



GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA



UNIVERSIDAD
DE
TALCA

“EVALUACIÓN DE FORMULACIONES DE
MICROORGANISMOS CONTROLADORES DE
ENFERMEDADES Y PLAGAS EN CULTIVOS
HORTOFRUTÍCOLA DE REGIONAL”

Proyecto N°C98-1-A-072

INFORME FINAL

Mauricio Lolas Caneo
Eduardo Donoso Cuevas
Blas Lavandero Icaza



I. ANTECEDENTES GENERALES

Nombre del Proyecto: Evaluación de formulaciones de microorganismos controladores de enfermedades y plagas en cultivos hortofrutícola de regional.

Código: C98-1-A-072

Región: 7

Fecha de aprobación o adjudicación: Julio 1998

Forma de Ingreso al FIA: Concurso

Agente Ejecutor y Asociados: Universidad de Talca.

Coordinador del Proyecto: Mauricio Lolas Caneo

Costo Total: \$ 102.320.484

Aporte del FIA : \$ 60.125.202 Porcentaje del costo total: 58,76%

Período de Ejecución: Agosto 1998 a Agosto 2001.

II. RESUMEN EJECUTIVO

En los tres años de ejecución, el equipo de investigación del proyecto logró importantes avances en evaluación de la efectividad de biocontroladores de enfermedades y plagas. En primer lugar, se realizó una recolección de especies de organismos biocontroladores en diferentes sectores de la VII Región, incluyendo sectores cordilleranos, reservas forestales; secano costero y huertos comerciales locales. Dentro de los hongos obtenidos, distintas especies de *Trichoderma*, tales como *T. harzianum* (cepa Queule), *T. longibrachiatum* (cepa Soto), *T. hamatum* (cepa Tubo), *T. virens* (cepa Sherwood), *T. parceanamosum* (cepa Trailes) y las cepas Coque y Longavi, las que no fueron identificadas, fueron sometidos a pruebas de efectividad de control tanto *in vitro*, a nivel de laboratorio, como *in vivo*, en condiciones controladas de invernadero, Estación Experimental y unidades de validación (UVAL) con agricultores locales. De esta forma, las cepas de *Trichoderma* mencionadas fueron evaluadas en cultivos tales como tomate, brócoli, pimentón, lechuga, espárragos y manzanos y para el control de enfermedades causadas por los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Venturia inaequalis*. Del mismo modo, de los entomopatógenos colectados solamente una cepa del *Girnavovirus* de *Cydia pomonella*, denominado CpGV-L1, resultó activo en el control de la polilla de la manzana. Del trabajo de laboratorio y campo con la cepa CpGV-L1, finalmente este entomopatógeno pudo ser transferido en un huerto de producción orgánica comercial de manzanas otorgando un nivel adecuado de protección.

Si bien la producción y aplicación de las cepas de *Trichoderma* usados fue exitosa logrando una forma de masificación simple y rápida para su desarrollo y uso, el caso del CpGV-L1 fue muy distinto. A pesar de todo el esfuerzo involucrado durante los tres años de ejecución del proyecto, no se solucionaron todos los problemas referentes a la producción en una escala mayor del CpGV-L1, pero quedó de manifiesto la posibilidad de solucionar estos problemas y poder realizar un desarrollo mayor posterior de este controlador.

III. TEXTO PRINCIPAL

1. RESUMEN

El objetivo del proyecto “Evaluación de formulaciones de microorganismos controladores de enfermedades y plagas en cultivos hortofrutícola de regional”, en su propuesta original fue evaluar la efectividad de cepas del hongo biocontrolador *Trichoderma* y Virus granuloso (VG), colectadas en la VII Región, sobre enfermedades y plagas, respectivamente, de importancia primaria. En una primera etapa de laboratorio, se trabajó de forma de acotar las dosis óptimas, formulaciones, momento de aplicación y formas de almacenaje de ambos biocontroladores. Posteriormente en una segunda etapa, se evaluaron ambos biocontroladores, en base a los resultados obtenidos en la etapa anterior, en relación a su efectividad sanitaria en la producción de almácigos de brócoli, tomate y pimentón y en cultivos experimentales de manzano, espárrago, lechuga, tomate y pimentón. De esta forma, fueron validadas las dosis, formulaciones y momentos de aplicación y se establecieron las recomendaciones técnicas para el uso de VG y *Trichoderma*, de fácil uso para el agricultor y eficientes en el control de plagas y enfermedades.

En base a lo anterior, se aislaron e identificaron una cepa de Virus Granuloso y siete de *Trichoderma* spp., determinándose cinco especies distintas y de las cuales tres demostraron poseer un alto potencial biocontrolador. Las cepas fueron las siguientes como *T. harzianum* (cepa Queule), *T. longibrachiatum* (cepa Soto), *T. hamatum* (cepa Tubo), *T. virens* (cepa Sherwood), *T. parceanamosum* (cepa Trailes) y las cepas Coque y Longaví.

Además, se desarrolló un sistema semi-continuo de producción de las distintas cepas de *Trichoderma* a nivel de laboratorio, que logró abastecer las necesidades del proyecto, tanto para ensayos como para las unidades de validación. Este, básicamente consistió en un sistema de producción bi-fásico, consistente en una primera fase de producción en medio líquido, para luego pasar a una fase de producción en sólido, desde la cual se extraen las conidias para ser utilizadas, este sistema utiliza como nutrientes una mezcla de granos.

En los ensayos *in vitro*, fue posible determinar la efectividad de inhibición del crecimiento de seis hongos fitopatógenos causante de enfermedades de importancia económica por las distintas cepas de *Trichoderma*: *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Phytophthora capsici*. Del mismo modo, se determinaron las concentraciones efectivas para el control de la polilla de la manzana, *Cydia pomonella* por la cepa de virus granuloso. Posteriormente, para *Trichoderma*, estas concentraciones fueron evaluadas *in vivo* en producción de almácigo de tomate, pimentón y brócoli y en cultivos experimentales de lechugas hidropónicas, tomates, brócoli y manzano, seleccionándose las mejores cepas de *Trichoderma* para cada enfermedad y desarrollando los parámetros básicos para su inclusión en los sistemas de manejo de enfermedades fúngicas. Además se logró determinar la estrategia de uso del Virus Granuloso para el control de la polilla de la manzana bajo un sistema de producción orgánico. Dentro de esta línea de investigación, se formaron unidades de validación (UVAL) con el uso de la concentración efectiva de Virus Granuloso en huertos de manzano de San Fernando (VI Región) y del sector Los Maitenes en las cercanías de San Clemente (VII Región). Del mismo modo, para las cepas efectivas de *Trichoderma*, se establecieron UVAL en esparragueras de Pelarco (VII Región) principalmente para el control de enfermedades de la corona causadas por *Fusarium* sp.; en cultivos de tomate y melón de agricultores pertenecientes al Centro de Gestión Empresarial de la Universidad de Talca, para el control de enfermedades causadas por *Fusarium* spp., y también en un huerto de manzano orgánico de la zona Los Maitenes en las cercanías de San Clemente (VII Región) para el control preventivo de *Venturia inaequalis* (sarna del manzano).

De manera de preservar las cepas en el tiempo y de evaluar el mejor método de producción masiva, se realizaron ensayos de almacenaje de las cepas de *Trichoderma* y Virus Granuloso a nivel de laboratorio. De los estudio de almacenaje, lo mas rescatable es el hecho de que *Trichoderma* es capaz de mantenerse por 60 a 90 días en perlita, lo que estaría permitiendo un control eficiente de enfermedades de suelo en cultivos hidropónicos o bien en almácigo y vivero.

Finalmente, los resultados relevantes fueron difundidos ampliamente en días de campos y charlas a agricultores; presentaciones orales y posters en congresos científicos de las Sociedades Chilena de Fitopatología, Chilena de Entomología y Agronómica de Chile. Además, se participó activamente en Ferias de Producción Orgánica y eventos realizados por el FIA. Del mismo modo, se elaboraron boletines divulgativos de uso de *Trichoderma* y Virus de la Granulosis, basados en los resultados relevantes del proyecto.

Uno de los principales impactos de este proyecto de investigación fue la comprobación de la existencia de una gran biodiversidad de microorganismos existentes en la VII Región de Chile, con alto potencial biocontrolador de enfermedades y plagas que afectan los cultivos agrícolas. Incluso, esta eficacia biocontroladora sería mayor que la ofrecida por los productos comerciales disponibles para el agricultor durante el desarrollo del proyecto. Por otra parte, se logró la participación de agricultores, quienes introdujeron el uso de ambos biocontroladores, en sus planes normales de manejo. Lo anterior, y debido a los buenos resultados logrados, ha generado una demanda constante por estos microorganismos evaluados. Además, se establecieron las bases preliminares para una producción comercial local de las cepas de *Trichoderma*, a nivel semi-industrial, que permitiría el desarrollo masivo de bio-controladores, lo cual constituye una necesidad básica de agricultores orgánicos, quienes día a día aumentan su demanda por este tipo de insumos.

2. OBJETIVOS

General: Evaluación de formulaciones de microorganismos controladores de enfermedades y plagas en cultivos hortofrutícola de importancia regional.

Específicos:

- ✓ Aislar e identificar de cepas de Virus granuloso y *Trichoderma* spp.
- ✓ Disponer de un sistema de producción que permita tener un stock constante de los controladores biológicos.
- ✓ Determinar las cepas de los controladores biológicos, sus formulaciones y formas de aplicación para el control de las enfermedades y plagas a nivel de laboratorio.
- ✓ Determinar las cepas de los controladores biológicos, sus formulaciones y formas de aplicación para el control de las enfermedades y plagas en cultivos experimentales.
- ✓ Formar unidades de validación con productores orgánicos.

Análisis del cumplimiento de los objetivos. (Formato Informe Final).

3. METODOLOGÍA

3.1 UNIDAD DE *Trichoderma*

3.1.1 Recolección de cepas de *Trichoderma sp.*

Para la recolección de cepas de *Trichoderma sp.* se recolectaron muestras de suelo y hojarasca en distintas formaciones vegetacionales y predios.

La cepa Soto se obtuvo de un cultivo de maravillas en Rengo. Las cepas Sherwood y Tubo se obtuvieron del parque forestal de la Universidad de Talca. La cepa Queule se obtuvo de la reserva Nacional ubicada en Tregualemu, donde existe una de las últimas formaciones de Queule. La cepa Trailes se obtuvo de la Vega de los Trailes ubicada en la base del cerro Enladrillado en el sector de Vilches. La cepa Longavi se obtuvo de un huerto de frambuesos ubicado en el sector de la Merced en Longaví y la cepa Coque de un huerto abandonado de manzanos ubicado en las cercanías de Linares. En todos estos casos se han traído muestras de suelo de sectores cercanos al camino y de otros de difícil acceso, generalmente ubicados en quebradas a las que se debe llegar usando cuerdas, de forma de aumentar la diversidad de las muestras.

Estas muestras de suelo se colocaron, primero en cámara húmeda por un tiempo adecuado, para la formación de micelio visible y luego se sacaron muestras de este micelio y de suelo, los que se cultivaron en placas Petri con medio de cultivo agar malta. A este se le agregó un antibiótico Nistatina (50 mg/l) y ácido láctico al 25% en una dosis de 250µl/ 100 ml, para estimular solo el crecimiento de hongos. Se dejó en incubación hasta que se pudiera observar crecimiento de micelio sospechoso de ser *Trichoderma sp.* y se volvió a reaislar. Una vez obtenido un cultivo puro se hacía una identificación preliminar bajo microscopio, para corroborar que perteneciera al género *Trichoderma* y luego se almacenaba en tubos de cultivo. Previo a esto, la placa original se mantuvo por varios días de forma de observar que hongo predominaba, siendo siempre el hongo identificado como *Trichoderma sp.*

3.1.2 Identificación de las cepas:

Dada la dificultad para la identificación de las especies del genero *Trichoderma*, se optó después de varios e infructuosos intentos de determinar las especies, contratar los servicios del Profesor Eduardo Piontelli de la Universidad de Valparaíso. Los resultados de su identificación se detallan en el anexo 1, donde se adjunta el informe entregado.

3.1.3 Pruebas *in Vitro*

Ensayo 1 En el primer ensayo, se evaluó el efecto de las especies recolectadas de *Trichoderma sp.* sobre conidias o unidades formadores de colonias, de los distintos patógenos, insertas en el medio de cultivo. El objetivo fue determinar la capacidad de control de *Trichoderma sp.* sobre una especie patógena ya presente. Para esto se utilizó medio de cultivo agar Papa dextrosa (ADP), esterilizado en autoclave, acidificado y con antibióticos, al que en estado liquido y con una temperatura inferior a 30°C, se le agregaron las conidias de los hongos fitopatógenos de forma de no dañarlas. La concentración de conidias se determinó utilizando una cámara Neubauer, ocupando la siguiente formula.

$$\text{conidias/ } \mu\text{l} = \frac{\text{conidias}}{1 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm}} \quad (\text{Lab. Brand, 1991})$$

Las conidias o unidades de inculo de los hongos a utilizar, se extrajeron con solución de tritón de placas Petri con cultivos puros de los microorganismos. Una vez solidificado el medio se aplicaron los siguientes tratamientos, con 5 repeticiones cada uno mostrado en el siguiente cuadro.

Cuadro 3.1.1 Tratamientos evaluados en ensayo de control de *Trichoderma sp* sobre los distintos fitopatógenos.

<i>Trichoderma sp</i> 10 ⁸	<i>Trichoderma sp</i> 10 ⁸ + fungicida
<i>Trichoderma sp</i> 10 ⁷	<i>Trichoderma sp</i> 10 ⁷ + fungicida
<i>Trichoderma sp</i> 10 ⁶	<i>Trichoderma sp</i> 10 ⁶ + fungicida
<i>Trichoderma sp</i> 10 ⁵	<i>Trichoderma sp</i> 10 ⁵ + fungicida
Benomilo (dosis comercial)	Trichodex dosis comercial
Solo patógeno	Trichodex dosis comercial + Benomilo

Los tratamientos con *Trichoderma sp* consideraron la aplicación de 30 µl de cada una de las concentraciones, extrayéndose las conidias de cultivos en agar malta. Las conidias se pusieron en una solución de Tritón (50µl/lit) aplicadas en la concentración pertinente y en la dosis ya mencionada en el centro de la placa Petri, que ya contenía las conidias de los patógenos.

Como parámetros a evaluar consideró:

- Diámetro de crecimiento de *Trichoderma*
- Efecto del fungicida sobre la acción de *Trichoderma*.

Este ensayo se realizó en el laboratorio de fitopatología de la UTAL, en la cámara de aislamiento a 20°C constante.

El principal problema metodológico, fue la aislamiento de los hongos fitopatógenos, ya que estos se contaminaban repetidamente con levaduras y *Trichoderma*. Por lo que se agregó al medio de cultivos Nistatin.

Ensayo II En el segundo ensayo se evaluara el efecto de *Trichoderma*, presente en el medio de cultivo, sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos. Para lo cual se hará medio de cultivo DPA, en lo que se insertaron de la misma forma que en el ensayo anterior las 4 concentraciones de *Trichoderma sp* y Trichodex, quedando los tratamientos como los que se ven en el cuadro 3.2, con 5 repeticiones cada uno.

Cuadro 3.1.2 Tratamientos con *Trichoderma* incluido en el medio de cultivo.

<i>Trichoderma</i> sp. 10^8	<i>Trichoderma</i> sp. 10^6 + patógeno	Trichodex 10^9 (Dosis comercial)
<i>Trichoderma</i> sp. 10^7	<i>Trichoderma</i> sp. 10^5 + patógeno	Trichodex 10^9 + patógeno
<i>Trichoderma</i> sp. 10^6	<i>Trichoderma</i> sp. 10^8 + patógeno + fungicida	Trichodex 10^9 + patógeno + fungicida
<i>Trichoderma</i> sp. 10^5	<i>Trichoderma</i> sp. 10^7 + patógeno + fungicida	Solo Patógeno
<i>Trichoderma</i> sp. 10^8 + patógeno	<i>Trichoderma</i> sp. 10^6 + patógeno + fungicida	Solo <i>Trichoderma</i>
<i>Trichoderma</i> sp. 10^7 + patógeno	<i>Trichoderma</i> sp. 10^5 + patógeno + fungicida	Patógeno + fungicida

Los patógenos se aplicaran en las concentraciones ya mencionadas en la cuadro 1 en una dosis igual a la que se aplico *Trichoderma* en el ensayo I. El fungicida utilizado fue Benomilo a dosis comercial.

Ensayo III En este ensayo se midió la capacidad de avance de *Trichoderma* sobre los hongos patógenos. Esto consistió en poner en una placa con PDA, en el cual a distancias iguales de los bordes (2 cm) y en lados opuestos de la placa, se agregaron discos con *Trichoderma* y de cada uno de los patógenos extraídos, de cultivos en PDA, que fueron sembrados con 10^6 conidias por ml de medio.

3.1.3 Ensayos en almácigos

Control de *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum* en almácigos de pimentón. El ensayo fue realizado en almácigos de pimentón var. Resistan, sembrados en bandejas speedling, las que contenían una mezcla de tierra de hoja, suelo del lugar y arena 1:2:1, la que fue autoclavada dos veces a 121° C. Por 30 minutos. A esta mezcla se les agrego una solución de propavulos del patógeno en una concentración de 10^8 conidias/ml. El ensayo fue conducido

en el Campus Lircay de la Universidad de Talca. En invernaderos del departamento de Hortalizas.

Rhizoctonia solani

Los tratamientos fueron los siguientes:

- T1. Cepa Trailes, *Trichoderma parceanamosum*. En una concentración de 10^9 conidias/ml.
- T2. Cepa Queule, *Trichoderma harzianum*. En una concentración de 10^9 conidias/ml.
- T3. Trichodex en su dosis comercial.
- T4. Benomilo en su dosis comercial.
- T5 Testigo. Agua estéril.
- T6. Cepa Trailes, *Trichoderma parceanamosum*. En una concentración de 10^9 conidias/ml. más Benomilo en su dosis comercial.
- T7. Cepa Queule, *Trichoderma harzianum*. En una concentración de 10^9 conidias/ml. más Benomilo en su dosis comercial.

Esto fue aplicado en una dosis de 3 ml por celda. El diseño estadístico fue completamente al azar, contando con 5 repeticiones, cada una de las cuales se componía de 10 plantas. Entre las filas de los distintos tratamientos se encontraba una hilera sin suelo, como forma de aislar los tratamientos.

Sclerotinia sclerotiorum

Los tratamientos fueron los siguientes:

- T1. Cepa Longaví, *Trichoderma* sp.. En una concentración de 10^9 conidias/ml.
- T2. Cepa Queule, *Trichoderma harzianum*. En una concentración de 10^9 conidias/ml.
- T3. Trichodex en su dosis comercial.
- T4. Benomilo en su dosis comercial.
- T5 Testigo. Agua estéril.
- T6. Cepa Longaví, *Trichoderma* sp. En una concentración de 10^9 conidias/ml. más Benomilo en su dosis comercial.

Totales de 10 "mezclas"?

T7. Cepa Queule, *Trichoderma harzianum*. En una concentración de 10^9 conidias/ml. más Benomilo en su dosis comercial.

Esto fue aplicado en una dosis de 3 ml por celda. El diseño estadístico fue completamente al azar, contando con 5 repeticiones, cada una de las cuales se componía de 10 plantas. Entre las filas de los distintos tratamientos se encontraba una hilera sin suelo, como forma de aislar los tratamientos.

Control de *Fusarium oxysporium* en almácigo de Tomate var. Cal Ace y sobrevivencia de *Trichoderma*

En tomate al aire libre var. Cal. Ace. Se evaluó el control de Tr sobre *Fusarium oxysporium* Se realizó lo siguiente:

- Se utilizó una mezcla de suelo de 1:1:1 de suelo del Campus norte de la UTAL, tierra de hoja y arena.
- Se diseñaron bloques con suelo estéril y no estéril. La esterilización se realizó en autoclave a 121°C . Por media hora tres veces. Y además se dividió en dos cepas de Tr. Sherwood y Longaví.
- Las bandejas speedling de 98 alvéolos se llenaron con estos suelos, en hilera por medio con 13 celdas cada una. La separación entre hileras busca aislar los tratamientos.

Cuadro 3.1.3 Tratamientos con *Trichoderma* en ensayos en almácigos de tomate.

Suelo estéril	Suelo sin esterilizar
<i>Trichoderma</i> 10^9	<i>Trichoderma</i> 10^9
<i>Trichoderma</i> 10^8	<i>Trichoderma</i> 10^8
<i>Trichoderma</i> 10^9 + fungicida	<i>Trichoderma</i> 10^9 + fungicida
<i>Trichoderma</i> 10^8 + fungicida	<i>Trichoderma</i> 10^8 + fungicida
Trichodex 10^9	Trichodex 10^9
Trichodex 10^8	Trichodex 10^8
Trichodex + fungicida	Trichodex + fungicida
Suelo solo	Suelo solo
Solo <i>Fusarium</i>	Solo <i>Fusarium</i>
Fungicida	fungicida

El fungicida consistió en Benomilo a dosis comercial. Trichodex también fue a dosis comercial.

La forma de aplicar los tratamientos fue aplicar una suspensión de macroconidias del patógeno, en una dosis de 1 ml por celdas a una concentración de 10^6 . A las 48 horas se sembraron las semillas de tomate aplicándose en forma localizada un ml de cada uno de los tratamientos de Tr, Tx, el fungicida y las mezclas de estos.

Las bandejas se ubicaron en el invernadero de maternidad en el Campus Norte de la UTAL. A temperatura y humedad adecuada para su germinación, una vez que emergieron se colocaron en una zona de menor temperatura dentro del invernadero y se evaluaron los parámetros ya mencionados. Además se realizaron mediciones sobre la población de *Trichoderma* y *Fusarium* en el suelo, a través del tiempo. Para lo cual se extraían semanalmente, por un mes un gramos de suelo por celda. El suelo colectado para cada repetición de los tratamientos se diluyo en forma seriada para la cuantificación de hongos del suelo (FAO, 1985) 0,1 gr. de suelo en 99.9 ml de agua destilada estéril y 100 μ l del sobrenadante de la suspensión fue sembrada en medio de cultivo agar extracto malta (2%) acidificado y con 0.15 mg. de amoxicilina. Las placas fueron incubada por 4 días a 25°C, para luego realizar el recuento de colonias de *Trichoderma*, as cantidades de cada hongo se expresaron en u.f.c/gr. de suelo.

Los datos obtenidos fueron sometidos a una análisis de varianza con medias repetidas en el tiempo. Al resultar este análisis significativo se aplico el test de Tukey para la separación de medias.

Control de *Rhizoctonia solani* en almácigos de Brócoli El ensayo fue realizado en almácigos de brócoli, var. Maratón, establecidos en bandejas speedling con una mezcla de tierra de hoja, suelo del lugar y arena en una proporción de 1:2:1, respectivamente. Esta mezcla de suelo fue autoclavada dos veces a 121°C por 30 minutos. El inóculo de cada hongo fue adicionado al suelo de cada celdilla de la bandeja a través de un disco de micelio, de 0,5 cm de

diámetro, el que fue colocado en centro de cada celdilla. Después de tres días de la inoculación, se puso la semilla, sobre este disco y se aplicaron los distintos tratamientos, con micropipeta, aplicándose 3 ml de cada tratamiento. El diseño estadístico utilizado fue de Bloques Completos al Azar con arreglo factorial de 3x2x2, con los siguientes factores: (F1) Cepa 1 de *Trichoderma harzianum* (Queule), Cepa 2 de *Trichoderma parceanamosum* (Trailes) y Trichodex; (F2) concentración de conidias 0, y 10⁹ conidias ml⁻¹, y (F3) con y sin fungicida. El diseño del ensayo tiene la estructura explicada en el cuadro 3.3.

Cuadro 3.1.4 Tratamientos con *Trichoderma* en ensayos en almácigos de Brócoli.

F1	<i>Trichoderma</i> Cepa 1				<i>Trichoderma</i> Cepa 2				Trichodex			
F2	0		10 ⁹		0		10 ⁹		0		10 ⁹	
F3	s/f	c/f	s/f	c/f	s/f	c/f	s/f	c/f	s/f	c/f	S/f	C/f
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12

Se utilizaron cinco repeticiones (una bandeja speedling por repetición) y 10 celdas/semillas como unidad experimental. Los ensayos fueron conducidos en los invernaderos de investigación de la Facultad de Ciencias Agraria ubicados en el Campus Lircay de la Universidad de Talca.

3.1.5 Ensayos en cultivos experimentales.

Control de *Botrytis cinerea* en lechuga var. Esmeralda en sistema hidropónico, de bandeja flotante. Este ensayo se evaluó el efecto de la Cepa Sherwood (*Trichoderma virens*), en el control de *Botrytis cinerea* sobre lechuga. Var Esmeralda. Las lechugas fueron obtenidas de un almácigo realizado, en sistema hidropónico de bandeja flotante con sustrato, siendo este compuesto por turba, en bandejas speedling, las que flotaban sobre piscinas de agua con la solución nutritiva Wyfe. WYF

Las plantas se transplantaron, sanas y homogéneas, con dos hojas verdaderas, a piscinas de 1,2 por 1,5 m, con una profundidad de 10 cm. Las que también contienen la solución

nutritiva Wye. Estas piscinas se ubicaron en los invernaderos del Centro Experimental Panguilemo de la Universidad de Talca. Sus condiciones ambientales fueron de 20 a 22° C de temperatura y humedad ambiental de 50 a 60%.

