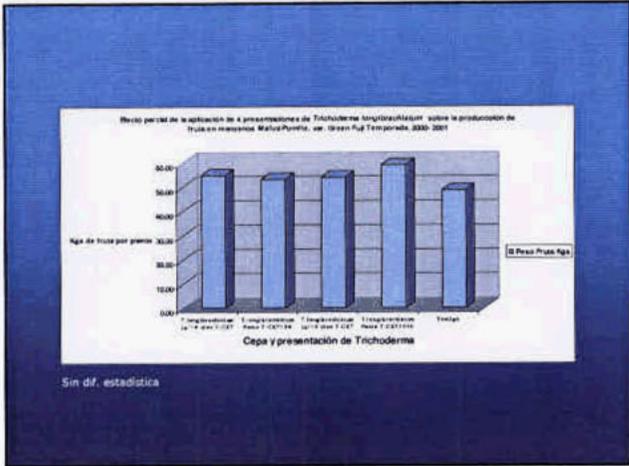
Aislados de Nativos de *Trichoderma* spp.





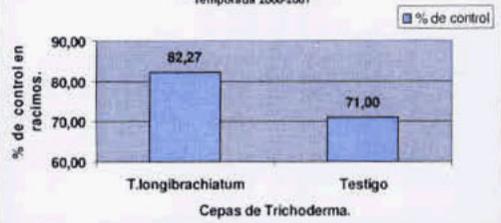


Efecto de la aplicación de cepas nativas de *Trichoderma* spp. formulado en pasta y suspensión sobre la producción de plantas de manzano, con distintos niveles de daño por *P. cactorum*. (Sin daño, daño medio y daño alto)



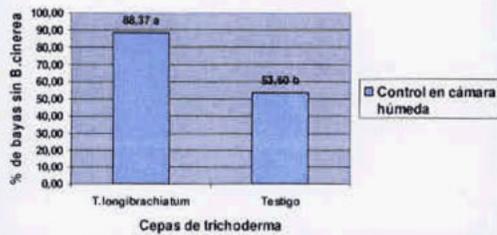
Evaluación de Cepas nativas de Trichoderma en el control de *B. cinerea* en *Vitis vinifera* Var. Chardonay. Predio Cordillera Viñedos Orgánicos Emiliana.

Control de *B. cinerea* con aplicaciones de *T. Longibrachiatum* en *Vitis vinifera*, var. Chardonay, Predio Cordillera, Casablanca. Temporada 2000-2001

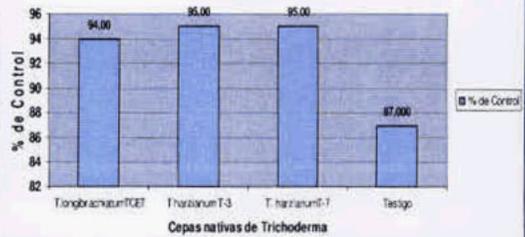


No hay dif. significativa al 5%.

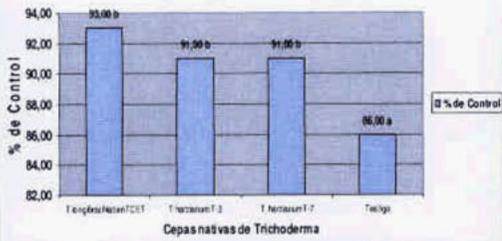
Control de *B. cinerea* en *Vitis vinifera*, var. Chardonay en cámara húmeda %. Predio cordillera casablanca (Temporada 2000-2001)



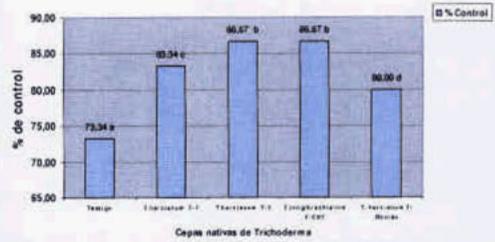
Control de *B. cinerea* en *Vitis vinifera* var. Chardonay, Predio Cordillera Viñedos Orgánicos Emiliana, Temporada 2001-2002



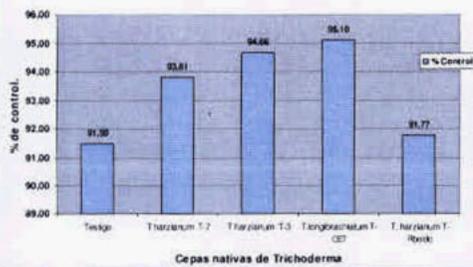
Control de *B. cinerea* en *Vitis vinifera* var. Chardonnay, bayas dispuestas en cámara húmeda
 Predio Cordillera, Viñedos Orgánicos Emiliana, Temporada 2001-2002



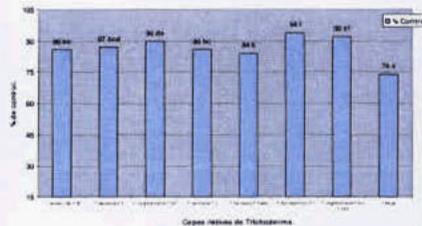
Evaluación de 4 cepas de *Trichoderma* en el Control de *B. cinerea* en *Vitis vinifera* var. chardonnay.
 Predio Cordillera, Casablanca, Temporada 2002-2003



Control de *B. cinerea* en bayas de *Vitis vinifera*, var Chardonnay, en cámara húmeda,
 Predio Cordillera Casablanca, Temporada 2002-2003



Evaluación de 7 cepas de *Trichoderma* spp. en el Control de *Botrytis* en *Vitis vinifera*, var. Chardonnay,
 Predio cordillera, Casablanca, Temporada 2002-2003

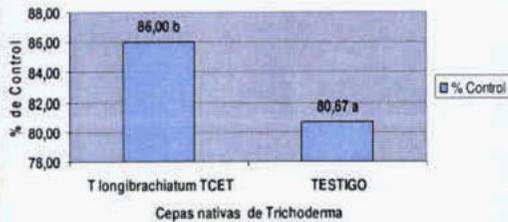


Control de *B. cinerea* en bayas de *Vitis vinifera*, var. Chardonnay, dispuestas en cámara húmeda.
 Predio Cordillera, Casablanca.
 Temporada 2003-2004.

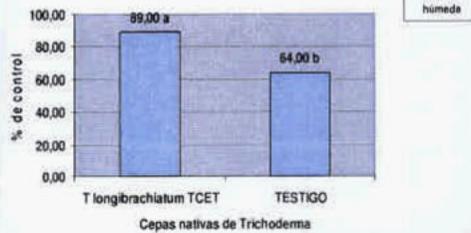


Evaluación de cepas nativas de *Trichoderma* en el control de *B. cinerea* en uva de mesa var. Red Globe.
 Predio Los Robles Viñedos Orgánicos Emiliana.

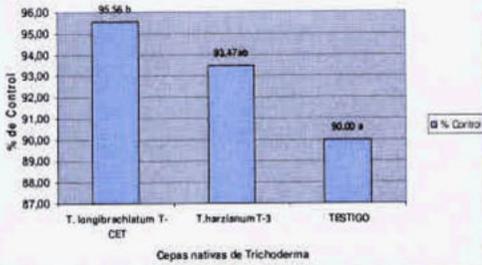
Evaluación de *T. longibrachiatum* en el control *B. cinerea* en Uva de mesa Var. Red Globe.
 Predio Los Robles Viñedos Orgánicos Emiliana.
 Temporada 2000-2001



Control de *B. cinerea* sobre bayas dispuestas en cámara húmeda. Uva de mesa Var. Red Globe.
 Predio Los Robles, Viñedos Orgánicos Emiliana
 Temporada 2000-2001

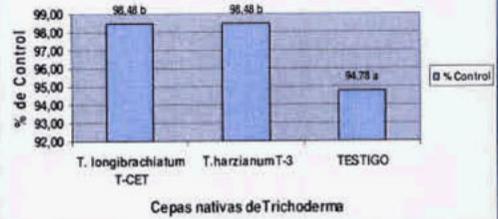


Evaluación de 2 cepas de *Trichoderma* spp. en el control de *B.cinerea*, % en uva de mesa var. Red Globe, Predio Los Robles Viñedos Orgánicos Emiliana, Temporada 2001-2002



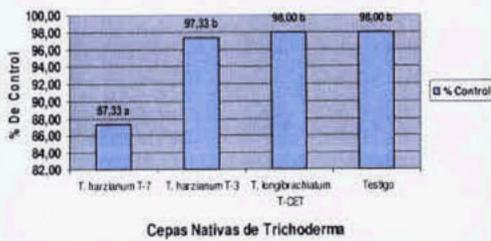
Control de *B. cinerea* en bayas dispuestas en cámara húmeda. Uva de mesa var. Red Globe.

