

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE GRADUADOS



**EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO IN VITRO EJERCIDO POR
MICROORGANISMOS SOBRE *BOTRYTIS CINEREA* Pers. ex Fries
EN FRUTOS DE FRESA
(*Fragaria x ananassa* Duch.)**

Tesis presentada como parte de los
requisitos para optar al grado de
Magíster en Ciencias Mención
Producción Vegetal.

GINA NATALIE LEONELLI CANTERGIANI

VALDIVIA – CHILE

2006

Profesor Patrocinante:

Luigi Ciampi P., Ing. Agr. , M. Sc., Ph. D.
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Austral de Chile

Profesores Evaluadores:

Fernando Medel S., Ing. Agr., Dr.
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Austral de Chile

Ricardo Fuentes P., Ing. Agr., M. Sc.
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Austral de Chile

VALDIVIA, DICIEMBRE DE 2006

DECLARACIÓN

Yo, Gina Natalie Leonelli Cantergiani, declaro que soy autor del presente trabajo que lo he realizado en su integridad y no lo he publicado para obtener otros Grados o Títulos.

A la hermosa familia

que Dios

Eligió para mi

AGRADECIMIENTOS

Al concluir esta etapa, deseo expresar mi gratitud y reconocimiento:

A mi familia por su amor, comprensión y estímulo, que han sido fundamentales.

Al académico Sr. Luigi Ciampi P., por su inapreciable ayuda en el desarrollo y revisión del trabajo, como también por su amistad, confianza y acogida.

Al académico Sr. Ricardo Fuentes P., por sus valiosas sugerencias en la revisión y corrección del trabajo y por su permanente disposición de ayuda en las labores académicas.

Al académico Sr. Fernando Medel S., por sus oportunas sugerencias en la revisión y corrección del trabajo y su buena voluntad para colaborar y servir.

Al académico Sr. Aage Krarup H., mi especial reconocimiento cuya generosa y significativa entrega fue fundamental en mi formación académica. Por brindarme su amistad y por compartir largos momentos de interés común por la horticultura.

A la académica Sra. Oriana Betancourt G., por su constante apoyo, buena voluntad y valiosa colaboración durante la ejecución del trabajo.

A la Sra. Viviana Riquelme V., por su gentileza y siempre cordial atención brindada durante mis estudios de postgrado.

Finalmente, a todas las personas que me brindaron su apoyo y comprensión durante esta larga y agotadora jornada de mi vida.

ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Hipótesis.	3
1.2	Objetivos.	3
1.2.1	Objetivos generales.	3
1.2.2	Objetivos específicos.	3
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1	<i>B. cinerea</i> , hongo causante del moho gris en plantas.	5
2.1.1	Condiciones ambientales predisponentes a la infección por <i>B. cinerea</i> .	7
2.2	<i>B. cinerea</i> como agente fitopatógeno de la fresa.	9
2.2.1	Etiología de <i>B. cinerea</i> en la fresa.	9
2.2.2	Importancia económica de <i>B. cinerea</i> en el cultivo de fresa.	10
2.2.3	Métodos actuales de control de <i>B. cinerea</i> en fresa.	11
2.3	Control biológico de <i>B. cinerea</i> .	12
2.3.1	Conceptos y factores relacionados con el control biológico.	13
2.3.2	Naturaleza del antagonismo.	15
2.3.3	Antecedentes sobre el control biológico de <i>B. cinerea</i> .	16
2.3.4	Importancia del control biológico.	21
3	MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1	Material.	25
3.1.1	Lugar de realización del estudio.	25

3.1.2	Material de laboratorio.	25
3.1.3	Origen de las cepas utilizadas por <i>B. cinerea</i> .	25
3.1.4	Origen de las cepas antagonistas.	26
3.2	Métodos.	27
3.2.1	Aislamiento de <i>B. cinerea</i> a partir de tejido enfermo.	27
3.2.2	Aislamiento de antagonistas a partir de material de fresa.	27
3.2.3	Aislamiento de antagonistas a partir del suelo de cultivos de fresa.	29
3.2.4	Aislamiento de antagonistas a partir de frutos.	30
3.2.5	Aislamiento de antagonistas a partir de hojas.	31
3.3	Caracterización de las cepas de <i>B. cinerea</i> .	32
3.4	Identificación preliminar de las cepas de antagonistas.	33
3.5	Pruebas de antagonismo en <i>B. cinerea in vitro</i> .	34
3.6	Detección de la capacidad saprofítica de los antagonistas.	36
3.6.1	Evaluación.	38
3.7	Preparación de los inóculos para el ensayo del control biológico <i>B. cinerea</i> en frutos de fresa.	38
3.7.1	Estandarización de la concentración de <i>B. cinerea</i> .	38
3.7.1.1	Obtención de conidias maduras de <i>B. cinerea</i> .	38
3.7.1.2	Determinación de la concentración que causa colonización visible del moho gris.	39
3.7.1.3	Evaluación.	39
3.7.2	Estandarización de la concentración de metabolitos antagonistas.	40
3.7.2.1	Evaluación.	41
3.7	Estandarización de la concentración de <i>S. maltophilia</i> .	42