Después de trasplante se dejaron las plantas solo en agua, por tres días antes de agregar la solución nutritiva, esperándose tres días más para la estabilización del material vegetal y reemplazo de las plantas que presentaron un menor vigor, quedando el plantel homogéneo, después de lo cual se aplicaron los tratamientos siguientes.

- T1. Testigo con la aplicación de agua.
- T2. *Trichoderma* Cepa Sherwood, en una concentración de 10^9 conidias/ml
- T3. Trichodex en su dosis comercial.
- T4. Benomilo+Captan, en su dosis comercial.
- T5. *Trichoderma* Cepa Sherwood, en una concentración de 10^9 conidias/ml en combinación con Benomilo+Captan, en su dosis comercial.
- T6. Trichodex en su dosis comercial. Más Benomilo+Captan, en su dosis comercial.

Los tratamientos se aplicaron en una dosis estandarizadas para lograr un mojado total de la planta. Aplicándose con bomba de espalda Solo©. Una semana después de realizadas estas aplicaciones, se inocularon las plantas con una suspensión de conidias de *Botrytis cinerea*, en una concentración de 10^6 conidias/ml. Utilizándose la misma dosis que para los tratamientos.

Al momento de cosecha se midieron los parámetros de incidencia, severidad, a través de 4 categorías de daño, altura y peso de las plantas.

El diseño estadístico a utilizar fue el completamente al azar, con arreglo factorial de $2 \times 2 \times 2$, con tres repeticiones por tratamientos, de las que se utilizaron las 17 plantas centrales de cada piscina, las que contaban con 39 plantas cada una. Además en un sector aparte se dejó una piscina sin ningún tratamiento, ni inoculación de *Botrytis cinerea*.

Control de *Fusarium oxysporium* en cultivos de tomate var. Presto. En este cultivo se utilizó la variedad Presto para invernadero. Las plántulas se obtuvieron del primer ensayo de almácigo, pero en estas plantas testigos no presentaron síntomas de enfermedad, por lo que no se pudieron realizar evaluaciones respecto a los objetivos planteados.

El objetivo de este ensayo es determinar la efectividad de las dos cepas de *Tr.* para controlar las enfermedades fúngicas del tomate. Midiendo enfermedades presentes, severidad, incidencia, rendimiento y calidad de la producción final.

El ensayo se está realizando en el terreno de un agricultor del sector de Colín. Estas plantas se plantaron en hilera a 30 cm sobre la platabanda y 1 metro entre hileras.

Cuadro 3.1.5 Tratamientos con *Trichoderma* en ensayos de Tomate al aire libre

<i>Tr.</i> Queule 10^9	Tx dosis comercial
<i>Tr.</i> Soto 10^9	Benomilo
Testigo	

Estos tratamientos repetidos para las plantas obtenidas del bloque de suelo esterilizado y no esterilizado.

Los tratamientos se aplicaron con bomba de espalda Solo® de 20 lt. Estos fueron dirigidos al follaje como al suelo en la base del cuello.

Control de *Fusarium solani* en cultivos experimentales de tomate var. Agora. Este ensayo se realiza en el Campus Lircay de la Universidad de Talca. Las plantas de tomate var. Agora, obtenidas de almácigos en bandejas speedling, con sustrato estéril. Se transplantaron a bolsas con una mezcla de suelo que contenía tierra de hoja, perlita y suelo del lugar, la que fue autoclavada y posteriormente inoculada con *Fusarium solani*, en una dosis de 10^6 conidias por ml, a través de una suspensión acuosa en una dosis de 10 ml por bolsa, aplicados al hoyo de plantación, esto tres días antes del trasplante. Durante el cual se aplicaron los tratamientos que se detallan a continuación:

T1. Testigo con la aplicación de agua.

T2. *Trichoderma harzianum* Cepa Queule, en una concentración de 10^9 conidias/ml

T3. Trichodex en su dosis comercial.

T4. Benomilo, en su dosis comercial.

T5. *Trichoderma harzianum* Cepa Queule, en una concentración de 10^9 conidias/ml en combinación con Benomilo, en su dosis comercial.

T6. Trichodex en su dosis comercial, en combinación con Benomilo, en su dosis comercial.

Este ensayo se maneja en un diseño completamente al azar, con 4 repeticiones, cada una de las cuales cuenta con 10 plantas.

Control de *Venturia inaequalis* en manzanos var. Fuji.

Se utilizaron árboles de manzano, cv. Fuji, de 2 años de edad, conducidos en eje central, cultivados bajo un sistema de producción orgánica. El huerto se encuentra ubicado en los Maitenes, a 10 Km. al este de San Clemente.

Los tratamientos a evaluar corresponden a:

- T1 Pulverización con conidias de la Cepa Queule de *Trichoderma harzianum*, a una concentración de 10^9 conidias ml^{-1}
- T2 Pulverización con Thiolux, en su dosis comercial
- T3 Pulverización de Thiolux alternado con pulverizaciones con conidias de la Cepa Queule de *Trichoderma harzianum*, a una concentración de 10^9 conidias ml^{-1}

Las pulverizaciones fueron dirigidas a las hojarascas del suelo, iniciándose según monitoreo de presencia de ascosporas liberadas y condiciones ambientales favorables a la infección. La aplicación se repitió a los 7 días, para después continuar según condiciones ambientales, lluvias y neblinas fuertes.

Espárragos

Este ensayo se realizó sobre espárragos de 2 años de edad, los cuales presentaban ataques severo de *Fusarium* sp. Se realizaron aplicación de *Trichoderma harzianum* Cepa Queule, a través de inyección a las raíces, en una dosis de 10^9 conidias/ml con un volumen tal que lograra un mojado total del sistema radical. Lo que se repitió a los 15 días, Se evaluaron 10 plantas tratadas y no tratadas. Evaluando sintomatología y rendimiento.

3.1.6 Producción en masa y almacenamiento.

Producción en masa. En este aspecto se evaluó la productividad y efectividad de diversos medios de cultivo, para lograr una alta producción de *Tr*. Proyectándose así a una reproducción semi industrial de este hongo.

Se probaron diversas semillas y formas de estas, recipientes donde realizar la producción y protocolos de higiene, para evitar contaminaciones.

T1. Semillas de trigo.

T2. Semillas de avena.

T3. Semillas de maíz.

T4. Maíz chancado.

T5. Afrecho.

T6. Viruta.

T7. Aserrín.

T8. Mezcla de las semillas enteras (Trigo, avena y Maíz)

Esto en tres bloques, los que fueron dados por el tratamiento dados a los substratos, previo a la esterilización e inoculación con las cepas de *Tr*. Estos fueron:

P1. Ningún tratamiento.

P2. Cocción por una hora.

P3. Pregerminación. En este se colocaron los substratos en cámaras húmedas. Luego de esto todos los substratos se autoclavarán dos veces, a 121° C. Por 15 minutos.

Se aplicaron 100 gramos de cada sustrato, luego de los cual se inoculo con cubos de micelio de *Tr*. Proveniente de cultivos puros en Agar malta. Estos tratamientos se colocaron en la sala de incubación del Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Talca a una temperatura que fluctuaba entre los 20 y 25° C. Con un régimen de luz natural. Un mes después se realizaron conteos de conidias de cada uno de los substratos. Para lo cual se tomaron 5 gr. De cada tratamiento, el que agregaba a una solución de tritón al 0,5%, y puesto a agitación a 400 r.p.m. por una hora. Luego de lo cual se extraía un ml de esta solución, el que se diluía 100

veces y se realizaba el conteo en una cámara Neubauer. Esto bajo un análisis de bloques al azar. Con 4 repeticiones por tratamiento.

Ensayos de almacenaje. En estos ensayos se evaluaron los siguientes tratamientos. Se evaluaron dos tipos de almacenaje, el primero en medio líquido y el segundo en medios sólidos. Se utilizaron como medida de evaluación, la relación de conidias iniciales respecto a las conidias finales, con capacidad de formar colonias. Para lo que se realizaba la siguiente metodología. De cada uno de las muestras se tomo, un ml o un gr., según correspondiera, el que era diluido en 100 ml de agua estéril, la que después de agitarse, se realizaba un conteo de conidias, con cámara Neubauer, para después sembrar un ml de la suspensión, en agar malta, acidificado con ácido láctico. Una vez se iniciara el crecimiento de las colonias, se obtenía la relación, entre la cantidad de conidias y las u.f.c.

Los tratamientos en medios líquidos fueron los siguientes.

- Agua estéril
- Agua sin esterilizar
- Agua estéril + Ac. Láctico
- Agua sin esterilizar + Ac. Láctico

Estos tratamientos se mantuvieron en cuatro condiciones. A temperatura ambiente, con y sin luz. Y en refrigerador a 4° C, con y sin luz. El control de la luz, se realizo, envolviendo en papel aluminio los frascos. Se realizaron 3 repeticiones de cada tratamientos, cada uno contando con 5 frascos.

Las mediciones se realizaron cada diez días, hasta el momento, en que la viabilidad fuera inferior al 30%, de la cantidad de conidias iniciales. La concentración inicial de conidias era de 10^9 conidias/ml.

En medio sólido se realizaron ensayos en los siguientes sustratos.

- Talco.
- Tierra de diatomeas.
- Perlita.

Para esto se elaboro una solución de conidias de *Tr.* extraídas de un cultivo puro en una concentración de 10^{10} conidias/ml, de la que se extrajeron muestras de 10 ml, las que se pusieron en envases de vidrio autoclavados, luego agregándose 20 gr. cada uno de los materiales, hasta obtener una consistencia sólida, luego de lo cual se colocaron en horno de secado por 24, 48 y 72 hrs. Para luego ser almacenados a temperatura ambiente, en oscuridad. Luego de lo cual se extrajo un gr. de cada una de las muestras, la que se diluyo en 100 ml de agua estéril, del cual se extrajo un ml, el que fue sembrado en placas Petri, con agar malta, acidificado con ácido láctico. Para luego realizar un conteo de la cantidad de conidias presentes. Este mismo conteo se realizo cada 15 días. Las placas se guardaron en oscuridad y a temperatura ambiente. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento, con 3 placas por repetición.

Todos los ensayos se analizaron con el programa Statistica for Windows Release 4.5, los ensayos que utilizaron arreglo factorial fueron analizados como tal, pero la expresión de los datos se realizo en base a los tratamientos realizado para facilitar su comprensión.

3.2 UNIDAD DE VIRUS GRANULOSO

3.2.1 Colecta de virus granuloso

Se procedió a colectar larvas y pupas muertas en huertos de manzano abandonadas en la séptima región. Los sectores muestreados fueron Lircay, Panguilemo, Alto Las Cruces, Longaví sector Las Mercedes, Cauquenes, Gultro y Linares. En cada una de estas localidades se colectaron las muestras en recipientes de plástico negro y se almacenaron a 6° C, con el fin de evitar la perdida de material viral tanto por la acción del calor o de los rayos ultravioleta. Una vez recolectadas las muestras se procedió a llevarlas al laboratorio para su análisis.

Entre el 20 de Noviembre y el 20 de Mayo de cada año se hicieron viajes entre las zonas antes mencionadas, abarcando un importante numero de huertos de manzano. En estos

huertos se colocaron trampas de papel corrugado, colectándose las trampas semanalmente con el fin de obtener larvas y pupas de *Cydia pomonella* para la crianza. Además en cada huerto se colecto un importante número de larvas muertas, con el fin de encontrara nuevas cepas de virus Granuloso.

3.2.2 Aislación e identificación del virus.

Las muestras fueron maceradas por 3 días en agua destilada a temperatura ambiente, evitando el contacto con la luz. Esto asegura una adecuada descomposición de los tejidos y posterior liberación de los cuerpos de inclusión en la solución. Una vez transcurrido los 3 días se suspendió el macerado en Tween 20 al 0,1%, para centrifugar las muestras a 1500 r.p.m. durante 2 minutos. Al cabo de ese tiempo se descarto el pellet, trasvasando el sobrenadante a otro tubo, el cual se centrifugo a 10.000 r.p.m. durante 30 minutos. Se descarto el sobrenadante y se resuspendió el pellet en unas gotas de agua destilada.

Para la identificación de las muestras se realizaron frotis de las suspensiones centrifugadas sobre un portaobjeto limpio. Luego se trato el frotis son HCl al 0,1 % durante 5 minutos, al cabo del cual se trataron con una solución de Giemsa diluido durante 10 minutos. Posteriormente se lavaron con agua corriente durante 5 a 10 segundos. Fue posible observar bajo microscopio los cuerpos de inclusión de color azul. Las gotas de grasa rojas y otras sales nos se tiñen . Esto es importante, ya que los uratos por ejemplo, son fácilmente confundibles con cuerpos de inclusión viral.

Se identificaron los cuerpos de inclusión comparando con las fotos de bibliografía y descripciones que se detallan en las publicaciones de Lecuona(1996), Payne (1981), y Maramorosch & Sherman (1985).

Además de la identificación de los cuerpos físicos se realizaron infestaciones de larvas sanas con las soluciones de los cuerpos de inclusión usando una concentración de 3×10^7 ci/ μ l. Observando la formación de los cuerpos de inclusión en los hospederos sanos posterior a la muerte de estos y corroboración de los síntomas.

3.2.3 Producción de anticuerpos policlonales para la identificación de VG.

A un conejo se le hicieron inyecciones intramusculares una vez por semana durante 3 semanas de 3×10^7 CI/ μ l de VG Cepa LI. Una vez transcurrido la quinta semana se procedió a extraer sangre de la arteria principal de la oreja del animal según la metodología descrita por Ball y col. para la extracción de anticuerpos. Una vez extraído el suero de la sangre esta se llevo a una solución de azida de sodio al 0.025% previa centrifugación y filtrado a través de un filtro para bacterias de 0.2 μ m. Posterior a esto se almaceno en tubos de plástico con igual cantidad de glicerol y se procedió a congelar las.

Luego se agrego por cada ml de antisuero 1ml de agua destilada, 1,3 ml de sulfato de amonio saturado. Se dejo mezclando por 30 min. y se refrigero toda la noche.

Se centrifugo a 8000 (g) durante 10 min., y se descarto el sobrenadante. El pellet fue resuspendido lentamente en 1ml de PBS. Se agrego además 1ml de agua y 1,02 ml de sulfato de amonio saturado por cada ml del pellet resuspendido. Mezclamos y volvimos a centrifugar por 10 min. a 8000 g. El anticuerpo policlonal proveniente del conejo (Gra-antiCpGV) diluido en PBS, se agrego a las placas de poliestireno, usando un volumen de 50 μ l. Esta se incubo toda la noche a 4°C.

Lavando 4 veces con PBS-Tween, se procedió a eliminar el residuo de la solución de antígeno. Finalmente se enjuago con agua destilada y se dejo secar a temperatura ambiente. Estas placas sensibilizadas con Gra-antiCpGV se podían almacenar a 4°C hasta ser utilizadas.

Las muestras de larvas con síntomas de virosis eran maceradas permitiendo su descomposición siguiendo la metodología descrita para la aislación de cuerpos de inclusión, explicada anteriormente.

De la solución de larvas maceradas obtenidas se diluían 1 en 1000 veces con PBS-Tween, agregando a cada celda 50µl y se dejaba a temperatura de habitación por 2 horas.

Nuevamente se lavaba cuatro veces con PBS-Tween, para posteriormente al secado agregar 50µl del conjugado anti-rabbit IgG-paranitrofenilfosfatasa diluido 1 en 200 veces en PBS-Tween, por 30 min. a temperatura de habitación. Luego lavamos cuatro veces con PBS-Tween y agregamos la solución sustrato dejando 30 min. para que se produjera la reacción. Para detener la reacción se usaron 50µl de H₂SO₄ 2M. Después se procedió a leer en un lector de placas Metrolab 980, a 450 nm.

3.2.4 Crianza de *Cydia pomonella* sobre dietas artificiales.

Para la crianza de larvas se utilizó dietas artificiales (Southland Products Inc.) dentro de recipientes plásticos de 4.5 cm de diámetro y 7 cm de alto con tapa perforada y cubierta con malla fina para ventilación. Estas se dejaban reposar a temperatura ambiente por lo menos 24 horas antes de introducir las larvas neonatas. Tomando con cuidado las larvas desde el hilo de seda se colocaban 2 larvas por recipiente, realizando pequeños orificios en la dieta alrededor de la larva con el objetivo de facilitar la exploración de la larva. Para evitar contaminaciones bacterianas en las dietas de crianza, una suspensión de 500 mg de cloranfenicol fue agregada a la dieta original. Este antibiótico de amplio espectro controla bacterias gram (+) y gram (-).

Las larvas eran criadas durante todos los estadios en los recipientes hasta su pupación. Posterior a esto se retiraban las pupas individualmente y se separaban según sexo contando los segmentos abdominales. Una vez que los adultos emergían eran llevados a cámaras de ovipostura mantenidos a 25 ° C ± 1 y a 60 % de HR. En cada cámara de ovipostura se colocaban un máximo de 25 parejas.

Diariamente los papeles con huevos eran retirados e incubados los huevos en la cámara de crianza, hasta eclosión, posteriormente se transportaban a los recipientes con dietas.

3.2.5 Producción de CpGV-L1

Una parte de la crianza de *C. pomonella* se separó del resto, cuando las larvas alcanzaban el cuarto estadio larval, criándose separadamente hasta que éstas mudaban al quinto estadio. Una vez ocurrido este proceso, las larvas fueron transferidas a una dieta artificial inoculada con $1,07 \times 10^7$ cuerpos de inclusión (CI)/ μl de CpGV-L1 μl^{-1} . Sobre un papel de aluminio se depositó una capa de 5 mm de espesor de la dieta. Una vez solidificada ésta, el papel con la dieta fue enrollado y cortada en secciones de 2 cm. A cada uno de estos rollitos fue asperjada la suspensión viral, y posteriormente fueron puestos dentro de frascos de vidrio y se le adicionaron las larvas. Los frascos fueron incubados en una cámara oscura, para evitar pérdidas por la acción de la luz. De este modo se podía fácilmente encontrar las larvas muertas por el virus al desenrollar el papel aluminio con dieta para su posterior maceración.

Los CI fueron contabilizados y almacenados en agua destilada estéril a una concentración de $1,07 \times 10^{10}$ CI μl^{-1} a 6°C en oscuridad.

3.2.6 Ensayos de laboratorio

Determinación de concentración letal 50 (LC₅₀) de CpGV-L1 en *Cecidia pomonella* (L.).

Para este propósito, 100 μl de dieta artificial fue inoculada con 15 μl de una suspensión de CpGV-L1 a distintas concentraciones. Luego, diez larvas neonatas fueron colocadas con cuidado en cada celda con la dieta y el virus (placas para ELISA, SOCOREX) a las distintas concentraciones. Diariamente, se observaron las larvas bajo luz, registrando su comportamiento y síntomas aparentes. Una vez que todas las larvas de algún tratamiento murieron, se detuvo el ensayo. Las concentraciones utilizadas correspondieron a:

Tratamientos	Concentración viral	Nº Repeticiones	Nº Larvas por repetición
T1	0	4	10
T2	$1,064 \times 10^4$	4	10
T3	$1,064 \times 10^5$	4	10
T4	$1,064 \times 10^6$	4	10

Se utilizó una regresión Logística para ajustar los datos de individuos muertos a una curva de respuesta. La regresión logística se utiliza para estudiar el efecto de múltiples variables explicatorias sobre una variable respuesta categórica, ya sea dicotómica o con más de dos categorías en escala ordinal. En estos casos no se puede aplicar el modelo de regresión lineal múltiple por no cumplirse el supuesto de continuidad y de distribución normal de la variable dependiente (Dobson, 1983; Taucher, 1999). Finalmente, se determinó la LC₅₀ con los resultados obtenidos al día quinto después de la inoculación con el virus, basados en lo anteriormente realizado por Payne (1981) siendo el momento con mejor ajuste de los datos al modelo.

La suspensión viral utilizada en este ensayo, fue producida el 4 de Marzo de 2000, días previo a la realización del experimento y su concentración inicial fue de $1,064 \times 10^6$ civ ml⁻¹. Anteriormente, se había realizado un ensayo similar, pero con una suspensión viral de dos años de almacenamiento en refrigerador convencional.

Control de *Cydia pomonella* con CpGV aislado L1. Se llevó a cabo un ensayo en el cual se comparó la efectividad de CpGV-L1 con Phosmet (Imidan); *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Dipel 2X) sobre la mortalidad de larvas neonatas de *Cydia pomonella*.

Para este propósito, 100 µl de dieta artificial fue inoculada con 15 µl de una suspensión de cada tratamiento. Luego, diez larvas neonatas fueron colocadas con cuidado en cada celda con la dieta los tratamientos (placas para ELISA, SOCOREX). Los tratamientos utilizados se describen en el cuadro 3.2.1

Cuadro 3.2.1 Tratamientos Ensayo de Laboratorio de Comparación.

Tratamiento	Larvas/replicas	Replicas	Dosis
Control (agua)	10	4	agua
CpGV-L1	10	4	$1,064 \times 10^9$ CI/L
Phosmet (Imidan)	10	4	1,20 g/L
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> (Dipel 2X)	10	4	0,75 g/L

En el caso de CpGV-L1 se ocupó la LC₉₀ obtenida en el ensayo anterior de $1,064 \times 10^9$ CI/L (ensayo LC₅₀ Informe N°4). La suspensión viral utilizada en este ensayo, fue producida el

4 de Marzo de 2000, días previo a la realización del experimento y su concentración inicial fue de $1,064 \times 10^6$ CI/ ml ($=1,064 \times 10^9$ CI/L). Para Phosmet se utilizó una dosis de 1,2 g/L, mientras que para *B. thuringiensis* var. *kurstaki* se aplicó una dosis de 0,75 g/L. El tratamiento control fue agua estéril.

Se utilizaron larvas de primer estadio recién eclosadas, las cuales eran colocadas con cuidado sobre las celdas con las concentraciones antes descritas y tapadas con un portaobjeto para evitar que hicieran abandono de estas. Para cada tratamiento se ocuparon placas ELISA distintas, para evitar contaminación entre tratamientos. 24 horas después todas las larvas vivas eran consideradas para el ensayo, asegurándose de que al menos quedaran 10 larvas por replica.

Diariamente, se observaron las larvas bajo lupa, registrando su comportamiento y síntomas aparentes. Se midió mortalidad y los días transcurridos desde la aplicación hasta que se obtuvo una mortalidad del 90% de los individuos en todos los tratamientos, exceptuando el control.

El ensayo se llevó a cabo en un diseño completamente al azar (DCA). Los datos se analizaron mediante un Análisis de Varianza para medidas repetidas en el tiempo, usando el programa computacional Statistica for Windows Release 4.5, en el que se evaluó el producto empleado sobre la mortalidad de las larvas en el tiempo. Los datos de mortalidad fueron transformados a valores angulares para cumplir los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Finalmente las medias de los distintos tratamientos en el tiempo fueron separados con el test de Tukey ($p \leq 0.05$).

3.2.7 Ensayos de campo

Determinación de la actividad de una Cepa nativa de Virus Granuloso (CpGV-L1), sobre *Cydia pomonella* (L.) Se utilizó un paño experimental de 375 m² más otros 375 m² de borde. Los árboles pertenecen a un huerto de manzano variedad Braeburn de 4 años, localizado en la Estación Experimental Panguilemo de la Universidad de Talca. El 4 de Octubre de 1999 se inició el monitoreo de *C. pomonella* con la instalación de tres trampas de feromonas

(Pherocon® Trécé Incorporated) en tres puntos del huerto. Estas fueron instalados a un metro de la copa del árbol y orientadas hacia el Sur-Oeste. Cada dos días, se registró el número de machos capturados. Estas trampas fueron reemplazadas dos veces, a las diez y a las seis semanas de instaladas cada vez (10 de Diciembre de 1999 y 24 de Enero de 2000). Además se llevó un registro diario de las temperaturas máximas y mínimas a través de la Estación Meteorológica de la Estación Experimental Panguilemo.

La primera pulverización fue realizada 100 grados días después del primer vuelo sostenido. Después de ésta se realizó una segunda, a los siete días después sólo para los tratamientos con productos biológicos, vale decir CpGV-L1 y *B. thuringiensis*. Para la segunda generación de polilla, se hicieron tres pulverizaciones: a los 80 grados-días después de la última captura máxima de machos, y posteriormente a los siete y 14 días después de ésta. La tercera generación recibió una pulverización a los 70 grados-días después de la máxima captura de machos y a los siete días después. La repetición de las pulverizaciones, se hizo sólo para los productos biocontroladores. En el caso del insecticida azinphosmetil, se realizaron tres aplicaciones que correspondieron a 100, 80 y 70 grados-días después del número máximo de captura de machos en las trampas.