Predio Los Robles, Viñedos orgánicos Emiliana, Temporada 2001-2002



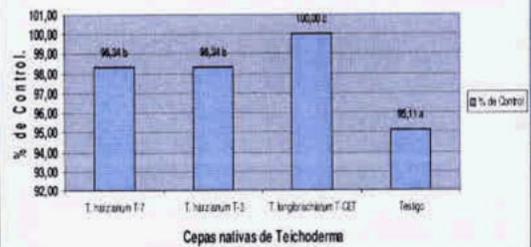
Evaluación de 3 cepas de *Trichoderma* en el control de *B.cinerea*, % en uva de mesa var. Red globe

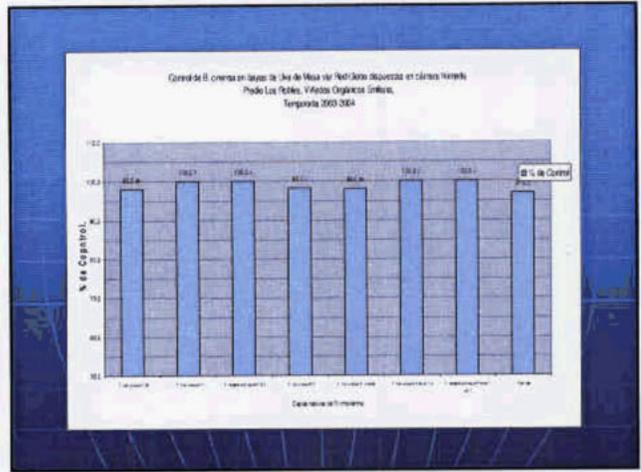
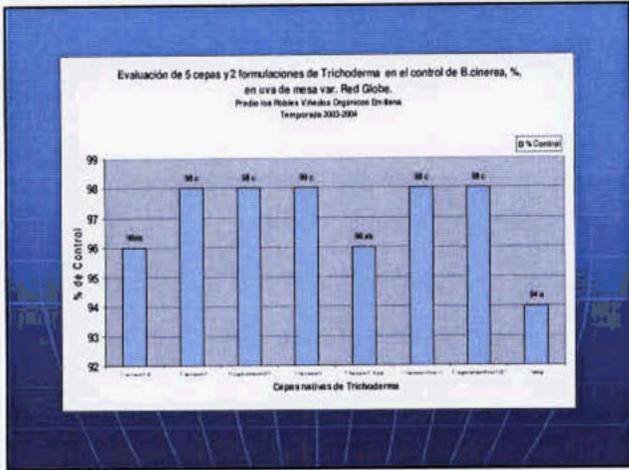
Predio los Robles Viñedos Orgánicos Emiliana, Temporada 2002-2003



Control de *B. cinerea* en Bayas de Uva de mesa . Var. Red Globe dispuestas en cámara húmeda, tratadas con cepas nativas de *Trichoderma* spp

Predio los Robles, Viñedos Orgánico Emiliana, Temporada 2003-2003







Colonia de Trichoderma nativo creciendo en madera de álamo



Crecimiento de diversas colonias de Trichoderma



Prueba de crecimiento dual.



Aislados clase 1, crecen sobre el patógeno.



Evaluación de campo de diversas cepas de *Trichoderma*.



Formulación en pasta, para el control de *P. cactorum*.



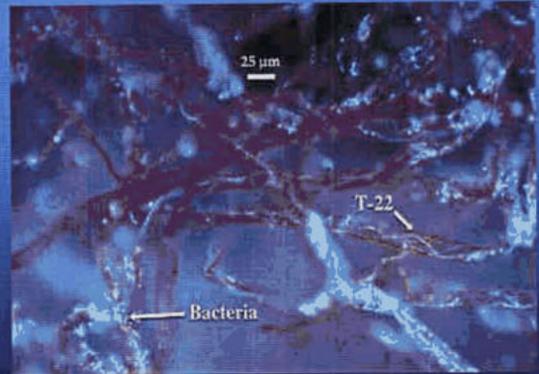
Obtención de esporas secas para formulación en polvo.



Aplicación de pasta de *Trichoderma* para control de *P. cactorum* en manzanos



Aplicación de pasta de *Trichoderma* para control de *P. cactorum* en manzanos



25 μm

T-22

Bacteria



25KV X1000 0208 1.0U HGRIC



Halo de inhibición *B. cinerea*



Antibiosis y micoparasitismo de *P. cactorum*



Producción en medio sólido



Trichoderma, conidias deshidratadas.

- 9) **Impactos del proyecto: descripción y cuantificación de los impactos obtenidos, y estimación de lograr otros en el futuro, comparación con los esperados, y razones que explican las discrepancias.**

a) Impacto Económico

1) En este plano los impactos estimados inicialmente coinciden con los obtenidos. Actualmente las empresas que participaron en el proyecto alcanzan aproximadamente las 1000 has de producción orgánica y a partir del año 2005 solo se utilizarán para el control de *B. cinerea* y *P. cactorum* controladores logrados con el proyecto. Para lograr este objetivo se estructuró una empresa responsable de producir y comercializar estos insumos para abastecer inicialmente a las empresas del proyecto y en lo sucesivo debiera entrar al mercado ampliado de insumos orgánicos a nivel nacional, la empresa mencionada es ITAS S.A. constituida especialmente para desarrollar este objetivo con el doble objetivo de continuar con la investigación y mantener estos controladores en el mercado nacional.

2) Este proyecto contribuyó en lo económico a la incorporación de la producción de uva de mesa, viña y manzanas orgánicas, en la actividad productiva y económica habitual, de las empresas que participaron del proyecto y en el mercado de fruta orgánica internacional tanto europeo como norteamericano.

3) Este proyecto contribuyó a la generación de una unidad de formación técnica y de generación de conocimiento, destinada a la investigación y desarrollo de insumos orgánicos entre otros del antagonista *Trichoderma* spp. que debiera ser sustentable en el tiempo y contribuir a la formación de capital humano que realice su aporte en los sistemas agrarios, que deberán introducir la

sustentabilidad como variable activa en el diseño y concepción de sus unidades de producción.

4) Obtención de mayores ingresos por ha. de tierra en producción de fruta orgánica, estos precios premio alcanzan hasta un 15-20% de mayor valor, lo que permite desarrollar las normas técnicas que este tipo de producción involucra, como es el reciclaje de material orgánico y su utilización lo que determina un mayor uso de mano de obra.

b) Impacto Social

Este proyecto contribuyo a la estabilización de los sistema de producción de fruta orgánica en la zona central, incrementando la absorción de mano de obra ya que estos sistemas utilizan un mayor número de personas por ha. de producción.

Disminución del riesgo de intoxicación del personal que trabaja en estos sistemas.