3.8	Ensayo de control biológico <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i> en frutos.	42
3.8.1	Evaluación.	43
3.9	Criterios de evaluación de la pudrición gris de los frutos.	44
3.10	Análisis estadístico.	45
4	RESULTADOS	46
4.1	Aislamiento de <i>B. cinerea</i> a partir de fruto.	45
4.2	Aislamientos de antagonistas de <i>B. cinerea</i> .	48
4.3	Caracterización de cepas de <i>B. cinerea</i>	50
4.4	Identificación de cepas antagonistas.	53
4.5	Pruebas de antagonismo a <i>B. cinerea in vitro</i> .	53
4.6	Detección de la capacidad de los antagonistas de causar pudrición en los frutos.	58
4.7	Preparación de los inóculos para el ensayo de control biológico de <i>B. cinerea</i> en frutos de fresa.	64
4.7.1	Estandarización de la concentración de <i>B. cinerea</i> .	64
4.7.2	Estandarización de la concentración del antagonista.	66
4.8	Ensayo de control biológico de <i>B. cinerea</i> bajo condiciones de laboratorio.	70
5	DISCUSIÓN	76
6	CONCLUSIONES	100
7	RESUMEN	102
8	SUMMARY	104
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
	ANEXOS	124

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Mapa de la IX Región de Chile, en el que se indican los lugares donde se tomaron muestras de fresas para aislar cepas de <i>B. cinerea</i> y seleccionar microorganismos antagonistas.	25
2	Procedimiento utilizado para el aislamiento de <i>B. cinerea</i> .	27
3	Aislamiento de antagonistas a partir de suelo de cultivo de fresas.	29
4	Aislamiento de antagonistas a partir de frutos.	30
5	Aislamientos antagonistas a partir de hojas.	31
6	Caracterización de las cepas de <i>B. cinerea</i> .	33
7	Pruebas de antagonismo a <i>B. cinerea in vitro</i> .	34
8	Esquema de la inhibición del micelio del hongo producida por microorganismos antagonistas.	35
9	Detección de la capacidad saprofítica de los antagonistas en frutos de fresas.	37
10	Esquema de la estandarización de la concentración de <i>B. cinerea</i> .	40
11	Esquema de la inhibición del micelio del hongo producida por microorganismos antagonistas.	41
12	Placas con agar papa dextrosa (PDA), ilustrando crecimiento miceliar de <i>B. cinerea</i> a cuatro días de incubación (derecha), y con desarrollo de estructuras de resistencia, esclerocios a los 20 días de incubación a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.	51
13	Cepario de <i>B. cinerea</i> en tubo de agar inclinado y en placa Petri con agar papa dextrosa, mostrando la formación de esclerocios, almacenados a 7°C .	53
14	Formación de micelio a partir de esclerocio de <i>B. cinerea</i> en agar papa dextrosa (PDA), después de tres días de incubación a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.	54