Cuadro 3.2.2 Tratamientos utilizados para la determinación de la actividad de una Cepa nativa de Virus Granuloso (VG), CpGV-UTALCA, sobre *Cydia pomonella* en manzanos cv. Braeburn ubicados en la Estación Experimental Panguilemo.

Producto	Concentración	Agua usada	Adyuvantes	Repeticiones
CpGV-UTALCA	1.07 x 10 ¹⁰ CI/L	10 L	Azúcar (2.5% w/v)+leche descremada (0.5% w/v)	4
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> (Formulado en polvo)	6 g/L de agua	10 L	Ninguno	4
	1.5 g/L de agua			4
Azinfos-Metil (Gusación)	120 g/100L	12 L		4
Control	10 L de agua	10 L		4

Todas las aplicaciones se hicieron con una bomba manual SOLO hasta punto de goteo.

La cosecha y la evaluación de frutos sanos dañados por la polilla, fueron realizados el 29 de Febrero de 2000. Las evaluaciones realizadas correspondieron a:

- A) Frutos dañados por la polilla de la manzana. Para su determinación, se evaluaron todos los frutos cosechados de cuatro árboles por cada repetición y se determinó el porcentaje de frutos con daño de polilla en relación al total de frutos cosechados. Posteriormente, los valores porcentuales fueron transformados a valores angulares mediante la función $\arccos(x)^{1/2}$, para cumplir con el postulado de normalidad del Análisis de Varianza. Finalmente, se compararon los tratamientos a través del test de separación de medias de Tukey, con un nivel de significancia del 5%.
- B) Profundidad de daño. Para determinar la profundidad del daño realizado por *C. pomonella* sobre los frutos, se tomó una muestra de 30 frutos al azar de los frutos totales cosechados por tratamiento. Los frutos fueron disectados en forma individual y se separaron en las siguientes categorías:

Daño profundo: aquellos frutos que presentaban una galería evidente con la presencia o no de larvas. Los frutos de esta categoría no son posibles de ser comercializados como frutos frescos.

Daño superficial: aquellos frutos que presentaban daño a nivel de la epidermis del fruto, u orificios que no se constituyeron como galerías evidentes, sin la presencia de larvas de ningún estadio. Los frutos de esta categoría son comercializados como frutos frescos.

En ambos casos, se determinó el porcentaje de frutos en cada categoría y se transformados a valores angulares mediante la función $\arccos(x)^{1/2}$, para cumplir con el postulado de normalidad del Análisis de Varianza. Finalmente, se compararon los tratamientos a través del test de separación de medias de Tukey, con un nivel de significancia del 5%.

Unidades de Validación (UVAL). Se utilizaron 9 hileras de 60 árboles de un paño de 3 ha de manzano en transición a orgánico, variedad Fuji en la localidad de Maitenes con el Sr. Carlos Holmgren . Además 864 arboles Variedades Fuji y Royal Gala en San Fernando con el Sr.

5	90 gd l vuelo sostenido	No	7 días después	14 días después	8
6	90 gd l vuelo sostenido	Si	7 días después	14 días después	8
N	90 gd l vuelo sostenido	Si	7 días después	14 días después	8

Cada tratamiento tenía un total de 8 repeticiones de cada unidad experimental. Cada unidad consistió de un grupo de 5 arboles en donde se evaluaron los tres arboles centrales.

El primer vuelo sostenido se produjo el 30 de noviembre del 2000, haciendo la primera aplicación a los 90 grados días correspondiendo al día 9 de diciembre.

Para la segunda generación el primer vuelo sostenido fue el día 19 de enero del 2001, haciendo la primera aplicación a los 90 grados días el día 26 de Enero del 2001.

La tercera generación tuvo su primer vuelo sostenido el 18 de febrero del 2001, y la primera aplicación correspondió al día 26 de febrero del 2001 (90 grados días desde vuelo sostenido).

En el huerto de San Fernando se trabajó con una unidad experimental de 9 arboles en el cual el árbol central sería el evaluado. Solamente se realizó una evaluación después de la primera generación de polilla en este huerto, debido a problemas con el agricultor.

Se realizaron evaluaciones después de cada generación de *C. pomonella*, que consistían en la determinación de los porcentajes de frutos dañados, de un total de 150 frutos por cada unidad experimental, en Maitenes y 50 en la UVAL de San Fernando. Al final de la temporada se evaluaron el porcentaje de frutos dañados, del total de frutos cosechados de las unidades experimentales. Del total de frutos dañados se tomó una muestra representativa de cada tratamiento y se determinó el porcentaje de frutos con heridas superficiales y profundas.

Además se instalaron trampas de cartón corrugado (una trampa por árbol), las cuales se retiraron al final de la cosecha y midiendo el número de larvas vivas y muertas por trampas.

Ensayo Alternancia de CpGV-L1 con insecticidas tradicionales. Este ensayo tenía como objetivo evaluar la posibilidad de usar CpGV-L1 en combinación con un programa de control de *C. pomonella* tradicional, en la Estación Experimental Pangulemo, sobre manzanos de la variedad Royal Gala de 5 años.

El paño experimental fue de 500 m², consistente en dos bloques de tres hilera de 50 m de largo. El daño histórico del huerto no superaba el 2% de daño con control convencional.

Para esto se eligieron tres hileras de arboles, y en la hilera central se distribuyeron los tratamientos al azar. Cada repetición consistía de cinco arboles y se evaluarán los tres arboles centrales, quedando así dos arboles de borde entre cada tratamiento. Cada tratamiento tenía un número de cuatro repeticiones. Las evaluaciones se realizaron después de cada generación en los frutos todavía en los arboles. Se realizó una evaluación de 50 frutos por árbol (150 frutos por repetición), para determinar el porcentaje de frutos dañados para cada tratamiento.

Después de la cosecha se evaluaron todos los frutos cosechados y los frutos caídos. Además se instalaron trampas de cartón corrugado (una trampa por árbol), las cuales fueron retirados al final de la cosecha, midiendo el número de larvas vivas y muertas por trampa.

Cuadro 3.2.4 Tratamientos Ensayo Alternancia de CpGV-L1 con insecticidas tradicionales

Tratamientos	1 ^{ra} Aplicación	2 ^{da} Aplicación	3 ^{ra} Aplicación	4 ^{ta} Aplicación
Convencional	Supracid	Gusathion	Lorsban	Imidan
CpGV al final	Supracid	Gusathion	Lorsban	CpGV
2 CpGV alternados	Supracid	CpGV	Lorsban	CpGV
2 CpGV al final	Supracid	Gusathion	Lorsban	CpGV (repetiendo a los 10 días)

Las concentraciones usadas para el CpGV-L1 fueron de 1×10^{10} CI/L, con un mojamiento de 1000 L /ha. En El caso de Gusathion, Supracid, Lorsban e Imidan se utilizaron las dosis recomendadas por el fabricante(ver cuadro 3.2.5).

Cuadro 3.2.5 Dosis de productos utilizados en los programas.

Producto	Dosis
Supracid 40 WP	100 g/100 L agua
Gusathion M 35 WP	120 g/100 L agua
Lorsban 50WP	120 g/100 L agua
Imidan 50 WP	120 g/100 L agua
CpGv-L1	1×10^{12} CI/ 100L agua

Programa estándar o convencional era el programa de tratamiento habitual de un agricultor.

Se supone un programa clásico con 4 tratamientos: Noviembre, Diciembre, Enero, Febrero.

La fecha de tratamiento exacta para la primera aplicación según las capturas y de la dinámica poblacional de la polilla, fue el 29 de octubre. Las demás fechas de aplicación consideraron los periodos residuales de los insecticidas.

3.2.8 Ensayos de Almacenaje

Almacenamiento del CpGV-L1 en suspensión líquida. En este ensayo se evaluó el efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre la actividad viral de una suspensión líquida de CpGV-L1 usada en el control de *Cydia pomonella*. Las suspensiones líquidas fueron almacenadas a 24° C, en una cámara de crecimiento Percival Scientific BC-40 y a 6° C en refrigerador, durante distintos periodos de tiempo (Cuadro 3.2.6).

Las suspensiones virales, a distintas concentraciones, fueron formuladas independientemente, utilizando la metodología descrita anteriormente para la producción de

virus, a partir de una suspensión madre almacenada con una concentración de $1,07 \times 10^{10}$ civ ml^{-1} . Para almacenar las suspensiones se usaron tubos de 110 ml de material plástico con tapa atomillada que contuvieron de 50 - 100 ml de CpGV - L1 formulado como suspensión líquida. Los tubos de todos los tratamientos fueron cubiertos con papel de aluminio para ser mantenidos en completa oscuridad .

Cuadro 3.2.6 Periodos de tiempo, concentración y temperatura de almacenaje de suspensiones líquidas de CpGV-L1.

Días	Título (civ/ml)	Volumen (ml)	Temperatura (°C)	Nº larvas
730	$1.07 * 10^6$	50	6	160
730	$1.07 * 10^6$	50	25	160
365	$8,4 * 10^6$	50	6	160
365	$8,4 * 10^6$	50	25	160
183	$1,4 * 10^6$	100	6	160
183	$1,4 * 10^6$	100	25	160
92	$4,8 * 10^6$	50	6	160
92	$4,8 * 10^6$	50	25	160
0	$1,064 * 10^6$	50	-	160
0	$1,064 * 10^6$	50	-	160

Con el objetivo de determinar la pérdida de la actividad viral (AU) del CpGV-L1 formulado y almacenado como suspensión líquida, se realizaron una serie de bioensayos, para determinar las LC_{50} para *C. pomonella* de las suspensiones virales sometidas a distintos periodos de almacenamiento y temperatura. Para esto se utilizó la metodología anteriormente descrita para la determinación de LC_{50} usando las mismas concentraciones que para el ensayo a nivel de laboratorio. Por lo tanto, se utilizaron cuatro concentraciones de CpGV-L1 con 10 larvas neonatas por repetición y un total de cuatro repeticiones por cada concentración .

Una vez obtenidas las distintas LC₅₀ se determinaron los siguientes parámetros:

- A) Tiempo Letal Medio (TL₅₀): tiempo en que se produce la mortalidad de la mitad de la población, a una concentración dada del agente controlador. Para el calculo de este se realizo una regresión lineal entre el logaritmo de la AU por el número de días.
- B) Unidad de Actividad (AU): se define como la razón entre una suspensión viral estándar o patrón (S) y una a comparar (X). Esta unidad nos indica la pérdida proporcional de actividad de una suspensión viral y se calcula de la siguiente manera:

$$AU = \frac{LC_{50} S}{LC_{50} X}$$

4. DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES Y TAREAS EJECUTADAS

Obj Especific N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Término	Fecha termino real	Observaciones
Global	8.1.1	Compra de equipo e insumos	oct/98	Abr/99	En esta fecha arribó la cámara de crianza, el resto de los equipos llegó en la fecha adecuada, los insumos se compraron gran parte hasta esta fecha, el resto se hizo según necesidades
8.2.1	8.2.1.1	Recolección y aislaron de cepas de <i>Trichoderma</i> y VG	Nov/98	Nov/98	
	8.2.1.2	Identificación de las cepas	Nov/98	Nov/98	
8.2.2	8.2.2.1	Instalación de sistema de cultivo de <i>Trichoderma</i>	Dic/98	Dic/98	
	8.2.2.2	Instalación de crianza de larvas para cultivo de VG	Dic/98	Febrero 2000	La crianza pudo ser más o menos constante desde esta fecha por el atraso de la cámara de crianza y problemas en el mantenimiento del ciclo completo de <i>C. pomonella</i> .
	8.2.2.3	Determinación de mejor método de almacenaje de VG y <i>Trichoderma</i>	Julio/00	May/01	Se determinaron en esta fecha, ya que se incluyeron los sistemas de producción de Tr, no contemplados originalmente. Para el caso de VG se quiso tener tiempos de almacenaje mayor por lo que se repitió el ensayo realizado entre 1999 y 2000 en Mayo del 2001.
8.2.3	8.2.3.1	Desarrollo ensayos de <i>Trichoderma</i> en placas. Ensayo 1 Ensayo 2 Ensayo 3 Ensayo 4	Abril/99	May/99 Jun/99 Ago/99 May/99	El ensayo N° 4 se fusiono con el ensayo de dosis. El retraso fue dado por los problemas de contaminación descritos en la sección de problemas enfrentados.
	8.2.3.2	Ensayos VG in vitro	Abril/99	Mar/00	Debido al retraso en la llegada de la cámara y problemas en la crianza.
Global	8.1.2	compra materiales e insumos	Enero/99		Se realizo según necesidades durante todo el año
8.2.3	8.2.3.3	Ensayos en speedling	Abril/99		Se fusionaron con los ensayos en almaciguera

8.2.4	8.2.4.1	Ensayo de <i>Trichoderma</i> en almacigueras Pimentón Tomate Remolacha(lechuga) Brócoli	Julio/99 Julio/99 Julio/99 Dic/99	Nov/99 Oct/99 Dic/99 Jul/2000	El ensayo en pimentón se realizó en noviembre, por las demoras en el ensayo <i>in Vitro</i> , el ensayo en tomate no dio diferencias significativas, por lo que se trataron varias formas de inoculación, en el cultivo de remolacha, se optó por utilizar lechuga, la que determinó las dosis de inoculación de <i>Botrytis</i> y en brócoli, hubieron problemas con las cepas de patógeno, ya que no mostraba patogenicidad.
		Instalación de cultivos experimentales de Tomate Manzano Brócoli Espárrago	Agos/99 Junio/99 Feb/00 Sep/99	Nov/99 Jun/99 Jul/00 Sep/00	Se instalaron los cultivos en estas fechas en relación a las actividades anteriores. Este ensayo de manzano solo incluyó Vg, en sept/2000 se incluyó <i>Tr</i> . En tomate este fue el primer ensayo en colin. El segundo se instaló en dic.
	8.2.4.2	Ensayos de <i>Trichoderma</i> y Vg en cultivos experimentales de Tomate Manzano Espárrago brócoli (solo <i>Tr</i> .)	Agos/99 Agos/99 Sep/99 Feb/00	Dic/99 Mar/01 May/01 Nov/00	Este ensayo de tomate corresponde al primero, el segundo en bolsas concluyó en Mar/2000, el ensayo de manzanos correspondió al realizado en los Maitenes, tanto para <i>Tr</i> como para Vg, se dio preferencia a trabajar en el control de <i>Venturia inaequalis</i> que en <i>Phytophthora capsici</i> . En espárrago se dan los detalles en la sección de problemas enfrentados, en brócoli, se retrasó por los problemas sufridos en el almálico.
8.2.5	8.2.5.1	Charla y día campo resultados <i>Tr</i> y VG	Oct/99	Agos/98 Abr/99 Sep/99 Nov/00	Exposición sobre objetivos del proyecto en IV Jornada Científica de Estudiantes de Agronomía, Talca Póster en II Feria Orgánica en Stgo. Exposición V Jornada Científicas de Estudiantes de Agronomía, Valdivia. Póster resultados del proyecto en "Encuentro de Producción Hortícola Mercado y Calidad" organizado por el FIA, Talca.
Global	8.1.3	Compra materiales e insumos	Ene/00		Según necesidades durante el año
8.2.5	8.2.5.2	Charla y día	Ene/00	Jun/00	Se realizó en esta fecha en función de la información obtenida
	8.2.5.3	Selección agricultores UVAL	Ene/00	Ene/00	Se seleccionaron agricultores, para tomate, manzano y espárragos

	8.2.5.4	Día de campo agricultores, SAG, INDAP, GTT, agroindustrias, agricultores orgánicos en brócoli	Abr/00	Dic /00	Ensayo de manzano, resultados de media temporada
	8.2.5.5	Instalación de Unidad de validación (UVAL)	May/00	Ago/00	Según las necesidades de los cultivos
	8.2.5.6	Día de campo agricultores, SAG, INDAP, GTT, agroindustrias, agricultores orgánicos en UVAL	Dic/00	Mar/01	Con resultados de ensayos en manzano
Global	8.1.4	Compra materiales	Ene/01	Ene/01	
	8.2.5.7	Elaboración de artículos de difusión para prensa	Mar/01	Jul/01	Se realizo un boletín de difusión.
	8.2.5.8	Evaluación UVAL	Dic/00	Mar/01	
	8.2.5.9	Elaboración informe resultado de todos los ensayos y análisis global de los mismos.	Agos/01		
	8.2.5.10	Día de campo agricultores, SAG, INDAP, GTT, agroindustrias, agricultores orgánicos etc. a ensayos en UVAL	Agos/01	Jun/01	Día de Campo "Manejo De Hortalizas Bajo Un Sistema Orgánico" en conjunto con el proyecto FIA <i>Desarrollo De Tecnologías Para La Agricultura Orgánica Para Dos Rubros En La Séptima Región.</i>
	8.2.5.11	Charlas de difusión	Mar/01	Oct/00	X Congreso de Fitopatología "Potencial Biocontrolador de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> "
				Nov/00	51 ^{er} Congreso Agronómico "Control biológico de <i>Botrytis cinerea</i> con cepas nativas de <i>Trichoderma</i> " Y "Control de <i>Cydia pomonella</i> con una Cepa nativa de <i>Cydia pomonella Granulovirus</i> (CpGV-L1)"
				Nov/00	XXII Congreso Nacional de Entomología "Control a nivel de laboratorio de la polilla de la manzana <i>Cydia pomonella</i> (Linnaeus) (Tortricidae) con <i>Cydia pomonella Granulovirus</i> aislado L1 (CpGV-L1) (Baculoviridae)"
				Junio/01	Presentación "Experiencias en el control de <i>Cydia pomonella</i> con el Virus Granuloso de <i>Cydia pomonella</i> (CpGV)" Reunión Sociedad Chilena de Entomología.
				Julio/01	Presentación de Boletín "Control de enfermedades y plagas con microorganismos"
Global	8.1.5	Elaboración informe final	Jun/01	Jun/01	

5 RESULTADOS

5.1 UNIDAD DE *Trichoderma*

5.1.1 Recolección de Cepas de *Trichoderma*

De la recolección de muestras de suelo, se obtuvieron finalmente 7 cepas de *Trichoderma*, las que provienen de diversas localidades de la zona central de Chile.

5.1.2 Identificación de las cepas.

- a.) Cepa Sherwood: ecotipo obtenido del parque forestal dentro del Campus Lircay de la UTAL, la que fue identificada como *Trichoderma virens*, descrito en la literatura como gran productor de sustancias fungicidas.
- b) Cepa Soto: Obtenida de cultivo de maravilla en la zona de Rengo, siendo identificada como *Trichoderma longibranchiatum*.
- c) Cepa Trailes: Ecotipo procedente de la Reserva Nacional Altos de Vilches, específicamente en los faldeos del cerro Enladrillado, en un bosque de renovales de roble la que fue identificada como *Trichoderma parceanamosum*.
- d) Cepa Queule : Esta Cepa se logro aislar de muestras de suelo, procedentes de la reserva nacional de Tregualemu, en la que existen los últimos árboles de Queule. Este ecotipo corresponde a la especie *Trichoderma harzianum*, siendo esta la misma utilizada en el producto comercial Trichodex, pero teniendo la ventaja de ser de origen nacional.
- e) Cepa Tubo: Esta Cepa al igual que Sherwood también se obtuvo del Campus Lircay, siendo identificada *Trichoderma hamatum*.

Además se obtuvieron dos cepas aun no identificadas, una extraída de un huerto de frambuesos en Longaví, denominada con el mismo nombre de la localidad y la otra en un huerto de manzanos abandonado, en las cercanías de Linares, denominada Coque.

5.1.3 Ensayos in vitro

Ensayo I

Fusarium oxysporium

En la cuadro 5.1.1 así como en la figura 5.1.1, se aprecia que la acción de las distintas cepas de *Trichoderma*, en proporcional con la dosis de conidias aplicadas, siendo el aumento de eficiencia, distinto para cada una de las cepas, así tenemos, que el mejor control se logro con la Cepa Queule, con la dosis mayor, pese a que esta Cepa, no realizo control sobre el patógeno en las dos dosis menores, a diferencia de Sherwood, Soto y Longavi. Pese a que las no hay efecto del fungicida sobre la acción de las cepas, cuando se compara el tratamiento con y sin fungicida de la misma Cepa, pero al comparar todos los tratamientos, se aprecia un efecto del fungicida, el que varia según las cepas, así tenemos que Coque, Longavi y Tubo se ven deprimidas, mientras que Sherwood y Soto se ven favorecidas, en cuanto a Queule, no se aprecia efecto.

Cuadro 5.1.1. Crecimiento de *Tr.* en cm de diámetro, sobre un cultivo de conidias de *F. oxysporium*, a distintas dosis de conidias de *Trichoderma*, de 7 cepas nativas.

Tratamientos	dosis 0	dosis 1*10 ⁵	dosis 1*10 ⁶	Dosis 1*10 ⁷	dosis 1*10 ⁸
Coque	0	0 b	0,4 bc	2 abc	2,73 abc
Coque +ben	0	0 b	0 c	1,53 bcd	2,2 bc
Trailes	0	0,23 b	0,15 c	2 abc	2,05 bc
Trailes + ben	0	0 b	0,235 bc	2,23 abc	2,05 bc
Queule	0	0 b	0,3 bc	2,95 a	3,78 a
Queude + ben	0	0,23 b	0,85 bc	3,03 a	3,33 ab
Longavi	0	0,35 b	1,48 ab	1,7 abcd	1,98 bc
Longavi +ben	0	0,85 ab	1,18 ab	1,83 abcd	1,65 c
Tubo	0	0,25 b	2,12 ab	1,93 abc	2,7 ab
Tubo + ben	0	0,535 b	1,1 b	2,33 ab	2,3 bc
Soto	0	0,48 b	1 b	2,48 ab	2,6 b
Soto + ben	0	1,48 a	2,15 ab	2,38 ab	3,03 ab
Sherwood	0	0,95 ab	1,78 ab	2,1 abc	2,53 b
Sherwood + ben	0	1,6 b	1,43 a	2 ab	2,53 ab
Significancia	n.s.				

Las diferencias de letras en las columnas, indican diferencias significativas. Tukey HSD p= 0.95
n.s= diferencias no significativas

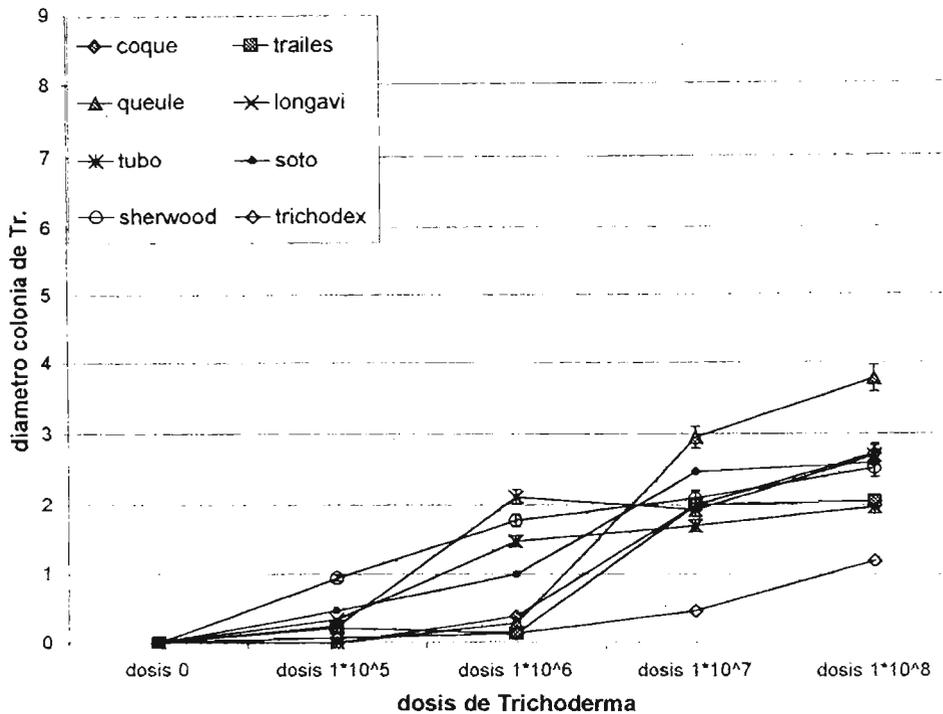


Figura 5.1.1 Crecimiento de *Tr.* a distintas dosis de conidias, sobre un cultivo in vitro de microconidias de *F. oxysporium*.

Botrytis cinerea

En cuadro 5.1.2 así como en la figura 5.1.2 podemos apreciar que el mejor tratamiento fue dado por la dosis mas alta, no habiendo mayores diferencias entre las cepas, salvo el caso de Trailes + benomilo, Queule y Coque que presentaron los peores resultados, diferenciándose estadísticamente de Sherwood.

Cuadro 5.1.2 Crecimiento de *Tr.* en cm de diámetro, sobre un cultivo de conidias *B. cinerea*, a distintas dosis de conidias de *Trichoderma*, de 7 cepas nativas.