El proyecto logró una novedosa articulación interinstitucional para superar el problema de obtención de insumos biológicos viables, técnica y económicamente. Se abrió una relación que permitió superar en estas empresas la desconfianza a involucrarse en proyectos de desarrollo tecnológico, lo que permitirá en el futuro la generación de nuevas iniciativas de innovación tecnológica.

c) Impacto ambiental

La aplicación de la tecnología desarrollada contribuye notablemente al desarrollo de la agricultura orgánica, al generar un instrumento biológico de control de enfermedades de importancia económica en huertos de manzano, viñas y parrones. Este biocontrolador de bajo impacto ambiental, al utilizarse en la producción orgánica de frutales genera una serie de externalidades positivas sobre el medio ambiente, entre ellos podemos mencionar la eliminación del uso de funguicidas sintéticos y de todo tipo de elementos de síntesis química de los

predios involucrados. Así como viabilizar el desarrollo de un sistema armónico con el entorno incorporando el reciclamiento de todos los desechos orgánicos generados en la actividad frutícola, mejorando permanentemente las condiciones del suelo, incorporando la producción animal diseñando y manejando sistemas integrados y diversificados de producción.

Estos sistemas siempre mejoran la diversidad, el reciclaje, la capacidad de retención de agua, disminuyen la erosión y la contaminación del suelo y del agua de riego. Una condición fundamental para que este tipo de sistema funcione, es participar en un mercado regulado por una normativa muy estricta, cumplir con ella y contar establemente con el abastecimiento de insumos biológicos como el que generado por el presente proyecto.

Los impactos obtenidos sobrepasan las expectativas iniciales, las razones de esta condición corresponden a las siguientes:

- 1) Alto compromiso de las empresas asociadas en la ejecución del proyecto.
- 2) Compromiso del conjunto de la corporación CET en el desarrollo de la iniciativa propuesta al FIA.
- 3) En el plano experimental el aislamiento e identificación de cepas con alta capacidad de control.
- 4) Aprendizaje del equipo ejecutor durante el desarrollo del proyecto.
- 5) Dimensionamiento adecuado de los objetivos del proyecto.
- 6) Estructura y formato de las propuestas planteadas por FIA en el desarrollo de los concursos de innovación agraria.

10) Conclusiones y Recomendaciones.

- Se aislaron y evaluaron 8 especies y 42 cepas de Trichoderma.
- Se definieron cepas con comportamientos diferenciados a 10-15 y 25 °C.
- Se evaluó en viña; parronal y huertos de manzano el comportamiento de 6 cepas de Trichoderma.
- Se lograron adecuados niveles de control de *B. cinerea* con *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*. Alcanzándose hasta un 98% de control.
- Se controló la aparición de *P. cactorum* en huertos de manzano con una formulación en pasta de *T. longibrachiatum* y *T. harzianum*.
- Se desarrollo una propuesta de control integrado de *V. inaequalis* en huertos de manzano en base a Trichoderma y Polisulfuro de Calcio.
- Se lograron 3 productos finales formulados, pasta, suspensión y polvo.
- Se logro el abastecimiento con cepas nativas de las empresas participantes del proyecto.

11) Otros aspectos de interés.

- Se generó una unidad productora de Insumos Biológicos con la estructura Jurídica de una Sociedad Anónima, ITAS S.A.

13)Anexo.

Informe Consultaría, Ing. Nilda Pérez Consuegra, Universidad de Ciencias Agrarias de la Habana.

PROYECTO

PRODUCCIÓN Y UTILIZACIÓN DE *Trichoderma* spp., EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES FUNGOSAS EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE FRUTA ORGÁNICA DE EXPORTACIÓN EN LA ZONA CENTRAL DE CHILE

RESULTADOS DE ASESORIA

24 de septiembre a 14 de octubre del 2001

Asesora: Ing. Nilda Pérez Consuegra MSc.

Universidad Agraria de La Habana

RECOMENDACIONES GENERALES SEGÚN LAS DIFERENTES ETAPAS DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN MASIVA DE *Trichoderma* spp.

Etapas en el proceso de producción masiva de *Trichoderma* spp.

- 1. Aislamientos nativos**
- 2. Cultivos puros**
- 3. Cepario de conservación**
- 4. Cepario de trabajo**
- 5. Obtención de inóculo**
- 6. Preparación del sustrato**
- 7. Proceso de esterilización**
- 8. Inoculación**
- 9. Incubación**
- 10. Producto final**

1. Aislamientos nativos

Cuando se pretende desarrollar la tecnología para la producción de un organismo cualquiera considerado como agente de control biológico lo más recomendable es buscar aislamientos nativos, aunque en una primera etapa se puede comenzar con la introducción de estos agentes desde otras regiones. Para la búsqueda de aislamientos nativos se organizarán recorridos de campo, tratando de buscar en aquellos sitios donde los patógenos se manifiestan con un menor índice de infección. También es recomendable buscar en sitios como bosques y regiones apartadas de los campos agrícolas, así como en campos de agricultores que acostumbren a utilizar poco o ningún plaguicida o fertilizante inorgánico. Ha de buscarse preferentemente en aquellos predios donde el manejo de la nutrición este basada en el uso de la materia orgánica. Si se tiene una idea previa de los patógenos con mayor interés en controlar, se recogerán muestras de suelo de los predios donde se cultivan sus hospedantes. Aunque *Trichoderma* spp., puede aislarse prácticamente de cualquier sustrato donde se encuentre presente, lo más conveniente es buscarlo en el suelo. La búsqueda en suelos supresores es muy importante, en los suelos supresores los patógenos pueden estar presentes y no manifestarse los síntomas dada la presencia de antagonistas, hay que identificar donde están esos suelos supresores y buscar allí.

Los aislamientos se realizarán a partir de muestras de suelos. La metodología recomendada para realizar los aislamientos es la descrita por Elad y Chet (1983).

2. Cultivos puros

Siguiendo la metodología descrita por Elad y Chet (1983) y después de cuatro días de incubación se puede aislar *Trichoderma* spp., y se pueden obtener los cultivos puros. Para la identificación del género se recomienda basarse fundamentalmente en las características culturales y morfológicas de *Trichoderma* creciendo en agar extracto de malta (**AM**) al 2% (20 g extracto de

malta Oxoid, 20 g agar, 1000 ml de agua destilada estéril), según recomiendan Rifai (1969) y Bisset (1984).

Se recomienda para esto que todos los aislamientos que se obtengan crezcan en placas Petri de 90 mm, incubadas durante dos días a 25⁰C, en la oscuridad y a continuación que sean expuestas a luz artificial para estimular la esporulación, a la temperatura del laboratorio. Se realizarán exámenes macroscópicos y microscópicos (microcultivos) de cada aislamiento, teniendo en cuenta las descripciones que aparecen en las revisiones del género hechas por Rifai (1969) y Bisset (1984). Las características evaluadas serán el aspecto, bordes, color y velocidad de crecimiento de las colonias, y forma y disposición de las fiálosporas y fiálides. Estas características permitirán identificar el género. Para identificar la especie, se precisa de un taxónomo. Es conveniente solicitar este servicio una vez que se hayan seleccionado los aislamientos más promisorios.

Una vez que se han obtenido los aislamientos nativos puros, se precisa realizar las pruebas de antagonismo "in vitro" y en condiciones semicontroladas y de producción o campo, para la selección de las cepas más promisorias, que serán recomendadas para su uso en la producción.

Cada uno de los aislamientos obtenidos debe estar acompañado de la una ficha donde aparezca una información completa, que en cualquier momento pueda necesitarse. De este modo se irá conformando el cepario.