15	Trozo de agar papa dextrosa con micelio de <i>B. cinerea</i> en desarrollo.	54
16	Colonias bacterianas de <i>S. maltophilia</i> desarrolladas por el método de estrías en placas con medio de cultivo TSA.	55
17a	<i>B. cinerea</i> , en presencia de la bacteria <i>K. movilis</i> , con formación de halo de inhibición.	56
17b	<i>B. cinerea</i> en presencia de la bacteria antagonista <i>E. cloacae</i> , con formación de halo de inhibición.	56
17c	<i>B. cinerea</i> en presencia de la bacteria antagonista <i>S. maltophilia</i> , con formación de halo de inhibición.	56
18	Cámara húmeda con tres frutos por placa, inoculadas con cada dilución.	66
19	Relación entre las lecturas de densidades ópticas y la concentración (UFC/ml) de la cepa antagonista en función del tiempo (durante 24 h).	68
20	Histograma que muestra el efecto de los tratamientos, antagonista a una concentración mínima (42×10^6 UFC/ml), media (23×10^7 UFC/ml) y máxima (30×10^7 UFC), sobre el porcentaje de incidencia de la enfermedad (PIE), en frutos evaluados al cuarto día de incubación.	71
21a	Micelio de 48 horas del hongo <i>B. cinerea</i> en presencia de la bacteria <i>E. cloacae</i> (antagonismo a 40x de magnificación).	74
21b	Micelio de 96 horas del hongo <i>B. cinerea</i> en presencia de la bacteria <i>E. cloacae</i> (antagonismo a 100x de magnificación).	74
22a	Micelio de 48 horas del hongo <i>B. cinerea</i> sin presencia de la <i>E. cloacae</i> (antagonismo a 40x de magnificación).	74
22b	Micelio de 96 horas del hongo <i>B. cinerea</i> sin presencia de bacteria <i>E. cloacae</i> (antagonismo a 100x de magnificación).	74
23a	Micelio de 48 horas del hongo <i>B. cinerea</i> en presencia de la bacteria <i>K. movilis</i> (antagonismo a 100x de magnificación).	75
23b	Micelio de 96 horas del hongo <i>B. cinerea</i> en presencia de la bacteria <i>K. movilis</i> (antagonismo a 40x de magnificación).	75

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Cepas de <i>B. cinerea</i> aisladas de diferentes lugares de la IX Región (Chile), provenientes de tejido enfermo de frutos de fresa.	46
2	Número de cepas de <i>B. cinerea</i> aisladas por localidad muestreada de diferentes lugares de la IX Región (Chile), provenientes de tejido enfermo de frutos de fresa.	47
3	Origen, procedencia, fecha y número de antagonistas obtenidos a partir de los aislamientos bacterianos ensayados en pruebas de inhibición <i>in vitro</i> contra <i>B. cinerea</i> .	49
4	Material de origen, procedencia y fecha de aislamiento de las 12 cepas antagonistas, señalados en el cuadro 3.	50
5	Coloración del micelio, capacidad para formar cuerpos de resistencia (esclerocios), crecimiento a 20 ° C y esporulación de 3 cepas de <i>B. cinerea</i> .	52
6	Acción <i>in vitro</i> de las bacterias antagonistas sobre la inhibición de micelio, esporulación y formación de esclerocios en diferentes cepas de <i>B. cinerea</i> .	57
7	Detección de la capacidad de causar pudrición sobre frutos de fresa, de 5 bacterias antagonistas seleccionadas.	59
8	Lecturas de densidades ópticas para cinco diluciones, el número de esporas/cc, aplicadas a cada fruto y obtención del rango incidencia de <i>B. cinerea</i> .	65
9	Lecturas de densidades ópticas y número de unidades formadoras de colonia (UFC) por dilución, realizada con la cepa bacteriana antagonista, <i>S. maltophilia</i> en medio de cultivo TSA en diferentes tiempos (horas).	67

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo

1	Material e instrumental de laboratorio.	124
2	Confección de cámaras húmedas estériles.	125
3	Medios de cultivo.	126
4	Método para determinar concentración bacteriana por dilución en serie y posterior recuento en placa.	127
5	Detalle de los datos tomados para realizar la curva de crecimiento bacteriano.	128
6	Detalle de los datos tomados para realizar la evaluación del biocontrol en las tres concentraciones aplicadas del antagonista.	129
7	Resultados del ensayo de control biológico, aplicando una concentración de esporas del hongo conocida y tres concentraciones del antagonista sobre un total de 30 frutos, evaluados al cuarto día de incubación.	134
8	Agroclimatología IX Región	135
9	Detalle del análisis estadístico aplicado para los resultados arrojados después de haber realizado el bioensayo	136

1 INTRODUCCIÓN

En los últimos 20 años, el sector hortofrutícola de la agricultura chilena ha adquirido un notable desarrollo, producto de un incremento del área bajo cultivo provocado por la expansión de las exportaciones.

Sin embargo, este rápido crecimiento no se ha visto ajeno a problemas fitosanitarios que, en ocasiones causan graves pérdidas por disminución en la producción de frutas o por baja calidad del producto.

La fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) es uno de los frutales menores de mayor importancia en la zona central de Chile, y en la zona sur de nuestro país ha ido teniendo un crecimiento en aumento (Nissen y Hoffmann, 1998). El hongo causante de la pudrición gris, *Botrytis cinerea* Pers. ex Fries, es particularmente dañino por los problemas que causa en el período de cosecha y durante la comercialización (Montealegre, 1996).