Tratamientos	dosis 0	dosis $1 \cdot 10^5$	dosis $1 \cdot 10^6$	Dosis $1 \cdot 10^7$	dosis $1 \cdot 10^8$
Coque	0	2,2 b	3,9 ab	5 ab	5,75 b
Coque +ben	0	3,225 a	4,125 ab	5,12 ab	6,375 ab
Trailes	0	3,4 a	4,175 ab	5,55 ab	6,75 ab
Trailes + ben	0	2,075 b	2,09 b	4,55 b	5,625 b
Queule	0	2,25 b	3,53 b	5,45 b	6,21 b
Queule + ben	0	3,38 a	4,35 ab	5,95 a	6,78 ab
Longavi	0	2,25 b	3,83 ab	4,72 b	5,93 b
Longavi +ben	0	2,98 ab	3,68 b	5,12 ab	6,03 b
Tubo	0	3,5 a	4,3 ab	5,7 ab	6,35 ab
Tubo + ben	0	3,48 a	4,65 a	5,97 a	6,3 ab
Soto	0	2,85 ab	3,98 ab	5,08 ab	6,38 ab
Soto + ben	0	2,93 ab	4,08 ab	4,95 ab	6,68 ab
Sherwood	0	3,28 a	4,33 ab	5,93 a	7,13 a
Sherwood + ben	0	2,75 ab	4,05 ab	5,25 ab	7,03 ab
Significancia	ns				

Las diferencias de letras en las columnas, indican diferencias significativas. Tukey HSD $p=0.95$
n.s.= diferencias no significativas

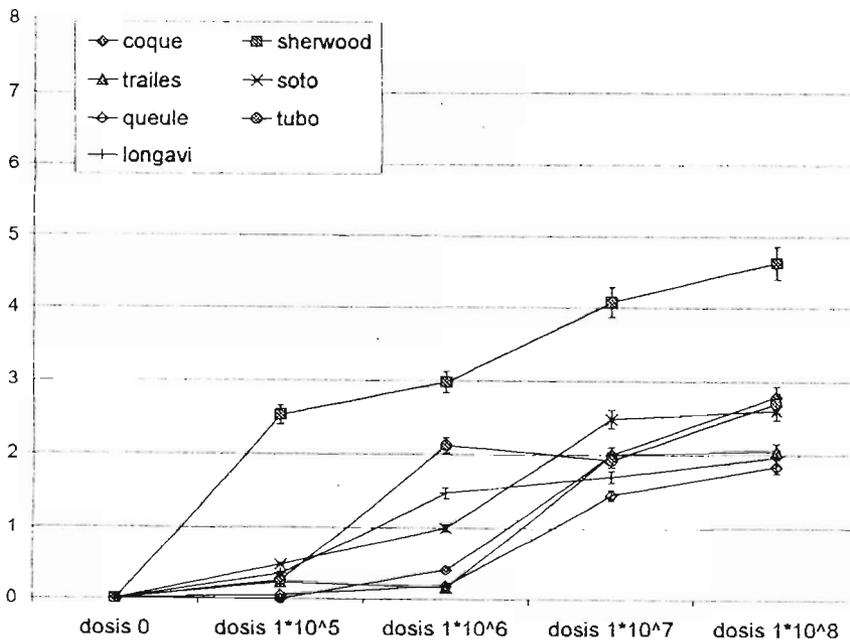


Figura 5.1.2 Crecimiento de *Tr.* a distintas dosis de conidias, sobre un cultivo in vitro de conidias de *B. cinerea*.

Phytophthora capsici

En el caso de *Phytophthora* tenemos que ser obtuvo un buen efecto de las cepas en todas las dosis, siendo mejor en la de 10^8 , además que no hubo efecto del Metalaxilo sobre la acción de *Trichoderma*. Por otra parte hay que destacar que en este patógeno, es en el que se vio la mayor rapidez de acción que en los otros, alcanzando el nivel máximo de crecimiento entre tres y cinco días antes que en el caso de los otros patógenos.

Cuadro 5.1.3. Crecimiento de *Tr.* en cm de diámetro, sobre un cultivo de conidias de *Phytophthora capsici*, a distintas dosis de conidias de *Trichoderma*, de 7 cepas nativas.

Tratamientos	dosis 0	dosis $1 \cdot 10^5$	dosis $1 \cdot 10^6$	dosis $1 \cdot 10^7$	dosis $1 \cdot 10^8$
Queule	0	2,3 ab	4,35 a	6,18 a	7,02 ab
Queule + ben	0	3,3 a	4,48 a	5,63 ab	7,2 a
Trailes	0	3,18 a	3,98 a	5,2 abc	6,55 ab
Trailes + ben	0	3,15 ab	4,23 a	5,13 abc	6,6 ab
Coque	0	2,63 ab	3,58 ab	4,55 bc	6 bc
coque +ben	0	2,75 ab	3,63 ab	4,45 bc	6,05 bc
Longavi	0	2,25 b	3,29 ab	4,73 bc	5,03 bc
Longavi +ben	0	2,98 ab	3,68 ab	5,13 abc	6,03 bc
Tubo	0	3,25 a	4,13 a	5,28 ab	6,5 ab
Tubo + ben	0	3,28 a	4,48 a	5,3 ab	6,73 ab
Soto	0	2,85 ab	3,98 a	5,08 bc	6,38 b
Soto + ben	0	2,93 ab	4,08 a	4,95 bc	6,38 b
Sherwood	0	2,08 b	2,88 b	4,18 bc	5,58 c
Sherwood + ben	0	2,25 b	3,78 ab	5,03 bc	5,88 bc
Significancia	n.s.				

Las diferencias de letras en las columnas, indican diferencias significativas. Tukey HSD $p = 0.95$
n.s.= diferencias no significativas

Rhizoctonia solani

Respecto a *Rhizoctonia solani*, tenemos que los mejores tratamientos fueron dados por las cepas Trailes y Queule, sin benomilo, diferenciándose estadísticamente del resto, también hay que destacar que en estas dos cepas el fungicida tuvo un efecto detrimental, además no se vio un aumento constante en la eficiencia de control al ir aumentando las dosis.

Cuadro 5.1.4 Crecimiento de *Tr.* en cm de diámetro, sobre un cultivo de conidias de *Rhizoctonia solani*, a distintas dosis de conidias de *Trichoderma*, de 7 cepas nativas.

Tratamientos	dosis 0	dosis 1*10 ⁵	dosis 1*10 ⁶	dosis 1*10 ⁷	dosis 1*10 ⁸
Coque	0	0 c	0,4 d	2 bc	2,79 bc
coque +ben	0	0 c	0 d	1,52 bc	2,2 bc
Sherwood	0	0,23 c	0,15 d	2 bc	2,05 bc
Trailes + ben	0	0 c	0,23 d	2,23 bc	2,05 bc
Sherwood + ben	0	0,05 c	0,18 d	1,45 c	1,85 c
Queule + ben	0	0,18 c	0,48 d	1,28 c	2,75 bc
Longavi	0	0,35 c	1,48 c	1,7 bc	1,98 bc
Longavi +ben	0	0,85 b	1,18 cd	1,83 bc	1,65 c
Tubo	0	0,25 c	2,12 bc	1,93 bc	2,7 bc
Tubo + ben	0	0,53 b	1,1 c	2,33 bc	2,3 bc
Soto	0	0,48 c	1 cd	2,48 bc	2,6 bc
Soto + ben	0	1,45 b	2,21 bc	2,75 b	3,15 b
Trailes	0	2,53 a	2,98 ab	4,08 a	4,63 a
Queule	0	2,9 a	3,45 a	4,53 a	5,05 a
Significancia	n.s.				

Las diferencias de letras en las columnas, indican diferencias significativas. Tukey HSD $p=0.95$
n.s.= diferencias no significativas

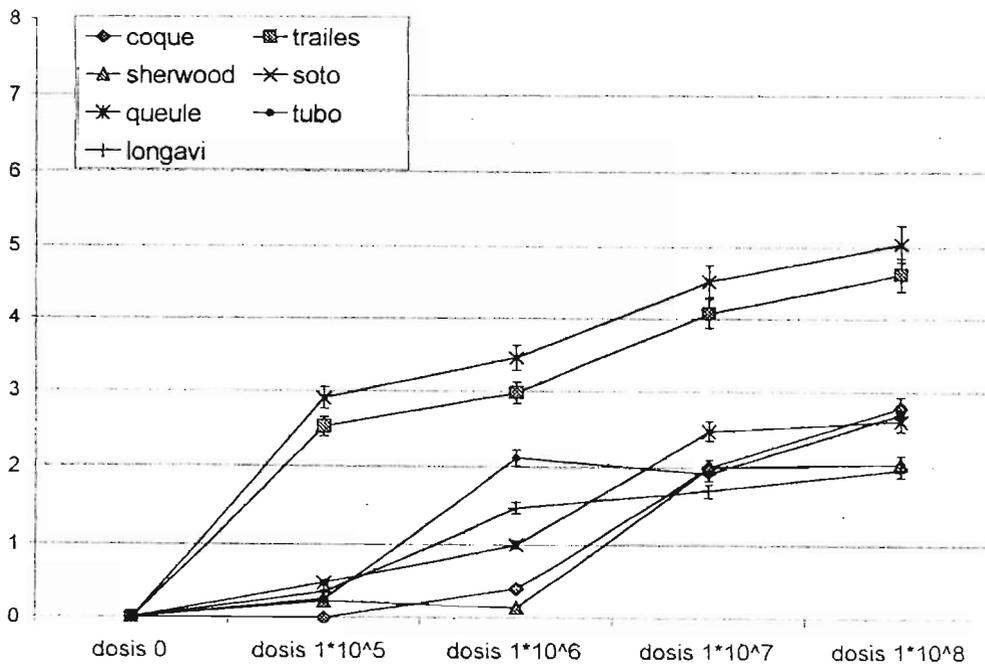


Figura 5.1.3 Crecimiento de *Tr.* a distintas dosis de conidias, sobre un cultivo in vitro de conidias de *Rhizoctonia solani*.

Sclerotinia sclerotiorum

En cuanto a *Sclerotinia sclerotiorum*, podemos ver que no hubo mayores diferencias entre las cepas a las dosis de 10^7 y 10^8 , siendo solo posible determinar que la cepa Queule logro junto a Trailes más el funguicida el mejor efecto.

Cuadro 5.1.5 Crecimiento de *Tr.* en cm de diámetro, sobre un cultivo de conidias de *Sclerotinia sclerotiorum*, a distintas dosis de conidias de *Trichoderma*, de 7 cepas nativas.

Tratamientos	dosis 0	dosis $1 \cdot 10^5$	dosis $1 \cdot 10^6$	Dosis $1 \cdot 10^7$	dosis $1 \cdot 10^8$
Coque	0	0 b	1,85 b	2 b	2,83 bc
Coque +ben	0	1,33 ab	2,37 ab	3,42 a	3,63 abc
Trailes	0	1,33 ab	2,38 ab	3,43 a	3,63 abc
Trailes + ben	0	1,94 ab	3,58 a	4,2 a	5,15 ab
Queule	0	0,9 a	1,65 b	2,78 ab	4,85 ab
Queule + ben	0	0,63 ab	1,35 b	3,2 a	3,35 bc
Longavi	0	0 b	0 c	1,85 b	2,65 c
Longavi +ben	0	0 b	1,33 b	2,38 ab	3,43 bc
Tubo	0	0,25 b	1,08 bc	2,35 ab	3,05 bc
Tubo + ben	0	0,65 ab	1,33 b	2,88 ab	3,93 abc
Soto	0	0,58 ab	1,37 b	2,18 ab	3,35 bc
Soto + ben	0	1,23 ab	2,13 b	3,17 a	4,1 abc
Sherwood	0	0,33 b	0,88 bc	2,28 ab	2,95 bc
Sherwood + ben	0	0 b	1,73 b	2,78 ab	3,7 abc
Significancia					

Las diferencias de letras en las columnas, indican diferencias significativas. Tukey HSD $p=0.95$
n.s.= diferencias no significativas

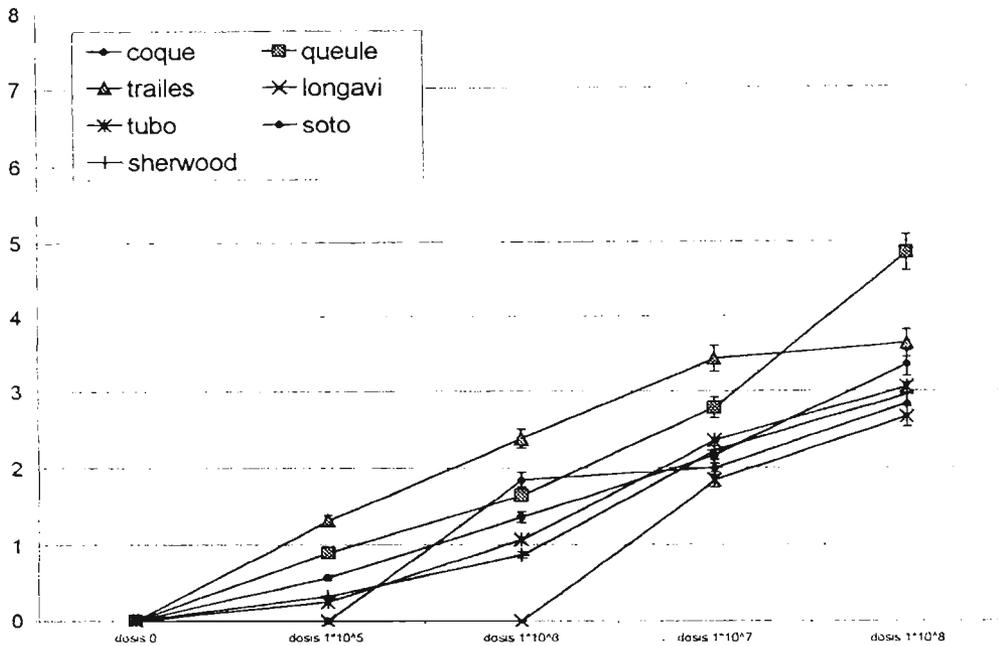


Figura 5.1.4 Crecimiento de *Tr.* a distintas dosis de conidias, sobre un cultivo in vitro de conidias de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Ensayo II

En este ensayo no se obtuvieron diferencias significativas en ninguno de los patógenos, ya que estos no pudieron desarrollarse sobre las conidias de *Trichoderma*, no habiendo diferencias con el testigo.

Ensayo III

En estos ensayos podemos apreciar que se acentúan las tendencias vistas en el ensayo de dosis, así tenemos que la Cepa con mejor efecto para el caso de *Botrytis*, fue *T. virens*, que corresponde a Sherwood, para el caso *Sclerotinia* fueron las cepas Trailes, Queule, Coque, Longavi y Soto. *Phytophthora* no mostró diferencias en ninguna de las cepas nativas, pero sí con Trichodex, el que no se diferenció del testigo. En el caso de *Rhizoctonia solani* no hubo diferencias significativas en ninguna de las cepas, diferenciándose todas del testigo.

Cuadro 5.1.6 Porcentaje de cubrimiento logrado por distintas cepas de *Trichoderma* sobre cinco patógenos.

CEPA	<i>Botrytis</i>	<i>Sclerotinia</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Fusarium</i>
Trailes	28,67 c	100 a	94,11 a	94,17 a	60,45 a
Queule	36,76 c	68,38 ab	78,97 a	91,17 a	51,91 a
Sherwood	100 a	36,76 bc	78,23 a	79,26 a	54,11 a
Coque	31,17 cd	87,05 a	100 a	91,17 a	49,26 a
Longavi	57,94 b	100 a	75,14 a	79,41 a	47,79 a
Soto	18,38 d	100 a	85,29 a	82,35 a	50,82 a
Tubo	20,58 d	69,29 ab	94,85 a	90,44 a	54,2 a
Trichodex	27,2 cd	44,41 b	25 b	78,67 a	0 b
Testigo	0 a	0 c	0 b	0 b	0 b

Las diferencias de letras en las columnas, indican diferencias significativas. Tukey HSD $p=0.95$

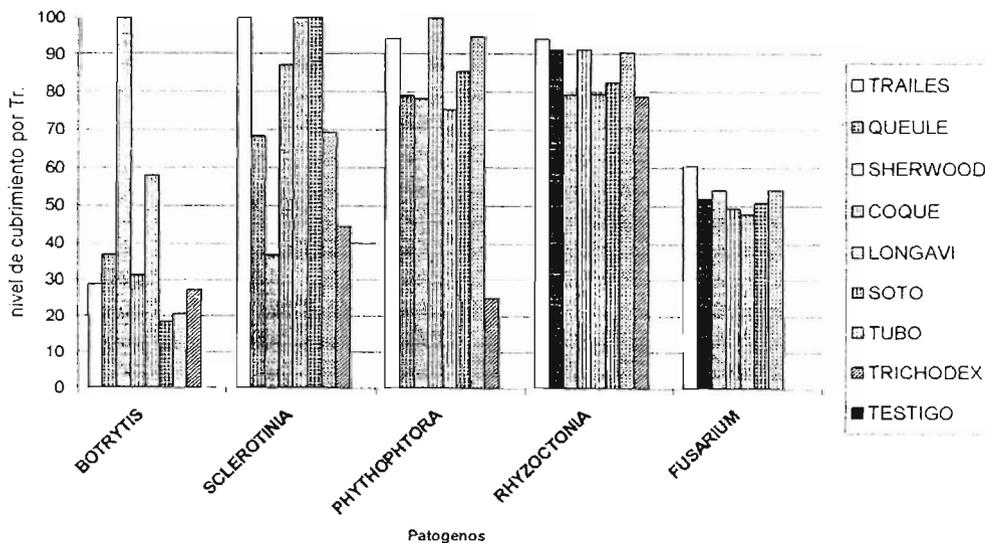


Figura 5.1.5 Porcentaje de cubrimiento logrado por distintas cepas de *Trichoderma* sobre cinco patógenos.

5.1.4 Ensayos en almácigos

Control de *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum* en almácigos de pimentón.

Rhizoctonia solani.

En los siguientes cuadros se aprecian los resultados de los ensayos en pimentón, para el control de *Rhizoctonia solani*, con las cepas de *Trichoderma*, Trailes y Queule.

En la medición sobrevivencia, se obtuvieron los mejores resultados con los tratamientos consistentes en la Cepa Trailes y la Cepa Queule mas benomilo, seguidos por Benomilo, Queule, y Trailes mas benomilo. Sin diferencias significativas entre ellos. Luego están los tratamientos con Trichodex con y sin benomilo y en ultimo lugar el testigo, presentando diferencias significativas entre ellos.

En cuanto al factor altura, tenemos que las mayores alturas fueron los tratamientos Queule con Benomilo y Trailes. Que le siguen son Queule, Benomilo y Trailes mas benomilo. Y a continuación los dos tratamientos con Trichodex. El ultimo lugar lo ocupa el testigo

Cuadro 5.1.9 altura y plantas vivas de pimentón, bajo distintos tratamientos para el control de *Rhizoctonia solani* en almácigo.

Tratamiento	Sobrevivencia %
Testigo	52 c
Trailes 10 ⁹	98 a
Queule 10 ⁹	92 ab
Benomilo	96 ab
Trichodex 10 ⁹	74 b
Trichodex 10 ⁹ + Benomilo	80 b
Trailes 10 ⁹ + Benomilo	92 ab
Queule 10 ⁹ + Benomilo	98 a

Las diferencias de letras en las columnas, indican diferencias significativas. Tukey HSD p= 0.95

Los tratamientos con las dos cepas de *Tr.* ya sea con o sin benomilo, permiten una mayor sobrevivencia de plantas en almácigo, superando incluso al tratamiento con benomilo. En cuanto al efecto de Trichodex este fue inferior al de las cepas nativas, pese a ser la misma

especie que la Cepa Queule (*T. harzianum*), logrando igualar al tratamiento con benomilo, al ser mezclado con este mismo fungicida.

Sclerotinia sclerotiorum

Los tratamientos con la Cepa Longaví presento la mejor respuesta en cuanto a altura de planta, seguido por Queule, Benomilo, Queule mas benomilo y Longaví mas benomilo.

Cuadro 5.1.10 Altura y plantas vivas de pimentón, bajo distintos tratamientos para el control de *Sclerotinia sclerotiorum* en almácigo.

Tratamiento		Sobrevivencia %
Testigo	T1	58 c
Queule 10 ⁹	T2	94 a
Longaví 10 ⁹	T3	98 a
Benomilo	T4	84 ab
Trichodex 10 ⁹	T5	80 b
Trichodex 10 ⁹ + Benomilo	T6	82 b
Queule 10 ⁹ + Benomilo	T7	94 a
Longaví 10 ⁹ + Benomilo	T8	92 ab

Las diferencias de letras en las columnas, indican diferencias significativas. Tukey HSD p= 0.95

En el caso de sobrevivencia de plantas tenemos que las diferencias son menos claras, que en el caso de *Rhizoctonia*, donde vemos que los tratamientos de Trichodex y de Queule, no difieren estadísticamente, ya sea con o sin benomilo. Aunque Longaví logro una mayor sobrevivencia, las diferencias no son marcadas. El benomilo, logro un control similar al de los tratamientos con *Tr.* y con Tichodex.

En todos lo casos, los tratamientos lograron diferencias significativas con le testigo. Además la sobrevivencia de plantas al usar las cepas de *Trichoderma* nativas con o sin benomilo, se logro entre un 46 y 26% de reducción de la mortalidad de las plantas, con relación al testigo. Siendo mayor la reducción para el caso de *Rhizoctonia*, que para *Sclerotinia*. La Cepa Queule que se utilizo en los dos ensayos, mostró una buena acción, logrando sobre un 96% de sobrevivencia en *Rhizoctonia* y sobre un 84% en *Sclerotinia*. Pero no presento diferencias tan marcadas como las otras dos cepas (Longaví y Trailes) con respecto a Trichodex

y Benomilo. Lo que en el caso de Trichodex se explicaría, ya que las dos son *T. harzianum*. Además las tres cepas de *Tr.* evaluadas mostraron buena compatibilidad con Benomilo.

Control de *Fusarium oxysporium* en almácigo de Tomate var. Cal Ace y sobrevivencia de *Trichoderma* En este ensayo no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos, ni estos con el testigo, lo que se debió a que la Cepa de patógeno, presentó una baja agresividad, lográndose solo resultados en cuanto a los datos de sobrevivencia de las cepas utilizadas en el suelo.

El efecto del fungicida sobre el establecimiento de la Cepa Queule, tanto en el suelo estéril como en el no estéril, no fue significativo, sin embargo la interacción entre ambos factores solo en suelo estéril fue altamente significativa. Así tenemos que no existen diferencias significativas en cuanto al antagonista con sin y benomilo, pero si entre el fungicida y Trichodex.

Cuadro 5.1.11 Cuadro Efecto del fungicida Benomilo sobre el número de colonias de *T. harzianum* Cepa Queule y Trichodex desde suelo esterilizado y cultivado con tomate e infectado con *F. oxysporium* f.sp *radicis-lycopersici*.

Fungicida	u.f.c x 10 ⁴ /gr de suelo		
	<i>T. harzianum</i> Cepa Queule	<i>T. longibrachiatum</i> Cepa Soto	Trichodex
Sin benomilo	1,86 ab	2.16 ab	2.37 a
Con Benomilo	2.6 ab	3.43 a	1.0 b

Las diferencias de letras en las columnas, indican diferencias significativas. Tukey HSD p= 0.95

Trichodex ve disminuido su establecimiento por el fungicida Benomilo, lo que no ocurre con la Cepa Queule, por lo que Benomilo no estaría influenciando el establecimiento de *Trichoderma harzianum* Cepa Queule, por lo menos durante un periodo de 39 días.

En cuanto a la sobrevivencia de la Cepa en el suelo, en comparación con Trichodex, tenemos que con una inoculación de 10⁸ no hubo diferencias significativas, pero a una concentración de inóculo de 10⁹ conidias/ml la Cepa Queule logró un mayor nivel de sobrevivencia que Trichodex.