2.1. Pruebas de antagonismo

2.1.1. Cultivo dual

Para esta prueba se recomienda la técnica de cultivo dual. Las colonias de *Trichoderma* spp., han de conservarse, hasta la realización del ensayo, en tubos de cultivo, en cuñas de Agar Malta, PDA, Saboraud o Saboraud Dextrosa Agar Extracto de Levadura, al igual que los aislamientos de los hongos fitopatógenos que serán objeto de control. En placas Petri de tamaño estandar (90 x 15 mm), sobre medio de cultivo PDA, se inoculan discos de micelio (5 mm) de cada aislamiento de *Trichoderma* spp., y del fitopatógeno, a una distancia de 50 mm. En el testigo se inocula solamente un disco de micelio de cada uno de los aislamientos a probar. Se utilizarán cinco placas en cada combinación. El ensayo se replicará tres veces. A los siete días de incubación se evaluará el grado de antagonismo mediante la clave de Bell et al (1982) (tabla 1).

Esta técnica de cultivo dual será adaptada para el montaje de microcultivos. Se realizarán observaciones macroscópicas y microscópicas (en microcultivos), diariamente, para describir los cambios que ocurren durante la interacción patógeno - antagonista.

Tabla 1. Escala de clases de Bell et al. (1982)

Clase 1	<i>Trichoderma</i> spp. crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre la superficie del medio de cultivo.
Clase 2	<i>Trichoderma</i> spp. crece al menos sobre las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.
Clase 3	<i>Trichoderma</i> spp. y el patógeno cubren aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo.
Clase 4	El patógeno crece al menos en las dos terceras partes del medio de cultivo limitando el crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp.
Clase 5	El patógeno crece sobre la colonia de <i>Trichoderma</i> spp. ocupando toda la superficie del medio de cultivo.

Los aislamientos de *Trichoderma* spp. que estén en la clase 1 ó 2 se consideran altamente antagonistas.

2.1.2. Efecto de *Trichoderma* spp. sobre la germinación conidial de hongos fitopatógenos

Para la realización de este ensayo se escogerán los aislamientos de *Trichoderma* spp. que muestren grado de antagonismo 1 y 2, en cultivo dual. A partir de colonias puras, de siete días, se prepararán suspensiones conidiales a las que se deben determinar la concentración. El valor de la concentración puede variar de 2.5×10^4 para fitopatógenos cuyos conidios tengan un tamaño más grande y del orden de 2×10^6 para aquellos de conidios más pequeños al igual que para *Trichoderma*. Las suspensiones de esporas o conidios de los hongos fitopatógenos que no se tengan en cultivo puro pueden ser preparadas a partir de esporas o conidios colectados de manchas o lesiones formadas en diferentes partes de la planta de que se trate (hojas, flores, frutos, tallo, raíces). Se

seleccionaron manchas o lesiones características, que estén abundantemente esporuladas y se conservarán a 10°C hasta la realización del ensayo.

Las suspensiones se prepararán con agua destilada estéril y una gota de Tween-80 al 0,1%. La concentración será determinada con cámara de Neubauer. Se prepararán cámaras húmedas (cuatro en cada tratamiento). En cada una se colocarán dos portaobjetos sobre soportes de cristal y en éstos cuatro gotas de la suspensión conidial de *Trichoderma* spp. y del fitopatógeno. En el testigo se colocarán solamente gotas de la suspensión de conidial del fitopatógeno.

Las cámaras húmedas se incubarán durante 24 horas (este tiempo puede variar en dependencia de la velocidad de germinación del fitopatógeno de que se trate). Se contará el número de esporas o conidios germinados del fitopatógeno de un total de 25 en cada gota, determinándose el porcentaje de germinación. El ensayo se replicará tres veces. Hay que montar tantas cámaras húmedas como número de lecturas que se vayan a realizar, pues una vez hecha la lectura el portaobjetos se desecha.

2.1.3. Efectividad de *Trichoderma* spp., en condiciones semicontroladas.

En la realización de estos ensayos, al igual que en los de campo, se utilizarán los aislamientos más promisorios (los que tengan grado de antagonismo 1 ó 2 y los que mayor porcentaje de inhibición de germinación de esporas o conidios exhiban). Estos ensayos pueden ser conducidos bajo un fondo de infección natural, o se pueden hacer inoculaciones de los fitopatógenos, esto en dependencia del cultivo.

En bolsas de polietileno, o macetas que contengan suelo de propiedades físicas, químicas y biológicas conocidas se sembrarán semillas o se plantarán los cultivos seleccionados. Se prepararán suspensiones conidiales de *Trichoderma* spp. de concentración conocida, a partir de un cultivo puro. Se realizarán aplicaciones por aspersión foliar (si se trata del control de patógenos foliares), a partir del momento en que se den las condiciones para la aparición de la enfermedad, de acuerdo con las condiciones climáticas y la fenología del cultivo. El momento para la primera aplicación es de suma importancia, pues una vez que el patógeno está establecido las posibilidades de éxito son menores, hay que tener en cuenta que en dependencia del cultivo y de la enfermedad se pueden necesitar varias aplicaciones. Es obligatorio montar un testigo, este se asperjará con agua al mismo tiempo que se realice una aplicación en las plantas tratadas con *Trichoderma*.

Se realizarán tantas evaluaciones como sean necesarias y se determinarán los índices de infección, según las metodologías establecidas para los diferentes patógenos en los distintos cultivos.

2.1.4. Efectividad de *Trichoderma* spp., en condiciones de campo.

El ensayo se realizará en áreas, donde se presenten frecuentemente epifitotias del patógeno que se pretende controlar, es preciso conocer las características físicas, químicas y biológicas del suelo, precisar las condiciones de riego. Las labores de cultivo han de ser las que se acostumbra en la región donde se hace el ensayo, excepto la aplicación de plaguicidas.

Un diseño experimental que se puede recomendar es el de bloques al azar, con cuatro réplicas y dos tratamientos: aplicación foliar de *Trichoderma* spp., y testigo sin aplicación (es muy frecuente que si el ensayo se hace en campos de

agricultores estos no acepten el testigo sin aplicación, pero es esencial incluirlo en el experimento para dar veracidad, exactitud y rigor científico a lo que se pretende demostrar). En los ensayos en que sea necesario se incluirá uno o varios controles, en este caso se usará el o los productos químicos recomendados. Precisar el procedimiento seguido para la reproducción del antagonista (cultivo estático o con agitación, fase sólida o líquida, sustrato. Momento en que han de comenzar las aplicaciones y número de aplicaciones en la temporada. Equipo de aplicación. Concentración de la solución final y dosis de aplicación en conidios/ha.

Se realizarán varias evaluaciones. Para esto se seleccionará un número determinado de canteros, hileras, surcos o plantas, en dependencia del cultivo y enfermedad y se determinará el índice de infección según corresponda.

Se realizará un estimado del rendimiento.

La temperatura, precipitaciones y humedad relativa local han de ser registradas en la estación meteorológica más cercana.

3. Cepario de conservación

Todos los aislamientos se mantendrán en un cepario de conservación, aún aquellos que no tengan un grado de antagonismo alto, pues pudieran servir en el futuro para otros estudios. En la literatura científica aparecen diferentes técnicas de conservación, estas pueden encontrarse en manuales de técnicas de trabajo con entomopatógenos y antagonistas. Una técnica muy efectiva de conservación consiste en separar los conidios del sustrato donde se reprodujo el antagonista y obtener de este modo los conidios puros, los conidios así obtenidos, con un contenido de humedad entre 5-10%, pueden ser almacenados por un tiempo prolongando conservando su viabilidad.

4. Cepario de trabajo

Los aislamientos que resulten promisorios una vez realizadas las pruebas de antagonismo se destinarán al cepario de trabajo. El cepario de trabajo se mantendrá en tubos de cultivo, en cuñas de PDA, Saboraud dextrosa agar, Agar malta, cualquier medio rico en nutrientes es suficiente para su mantenimiento. Hay que garantizar tener siempre disponibles un elevado número de tubos, lo más conveniente es que a partir del cultivo puro que se ha seleccionado para la producción se inoculen de 200 a 300 tubos de cultivo, a partir de estos tubos se sembrarán las placas donde crecerá el inóculo para sembrar en las bolsas o frascos de vidrio según se decida.