Hasta la fecha, este patógeno es manejado principalmente por estrategias de control químico. Sin embargo, la utilización de funguicidas es cada vez menos recomendable y más restringida debido a los problemas de contaminación ambiental que de su aplicación se derivan y por la frecuente aparición de cepas del patógeno resistentes a los funguicidas utilizados (Benito *et al.* 2000).

En Chile el control químico de *B. cinerea* ha presentado limitaciones, por el surgimiento de nuevas razas resistentes a los funguicidas de uso común contra el hongo tales como benzimidazoles y dicarboximidas (Carreño y Alvarez, 1989; Flores *et al.* 1991, Morales *et al.* 1991). Esta situación, más la dificultad de registrar nuevos plaguicidas, han estimulado un creciente interés en el control biológico de *B. cinerea* (Nelson y Powelson, 1988; Redmond *et al.* 1987). Por otra parte, las restricciones cada vez mayores de los mercados internacionales en relación a los niveles permitidos de residuos de plaguicidas, constituye un importante aliciente en la búsqueda de nuevas alternativas frente al control químico.

Hay también otras razones no menos importantes a considerar y que en los países desarrollados están motivando seriamente la investigación para el

desarrollo de tecnologías alternativas a los pesticidas químicos. Entre tales, las consecuencias en la salud humana a raíz de las aplicaciones masivas de estos productos probablemente son las de mayor peso, sobre todo por los posibles riesgos de contraer cáncer (Archibald y Winter, 1989; Stephens, 1990). Un simple análisis de todas estas razones basta para justificar el inicio de estudios sobre control biológico de *B. cinerea* en nuestro país, no sólo pensando en aplicarlo en fresas, sino también por las proyecciones de control del patógeno en otros cultivos, como por ejemplo, la uva de mesa, que dentro de los frutales es el cultivo de mayor superficie en nuestro país y en el cual la *Botrytis* corresponde a la principal crítica de condición a nuestras uvas de exportación, ya sea en USA, Europa, Japón y otros mercados (Morales, 1990).

Las investigaciones en torno a la obtención y utilización de agentes microbianos para el control biológico de fitopatógenos datan desde hace varias décadas. Sin embargo, no han avanzado a la par con la búsqueda y desarrollo de los productos químicos, debido a que estos últimos se han mostrado más eficaces para lograr los objetivos de mayor rendimiento de los cultivos. El potencial de la microbiota en el control biológico es enorme, dada la gran diversidad de microorganismos y de formas en que éstos pueden ser aprovechados, natural y artificialmente (Baker, 1991). A pesar que existen pocos antecedentes de control biológico de *Botrytis* en fresas, se han realizado numerosas investigaciones en torno a la etiología y la epidemiología del hongo en este hospedero. Además, hay interesantes ejemplos de ensayos exitosos sobre control de *Botrytis* en manzanas, frejol y otros hospederos utilizando diversos antagonistas microbianos o sus productos. Estos antecedentes indudablemente constituyen una base para abordar la alternativa del control de la pudrición gris del fruto de fresa desde un enfoque biológico. La investigación en esta área tiene, además, la perspectiva de complementarse en programas de control integrado, donde los fungicidas puedan aplicarse en forma mucho más restringida para minimizar sus consecuencias indeseables (Ciampi y Silva, 1991).

En apoyo a estos planteamientos, habría que destacar lo señalado por Medel, (1990) en el sentido que el control de plagas y enfermedades a través de sistemas integrados que permite el consumo de frutas con residuos tóxicos

mínimos, necesita de mayor investigación básica y aplicada toda vez que desde el punto de vista de los rendimientos y del control de la calidad para la exportación, ello es fundamental.

Por último el control biológico forma parte de las nuevas tendencias en la biotecnología mundial. Este trabajo pretende aportar antecedentes sobre control de *Botrytis* en fresa mediante alternativas biológicas, como microorganismos propios de la microflora del cultivo.

1.1 Hipótesis

Entre la gran diversidad de microorganismos saprófitos o que no son patógenos de plantas se encuentran numerosos antagonistas de *B. cinerea*, con diferente capacidad para controlar al patógeno en el hospedero. Luego, es posible aislar agentes microbianos, que posean un potencial adecuado para controlar la pudrición gris, que *B. cinerea* provoca a los frutos de fresa

1.2 Objetivos

Considerando la problemática planteada y la información disponible sobre el tema, en el presente estudio se han propuesto los siguientes objetivos:

1.2.1 Objetivos generales:

- 1) Comprender el mecanismo de control biológico de *B. cinerea* mediante el aislamiento y manejo de agentes microbianos antagonistas.
- 2) Establecer estrategias de control biológico de la pudrición gris en frutos de fresa.