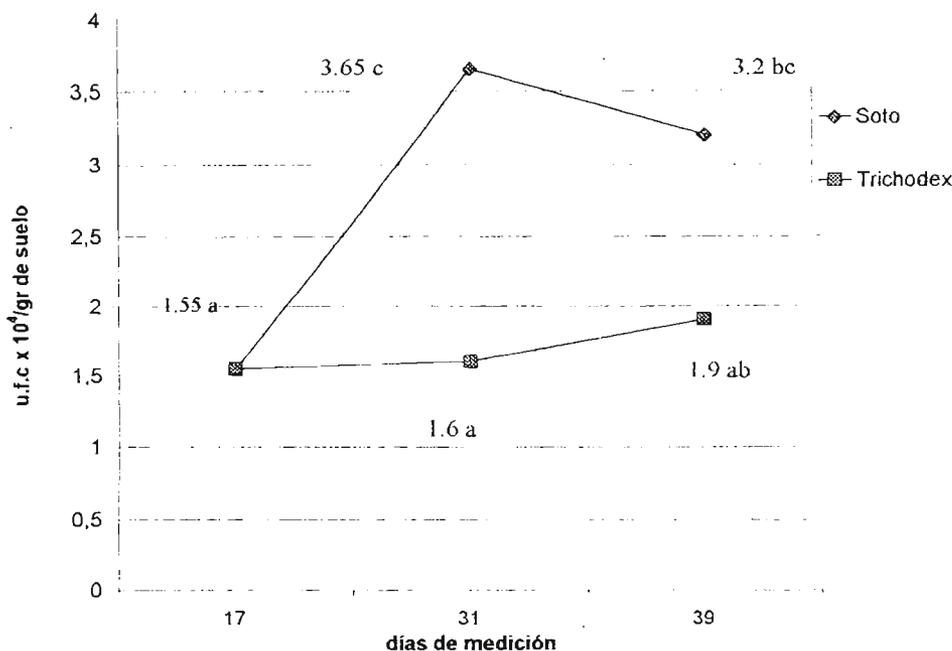


Figura 5.1.6 Densidad de conidias de *Trichoderma longibrachiatum* y Trichodex, en un almacigo de tomates.

La Cepa Soto no presentó diferencias significativas en cuanto a la presencia de benomilo, pero sí mostró una mayor densidad poblacional respecto a Trichodex cuando el fungicida estaba presente. Con respecto a Queule no mostró diferencias significativas con y sin benomilo.

Al analizar el establecimiento de la Cepa con respecto a la concentración de conidias se observó que no hubo diferencias entre Soto y Trichodex con una concentración inicial de 10^8 conidias/ml, pero a 10^9 conidias/ml se observó que en la medición del día 31 Soto era significativamente mayor que Trichodex, para perder esta diferencia significativa con Trichodex en la última medición el día 39.

Control de *Rhizoctonia solani* en almácigos de Brócoli

Ensayo de emergencia

5.1.12
Como se ve en el cuadro, los tratamientos Benomilo, solo o en mezcla con las Cepas de *Trichoderma* mas Queule solo mostraron una acción sobre el patógeno, diferenciándose estadísticamente del testigo. Esto pudo deberse a la metodología utilizada, en la que la cantidad de inóculo pudo haber sido excesiva dado por la 0 emergencia en el caso del testigo, además de haber aplicado el *Trichoderma* con posterioridad a la inoculación, de todas formas se probó que la Cepa Queule tiene un efecto similar al benomilo, dado que Benomilo presentó un control mayor que *Trichoderma*, no se puede determinar en que forma afectó el fungicida a la Cepa.

Cuadro 5.1.12 Porcentaje de emergencia de plántulas de Brócoli, afectadas con *Rhizoctonia solani*

Tratamientos	Emergencia
Testigo	0 b
Benomilo	75 a
Queule	37,5 a
Trailes	25,63 ab
Trichodex	25,63 ab
Q+B	60,42 a
Tr+B	60 a
Tx+B	64,58 a

Las diferencias de letras en las columnas, indican diferencias significativas. Tukey HSD $p=0.95$

Este ensayo es la continuación del almácigo de brócoli, de las plantas que sobrevivieron, se seleccionaron las 12 mas representativas de cada tratamiento, esto se hizo midiendo la altura de todas ellas y eligiendo las 12 mas cercanas a la media. Estas plantas se transplantaron a bolsas de 300 gr., con una mezcla de suelo del lugar, tierra de hoja y arena en una proporción de 1:2:1. La que fue esterilizada dos veces. Esto un diseño de bloques al azar.

Se midió en tres tiempos la cantidad de plantas vivas. Al observar el cuadro y la figura siguiente, se observa que solo el tratamiento utilizando Trichodex mostró una baja apreciable en la mortalidad en la última medición, siendo esta estadísticamente sin diferencias con el testigo. De los otros tratamientos aunque no hay diferencias estadísticas entre ellos, podemos decir que *Trichoderma parceanamosum* mas benomilo, fue el único en el que no hubo mortalidad post-transplante, a diferencia del tratamiento en que se utilizo la cepa sola, por lo que podría existir un efecto sinérgico entre la cepa Trailes y el fungicida. Por su parte en el caso de Queule, después de la primera semana post transplante no hubo mas mortalidad de plantas, a diferencia del tratamiento que incluía esta cepa mas el fungicida, por lo como se verá en los ensayos de tomates, el fungicida podría estar interfiriendo con la acción del biocontrolador.

Cuadro 5.1.13 Porcentaje de sobrevivencia de plantas de Brócoli afectadas por *Rhizoctonia solani*.

Tratamientos	Nov-21	Nov-23	Ene-23
Testigo	0 b	0 b	0 b
Benomilo	91,66 a	91,66 a	83,3 a
Queule	83,3 a	83,3 a	83,3 a
Trailes	100 a	93,3 a	91,6 a
Trichodex	100 a	91,6 a	33,3 b
Q+B	91,66 a	83,3 a	75 a
Tr+B	100 a	100 a	100 a
Tx+B	100 a	100 a	83 a

Las diferencias de letras en las columnas, indican diferencias significativas. Tukey HSD $p=0.95$

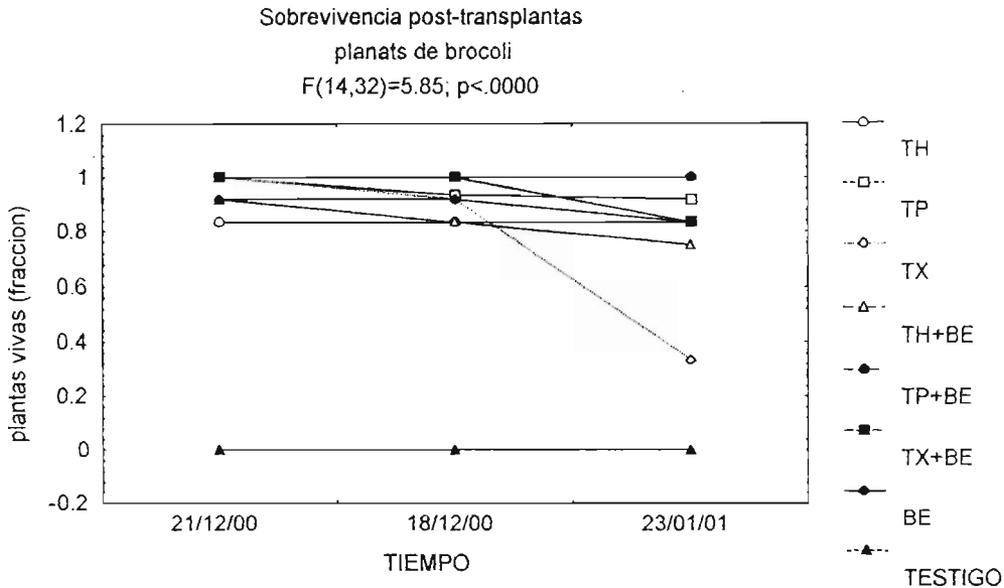


Figura 5.1.7 Porcentaje de sobrevivencia de plantas de Brócoli afectadas por *Rhizoctonia solani*.

3.1.5 Ensayos en cultivos experimentales

Control de *Botrytis cinerea* en lechuga var. Esmeralda en sistema hidropónico, de bandeja flotante.

En este ensayo se midieron los parámetros de peso, altura y calidad comercial, por lo que se definieron cuatro categorías:

- I: Sin ningún síntoma.
- II: Con un síntoma (Mancha de *Botrytis*)
- III: Daño evidente.
- IV: Daño severo (perdida total).

Las dos primeras categorías, se consideraron lechugas comercializables. Los parámetros de peso y altura, no mostraron diferencias significativas para ninguno de los tratamientos o factores. No así las categorías de calidad y número de plantas comercializables. La distribución de categorías de calidad por tratamiento se aprecia en la figura 5.1.9.

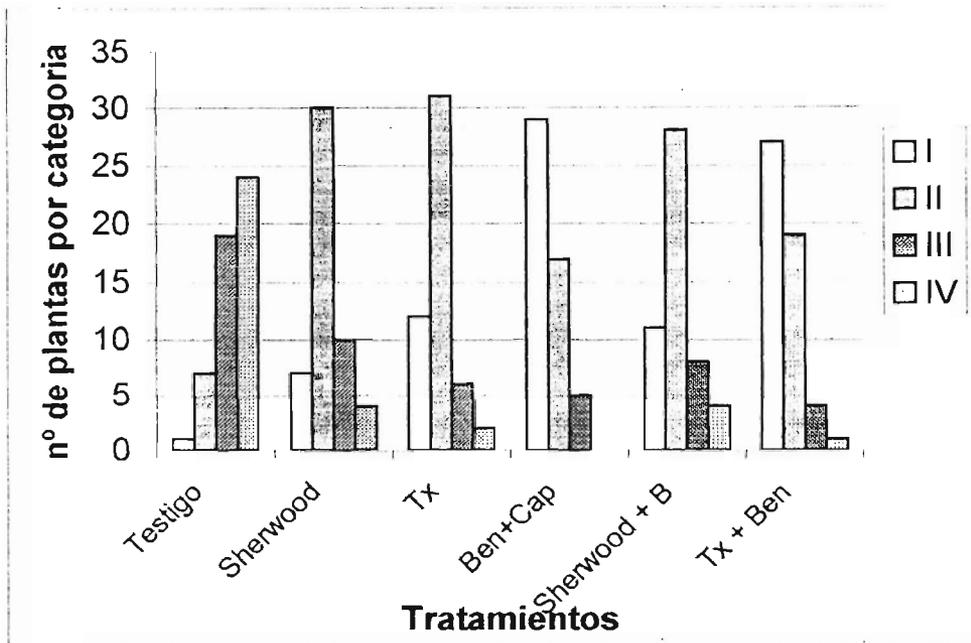


Figura 5.1.8 Distribución de calidad por tratamiento, en lechugas hidropónicas.

No hubo diferencias significativas en cuanto al porcentaje por tratamiento de plantas comerciales, tenemos que no hay diferencias significativas entre ellos, excepto con el testigo, el que solo alcanzo un 4% de plantas aptas para comercializar.

Cuadro 5.1.14 Resultados de los parámetros medidos en cultivo de lechugas hidropónicas.

Descripción	Peso	Altura	Plantas Comerciales	I	II	III	IV
Testigo	150.2 b	18.4 b	2.66 b	0.3 c	2.3 b	6.3 a	8 a
Benomilo + Captan	171.4 a	20.7 a	15.33 a	2.3 bc	10 a	3.3 a	1.3 ab
Sherwood 10 ⁹	162.1 ab	21.3 a	12.33 a	4 ab	10.3 a	2 a	0.6 b
Sherwood 10 ⁹ + Benomilo	173.3 a	21.3 a	13 a	9.6 a	5.6 ab	1.6 a	0 b
Trichodex	152.5 b	20.4 a	14.33 a	3.6 abc	9.3 a	2.6 a	1.3 ab
10 ⁹ Trichodex 10 ⁹ + Benomilo	171.3 a	21.0 a	15.3 a	9 ab	6.3 ab	1.3 a	0.3 b

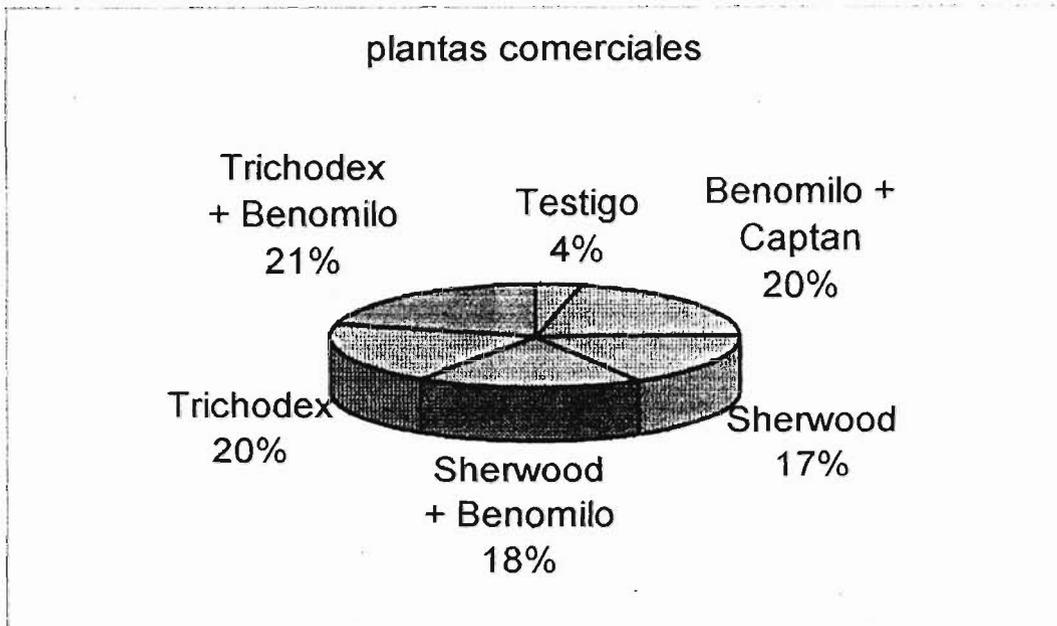


Figura N° 5.1.9 Distribución de lechugas de calidad comercial por tratamiento

Al observar la interacción Cepa, dosis y fungicida tenemos que no existen diferencias significativas, entre cepas, entre *Trichoderma* y el fungicida o las mezclas, excepto cuando se evalúa por categoría, en que los tratamientos con *Trichoderma* solos o en mezcla con benomilo+captan, lograron un mayor número de plantas sin daños que los fungicidas solos.

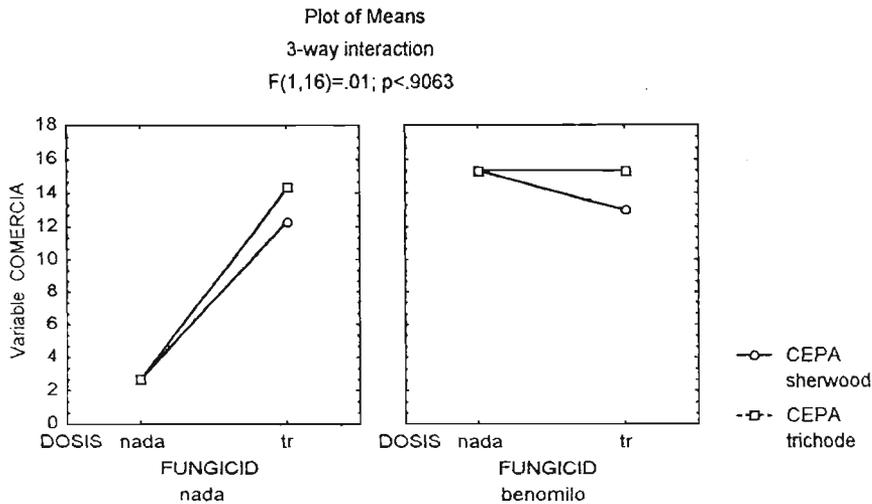


Figura N° 5.1.10 Interacción entre factores dosis y fungicida en número de lechugas de calidad comercial por tratamiento.

Todos los tratamientos con *Trichoderma*, con o sin los fungicidas lograron un nivel similar de control, diferenciados estadísticamente del testigo. En este ensayo como en el de tomate y brócoli se favorecieron las condiciones ambientales, para que el patógeno tuviera un buen desarrollo, esto dado por las condiciones de humedad, temperatura y forma de aplicación del patógeno, la que fue con bomba de espalda aplicando, la suspensión de conidias en forma vertical sobre la roseta, lo que permitió que el patógeno se asentara en las hojas más ocultas de la planta, donde se ve favorecido su desarrollo.

Control de *Fusarium oxysporium* en cultivos de tomate var. Presto. En este ensayo se evaluaron los parámetros de número de frutos por planta, plantas vivas (con una población inicial de 10 por tratamiento) y peso promedio de frutos por tratamiento.

En el parámetro de número de frutos tenemos que, el mayor número de frutos, plantas vivas, se obtuvo con los tratamientos con *Tr. Queule* y *Soto*. En el caso de Rendimiento por ha. El mejor resultado se obtuvo con *Queule* al igual que con peso promedio de frutos. Para el caso

de Trichodex, tenemos que éste superó a benomilo en peso y número de frutos. El testigo en todo los parámetros presentó, valores más bajos que los tratamientos.

Cuadro 5.1.15 Parámetros de producción en cultivo de tomate, bajo distintos tratamientos para el control de *Fusarium oxysporium*.

Descripción	Tratamiento	Nº frutos	Plantas vivas	Peso promedio frutos	Rendimiento
			Cm	g/fruto	Ton/ha.
Queule 10 ⁹	T1	114,3 a	6,66 a	137,31 a	15,69 a
Soto 10 ⁹	T2	89,66 ab	5 a	108,07 b	9,68 ab
Benomilo	T3	75,66 b	4,66 ab	95,95 bc	7,26 b
Trichodex 10 ⁹	T4	63,33 bc	4,66 ab	115,28 b	7,3 b
Testigo	T5	25,65 c	2 b	76,14 c	1,95 c

Las diferencias de letras en las columnas, indican diferencias significativas. Tukey HSD 0.05

Hay que considerar que este ensayo se realizó con una alta presión de inóculo del patógeno, ya que el bloque que estaba constituido por las plantas que venían de almácigo, en el cual el sustrato no estaba esterilizado y fue inoculado para el ensayo en speedling siendo estas plantas mucho más débiles que las del otro bloque, se perdió completamente.

Control de *Fusarium solani* en cultivos experimentales de tomate var. Agora. En los cuadros siguientes apreciamos la evolución de los porcentajes de plantas sanas, con síntomas y muertas, respectivamente, en las distintas fechas de medición. En lo referente a plantas sanas, tenemos que durante las dos primeras mediciones los mejores tratamientos fueron los que incluyeron a la Cepa Queule, diferenciándose estadísticamente solo del tratamiento de Trichodex con benomilo. A partir de la tercera medición el tratamiento con la Cepa Queule, sin benomilo, empezó a mostrar un tendencia de mayor control, lo que en la medición del 5 de octubre y la del 12 del mismo mes, demostró ser el mejor tratamiento diferenciándose significativamente del resto de los tratamientos. Los cuales no se diferenciaron de testigo. En cuanto a plantas con síntomas, ningún tratamiento se diferenció del testigo. Y en finalmente sobre plantas muertas, no hubieron diferencias significativas, hasta las dos últimas mediciones, en las que se aprecia, que la mayor mortandad la tuvo el testigo en primer lugar, seguido por benomilo y Trichodex mas benomilo, no habiendo diferencias estadísticas entre ellos. Trichodex mostró un nivel medio de mortandad y los niveles mas bajos, fueron dados por los

tratamientos con la Cepa Queule, con y sin Benomilo. En todos los casos se aprecia que benomilo tuvo un efecto detrimental sobre la acción de la Cepa Queule, en especial en lo referente al porcentaje de plantas sanas. Lo que fue significativo a contar de la medición del 5 de octubre. Pese a que Queule vio disminuido su efecto en cuanto al porcentaje de plantas sanas, si logro un buen resultado en cuanto a plantas muertas, mostrando solo un 2,5% de mortalidad, diferenciándose estadísticamente del testigo. Por su parte el tratamiento, con solo la Cepa Queule, logro un 0% de mortalidad, no diferenciándose estadísticamente, de la Cepa mas el fungicida.

Cuadro 5.1.16 Porcentaje de plantas sanas, de tomate cultivado en bolsas

TRATAMIENTOS	06-Sep	15-Sep	22-Sep ab	29-Sep	05-Oct	12-Oct
TESTIGO	90,0 ab	87,5 ab	82,5 ab	52,5 b	22,5 b	10,0 b
QUEULE +BEN	97,5 a	97,5 a	87,5 ab	77,5 ab	37,5 b	22,5 b
BENOMILO	87,5 ab	87,5 ab	80,0 ab	67,5 ab	25,0 b	17,5 b
TX	90,0 ab	87,5 ab	87,5 ab	77,5 ab	35,0 b	22,5 b
TX +BEN	87,5 b	77,5 b	72,5 b	65,0 ab	35,0 b	27,5 b
QUEULE	97,5 a	97,5 a	92,5 a	87,5 a	67,5 a	72,5 a

Las diferencias de letras en las columnas, indican diferencias significativas. Tukey HSD 0.05

Cuadro 5.1.17 Porcentaje de plantas de tomate cultivadas en bolsas, con síntomas de Fusariosis

TRATAMIENTOS	06-Sep	15-Sep	22-Sep	29-Sep	05-Oct	12-Oct
TESTIGO	5 ab	10 ab	10 ab	32,5 ns	50 ab	47,5 ab
QUEULE +BEN	2,5 ab	2,5 b	10 ab	20 ns	60 a	75 a
BENOMILO	10 a	10 ab	17,5 ab	22,5 ns	62,5 a	70 a
TX	2,5 ab	5 b	5 b	10 ns	52 ab	65 a
TX +BEN	12,5 a	17,5 a	22,5 a	20 ns	42,5 ab	47,5 ab
QUEULE	0 b	0 b	5 b	10 ns	30 b	25 b

Las diferencias de letras en las columnas, indican diferencias significativas. Tukey HSD 0.05

Cuadro 5.1.18 Porcentaje de plantas muertas por efecto de *Fusarium solani*

TRATAMIENTOS	06-Sep	15-Sep	22-Sep	29-Sep	05-Oct	12-Oct
TESTIGO	5 ns	2,5 ns	7,5 ns	15 ns	27,5 a	32,5 a
QUEULE +BEN	0 ns	0 ns	2,5 ns	2,5 ns	2,5 bc	2,5 c
BENOMILO	2,5 ns	2,5 ns	2,5 ns	10 ns	12,5 abc	12,5 abc
TX	5 ns	5 ns	5 ns	10 ns	10 abc	10 bc
TX +BEN	5 ns	5 ns	5 ns	15 ns	22,5 ab	25 ab
QUEULE	0 ns	0 ns	0 ns	0 ns	0 c	0 c

Las diferencias de letras en las columnas, indican diferencias significativas. Tukey HSD 0.05

Control de *Venturia inaequalis* en manzanos var. Fuji. El inicio de las aplicaciones se realizó, en base a la observación de las ascosporas presentes en la hojarasca del huerto. Por lo que la primera aplicación se realizó el día 27 de septiembre, aplicándose tres días después el Thiolux, repitiéndose lo mismo 7 días después, de forma de cubrir todo el pic de madurez del inoculo inicial.

El resto de las aplicaciones se realizaron según condiciones, esto es lluvia fuerte seguido de temperaturas superiores a 16° C. Dado lo anterior se realizaron 6 aplicaciones, de las cuales una fue innecesaria, dado que se realizó una aplicación después de una lluvia y esa noche volvió a llover por lo que tuvo que repetirse.

Solo se detecto un 0,3% de daño en el tratamiento T2, no habiendo presencia de *Venturia* en los otros dos tratamientos, ni en el resto del huerto. Hay que hacer notar que el huerto dada su exposición al viento y topografía es poco susceptible al ataque de este patógeno, a esto se suma un historial de baja incidencia. Por lo que se recomienda continuar con los ensayos, pero dejando un testigo sin aplicación. Además se evaluó la sobrevivencia de *Trichoderma* en las hojas de manzano, la que logro un periodo máximo de 10 días en el tratamiento combinado con Thiolux, siendo de 6 días para el tratamiento con *Trichoderma* solo.

Espárragos.

En este ensayo no se detectaron diferencias de ningún tipo dado que, por deficiencias en el manejo del cultivo el nivel de infestación por malezas fue muy alto, lo que produjo un anegamiento de las plantas, lo que inhibe la acción de *Trichoderma*, por lo que se realizaron aplicaciones post - poda, pero los resultados no se observaran hasta la próxima brotación.

5.1.5 Producción en masa y Almacenamiento

Ensayos de almacenaje.

Ensayos en liquido.

Los tratamientos con agua sin esterilizar con y sin Ac. láctico presentaron una pérdida de la viabilidad de las conidias de un 100% a los 2 días de iniciado el almacenaje, sin importar las condiciones de luz y temperatura, dado por la aparición de bacterias que afectaron a *Trichoderma*.

En cuanto a los tratamientos con agua estéril, los que presentaban Ac. láctico mostraron una mejor viabilidad que el resto, pero solo siendo significativa en los casos de falta de luz y refrigerados, ya que en los otros casos, con Ac láctico, pese a no haber proliferación de bacterias, las conidias de *Trichoderma* germinaban y se iniciaba un proceso de autólisis, dada la falta de sustrato. La viabilidad de estas suspensiones de conidias en agua estéril, con Ac. láctico, en oscuridad y a 4°C mantuvieron un nivel inicial de conidias por 10 días, a contar del día 15 se inicio una disminución de la viabilidad de las conidias, por debajo de 10^8 conidias/ml, lo que dadas las dosis necesarias para una acción efectiva, se considero no aplicable en terreno, así se genero un criterio, de que el almacenaje es útil mientras se mantenga una concentración de conidias de 10^9 conidias/ml o superior.