5. Obtención de inóculo

Para la obtención de inóculo se puede proceder como se ha estado haciendo hasta ahora, sobre medio semisintético en placas Petri, pero es esencial conocer la concentración de conidios que se coloca en cada bolsa o frasco y esta concentración se ha de corresponder con la cantidad de sustrato, en este caso avena.

6. Preparación del sustrato

Una vez seleccionado el sustrato se ha de determinar el contenido óptimo de humedad, sustratos con escasa humedad no permiten un crecimiento óptimo del hongo, si la humedad es muy alta, como este es un proceso de fermentación estática, el contenido de oxígeno es menor, y esto afecta la fermentación.

Además en dependencia del contenido de almidón del cereal de que se trate y del grado de molinado de este, existirá una mayor o menor tendencia a aglutinarse (consecuencia menor oxigenación) y presentar una menor superficie de

crecimiento, lo que hace que disminuya el rendimiento en conidios, que es lo que nos interesa producir.

Es conveniente comprar todo el sustrato que se necesite utilizar en una campaña de una sola vez, así no se corre el riesgo de tener sustratos de diferentes calidades o variedades, este tiene que ser lo más limpio posible, la calidad final del producto a obtener dependerá mucho de esto, ha de conservarse en un almacén adecuado, con difícil acceso para los roedores y evitar en lo posible las plagas de insectos y otros posibles animales.

Se recomienda cambiar la producción en frascos que se hace actualmente a bolsas. Para resolver el problema de escasez de oxígeno que puede presentarse en una bolsa herméticamente cerrada se recomienda cerrar esta con un fragmento de tubo de PVC (esterilizable), en el que se insertará un tapón de gasa-algodón, el tapón de gasa algodón permitirá el intercambio gaseoso.

El cultivo en bolsas tiene varias ventajas entre las que están:

- Ahorro de tiempo, el que se dedica al fregado de los frascos.
- Ocupa menor espacio en autoclave, incubadora y estantes para la incubación durante el proceso de producción.
- Mayor volumen de producción en un solo lote, con el consiguiente ahorro de energía eléctrica y humana
- Posibilidad de remover el contenido de la bolsa cada cierto tiempo.
- Una producción más limpia, pues aunque los frascos se laven, siempre existe el riesgo de que quede algún residuo.
- Más económico el proceso productivo.
- Manipulación más sencilla en el momento de cosechar el producto final, bastará con cortar donde se inserta el tapón y la bolsa.

6.1. Evaluar otros sustratos naturales

Entre los posibles sustratos naturales a evaluar pueden incluirse avena, trigo, cebada, centeno y arroz. El objetivo de la evaluación es encontrar el sustrato en el que se produzca la mayor concentración de conidios en el menor tiempo. Para esto hay que hacer una dinámica de esporulación, que consiste en inocular los diferentes sustratos, después de esterilizar e incubar a 25 más menos 1°C y evaluar diariamente la concentración de conidios a partir del segundo día de incubación hasta que esta se mantenga constante.

7. Proceso de esterilización.

El proceso de esterilización es una de las etapas claves en el proceso de producción masiva. En las instalaciones dedicadas a este fin debe considerarse un área separada del resto destinada a este fin, que se denominará "cuarto de esterilización y preparación de sustratos", pues es conveniente que en este además de ubicarse las incubadoras existan condiciones para preparar el sustrato a utilizar, sea en frascos o en bolsa. Se requiere de: área de fregado, mesetas, estantes para la colocación de diferentes materiales y de Baños de María". Una vez esterilizado el material destinado a la siembra se dejará reposar durante 24 en un cuarto destinado para este fin y que tenga acceso directo a los cuartos de inoculación y de incubación. Con determinada frecuencia tiene que darse mantenimiento a la autoclave y comprobarse el estado técnico con respecto a su capacidad para esterilizar completamente.

8. Inoculación

El cuarto de inoculación ha de reunir los requisitos mínimos para esta función. Ha de estar totalmente aislado del resto de la instalación, de modo que no se tenga

acceso directo a este desde afuera. Solo estará permitida la entrada al mismo de la persona o personas que se ocupan de esta función. Estas personas usarán bata, tapaboca y gorros estériles y se cambiarán de ropa, en un pequeño local que se ubicará entre el cuarto de incubación y el cuarto de inoculación.

Lo más conveniente es realizar la inoculación en una cámara de flujo laminar, en su defecto una pequeña habitación (cámara de siembra) puede ser utilizada, siempre que se tenga cuidado extremo con las normas de asepsia elementales.

Si se pretende producir más de un organismo no es conveniente utilizar la cámara de flujo para la inoculación de todos estos, pues dada la intensidad de su uso, por tratarse de un proceso de producción, los riesgos de contaminación serán grandes.

Es necesario conocer la concentración de inóculo que se coloca en cada bolsa o frasco, para esto no hay que hacer la lectura cada vez que se prepare un lote, pues basta con hacerlo cada cierto tiempo, siempre que se mantengan las mismas condiciones para producir el inóculo y por supuesto su calidad. Los frascos o bolsas inoculados y convenientemente rotulados se llevan al cuarto de incubación.

Esto de la rotulación es muy importante, cada frasco o bolsa debe ser marcado con la fecha de inoculación, esto tiene que ver con el lote, **el lote es la producción de un día**. En laboratorio hay que designar a una persona para que lleve esta estadística, pues es uno de los elementos que permitirá realizar un proceso de producción de acuerdo a una planificación.

9. Incubación

El proceso de incubación ha de realizarse en un ambiente controlado. Una vez que se conozcan los parámetros óptimos para el crecimiento y esporulación de la cepa que se está reproduciendo esta ha de incubarse bajo esas condiciones, para obtener el rendimiento máximo. La temperatura y humedad relativa han de ser registradas.

Un aspecto importante a considerar aquí es el tiempo de incubación ¿cómo determinar este? El período de incubación estará determinado por el número de días que se precise para obtener la máxima esporulación bajo las condiciones de incubación establecidas.

11. Producto final

Las bolsas o frascos conteniendo el producto final han de trasladarse a una habitación donde se realizará la cosecha, y en dependencia de la formulación que se escoja se realizará el proceso de envasado o se llevará al secado y posterior separación de los conidios.

10.1. Se recomienda la obtención de un producto final en polvo.

En la literatura científica está suficientemente argumentado el efecto detrimental de la humedad sobre la viabilidad de los conidios de los hongos hifomicetes, aún a bajas temperaturas, este efecto se acentúa a medida que las temperaturas aumentan. Se recomienda la **presentación en polvo**, en la que el propio sustrato que se utiliza para la producción masiva sea el vehículo portador de los conidios de *Trichoderma* spp. Para esto se requiere la utilización de un molino que garantice el tamaño de partículas adecuado. Previo al proceso de molinado, el sustrato, granos de cereales, donde ha estado creciendo el hongo será sometido a

secado. Una vez obtenido el polvo se envasará en bolsas plásticas de 1Kg de peso, que es la cantidad recomendada para una hectárea de cultivo. Entre las ventajas que tiene esta nueva forma de presentación están:

- ✓ Se elimina el inconveniente de pérdida de viabilidad de los conidios debido a la humedad.
- ✓ Los conidios del hongo se aplican junto con el sustrato donde estuvo creciendo, lo que garantiza una fuente de nutrientes segura en un ambiente hostil dada la intensidad de la competencia. Para las aplicaciones foliares esto es muy importante, pues la capacidad para competir es esencial para el establecimiento del antagonista en la filosfera.
- ✓ El período de almacenamiento puede prolongarse por un tiempo superior a los tres meses, siempre que se conserve en un local con un ambiente fresco y seco. Esto es ventajoso tanto para el productor como para el agricultor, ya que a principios de la temporada este último puede adquirir la cantidad de producto necesaria para mantener protegido el cultivo durante todo el ciclo y el productor puede garantizar con antelación el volumen de producción que demanda el mercado para esa época, lo que le permite una mayor planificación en el proceso de producción.
- ✓ Disminuyen los riesgos que necesariamente lleva implícito la aplicación de un medio biológico, pues se entrega un producto final de mayor calidad.
- ✓ Los costos de producción se abaratan por concepto de cambio de envase, pues las bolsas plásticas tienen un precio menor en el mercado.

La ventaja más notable de todas las enumeradas es que en las formulaciones en polvo (sea esta que se ha sugerido u otras), se mantiene la viabilidad de los conidios sin formular. Entre los portadores inertes que pueden ser usados en estas formulaciones están: attapulgita, montmorillonita, kaolinita, diatomita, talco y polvos orgánicos.

En una fase más avanzada del proceso de producción, quizás para el año próximo puede pensarse en trabajar más a fondo el problema de la formulación, que es el talón de Aquiles en la producción de estos organismos.

Control de calidad de *Trichoderma* spp.

El control de calidad es una actividad que se ha de realizar desde el momento mismo que en que se da inicio al proceso de producción masiva. Este proceso comienza con la construcción de la instalación que se dedicara a esta función, estas construcciones han de reunir un conjunto de requisitos que no abordaremos en este documento.

La comercialización de organismos como agentes de control biológico basados en hongos requiere de un control adecuado de las propiedades biológicas, físicas y químicas que aseguren al agricultor un producto de máxima eficacia en condiciones de campo. Existen metodologías para pruebas de calidad de diferentes organismos utilizados en el control microbial y que son producidos artesanalmente y en laboratorios comerciales.

Las pruebas microbiológicas recomendadas son:

- **Determinación del grado de antagonismo:** se realizaran pruebas de antagonismo con el organismo objeto de control de acuerdo con las metodologías descritas para estos ensayos. Entre las características más notables del género *Trichoderma* están que mantienen sus propiedades antagónicas por un tiempo prolongado siempre que sean conservados los aislamientos en condiciones óptimas, así como el producto final destinado a la venta.
- **Determinación de la concentración de conidios:** esta prueba es de suma importancia ya que determina la dosificación del insecticida biológico obtenido.

La concentración de conidios obtenidos por gramo de sustrato no debe ser menor de 10^9 conidios en formulaciones sólidas. La concentración se determina a los conidios obtenidos después de cosechar el producto que se enviara a la producción. Es necesario determinar el tiempo en que se produce la mayor concentración de conidios, ese será el periodo óptimo de incubación, para conocer este se precisa hacer una dinámica de esporulación.

- **Comprobación de la viabilidad a través de pruebas de germinación conidial:** deben obtenerse valores entre 85 y 100% de viabilidad. Para el caso de los biopreparados que tengan como destino la aplicación para el control de un patógeno foliar son deseables los valores mas altos de viabilidad, dado que el ambiente de la filosfera no es óptimo para la acción del antagonista y mientras mayor sea la viabilidad de los conidios mayores probalidades de éxito pueden esperarse.
- **Pureza:** con esta prueba se determina la proporción del agente de control microbial en relación con los posibles contaminantes. Conocer si existen otros microorganismos como posibles contaminantes es esencial para mejorar el proceso de producción y formulación.

Como ya indicamos la viabilidad es una de las pruebas de control de calidad esenciales para colocar un buen producto en el mercado. Por lo que es necesario conocer cuales son los factores que pueden afectarla. Entre estos están:

- **Exposición a la luz solar:** la vida media de los conidios aplicados a las hojas que están expuestas a la radiación solar es de apenas unas pocas horas, debido a que la radiación ultravioleta los destruye.
- **Contenido de humedad:** La **humedad** es un factor determinante en la supervivencia de los conidios. Cuando estos están secos, pueden mantener un nivel de germinación alto durante meses. La viabilidad de los conidios sin

secar, aunque estén almacenados a bajas temperaturas se reduce a porcentajes muy bajos. Por el contrario si los conidios se mantienen secos la viabilidad permanece alta durante meses. El polvo puro de conidios sin formular puede almacenarse en recipientes herméticos a 4 °C y mantener una viabilidad alta durante meses si el contenido de humedad es menor del 10%.

- **Temperatura:** La temperatura es un factor que influye significativamente sobre la viabilidad de los conidios. Las temperaturas bajas son más favorables para mantener niveles de viabilidad adecuados.
- **Tiempo de almacenamiento:** Como se ha mencionado la temperatura y la humedad en interacción con el tiempo de almacenamiento determinan el tiempo de viabilidad de los conidios. En condiciones de baja humedad el tiempo de almacenamiento se incrementa y la viabilidad es alta. Un comportamiento similar se observa con la temperatura. Para la conservación de cepas en el laboratorio se recomienda sembrar en medio nutritivo Papa Dextrosa Agar (PDA) a -20°C, se renuevan cada dos años.

Metodología para la realización de las pruebas de control de calidad

I. Viabilidad de los conidios

Para biopreparados obtenidos en medio sólido, utilizando granos de cereales como sustrato para el crecimiento.

- Preparar slides con medios nutritivos como papa dextrosa agar (PDA), Saboraud dextrosa agar extracto de levadura (SDAY), Saboraud. Utilizar preferentemente agar fino. Tratar de que quede una película muy delgada que facilite el conteo de conidios.
- Preparar cámaras húmedas. Los slides deben colocarse en cámara húmeda, pues la película del medio de cultivo es tan delgada que puede secarse, además de que los conidios necesitan humedad para germinar.

- Preparar una suspensión conidial de una concentración del orden de 10^7 a 10^8 y colocar 4 gotas de esta suspensión en cada portaobjetos.
- Incubar a temperatura de 25 más menos 2°C , en la oscuridad, el periodo de incubación es de 18-24 horas.
- Para el conteo observar al microscopio con lente de 40x.
- Los conidios se consideran viables si el largo del tubo germinativo es dos veces el diámetro del conidio. Aunque un mínimo de 200 conidios es suficiente el conteo de 500 o más incrementa la exactitud.
- El área de observación puede ser fijada con lactofenol, si no se puede hacer la evaluación a la hora que corresponde, se colocan unas gotas y se pone encima un portaobjetos. Si al lactofenol se adiciona azul algodón o fuschina eso mejora la observación.
- Para el conteo se buscará un campo donde se cuentan 25 conidios en cada gota, y de estos cuantos han germinado. Se cuentan en total 100 conidios en cada portaobjetos y se hacen tres réplicas para un total de 300 conidios.
- La viabilidad de los conidios puede estar entre el 85 y el 90 %, aunque lo mas recomendable para las aplicaciones foliares es que sea mayor del 90%.
- La prueba se repite a intervalos de tiempo que pueden estar entre 10, 20, 30, 40 y 50 días. Si se pretende almacenar por más tiempo ha de repetirse.

II. Pureza

Esta es una prueba de control de calidad esencial, por eso ha de repetirse en diferentes fases del proceso de producción masiva y no solamente al producto final. ¿Qué fases requieren de estas pruebas?

- Tubos de cultivo con cepas de conservación y de trabajo o placas Petri (en dependencia de lo que se use). ¿Cómo hacerlo? Chequeo visual para contaminantes y conidiación uniforme.

- Cultivos creciendo en PDA en placas Petri o creciendo en avena, en frascos de vidrio o en bolsas y que serán utilizados como cultivos "madre", estos requieren siembra en placas con medio agarizado para screen de contaminantes.
- Cultivos creciendo en avena en frascos de vidrio o en bolsas plásticas, requieren de siembra en placas Petri en medio agarizado para screen de contaminantes.
- Secado abierto del sustrato (avena) una vez completada la conidiación. Esto requiere chequeo visual para contaminantes y conidiación uniforme.
- Extracción de conidios. No requiere determinación de pureza.
- Secado de conidios hasta 5-10% de humedad. No requiere determinación de pureza.
- Control de calidad final. Requiere de siembra en placas Petri en medio agarizado para screen de contaminantes.
- Envasado.