Almacenamiento en sólido

Al evaluar los tiempos de secado se apreció que el único con una sobrevivencia aceptable, inmediatamente de terminado el proceso fue el que considero 24 horas de secado, bajando la población de conidias de $8.7 \cdot 10^{10}$ conidias/gr. a $3.1 \cdot 10^{10}$ conidias/gr. Así con este tratamiento de 24 horas de secado, se siguió el almacenaje, considerando la cantidad de conidias viables después de secado como base para determinar la pérdida de viabilidad de las conidias. Así en el gráfico, podemos apreciar que a partir del día 90 todos los tratamientos disminuyen su viabilidad bajo 10^9 conidias/gr., por lo que después de este tiempo se hacen inviables para su uso comercial, pero si es interesante si se piensa en utilizar la perlita y la tierra de diatomea como sustrato o complemento en cultivos sin suelo o bien a nivel de vivero o almácigo, ya que logran tener una población de *Trichoderma* activa, por un periodo de 3 meses y medio a un nivel superior a las 10^8 conidias/gr. lo que aunque es bajo si se considera como

un producto a ser diluido y asperjado, no lo es si se considera como sustrato, en especial en cultivos en recipientes, ya sean almácigos, vivero o hidropónico, ya que se considera una población de 106 conidias/gr. de suelo como activa. Así podríamos tener una protección efectiva por 120 días, lo que es suficiente para cualquier almácigo y para muchos cultivos hidropónicos.

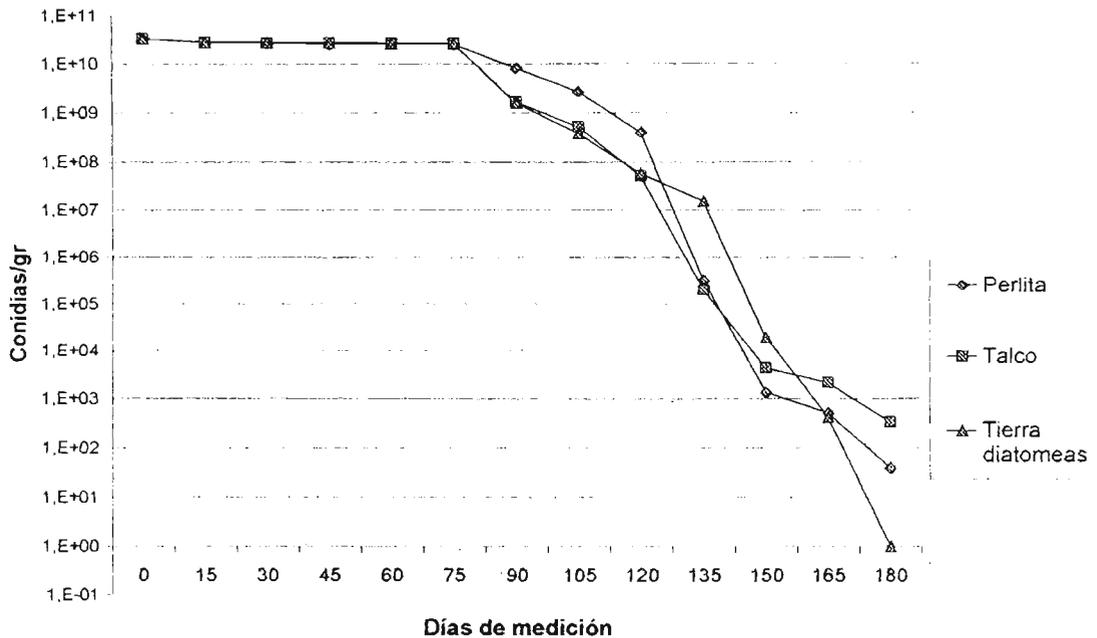


Figura N° 5.1.11 Sobrevivencia de conidias de *Trichoderma* en distintos medios de almacenaje.

Al realizar un análisis mas global de la producción y almacenaje de *Trichoderma*, es mucho mas factible generar un sistema de producción continua, el que presenta costos mucho menores que el almacenaje. Esto podría realizarse a través de un sistema bi fásico, en el que se partiría con un cultivo en medio líquido, el que consta de la mezcla de granos seleccionada, mas ácido láctico y en agitación permanente a temperatura ambiente y bajo luz permanente. Esta fase se puede mantener sin necesidad de recambio de nutrientes por cerca de 4 meses, tiempo después del cual se acaba el aporte energético para el hongo.

La segunda fase del sistema consiste en utilizar 3 ml del medio de cultivo sólido, inoculado a lo menos 7 días con anterioridad, estos 3 ml se aplican sobre 100 gr. de la mezcla de granos autoclavada y entre 3 y 7 días, dependiendo de la temperatura, se obtiene un cultivo sólido con conidias maduras, las que pueden mantenerse en excelente estado hasta por 60 días después de los cuales se inician los procesos de autólisis y contaminación. Lo que en suma equivale a 180 días de almacenaje, pero a diferencia del producto obtenido por secado y añadido a los sustratos, la solución a preparar a base del medio sólido, presenta conidias y micelio activo y en pleno crecimiento, lo que implica una mayor rapidez y efectividad en el control de los patógenos y en su instalación en el suelo. A partir de este cultivo en sólido se genera la solución final, la que utilizando 20 gr. de sustrato, se obtiene una solución final de 10^{10} conidias/ml, lo que alcanza para una hectárea. Los problemas que se presentan con este sistema son los siguientes:

- Se requiere una mayor coordinación con los productores que utilicen este producto, dado el tiempo entre el cultivo en sólido y la solución final, por lo que debería tenerse con anticipación la cantidad de hectáreas y naturalezas de los cultivos de manera de estimar las necesidades del biocontrolador.
- Determinar en mayor profundidad los parámetros de crecimiento del biocontrolador, ya que estos varían mucho de una especie a otra y en la misma medida entre aislaciones de la misma especie. Lo que permitiría optimizar y estandarizar aun mas los niveles de producción.
- En el caso de enfermedades dependientes de las condiciones climáticas como *Venturia* y *Botrytis*, se requiere un stock presente en el predio a utilizar o bien una muy rápida comunicación entre el productor de *Trichoderma* y el agricultor, frente a esto existe la posibilidad, con agricultores de un nivel tecnológico alto, el de entregarles cultivos de *Trichoderma* en medio sólido, para los periodos de mayor probabilidad de incidencias de las enfermedades, de manera que sean capaces de generar ellos la solución final.

La viabilidad de Tr, tanto en los sistemas de producción en sólido, en líquido y en el bi afásico. Siendo la viabilidad de sólido de aproximadamente un mes, luego del cual, Tr entra en un proceso de autólisis y se ve favorecida la infección por bacterias, que terminan por destruir al hongo.

En el medio líquido, mientras exista agitación, se puede mantener el cultivo por dos a tres meses, dependiendo de la cantidad de nutrientes y la oxigenación.

Pero después de evaluar los niveles y costos de producción, se considera, que un almacenaje mas prolongado no se justificaría, ya que se podría producir sin problema para la temporada, manteniéndose un stock en el sistema líquido, lo que permitiría tener una producción utilizable tres a cuatro días después de la inoculación en el medio sólido. Además la suspensión a base de conidias, proveniente de los granos, puede mantenerse viable con plena confianza, por 5 días a 4°C. Esto permitiría crear un sistema de inscripción a principio de temporada, de productores interesados, de forma de estimar la cantidad a producir y las fechas. De esta forma se tendría un producto mayor calidad, dado por un periodo casi nulo de almacenaje y un gran porcentaje de micelio activo, lo que aumentaría la efectividad del producto y además significaría una disminución importante en los costos para los agricultores. Lo que además los obligaría a organizarse.

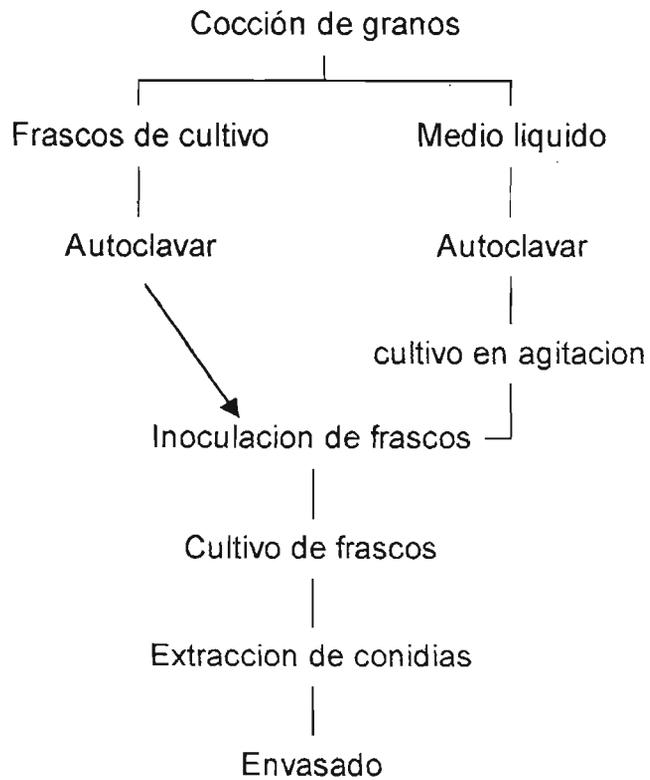
Otro punto importante que se abordo en la investigación desarrollada, fue la producción y almacenaje de *Trichoderma*, ya que en Chile existe una amplia gama de investigaciones sobre control biológico, pero prácticamente no se ha desarrollado ninguno a un nivel comercial, que permita a los productores utilizarlos con seguridad, tanto técnica como de abastecimiento y a un precio rentable. Es por lo anterior que a nivel de laboratorio, se diseño un sistema de producción bi-fásico, de bajo costo y requerimientos técnicos, pero si con mucha dedicación de mano de obra especializada, para la producción de *Trichoderma*. La ventaja de este sistema, frente a los productos comerciales, es que al ser un sistema de producción continuo, permite evitar tiempos prolongados de almacenamiento, esto estaría generando tres ventajas, la primera, sería una reducción de costos, la segunda es que se estaría utilizando micelio activo, en vez de conidias secas, lo que aumentaría la capacidad biocontroladora y velocidad de colonización de *Trichoderma* y la tercera ventaja es que se podrían generar centros de auto producción, que generen empresas o grupos de agricultores, disminuyendo aun mas los costos y asegurando el abastecimiento de estos insumos. Aunque sería necesario un control de calidad entregado por

un organismo especializado, para asegurar la pureza de las cepas y la asepsia del sistema de producción.

El sistema de producción se detalla a continuación.

- 1.- Cocer por una hora la mezcla de granos de maíz, avena y trigo (1:1:1).
- 2.- Moler la mezcla y en un matraz de 1 litro con agua destilada, agregar la mezcla molida a un 5%.
- 3.- Autoclavar la solución.
- 4.- Una vez autoclavada y enfriada, sembrar con la Cepa de *Trichoderma*, pura extraída de un cultivo en agar extracto malta.
- 5.- De la misma mezcla, extraer 50 gr. para cada frasco de cultivo y estos, se deben autoclavar.
- 6.- Después de 5 a 8 días, extraer 5 ml para cada frasco de cultivo.
- 7.- Una vez producidas las conidias y con un color verde oscuro y texturado, extraer 20 gr. por cada litro a producir, esto se agrega a un litro de agua mas 50 μ l de Tween 20 y poner en agitación.
- 8.- Filtrar con rejilla para nematodos y envasar.

falta
->
detalle



5.2 UNIDAD DE VIRUS GRANULOSO

5.2.1 Colecta de virus granuloso.

De los sectores muestreados solamente dos presentaron larvas con cuerpos de inclusión virales. De estos dos solamente la Zona de Lircay genero una infección efectiva y clara al alimentar a larvas sanas con dietas infestadas. muestras.

Zona	Cepas	Cepas altamente infectivas
Lircay	CpGV-L1	CpGvL1
Longavi	CpGV-L2	No infecta larvas sanas
Gultra	No presenta	-
Linares	No presenta	-
Alto Las cruces	No presenta	-
Panguilemo	No presenta	-
Cauquenes	No presenta	-

5.2.2 Aislación e identificación del virus.

Durante la temporada de 97-98 se colectaron numerosas larvas de *Cydia pomonella*, en árboles de manzano abandonados en los alrededores de la ciudad de Talca, con síntomas de virosis. Estos síntomas correspondían a manchas en el tegumento y tonalidad oscura en otras larvas (Lecuona, 1996). Al realizar ensayos en larvas sanas, entregándoles dietas con una solución de cuerpos de inclusión de VG con la Cepa L1, a una concentración de 3×10^7 CI/ μ l., se repitieron los mismos síntomas. Con una correcta aislación e identificación, corroboramos en el año 1999 que se trataba de una Cepa infectiva de Granulovirus para *Cydia pomonella*. Esta Cepa CpGV-L1 fue la que utilizaríamos en todos los demás ensayos.

Se puede observar bajo la tinción de Giemsa en un microscopio óptico la formación de numerosos cuerpos de inclusión viral (ci). Estos tienen forma de bastón de aproximadamente 300 nm de largo y 120 nm de ancho, presentando un solo virion por ci. El virion se ve claramente teñido de morado en el centro del ci, diferenciando claramente de otros cuerpos de tamaño similar.

5.2.3 Producción de anticuerpos policlonales para la identificación de VG.

Marcaba positivo a larvas enfermas con CpVg-L1 y negativo a larvas sanas. A pesar de ser un método bastante preciso que detecta fácilmente las partículas virales, el método resulta engorroso si se compara al método de observación directa. Preferimos utilizar la observación directa al microscopio debido a la facilidad de evidenciar los ci del virus. En el caso de que hubiésemos tenido más de una Cepa viral, hubiese sido una herramienta útil para distinguir entre cepas. Lamentablemente la utilización de anticuerpos policlonales a veces no puede diferenciar entre cepas y hubiéramos tenido que recurrir a la utilización de anticuerpos monoclonales.

5.2.4 Crianza de *Cydia pomonella* sobre dietas artificiales.

La producción de larvas neonatas a partir de huevos puestos dentro de las jaulas de postura, fue muy alta. En promedio una jaula con 25 parejas entregaba una cantidad de 150 huevos por día con una eclosión de un 80%. La mayor mortalidad se producía un vez traspasadas las larvas neonatas las cuales alcanzaban el tercer estadio sin problema. Un 95 % de las larvas llegaban hasta el tercer estadio, pero solo un 50% de estas llegaban a pupar. El factor de mayor mortalidad fueron las bacterias por lo cual se les agrego a las dietas antibióticos. El problema era que después del tercer estadio ya no había efecto ya que habían pasado casi tres semanas.

Debido a los problemas encontrados la producción de adultos no era muy regular llegando en muchos casos a cero. Para la producción de larvas neonatas usadas en los ensayos se debió almacenar una gran cantidad de larvas en diapausa que se iban utilizando a medida que nos quedábamos sin adultos.

5.2.5 Producción de CpGV-L1

Debido a los problemas de cría se pudieron producir muy pocos litros de solución viral. En Total se produjeron un total 11 litros en todo el periodo del proyecto. Un litro del producto fue producido entre 1997 y 1998. Este ultimo tenia un título de $1,07 \times 10^{10}$ ci/ ml, por lo que se tuvieron que usar alrededor de 1000 larvas por un litro de solución, para utilizarlo en el ensayo de campo de la temporada 1999-2000. Entre el año 1998 y 2000 no se logro producir mas que pequeñas cantidades de virus que fueron utilizados en los ensayos de laboratorio. Ya entre el principio del 2000 y finales de marzo del 2001 produjimos 10 litros de virus utilizando para la infección larvas de tercer y cuarto estadio colectadas de frutos de un huerto de manzano abandonado en Gultro.

Solucionando los problemas de cría masiva la producción podría seguir el esquema que se presenta en los anexos.

5.2.6 Ensayos de laboratorio

Determinación de concentración letal 50 (LC₅₀) de CpGV-L1 en *Cydia pomonella* (L.).

La LC₅₀ para el CpGV-L1(producido el 4 Mar 2000) fue de $8,1 \times 10^4$ civ /ml, lo cual concuerda bastante con lo obtenido para una Cepa distinta del mismo virus por Payne (1985), con una LC₅₀ de $1,54 \times 10^4$ civ/ml. Esta LC₅₀ nos indicaría que la Cepa en estudio sería potencialmente efectiva en el control de *C. pomonella* a nivel de campo, y justificaría un mayor desarrollo de esta Cepa viral para una producción a mayor escala.

Control de *Cydia pomonella* con CpGV aislado L1.

Como se puede observar en la figura 5.2.1 todos los productos provocaron una mortalidad por sobre el 97% al séptimo día desde aplicación, a excepción del control

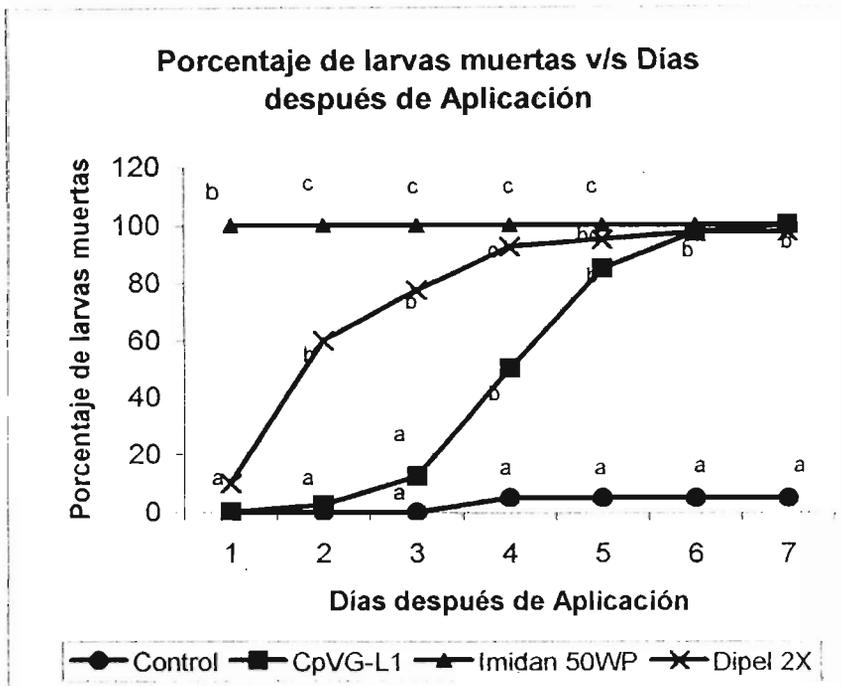


Figura 5.2.1 Porcentaje de larvas muertas, días después de la aplicación de CpGV-L1 con respecto a un control, Imidan y Dipel.

Los productos CpVG-L1 ($1,064 \times 10^9$ CI/L), Dipel 2X (0,75 g/L) e Imidan 50WP (1,2 g/L) controlan *C. pomonella* en condiciones de laboratorio. Todos estos productos mostraron una efectividad de control superior al 97% al cabo del séptimo día.

Existen diferencias en la velocidad de acción de los productos utilizados, siendo Imidan 50WP el producto que obtuvo la mayor mortalidad en el más corto tiempo, seguido por Dipel 2X y finalmente por CpVG-L1.

Debido a que dosis utilizada de Dipel 2x es tan alta lo hace excesivamente caro ya que para una hectárea se necesitaría de 750 g.

El hecho de que la mayor parte de la mortalidad en caso del CpGV-L1 se produce posterior al quinto día se debe realizar las aplicaciones en el momento preciso para disminuir al máximo las heridas por entrada de larvas.

Este ensayo indica que la dosis empleada es adecuada, pero de suma importancia y relevancia es el momento de aplicación debido a que su efecto es lento.

5.2.7 Ensayos de campo.

Determinación de la actividad de una Cepa nativa de Virus Granuloso (CpGV-L1), sobre *Cydia pomonella* (L.) El primer vuelo de machos sostenido ocurrió el día 8 de Octubre (Anexo 1) y desde ese momento se acumularon 100 grados-día (base 10°C) para la realización de la primera pulverización (5 de Noviembre). La segunda pulverización se realizó siete días después de la primera (12 de Noviembre). La tercera se llevó a cabo el 3 de Enero a los 80 grados día desde el último máximo de captura de machos. Las siguientes aplicaciones fueron el 10 y 17 de Enero de 2000. La sexta aplicación fue realizada a los 70 grados-días después del tercer máximo de captura de machos, correspondiendo al 31 de Enero y la última pulverización se realizó siete días después (7 de Febrero).

A) **Porcentaje de frutos dañados** El Cuadro 5.2.1 indica la efectividad de los distintos biocontroladores utilizados en el control de la polilla de la manzana. El mejor tratamiento fue el insecticida convencional azinphosmetil, el cual presentó una incidencia de daño de frutos del 17,1%. Los tratamientos biológicos fueron significativamente mejores que el control sin aplicación, sin embargo su nivel de control fue menor al del insecticida. Es así como el valor promedio de frutos dañados con el uso de CpVG-L1 fue de 73.5%, mientras que para *B. thuringiensis* fluctuó entre un 60 y un 71,6% a las dosis estudiadas. El nivel de daño por polilla de la manzana fue bastante alto en el control sin pulverizaciones, alcanzando valores mayores al 90% (Cuadro 5.2.1).

Cuadro 5.2.1 Efectividad de CpGV-L1 y otras alternativas biocontroladoras y químicas en el control de frutos dañados por *Cydia pomonella*.

Tratamientos	Total frutos dañados (%)	Total frutos dañados (%) ¹	
		Con heridas profundas	Con heridas superficiales
CpGV-L1	73,5 b	39,2 b	60,8 a
<i>B.t.</i> Dosis 1,5 g/L	60 b	50,8 a	49,2 b
<i>B.t.</i> Dosis 6 g/L	71,6 b	45,8 b	54,6 a
Azinphosmetil	17,1 c	-	-
Control	92,2 a	73,3 a	26,7 b

¹ % frutos del total de frutos dañados con heridas superficiales o profundas.

Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos, usando el test de separación de media de Tukey ($p < 0,005$).

El ensayo de campo debió realizarse con una suspensión viral con dos años de almacenaje, debido a los problemas de crianza explicados, y por lo tanto, nuevamente la falta de actividad de CpGV-L1 (evidenciada en los ensayos *in vitro*) quedó en manifiesto. Sin embargo, a pesar de esta menor actividad esperada, tanto los tratamientos con CpGV-L1 y la bacteria redujeron el número de frutos con heridas profundas y por lo tanto aumentaron la cantidad de frutos posibles de comercializar.

B) Profundidad de daño Si analizamos la profundidad del daño podemos observar que los tratamientos control y *B. thuringiensis* a 1,5 g/L, presentaron de forma significativa, mayores porcentajes de daños profundos que CpGV-L1 y *B. thuringiensis* a 6 g/L. Es así como el 73,3 % de los frutos dañados en el tratamiento control presentaban heridas profundas, a diferencia del 39,2 % que presentó los frutos del tratamiento CpGV-L1. Por otra parte, el 60,8% de los frutos dañados que recibieron aplicaciones con CpGV-L1 tenían solamente heridas superficiales. Para los tratamientos con *B. thuringiensis*, el 54,6% y 49,2 % de los frutos dañados tenían heridas superficiales, correspondiendo a las dosis 6 g/L y 1,5 g/L

respectivamente (Cuadro 5.2.1). Por lo tanto, la cantidad de frutos comercializables correspondería a 71,18 % para el tratamiento con CpGV-L1; a un 69,5 % para Bt dosis de 6g/L; un 67,5 % para Bt con una dosis de 1,5 g/L, y de 32,4 % para el tratamiento control.

Unidades de Validación (UVAL)

UVAL Maitenes: De un total de 7200 frutos evaluados el 22 de noviembre, solo se encontraron 5 frutos con daños de *C.pomonella*. No se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos.

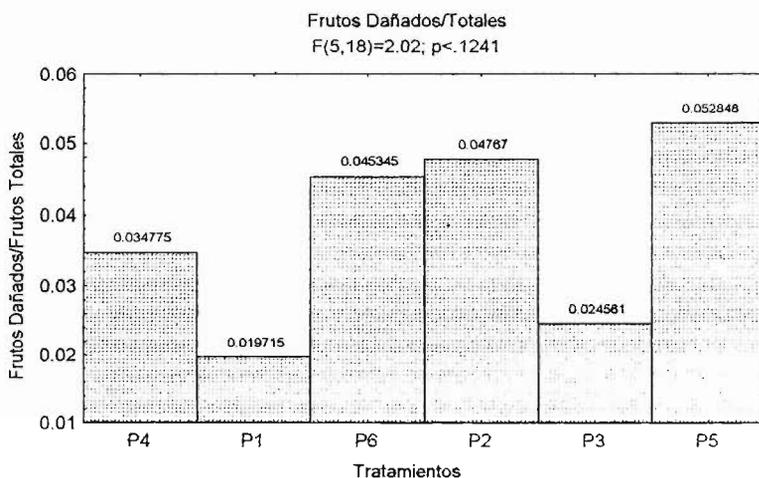


Figura 5.2.2 Frutos dañados/ frutos totales, en los seis programas de manejo de *Cydia pomonella*.