¿Cómo hacer los ensayos para determinar la pureza?

Existen dos procedimientos para determinar el grado de pureza de un biopreparado:

1. Una muestra de la suspensión de esporas se dispersa sobre Saboraud Dextrosa Agar, Papa Dextrosa Agar, o Agar malta al 2 %. Las placas se incuban a 25°C por cuatro días antes de chequear la aparición de contaminantes.
2. Varias muestras del sustrato sólido se colocan sobre Saboraud Dextrosa Agar, Papa Dextrosa Agar, o Agar malta al 2 % antes y después de la inoculación. Las placas se incuban a 25°C, por cuatro días antes de chequear la aparición de cualquier contaminante.

Determinación de la pureza en producto final

La presencia de otros microorganismos diferentes a *Trichoderma* se cuantifica preparando una serie de diluciones de 1 en 10 en un rango que va de 5×10^7 conidios por mililitro a 50 conidios por mililitro; 0.2 ml de cada dilución se dispersan en placas de agar malta (se hacen dos réplicas). Las placas se incuban de 3-4 días a 25°C, a continuación se cuenta el número de colonias de *Trichoderma* en toda la placa, donde las colonias aisladas pueden ser distinguidas dada la concentración tan baja de la suspensión original. Los contaminantes que aparecen se cuentan y la proporción entre *Trichoderma* y estos se expresa como porcentaje. Los niveles de contaminación han de ser del 0.002%.

Metodologías para estudio de la Bioecología de *Trichoderma* spp.

El conocimiento de los parámetros óptimos para el crecimiento y esporulación de *Trichoderma* es esencial para obtener un producto de calidad, este es un trabajo laborioso pero necesario para la caracterización de cada cepa que se producirá.

Las pruebas fundamentales comprenden la determinación del efecto de diferentes medios de cultivo, luz, temperatura, pH, y humedad relativa sobre crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial de *Trichoderma*. El objetivo de estas pruebas es buscar los parámetros óptimos para el crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial de cada cepa que se reproduzca. Los parámetros que resulten óptimos para una cepa dada no necesariamente tienen que serlo para otra. Se recomienda que estas pruebas se realicen a cepas de comprobada actividad antagonista tanto en condiciones de laboratorio como de campo. El conocimiento de estas características biológicas permitirá además de optimizar el proceso de producción ofrecer recomendaciones para las aplicaciones de campo.

I. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial de *Trichoderma* spp.

Para la realización de esta prueba hay que diferenciar entre los medios de cultivo sintéticos o sintéticos agarizados y los medios de cultivo naturales que se utilizan en los procesos de producción masiva por métodos artesanales.

Entre los medios de cultivo sintéticos que generalmente se recomiendan están: papa dextrosa agar, saboraud dextrosa agar, agar malta y Czapeck.

1. Preparación y esterilización de los medios de cultivo, debe ajustarse el pH antes de esterilizar y tomar una lectura después de la esterilización, pues el pH

puede cambiar a diferentes valores después de esta, y ese valor estará en dependencia del medio de que se trate.

2. Licuar los medios de cultivo y extender en placas Petri estándar (90 mm) de 12 a 15 ml el día antes de la inoculación. Cinco placas por cada medio de cultivo.
3. Para la inoculación se seleccionará un cultivo joven (aproximadamente de 7 días de edad) de *Trichoderma* spp., y con un perforador de 5 mm de diámetro se recortaran discos de micelio del borde de la colonia. El disco de micelio se colocará de modo que quede en contacto directo con el medio de cultivo. Marcar en el fondo de la placa dos líneas perpendiculares que pasen por el centro. Estas líneas son las guías para la medición del crecimiento micelial radial.
4. Incubar a 25°C, más menos 1°C, y realizar lecturas diarias del crecimiento radial de las colonias de *Trichoderma* spp., en los dos sentidos, y promediar estos valores. La medición se reporta en mm.
5. Después de 7 días de incubación se procederá a determinar la concentración de conidios, para esto se tomarán 10 ml de agua destilada estéril y se vierten en la placa Petri sobre la colonia en crecimiento y con un pincel de cerdas suaves se barre, con delicadeza, hasta que todos los conidios son arrastrados, el contenido se pasa a un tubo de cultivo y se hacen diluciones sucesivas hasta que sea posible el conteo, tal como aparece en las metodologías de control de calidad de entomopatógenos que ya se conocen.
6. Conteo en cámara de Neubauer. De no ser posible contar en el mismo día en que se prepararon las diluciones, hay que conservar en refrigeración, o añadir unas gotas de lactofenol o de formalina para detener el proceso de germinación, para esto es necesario contar con frascos pequeños con tapa y que puedan ser rotulados convenientemente.
7. Para evaluar el efecto de los diferentes medios de cultivo sobre la germinación conidial se prepara el ensayo siguiendo la misma metodología que se explicó en las pruebas de control de calidad.

Es muy importante realizar estos ensayos en diferentes sustratos naturales de los que se utilizan para la producción artesanal de hongos, entre los que se encuentran granos de trigo, cebada, centeno, avena y arroz. En la literatura científica aparecen recomendados un grupo grande de sustratos naturales, diferentes a los aquí mencionados.

En el caso de evaluar el efecto de los sustratos naturales sobre el crecimiento de *Trichoderma* spp., ha de determinarse el efecto sobre la concentración y germinación conidial, por las metodologías ya conocidas.

Para el caso de la concentración corresponde hacer una dinámica de esporulación. ¿Qué es esto? , la prueba consiste en determinar la concentración de conidios día a día hasta que está permanezca constante. De este modo se puede conocer con precisión cuantos días se necesitan para completar el proceso de producción masiva y esto significa eficiencia para el proceso productivo.

II. Efecto de la temperatura sobre crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial de *Trichoderma* spp.

La temperatura es uno de los factores que mayor influencia tiene sobre el crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial de *Trichoderma* spp. Los intervalos de temperaturas generalmente se establecen con una diferencia de 5°C. Las temperaturas a probar serían: 4, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 37 y 40°C.

Para realizar esta prueba se escoge el medio de cultivo que mejor resultados mostró en el ensayo I. El procedimiento a seguir es como se describió anteriormente con la diferencia de que es necesario incubar a las diferentes temperaturas que se han seleccionado, manteniendo idénticas condiciones experimentales.

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la germinación conidial se prepara una suspensión de conidios como ya se indicó y se incuban a las diferentes temperaturas que previamente se fijaron y permanecen idénticas el resto de las condiciones experimentales.

III.- Efecto de la luz sobre crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial de *Trichoderma* spp.

La luz tiene un marcado efecto sobre el crecimiento y germinación de *Trichoderma* spp. Las condiciones de luz que se establecen son tres: luz continua, luz alterna y oscuridad continua.

Se selecciona el medio de cultivo que mejor resultados mostró en el primer ensayo, se inocula como se explicó en I, y se incuba en diferentes condiciones de luz como se explica a continuación:

1. Luz continua: las placas Petri después de inoculadas se exponen todo el tiempo a una fuente conocida de luz (intensidad y luminosidad).
2. Luz alterna: las placas Petri permanecen envueltas durante 8 horas y 16 horas expuestas a la luz. Las placas se envuelven en papel aluminio, de modo que no penetre nada de luz. Los ciclos de luz y oscuridad pueden variar, no necesariamente tiene que ser 8 y 16.
3. Oscuridad continua: las placas Petri permanecen envueltas durante todo el tiempo que dure el ensayo. La determinación de la concentración y la germinación conidial se hacen, tal como se indicó en los ensayos anteriores.