Al comparar los tratamientos al final de cosecha no se observan diferencias significativas en ninguno de los tratamientos. A pesar de que como se puede observar en la figura 5.2.2 los tratamientos con aceite son menores el número de frutos dañados, el ensayo no detectó diferencias estadísticamente significativas.

El promedio total para el paño experimental fue de 3,5 % de manzanas con algún tipo de daño por polilla. Siendo el más alto 5,28 % y el más bajo 1,9 % de manzanas con daño.

Tampoco se aprecian tendencias ni diferencias al analizar el tipo de daño mostrando resultados erráticos en cuanto al porcentaje de frutos con daños profundos o superficiales.

En cuanto a las larvas encontradas en las trampas de cartón corrugado todas murieron o antes o durante la formación de pupa. Al analizar estas larvas bajo el microscopio, siguiendo la metodología anteriormente descrita para la identificación y aislación de cuerpos de inclusión viral, se pudieron observar los ci del Granulovirus.

Ensayo Alternancia de CpGV-L1 con insecticidas tradicionales

Frutos dañados

Al analizar el porcentaje de frutos dañados no se aprecian diferencias significativas según el test de Tukey ($p < 0.05$). Esto nos indica que no hay un programa de aplicaciones mejor que otro, lo cual se aprecia bastante bien en el Gráfico 1. Por lo tanto la posibilidad de usar CpGV-L1 en cualquiera de los 3 programas es válida. Es interesante notar que el programa N°3 usa la mitad de aplicaciones con pesticidas sintéticos al reemplazarlo con CpGV-L1, lo que tiene una ganancia con respecto a los otros programas por haber menos residuos químicos en la fruta. La utilización de CpGV-L1 en un programa de Producción Integrada de Manzana podría ser llevada a cabo siempre y cuando el historial de daño del huerto no sea demasiado elevado.

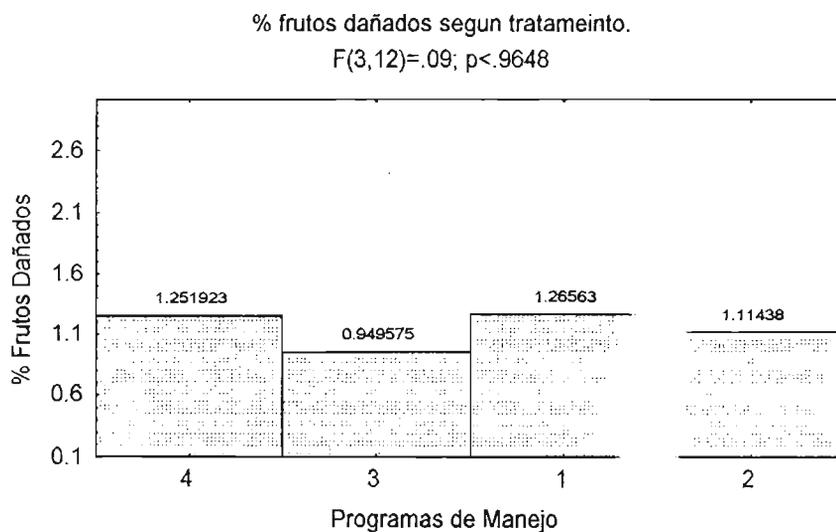


Figura 5.2.3 Porcentaje de frutos dañados según programa de manejo.

Bandas trampa:

Al evaluar el número de larvas diapausantes vivas y muertas por programa se puede observar que en el programa número tres, donde se realizaron 2 aplicaciones de CPGV-L1 el número de larvas muertas es estadísticamente significativo, siendo mayor a los demás programas descritos.

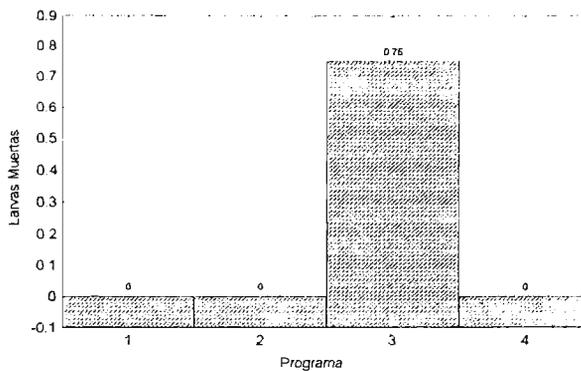


Figura 5.2.4 Número de Larvas Muertas encontradas en las bandas trampas según programa de manejo.

En los demás programas no se encontraron larvas muertas. Las larvas muertas fueron además examinadas en el laboratorio para determinar la presencia de cuerpos de inclusión del virus, saliendo positivos todas las muestras del programa 3.

5.2.8 Ensayos de Almacenaje

Almacenamiento del CpGV-L1 en suspensión líquida. No logramos llegar a la desactivación total de las suspensiones en los tiempos de almacenamiento utilizados. Pero pudimos detectar una gran disminución en la actividad con respecto a una solución no almacenada. Es así como suspensiones almacenadas a 25 ° después de 115 días aumentaba al doble la dosis letal necesaria para provocar la mortalidad de la mitad de los individuos (Lc50). No siendo así al almacenar la solución en el refrigerador a 6 °C. Bajo refrigeración, después del

año, comenzaba a disminuir significativamente la actividad viral de las suspensiones. Las soluciones virales almacenadas por dos años a una dosis de 1×10^6 no producían una mortalidad significativa con respecto al control, a diferencia de una solución no almacenada que usando la misma dosis producía un 100% de mortalidad a los 4 a 5 días después de la infección.

6. FICHAS TÉCNICAS.

6.1 Producción en Masa de Trichoderma

Ficha para producción de 100 lt de Trichoderma

	costos	und	cantidad	valor unidad	costo
Insumos	maíz	kg.	0,66666667	120	\$ 80
	trigo	kg.	0,66666667	120	\$ 80
	avena	kg.	0,66666667	120	\$ 80
	Ac.láctico	lt	0,03	15.000	\$ 450
	Tween 20	lt	0,0025	60.000	\$ 150
	Envases cultivo	und	500	500	\$ 250.000
	Envases comercial	und	500	120	\$ 60.000
	Aluminio	und	5	3.000	\$ 15.000
	Puntillas	und	20	8	\$ 80
	engría	Autoclavar	kw	120	150
infraestructura	Lab	mes	0,33	60.000	\$ 20.000
mano de obra		horas	48	5.000	\$ 240.000
Total					\$ 604.000

\$6.040,00

6.2 Producción de CpGV-L1

Debido a la escasa producción, la cual no fue continua, la estimación de costos de producción serían bastante inexacta. Es por ello y con la intención de no desincentivar el trabajo futuro de esta cepa es que no se presenta una ficha técnica al respecto. Esta sobrestimaría los costos, debido a que se trabajó con crianza individual y dietas importadas para asegurar el buen funcionamiento de los ensayos y del proyecto. La necesidad de trabajar en un sistema de masificación de *Cydia pomonella* sobre dietas artificiales es de importancia primaria antes de poder determinar un sistema semi-industrial de producción de virus. En este informe dentro de los anexos, se presenta un organigrama del modo en que pensamos que se podría realizar la producción con sus etapas claramente identificadas. Pero este sistema supone una producción continua de *C. pomonella* como sustrato básico para realizar cualquier producción.

7. PROBLEMAS.

Trichoderma

En la fase de ensayos in vivo, el principal problema fue la agresividad de las cepas de *Trichoderma*, que por una parte obligaron a extremar las medidas de esterilidad y a trabajar de un patógeno a la vez, de forma de evitar contaminación y por otra parte se debieron utilizar los medios de cultivos a mitad de concentración, para hacer mediciones mas graduales, lo que retraso el desarrollo de estos ensayos.

El segundo problema a enfrentar fue el no contar con un cepáριο de hongos patógenos, los que nos obligo a realizar colectas en cultivos, afectados por estos patógenos, pero no siempre la patogenicidad y virulencia de los hongos colectados era a mas adecuada a los ensayos, por lo que debimos conseguir cepas con el profesor Montealegre y con el INIA Carrillanca, lo que retraso los ensayos. Así los ensayos en tomates y Brócoli, debieron ser repetidos varias veces antes de que los patógenos generaran un nivel de daño, en los testigos, lo suficientemente alto, como para tener diferencias significativas con los testigos no inoculados.

No se han desarrollado métodos, en Chile para realizar inoculaciones con patógenos, lo que disminuye la replicabilidad de los ensayos.

En los ensayos en cultivos y almácigos, nos vimos en algunos casos, como el de Brócoli y pimentón a realizar los ensayos fuera de temporada, dados los ensayos anteriormente descritos, pero se subsano utilizando cultivos en invernadero.

En el caso de manzanos, ni el agricultor ni el campo experimental permitió realizar ensayos con un testigo absoluto, pese a lo cual se obtuvieron resultados similares a los de manejo convencional.

Para el proceso de almacenaje, no existen publicaciones accesibles sobre estas metodologías, en especial de las industriales, por lo que se debió improvisar, pese a lo cual nuestros resultados fueron similares a los obtenidos en otros estudios.

Virus Granuloso

Los principales problemas en esta unidad ocurrieron principalmente por la inestabilidad biológica normal de la crianza de esta polilla. Lo anterior ha sido parcialmente solucionado con la modificación de las dietas artificiales para su crianza (ver metodología sobre crianza).

Debido a la inactivación que presenta las suspensiones virales que han sido almacenadas por más de un año, nuestro ensayo de campo de primera temporada entregó resultados erráticos que distan bastante del potencial biocontrolador de CpGV-L1. Por ello, en los ensayos que se realizaron en la Estación Experimental Panguilemo y en las UVAL de San Fernando y San Clemente, se usaron suspensiones virales de menos de un año de almacenaje.

8. CUADRO RESUMEN DE COSTOS

Monto en \$

ITEM	FIA	Propios	Total
Honorarios	45.048.704	33.878.026	78.926.730
Equipos	6.944.996	0	6.944.996
Materiales e insumos	3.152.262	0	3.152.262
Servicios	432.114	0	432.114
Transporte	3.357.038	0	3.357.038
Viáticos	587.731	0	587.731
Transferencia	601.539	0	601.539
Uso laboratorio	-	3.859.433	3.859.433
Uso estación experimental	-	1.663.505	1.663.505
Gastos administrativos	-	2.444.318	2.444.318
Elaboración de proyecto		350.000	350.000
	-	0	102.319.666
Total	60.124.384	42.195.282	102.319.666

9. DIFUSIÓN DE RESULTADOS OBTENIDOS.

Los objetivos, resultados y conclusiones del proyecto fueron difundidos principalmente a través de Días de Campo y charlas, donde en todos hubo bastante público asistente. Además se distribuyó un Boletín de difusión en uno de estos Días de Campo y un boletín final de “Control Biológico Usando Microorganismos”.

En total se realizaron 4 Días de Campo 3 Charlas se presentaron 4 trabajos en Congresos nacionales y un trabajo en reuniones de sociedades científicas. Se presentó además en forma de poster en la II feria de Agricultura Orgánica y en un encuentro de horticultura organizado por el FIA.

En el siguiente cuadro se detallan las actividades de difusión realizadas:

Lugar	Nombre Actividad	Observaciones
IV Jornadas Científicas de Estudiantes de Agronomía. Talca	Control Biológico de Plagas y Enfermedades usando Microorganismos	Difusión Objetivos y Actividades del Proyecto
II Feria Agricultura Orgánica. Santiago	Poster del proyecto	Difusión Objetivos y Actividades del Proyecto
V Jornadas Científicas de Estudiantes de Agronomía. Valdivia	Evaluación de Microorganismos Controladores de Enfermedades y Plagas en Cultivos Hortofrutícolas de Importancia Regional.	Difusión Objetivos, Actividades del Proyecto y resultados parciales.
Encuentro de Producción Hortícola Mercado y Calidad. FIA. Talca.	Poster del proyecto	Difusión Objetivos, Actividades del Proyecto y resultados parciales.
Panguilemo, Talca	Primer Día de Campo	Difusión Objetivos, Actividades del Proyecto y resultados parciales.
Universidad de Talca y visita a Huerto Carlos Holgrem, Maitenes	Segundo Día de Campo	Resultados parciales UVAL y ensayos manzano.
San Clemente y visita a Huerto Carlos Holgrem,	Tercer Día de Campo	Resultados Ensayos de UVAL Manzanos.

Maitenes.		
San Clemente y visita a Huerto Carlos Holgremi, Maitenes.	Boletín de Difusión	Control de Plagas y enfermedades en cultivo de manzana orgánico.
Panguilemo Talca.	Día de Campo “Manejo De Hortalizas Bajo Un Sistema Orgánico” en conjunto con el proyecto FIA <i>Desarrollo De Tecnologías Para La Agricultura Orgánica Para Dos Rubros En La Séptima Región.</i>	Uso Trichoderma para el control de enfermedades de hortalizas. Manejo de hortalizas orgánicas y control de plagas.
X congreso de Fitopatología, Valdivia.	“Potencial Biocontrolador de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> ”	
51 ^{er} Congreso Agronómico, Talca	“Control biológico de <i>Botrytis cinerea</i> con cepas nativas de <i>Trichoderma</i> ” Y “Control de <i>Cydia pomonella</i> con una Cepa nativa de <i>Cydia pomonella Granulovirus</i> (CpGV-L1)”	
XXII Congreso Nacional de entomología	“ Control a nivel de laboratorio de la polilla de la manzana <i>Cydia pomonella</i> (Linnaeus) (Tortricidae) con <i>Cydia pomonella Granulovirus</i> aislado L1 (CpGV-L1) (Baculoviridae)”	
Reunión Mensual Sociedad Chilena de Entomología. Talca	Presentación “ Experiencias en el control de <i>Cydia pomonella</i> con el Virus Granuloso de <i>Cydia pomonella</i> (CpGV)”	
Universidad de Talca, Talca.	Presentación de Boletín “Control de enfermedades y plagas con microorganismos”	

10. IMPACTOS DEL PROYECTO.

A través de la formulación de estos insecticidas biológicos, existe la posibilidad de tener un el futuro una herramienta para el control de *Cydia pomonella* y de enfermedades tales como la *Venturia*, *Fusarium*, *Sclerotinia Phythophtora capsici*, *Botrytis* y *Rhizoctonia*.

Permite la producción orgánica del manzano, siendo la polilla de la manzana una de los mayores impedimentos para la producción, debido a las altas pérdidas que esta generaría sin su control.

En estos momentos existen varios agricultores, que estuvieron relacionados al proyecto o por los días de campo utilizaron y esta utilizando *Trichoderma*, así tenemos dos agricultores de manzano, uno en San Fernando y el otro en San Clemente, además de 5 productores de tomate en Pencahue, mas uno en Putagan, dos productores de frambuesa en Linares y uno de espárrago en Pelarco, por otra parte Huertos Orgánicos y Copefrut, han manifestado su interés de incluir el uso de *Trichoderma* en sus planes de manejo, esto debido a su eficiente control de enfermedades muchas de las cuales ni siquiera tienen simil químico. Las cepas nativas aisladas han respondido de mejor forma que los productos importados que contienen *Trichoderma*, encontrando cepas especialistas y generalistas. Esto nos sugiere que se planifique su producción según las necesidades

Además se logro que varios agricultores introdujeran el uso de ambos biocontroladores, en sus planes normales de manejo. Lo que esta generando una demanda constante por estos microorganismos.

Se sentaron las bases para un producción comercial local de *Trichoderma*, a nivel semi-industrial, que permitiría el desarrollo de una industria de bio-controladores, que es uno de las

principales necesidades de los agricultores orgánicos, quienes día a día aumentan la demanda por insumos para la agricultura orgánica.

Se ha determinado la importancia de preservar lugares con altos índices de diversidad, dado que es de esos sitios que se aislaron las cepas de mayor importancia.

11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Unidad de *Trichoderma*

En Chile existe una alta diversidad de microorganismos con potencial para control biológico, de los cuales muy pocos han sido desarrollados hasta una etapa de utilización comercial, lo que debilita a Chile en cuanto al abastecimiento de insumos para la producción orgánica.

Las cepas seleccionadas de *Trichoderma* mostraron todas acción sobre los patógenos estudiados, pero sus niveles de control variaron según el patógeno, demostrando un grado de especificidad en sus acción, lo que hace mas seguro el uso de este microorganismo.

No solo se demostró la eficiencia de las cepas en estudios in vitro, sino que también a escala de cultivos experimentales y comercial, demostrando la viabilidad técnica de uso de este biocontrolador, no solo en la agricultura orgánica, ya que dada su tolerancia a algunos fungicidas convencionales, permite su uso en programas de manejo integrado.

La Cepa de *Trichoderma* Cepa Queule mostró un excelente comportamiento en el control de *Fusarium solani*, *F. oxysporium*, *Phytophthora* spp y *Venturia inaequalis* a nivel comercial en huertos de manzano y tomate.

La Cepa Sherwood demostró un eficiente control de *Botrytis cinerea* tanto a nivel de laboratorio como en cultivos experimentales de lechuga.

En el caso de *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum* se hace necesario realizar mas ensayos a nivel de campo, ya que pesé a que los resultados obtenidos no fueron los mejores, si existe una acción de las cepas de *Trichoderma* sobre estos patógenos. Además en los ensayos realizados las condiciones dadas para el desarrollo de estos eran superiores a las que se dan normalmente en condiciones naturales.

El almacenaje de *Trichoderma* con los medios de que dispone el laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Talca, no es útil mas allá de 4 meses, siendo mucho mas factible tanto económica como técnicamente una sistema de producción continuo, que demostró mejores resultados en el control de enfermedades, al entregar como producto final una mezcla de conidias y de micelio.

Se hace necesario estudiar con mas detención dos aspectos del uso de *Trichoderma*, el primero es el de ajustar los criterios de aplicación, esto es frecuencia y sistemas de monitoreo de las enfermedades, de forma de optimizar el número y momento de aplicaciones necesarias del biocontrolador, para distintos cultivos y patógenos. El segundo aspecto es definir para las cepas con mejores resultados, los parámetros de crecimiento y productividad, de forma de crear una sistema industrial de producción de *Trichoderma*, esto a varias escalas, ya que dada la facilidad de producción y el bajo costo que esta implica, se podrían generar paquetes tecnológicos, para que empresas o agrupaciones de productores desarrollen centrales de auto abastecimiento, las que podrían servir a futuro con algunas modificaciones para el cultivo de entomopatógenos como *Metharizum* y otros controladores de enfermedades.

De los estudio de almacenaje, lo mas rescatable es el hecho de que *Trichoderma* es capaz de mantenerse por 60 a 90 días en perlita, lo que estaría permitiendo un control eficiente de enfermedades de suelo en cultivos hidropónicos o bien en almácigo y vivero.

Como conclusión de los ensayos en cultivos experimentales, para el caso de enfermedades de suelo, es recomendable usar *Trichoderma* en forma preventiva, ojalá durante la aplicación de compost o bien el la plantación o siembra.

Unidad de Virus Granuloso.

La concentración letal media (LC₅₀) para la Cepa CpGV-L1 de virus granuloso de $8,1 \times 10^4$ civ /ml. Lo anterior reitera lo obtenido por otros investigadores para otras cepas de virus granuloso en *Cydia pomonella*.

A una concentración de $8,1 \times 10^6$ civ/ml en laboratorio, se alcanzó una mortalidad del 100% en cuatro días, lo cual nos confirmó su potencial biocontrolador. A pesar que en nuestros ensayos de campo los porcentajes de daño fueron del 73,5% comparado al 17% del insecticida, solamente un 39,2 % de éstos tuvieron daños profundos. Tomando en cuenta que los frutos con daños superficiales son comercializables en un mercado para productos orgánicos, el total de frutos posibles de comercializar fue de un 71,18 %.

Para un mayor nivel de control de *Cydia pomonella* es importante que la suspensión viral utilizada no tenga un periodo de almacenaje mayor a un año. Nuestros bajos niveles de control en el ensayo de campo de primera temporada, pudieron deberse principalmente al hecho de haber usado una suspensión viral con mas de dos años de almacenaje.

Usando un programa de aplicaciones como el que se describe en los ensayos UVAL se puede mantener el daño de *Cydia pomonella* bajo el 3,5 %.

No existen diferencias significativas, entre programas de manejo de *Cydia pomonella*, que usan mas de 2 aplicaciones de CpGV-L1 por condición (esto es 90 gd después de primer vuelo sostenido), con o sin aplicaciones de aceite y los programas que solo usan dos aplicaciones del virus por condición, con o sin aceite.

Debido a lo último un huerto bajo confusión sexual, usando una aplicación a los 90 grados días después de vuelo sostenido mas otra aplicación a los 7 o 14 días después, podría mantener daños inferiores al 3,5 %.

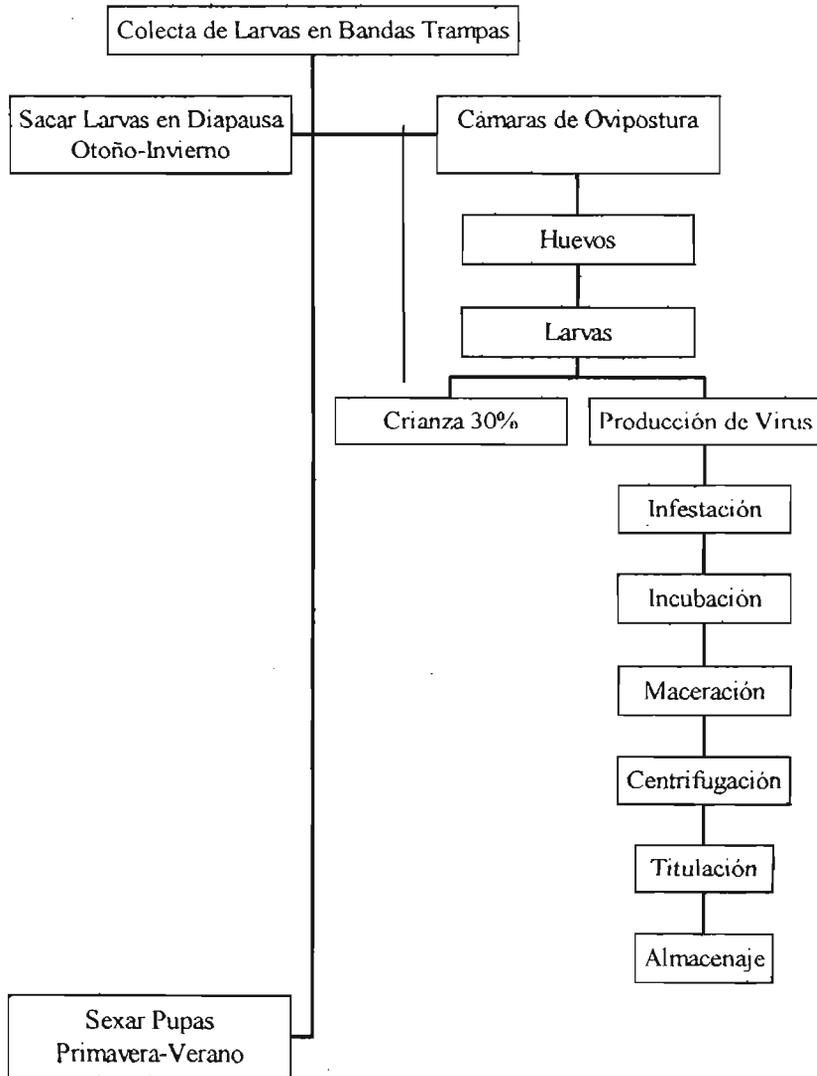
El producto CPGV-L1 es posible de usar dentro de programa de aplicaciones con insecticidas sintéticos, pudiendo reducir las aplicaciones químicas hasta en un 50% sin experimentar diferencias en los porcentajes de frutos dañados por *C. pomonella*. Esto último inclusive en un programa que considera como fechas de aplicación los periodos de residuos de los insecticidas.

Además CPGV-L1 reduce significativamente la población de larvas invernantes para la próxima temporada, reduciendo así la presión inicial de la plaga en el huerto.

Una solución de cuerpos de inclusión viral pierde su efectividad aumentando la temperatura y/o el tiempo de almacenaje. Una solución no debiera almacenarse mas de un año y aunque no es totalmente obligatorio el almacenamiento debería ser bajo refrigeración (6°C).

12. ANEXOS.

Esquema de Producción de CpGV-L1



Dieta de *Cydia pomonella*

La dieta es la elaborada por Pointot y Blues 1970 Ann.Zool.ECOL: Anim.2 (1) 79-91., modificada por Guennelon 1981 Agronomie 1: 59-64. Es conveniente que sus ingredientes se conserven a bajas temperaturas.

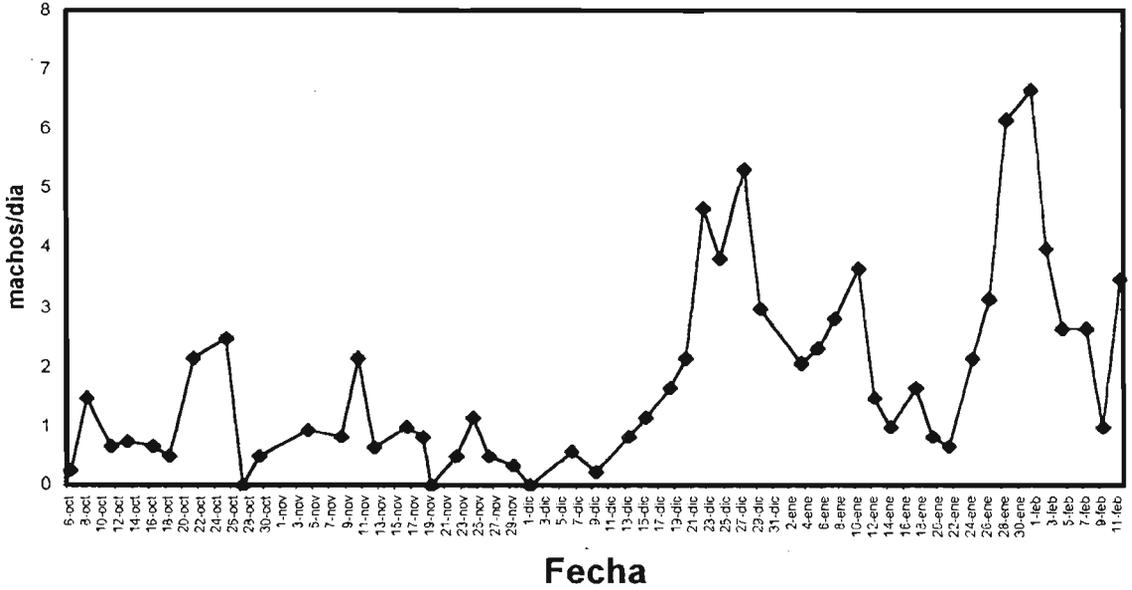
Agua	755 ml
Agar reposteria	15 g
Agar en rama	5 g
Harina de maiz	141 g
Germen de trigo	35,3 g
Levadura de cerveza virgen	37.8 g
Ac. ascórbico	5 g
Nipagin	1,8 g
Ac benzoico	2,3 g
Formaldehído 30%	1.3 ml
Gentamicina	500 mg
Complejo vitamínico	250 mg
Micostatín (líquido)	500 ml

Dieta Canadiense (para 1 Lt)

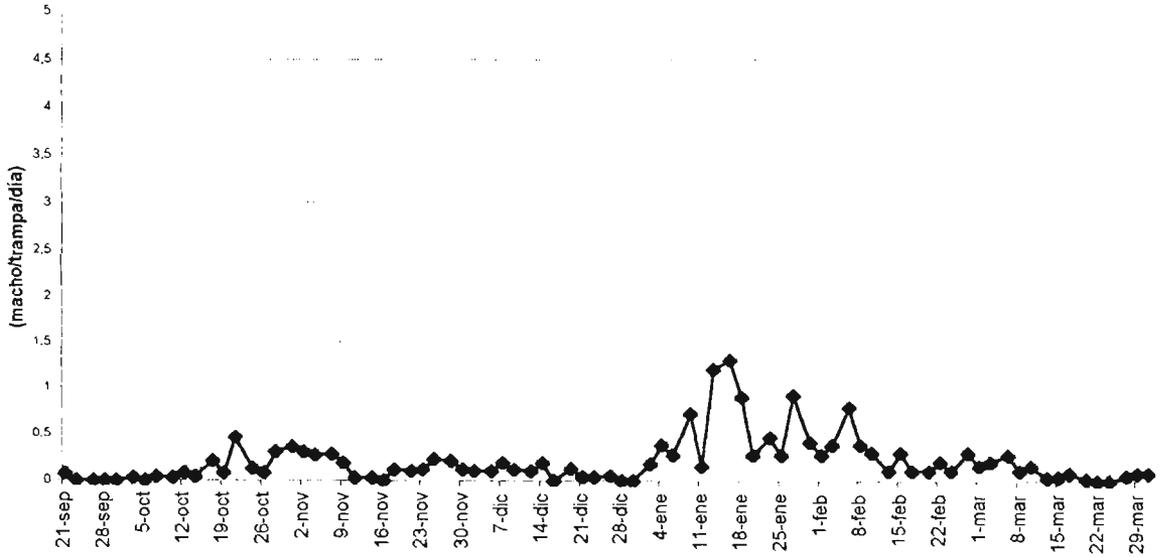
Celulosa	9 g.
Aserrín	75,2 g
Azúcar	18,72 g
Mezcla Vitaminica Vanderzant (Bio-Serv)	4.01 g
Mezcla de Sales, Wesson (Bio-Serv)	3.816 g
Parabenmetil	1.110 g
Ácido Fumárico	5.580 g
Formaldehído	0.36 ml
Cloruro de Choline	1.38 g
Harina de Maíz	93.6 g
Harina de trigo integral	48g
Germen de trigo	6.24 g
Gluten	3.6 g
Agua	722 ml
Parafina sólida	

La parafina se derrite y se barniza una pequeña capa por sobre la dieta para evitar la deshidratación.

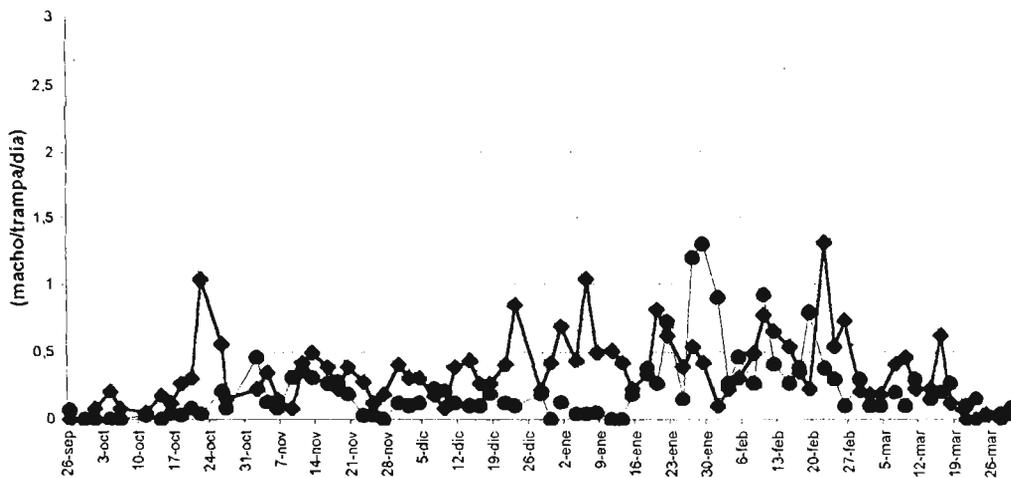
**Capturas Promedio Estación Experimental Panguilemo
Temporada 1999-2000**



**Captura de *Cydia pomonella* (2000/2001)
en huerto de los alrededores de San Clemente**



**Captura de *Cydia pomonella* temporada (1999-2000)
y temporada (2000-2001) en un Huerto de San Clemente**



Pauta Unidades de Validación de proyecto FIA

Evaluación de formulaciones de microorganismos controladores de enfermedades y plagas en cultivos hortofrutícola de importancia regional.

Código: C98-1-A-072

Nombre o Razón social: Universidad de Talca

Dirección: Longitudinal Sur Km. 245

Localidad: Panguilemo.

Teléfono/Fax: 200425

E-mail:

Tipo de manejo (orgánico, en transición, convencional)

Orgánico

Cultivos en que ha utilizado los biocontroladores (Trichoderma o Virus Granuloso):

Espárragos, hortalizas agroindustriales y bajo plástico.

Niveles de daños obtenidos con el uso de los biocontroladores:

En espárragos, no hubo daño superior al 5%, que pudiera ser atribuible a enfermedades de suelo. En las otras hortalizas se uso tanto preventiva como curativamente, evitando en el segundo caso el avance de la enfermedad

Apreciación de estado general del cultivo, en comparación con planes de manejo sin los biocontroladores:

En general, buen estado de los cultivos durante la ultima temporada de crecimiento (espárragos). En hortalizas de aire libre y bajo invernadero, se ogo un adecuado crecimiento de los cultivos.

¿Seguiría utilizando los biocontroladores?

Sí, en términos generales, utilizando un adecuado plan de manejo preventivo, es posible reducir los niveles de daño por enfermedades.

Recomendaciones:

Es necesario implementar un mecanismos que permita no tan solo la elaboración del producto, sino que su comercialización.

Evaluación de formulaciones de microorganismos controladores de enfermedades y plagas en
cultivos hortofrutícola de importancia regional.
Código: C98-1-A-072

Nombre o Razón social: Sr. Dillman Villa Polauco
Dirección: Los Confines Norte 7
Localidad: Angol IX región..
Teléfono/Fax: 45-716376
E-mail:

Tipo de manejo (orgánico, en transición, convencional)
Convencional

Cultivos en que ha utilizado los:
Desarrollo de plantines hortícolas de tomate bajo invernadero.

Niveles de daños obtenidos con el uso de los biocontroladores:
En la producción de plantines, se logro reducir casi a cero el nivel de daño producido por el complejo, de hongos del suelo, cuyo nivel de daño bajo manejo convencional fue inicialmente de un 20%. En cultivos de tomate, se logro disminuir la incidencia de daños por hongos vasculares, específicamente por verticiliosis, que afectó al cultivo durante la temporada pasada, evitando que afectara mayor numero de plantas

Apreciación de estado general del cultivo, en comparación con planes de manejo sin los biocontroladores:
Se logro un crecimiento y desarrollo adecuados a los requerimientos de la producción.

¿Seguiría utilizando los biocontroladores?
Dependiendo de la seguridad de recibir el producto en forma regular, si.

Recomendaciones:
Lograr mantener una oferta del producto que permita disponer de él, oportunamente.

Evaluación de formulaciones de microorganismos controladores de enfermedades y plagas en cultivos hortofrutícola de importancia regional.
Código: C98-1-A-072

Nombre o Razón social: Sr. José Moraga
Dirección: San Víctor Alamo
Localidad: Linares..
Teléfono/Fax: 73-375051
E-mail:

Tipo de manejo (orgánico, en transición, convencional)
Convencional (frambuesos) y en transición (espárragos)

Cultivos en que ha utilizado los:
Espárragos y Frambuesos

Niveles de daños obtenidos con el uso de los biocontroladores:
En espárragos, no se observo mayor ataque de Fusarium, sólo casos aislados de plantas con síntomas de la enfermedad. En frambuesos, según antecedentes por el agricultor, se aplico para control de Botrytis obteniendo un buen resultado.

Apreciación de estado general del cultivo, en comparación con planes de manejo sin los biocontroladores:
Espárrago presnto un excelente desarrollo vegetacional durante la reciente temporada.
Frambuesa, al comparar el uso de Trichoderma con respecto al de agroquimicos, se obtuvo un buen nivel de control , del bio-controlador

¿Seguiría utilizando los biocontroladores?
Si.

Recomendaciones:
Falta información de este producto.

Evaluación de formulaciones de microorganismos controladores de enfermedades y plagas en cultivos hortofrutícola de importancia regional.

Código: C98-1-A-072

Nombre o Razón social: Sr. Héctor Contreras

Dirección: Parcela , Santa Rita

Localidad: Pelarco

Teléfono/Fax: 71-370275

E-mail:

Tipo de manejo (orgánico, en transición, convencional)

Orgánico

Cultivos en que ha utilizado los:

En espárragos

Niveles de daños obtenidos con el uso de los biocontroladores:

En general, se ha logrado disminuir la incidencia de Fusarium, en el cultivo, mediante un programa tendiente a establecer colonias en un numero cada vez mayor en el suelo, con el fin de poblar adecuadamente la zona de crecimiento de las raíces

Apreciación de estado general del cultivo, en comparación con planes de manejo sin los biocontroladores:

Se aprecia un desarrollo vegetativo normal, pese al enmalezamiento y ataque de Fusarium

¿Seguiría utilizando los biocontroladores?

Sí, el agricultor posee un predio organico, por lo tanto, requiere de insumos como los biocontroladores para el control de enfermedades.

Recomendaciones:

Disponibilidad de productos, mecanismos de distribución y oferta en el mercado..

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Agrios, G. 1991. Fitopatología. Editorial Limusa. México. P 741.

Altomare, Norvell, Björkman, and Harman, Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai strain 1295-22. Appl. Environ. Microbiol. (in press).

Society for Horticultural Science 123 (1): in press. 1998.

Artigas, J.N. 1995. Entomología Económica. Ediciones Universitarias. Ediciones Universidad

Blanchard and Björkman The role of auxin in enhanced root growth of *Trichoderma*-colonized sweet corn. Bro 1996 Amer. Soc. Hort. Sci., Lexington, KY

Björkman, Blanchard and Gary E. Harman. Growth enhancement of shrunken-2 sweet corn by *Trichoderma harzianum* 1295-22: Effect of environmental stress Journal of the American de Concepción. Chile. Vol I. 1126pp.

Burgess, D. R.; Keane, P. J.. Biological control of *Botrytis cinerea* on chickpea seed with *Trichoderma* spp. and *Gliocladium roseum*: Indigenous versus non-indigenous isolates. Plant Pathology (Oxford), v.46, n.6, Dec., 1997.:910-918.

Cambra, M. et. al. 1995 Patología vegetal, Tomo #1. Ed. Sociedad Española de Fitopatología, M. L.V. Phytoma – España, S.L. pp 695.

Carisse, Odile; Pillion, Vincent; Rolland, Daniel; Bernier, Julie. Effect of fall application of fungal antagonists on spring ascospore production of the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. Phytopathology, v.90, n.1, Jan., 2000.:31-37.

Carreño, I., Alvarez, M., 1989. Razas resistentes a *Botrytis cinerea*. Aconex 26: 17-20.

Chattopadhyay, C.; Sen, Binecta. Integrated management of *Fusarium* wilt of muskmelon caused by *Fusarium oxysporum*. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology, v.26, n.2, 1996.:162-170.

Chen, J.; Abawi, G. S.; Zuckerman, B. M.. Efficacy of *Bacillus thuringiensis*, *Paecilomyces marquandii*, and *Streptomyces costaricanus* with and without organic amendments against *Meloidogyne hapla* infecting lettuce. Journal of Nematology, v.32, n.1, March, 2000.:70-77.

Chen, J.; Abawi, G. S.; Zuckerman, B. M.. Suppression of *Meloidogyne hapla* and its damage to lettuce grown in a mineral soil amended with chitin and biocontrol organisms. Journal of Nematology, v.31, n.4 Suppl., Dec., 1999.:719-725.

Ciampi, L., Silva, S., 1991. Perspectivas para el control biológico en *Botrytis cinerea* en Frambuesa. Aconex 31: 5-10.

Cook, R.J. & Baker, K.F. 1989. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. The American Phytopathological Society. II Edition, USA. 539 pp.

C-T Lo And C-Y Lin Plant Growth enhancement and disease control by *Trichoderma* sp. in Taiwan Compac Profe
Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan

De Meyer, Geert; Bigirimana, Joseph; Elad, Yigal; Hoefte, Monica. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum*T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology, v.104, n.3, April, 1998.:279-286.

Department of Horticultural Sciences, NYSAES, Cornell University, Geneva, NY 14456
Flanders, Hobart and William Smith Colleges, Kovach. The Effect of *Trichoderma harzianum* on Honey Bee Survival IPM Program, Cornell University NYS Ag. Exp. Sta., Geneva, NY 14456

Dewey, F.M. Chapter III. Detection Of Plant-Invading Fungi By Monoclonal Antibodies.in

Djian, C; Pijarowski, L; Ponchet, M; Arpin, N; Favre-Bonvin, J. Acetic acid: A selective nematocidal metabolite from culture filtrates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson and *Trichoderma longibrachiatum* Rifai. Nematologica, v.37, n.1, 1991:101-112

Dobson, A.J. 1983. Binnary Variables and Logistic Regression. Cap.8. in Introduction to Statistical Modelling. University of New Castle, New South Wales, Australia. Chapman & Hal.

Eastburn, D M; Butler, E E. Effects of soil moisture and temperature on the saprophytic ability of *Trichoderma harzianum*. Mycologia, v.83, n.3, 1991:257-263

Freitas, Leandro G.; Ferraz, Silamar; Almeida, Adriana M. S.. Control of *Meloidogyne javanica* on tomato by the production of seedlings into soil substrate with *Paecilomyces lilacinus*. Nematologia Brasileira, v.23, n.1, June, 1999.:65-73.

Gracia-Garza, J. A.; Reeleder, R. D.; Paulitz, T. C.. Degradation of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by fungus gnats (*Bradysia coprophila*) and the biocontrol fungi *Trichoderma* spp. Soil Biology & Biochemistry, v.29, n.2, 1997.:123-129.

Glen, D.M. & Clark, J. 1985. Death of *Cydia pomonella* larvae and damage to apple fruit, after field application of codling moth granulosis virus. Entomol. Exp. Appl. 38, 93-96.

Guennelon 1981. *Agronomie* 1: 59-64. Montenegro, 1995, Exportaciones Argentinas de productos orgánicos, en *Chile Agrícola*, Vol. XI N° 211 pags, 347-348.

Hazarika, K.; Dutta, P. K.; Saikia, L.; Deka, S. C.. Biological control of root-knot nematode in betelvine using parasitic fungus, *Paecilomyces lilacinus*. *Crop Research (Hisar)*, v.19, n.2, March, 2000.:338-342.

Harman, G.E. *Trichoderma for Biocontrol of Plant Patogens: From Basic Research to Commercialized Products*. Department of Horticultural Science and of Plant Pathology. Cornell University NYSAES. Geneva, NY 14456. Intrenet Publication.

Huber, J & Dickelr, E. 1982. Codling moth granulosis virus: its efficacy in the field in comparison with organophosphorus insecticides. *J. Econ. Entomol.* 70: 557-561.

Jaques, R. P., J. M. Hardman, J. E. Laing, R. F. Smith and E. Bent. 1994. Orchard trials in Canada on control of *Cydia pomonella* (Lep.: Tortricidae) by granulosis virus. *Entomophaga* 39: 281-292 (Publicación internet)

Jassim, H K; Foster, H A; Fairhurst, C P. Biological control of Dutch elm disease: Larvicidal activity of *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma polysporum* and lignicola in *Scolytus scolytus* and *Scolytus multistriatus* reared in artificial. *Annals of Applied Biology*, v.117, n.1, 1990:187-196

Jha, D K; Sharma, G D; Mishra, R R. Ecology of soil microflora and mycorrhizal symbionts in degraded forests at two altitudes. *Biology and Fertility of Soils*, v.12, n.4, 1992:272-278

Jisha, M. S.; Alagawadi, A. R.. Nutrient uptake and yield of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) inoculated with phosphate solubilizing bacteria and fungus in a cotton stalk amended vertisol. *Microbiological Research*, v.151, n.2, 1996.:213-217.

Kaupp,-W.J.; Ebling,-P.M. "Effect of mechanical processing and long-term storage on biological activity of virus". *Can-Entomol.* Ottawa : Entomological Society of Canada, 1868-. Sept/Oct 1993. v. 125 (5) p. 975-977.

Knudsen, G R; Eschen, D J; Dandurand, L M; Wang, Z G. Method to enhance growth and sporulation of pelletized biocontrol fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, n.10, 1991:2864-2867

Kumar, Vineet; Sharma, D. D.; Babu, A. M.; Datta, R. K.. SEM studies on the hyphal interactions between a biocontrol agent *Trichoderma harzianum* and a mycopathogen *Fusarium*

solani causing root rot disease in mulberry. Indian Journal of Sericulture, v.37, n.1, June, 1998.:17-20.

Lacey, L. A. & Knight, A. L. 1998. Use of entomopathogens for the microbial control of lepidopterous pest of pear and apple orchards. Proceedings of VIIth International Colloquim on Invertebrate Pathology and Microbial Control. Ivth International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Sapporo

Lecuona, R.E. 1996. Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga.338p.

Mathew, K. Abraham; Gupta, S. K.. Biological control of root rot of French bean caused by *Rhizoctonia solani*. Journal of Mycology and Plant Pathology, v.28, n.2, Aug., 1998.:202-205.

Mazzone, H.M. 1985. Pathology Associated With Baculovirus Infection. en "Viral Insectides for Biological Control". Maramorosch & Sherman Editores. Academic Press, Inc. Pointot y Blues 1970 Ann. Zool. Ecol:Anim.2 (1) 79-91 .

Montenegro, 1995, Exportaciones Argentinas de productos orgánicos, en Chile Agrícola, Vol. XI N° 211 pags, 347-348.

Morales, 1984, Resistencia del Moho Azul (*Penicillium expansum* L.) a Denony y Thiobendozil, en almacenaje de manzanas, En Revista Fruticola, N° 3.

Moscardi, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. Annu. Rev. Entomol. 44: 257-289.

Palani, P. Vijaya; Lalithakumari, D.. Antagonism of *Trichoderma longibrachiatum* strains to fungicide-sensitive and -resistant strains of *Venturia inaequalis*. Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, v.106, n.6, Nov., 1999.:581-589.

Park, K S; Jang, S W; Kim, C H; Lee, E J. Studies on biological control of phytophthora blight of red pepper: III. Formulations of *Trichoderma harzianum* and *Pseudomonas cepacia* antagonistic to *Phytophthora capsici* and their preservation. Korean Journal of Plant Pathology, v.5, n.2, 1989:131-138

Parveen, Shahida; Ehteshamul-Haque, S.; Ghaffar, A.. Biological control of *Meloidogyne javanica* on tomato and okra in soil infested with *Fusarium oxysporum*. Pakistan Journal of Nematology, v.11, n.2, 1993.:151-156.

Payne, C. 1981. The Suceptibility of the Pea Moth, *Cydia nigricana*, to Infection by the Granulosis Virus of the Codling Moth, *Cydia pomonella*. Journal of Invertebrate Pathology .38, 71-77.

- Pueyo, M., Hernández, R. y Reyes, T. Efectividad del Biopreparado de *Trichoderma harzianum* Rifai, en el Control de Damping Off en Ajo Puerro. Centro Universitario de Las Tunas, La Habana. Cuba. Publicaciones Internet.
- Rao, M. S.; Parvatha-Reddy, P.; Nagesh, M.. Management of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato by integration of *Trichoderma harzianum* with neem cake. Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, v.104, n.4, July, 1997.:423-425.
- Riddick, E. W. & Mills, N.J. 1995. Seasonal Activity of Carabids (Coleoptera: Carabidae) Affected by Microbial and Oil Insecticides in an Apple Orchard in California. Environmental Entomology. Vol. 24, N° 2. 331-366.
- Shanna, B K; Singh, B M; Sugha, S K. Integrated Effect of Biological and Chemical Control on Sclerotial Viability of Sclerotinia-Sclerotiorum Lib. de Bary Journal Biological Control, v.6, n.1, 1992:29-34
- Sankaranarayanan, C.; Hussaini, S. S.; Kumar, P. Sreerama; Prasad, R. D.. Nematicidal effect of fungal filtrates against root-knot nematodes. Journal of Biological Control, v.11, n.1-2, 1997.:37-41.
- Siddiqui, Imran A.; Ehteshamul-Haque, S.; Ghaffar, A.. Root dip treatment with *Pseudomonas aeruginosa* and *Trichoderma* spp., in the control of root rot-root knot disease complex in chilli (*Capsicum annum* L.). Pakistan Journal of Nematology, v.17, n.1, Jan., 1999.:67-75.
- Siddiqui, Imran A.; Ehteshamul-Haque, S.; Ghaffar, A.. Use of *Pseudomonas aeruginosa* and fungal antagonists in the control of root knot-root rot disease complex on mungbean and mashbean. Pakistan Journal of Nematology, v.17, n.2, July, 1999.:155-167.
- Singh, D. Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Trichoderma harzianum*. Tropical Pest Management, v.37, n.4, 1991:374-378
- Singh, P 1977 Artificial diets for insects, mites and spiders. New York, Plenum, 594p
- Stephan, Z. A.; Hassoon, I. K.; Antoon, B. G.. Use of biocontrol agents and nematicides in the control of *Meloidogyne javanica* root-knot nematode on tomato and eggplant. Pakistan Journal of Nematology, v.16, n.2, July, 1998.:151-155.
- Stankeviciene, Antanina; Lugauskas, Albinas. *Trichoderma viride* Pers. Against pathogenic microorganisms of *Dianthus* L. Bulletin of the Polish Academy of Sciences Biological Sciences, v.47, n.2-4, Dec., 1999.:207-215.
- Taucher, E. 1999. BIOESTADISTICA. Editorial Universitaria. Segunda Edición.

Viaene, Nicole M.; Abawi, George S.. *Hirsutella rhossiliensis* and *Verticillium chlamyosporium* as biocontrol agents of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* on lettuce. *Journal of Nematology*, v.32, n.1, March, 2000.:85-100.