Para el caso de la germinación conidial se prepara una suspensión de conidios como ya se indicó y se exponen a las diferentes condiciones de luz y oscuridad, permaneciendo en idénticas condiciones experimentales.

IV. Efecto del pH sobre crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial de *Trichoderma* spp.

1. Seleccionar el medio de cultivo a utilizar y prepararlo ha diferentes intervalos de pH, que pueden ir desde 3 hasta 10 (de uno en uno), después de la esterilización se mide el pH final, pues este cambia con el proceso, ese es el pH que se ha de tener en cuenta.
2. Extender las placas (cinco para cada valor de pH), inocular como ya se explicó, incubar a 25 más menos 1^aC, durante 7 días.
3. Para la evaluación del crecimiento micelial se medirá diariamente el crecimiento radial de la colonia como ya se explicó, esta medida en milímetros.
4. La esporulación se evaluará a los 7 días.
5. Para el ensayo de germinación conidial se prepararán slides con el medio de cultivo a los diferentes pH, el resto de la metodología es como ya se explicó.

V. Efecto de la Humedad relativa (Hr) sobre crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial de *Trichoderma* spp.

La evaluación del efecto de la humedad relativa sobre el crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial puede realizarse utilizando disoluciones saturadas de sales que mantienen un valor determinado de la Hr. Es requisito indispensable mantener el cultivo en un ambiente herméticamente cerrado, para esto se pueden instalar cámaras húmedas con placas Petri de 140 mm y sembrar *Trichoderma* spp., en placas más pequeñas que se colocarán en la cámara húmeda. Medir el crecimiento como ya se indico al igual que la esporulación, al concluir el ensayo. Como se usarán placas pequeñas, la medida del crecimiento se realizará en períodos de horas y no de días.

ANEXO

Disoluciones saturadas de sales que se usan para regular la humedad relativa

Disoluciones saturadas de sales		Humedad relativa (%) a diferentes temperaturas (°C)							
		5	10	15	20	25	30	35	40
Cloruro de litio	LiCl.H ₂ O	14	14	13	12	12	12	12	11
Cloruro de magnesio	MgCl.6H ₂ O	35	34	34	33	33	33	32	32
Carbonato de Potasio	K ₂ CO ₃ .2H ₂ O	-	47	44	44	43	43	43	42
Nitrato de Magnesio	Mg(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	58	57	56	55	53	52	50	49
Cloruro de Sodio	NaCl	76	76	76	76	75	75	75	75
Cloruro de Potasio	KCl	88	88	87	86	85	85	84	82
Sulfato de Potasio	K ₂ SO ₄	98	98	97	97	97	96	96	96

Medio selectivo para germinación

- Extracto de levadura al 0.1%
- Cloranfenicol al 0.1%
- Tween 80 al 0.01%
- 0.001-0.005% Benlate (PH)

14) Bibliografía Consultada.

- Alexopoulos, C.J. 1979. Introductory mycology. Third Edition. John Wiley and Sons, New York. E.U.A. 632pp
- Bjorkman, Th. 1999. Proceeding: New England vegetable and berry growers conference and trade show. Sturbridge, MA. P 310-312.
- Beker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. & Dinesh-Kumar, S. P. 1997. Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276,726-733
- Bell, D.K., Well, H.D. and Markham, C.R. 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six plant pathogens. *Phytopathology* 72: 279-382.
- Brunner, K, et al. 2003. The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviridae* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Curr. Genet.* 43, 289-295
- Cundom, M.A., Gaiad, S., Castañon, M., Arriola, S. y Coutinho. 1999. Actividad antagonica in vitro de hongos saprofitos sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. En: reunión de comunicaciones científicas y tecnológicas, secretaria general de ciencia y técnica, UNNE. actas tomo V pp. 125-128
- Chet I. 1987. *Trichoderma*- application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In *Innovative approaches to plant disease control* (I. Chet, Ed.), pp. 137-159. Wiley, New York.
- Domínguez, T. 1994. Evaluación de nuevas cepas de *Trichoderma spp.* Como antagonistas de *Botrytis cinerea* y *Phytophthora spp.* Tesis de grado. Facultad de Agronomía. Universidad Católica de Chile, Santiago. 37pp.
- Dubos . B. 1987. Fungal antagonism in aerial agrobiocenosis. In: *Innovative approaches to plant disease control* (I. Chet, Ed.), pp. 107-135. Wiley, New York.
- Dubos, B. Roudet, J. Bulit, and Burgarest Y. 1983. L'utilisation du *Trichoderma harzianum* Rifai dans la pratique viticole pour lutter contre la pourriture grise (*Botrytis cinerea* Pres)In : Les antagonismes microbiens, modes d'action et application a lutte biologique contre les maladies des plantes. XXIV e Colloque de la Societe Francaise de Phytopathologie, INRA, Service des Publications, Francia, 289-296pp.
- Elad. Y., Chet, I.,Boyle.P. and Henis.Y. 1993 Parasitism of *Trichoderma spp.* On *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. *Scanning electron microscopy and fluorescence micriscopy.* *Phytopathology* 73:85-88

Garza, G.A., Reeleder, R.D and Paulitz.T. 1997. Degradation of sclerotinia of *Sclerotinia sclerotiorum* by fungus gnats and the biological fungi *Trichoderma* spp. Soil Biol. Biochem. 29(2) :123-129

Ghisalberti, E.L. and Sivasithamparam. K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. Soil Biol. Biochem. 23(11)1011-1020.

Harman, G.,E.2000. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Dis. 84:379-393.

Harman, G.E.; Howell .Ch; Viterbo, A; Chet. I. and Lorito. M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic avirulent plant symbionts. Nature reviews microbiology 2:43-56.

Howell, C.R., Hanson, L., Stipanovic, R. and Puckhaber, L.2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seeds treatment with *Trichoderma virens*. Phytopathology 90:248-252.

Howell, C.R., 2002. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant disease 87(1): 4-10.

Lumsden, R.D., Locke, J., Adkins, S., Walter, J., and Ridout, C. 1992. Isolation and localization of the antibiotics gliotoxin produced by *Gliocladium virens* from alginate prill in soil and soilless media. Phytopathology 82:230-235

Metcalf, D.D., and Wilson, C.R., 2001. The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. Plant Pathol. 50:249-257.

Nelson, E.B. and Harman, G.E. 1997. Improved biocontro efficacy of *Trichoderma harzianum* 1295-22 for foliar phase of turf diseases by use os spray applications. Plant disease.81:1132-1138.

Odile,C. Philon, V. Rolland, D. And Bernier,J. 1999. Effect of fall application of fungal antagonists on spring ascospores production od apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. Phytopathology 90:31-37.

Papavizas, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. Ann. Rev. Phytopathol. 23:23-54.

Philon, V. Carisse,O. and Paulitz, T. 1997. In vitro evaluation of fungical isolate for their ability to influence leaf rheology, production of pseudothecia, and ascospores of *Venturia inaequalis*. Eur. J.Plant Pathol. 103:441-452

Smith, V.L.; Wilcox, W.F. and Harman, G.E. 1990. Potential for biological control of phytophthora root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium spp.* *Phytopathology* 80:880-885.

Sutton, J.C. and Peng, G. 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in Strawberry leaves. *Phytopathology* 83:615-621.

Venegas, V., R., Palazuelos, F.,P., Hirsch-Reinschagen,B.P.1996. Aplicación de *Trichoderma* en la protección de almácigos de lechuga *Lactuca sativa*. Memoria Congreso de Agronomía.

Yedidia, I., Benhamou, N., and Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1061-1070.

Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y., and Chet, I. 2000. Induction and accumulation of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiol. Biochem.* 38:863-873.