1.2.2 Objetivos específicos:

- 1) Identificar y seleccionar tanto cepas de *B. cinerea* como agentes microbianos antagonistas de *B. cinerea* cuya selección y manipulación experimental permita una mejor evaluación en el control de la pudrición gris.

- 2) Determinar, entre los antagonistas seleccionados, diferencias en sus capacidades de inhibir a *B. cinerea*.
- 3) Determinar la eficacia de las cepas antagonistas en el control de la pudrición gris en los frutos de fresa en ensayos bajo condiciones de laboratorio.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 *B. cinerea*, hongo causante del moho gris de las plantas.

Es la especie más común de las enfermedades en vegetales. Pertenece al dominio eucariota, reino mycota, phylum ascomycota, clase deuteromicete, familia moniliaceae, género *Botrytis* (Agrios, 1996; Ulloa y Hanlin, 2000; Mertely *et al.* 2002). El género *Botrytis* (del griego, Botreus: racimo de uvas) fue propuesto por primera vez en 1729 por Micheli y *B. cinerea* (del latín, cinere: ceniza) fue incluido inicialmente como especie dentro del género por Persoon en 1801 y descrito posteriormente por Fries en 1832, quedando definido finalmente como *Botrytis cinerea* Pers. ex Fries. (Jarvis, 1977; Coley-Smith *et al.* 1980).

Este hongo fue reconocido por varios autores hasta hace algún tiempo como una especie de formas colectivas en base a caracteres del conidióforo. Sin embargo, actualmente se considera que *B. cinerea* es el estado asexual (anamorfo) de *Sclerotinia (Botryotinia) fuckeliana*, el cual corresponde al estado sexual (telomorfo) y, por lo tanto, a la especie propiamente tal (Agrios, 1988; Esterio y Auger, 1997; Baroffio *et al.* 2003). Las otras formas con conidióforos del tipo *B. cinerea* se distinguen por otros caracteres y corresponden también a anamorfos de otras especies del género *Botryotinia*.

Los hongos fitopatógenos del género *Botrytis* y especialmente *B. cinerea* son patógenos importantes de frutos almacenados y transportados, hortalizas, cultivos ornamentales y en viveros (Buzeta, 1997). Jarvis, (1977) publicó una lista de 235 hospederos de *B. cinerea*, lo que da una idea de la extraordinaria polifagia de este hongo. Para Chile, Latorre, (1995) señala 24 especies hospederas de importancia económica.

B. cinerea es un hongo saprófito pero puede comportarse como parásito facultativo, particularmente de las Liliaceae y Asteraceae (Domsch *et al.* 1980), volviéndose en ocasiones muy agresivo si las condiciones son favorables.

El ciclo estacional de *B. cinerea* comienza con la germinación de esclerocios que han permanecido en restos de cultivos y plantas hospederas durante el período invernal. Los esclerocios producen micelio, el cual puede esporular originando conidias que son dispersadas por el viento o transportadas por

vectores. La infección del hospedero ocurre a partir de la germinación de las conidias que se han depositado sobre la superficie del mismo, desarrollándose inicialmente un micelio superficial saprofítico, pero que luego puede invadir tejidos susceptibles. Bajo condiciones frescas y húmedas el hongo produce una cubierta algodonosa característica, llamada moho gris, con abundante micelio y gran número de conidias, las cuales pueden causar infecciones ulteriores y propagar el patógeno hacia otras plantas. En algunas partes del hospedero, tales como los frutos, las infecciones pueden permanecer latentes hasta la madurez o senescencia del tejido vegetal, momento en el cual irrumpe el hongo desarrollando micelio y esporulando. Cuando el patógeno se encuentra con condiciones limitantes o desfavorables al crecimiento produce los esclerocios, que son estructuras de resistencia para sobrevivir durante períodos adversos. *B. cinerea* también puede pasar el invierno en forma de micelio en restos de plantas o rastrojos de cultivos, donde puede presentar un limitado crecimiento de tipo saprofítico, según la rigurosidad de las condiciones ambientales. Al producirse condiciones climáticas favorables, se reanuda el crecimiento del micelio o germinan los esclerocios, reiniciándose el ciclo (Jarvis, 1977; Coley-Smith *et al.* 1980; Agrios, 1996).

La forma en que ocurre la infección causada por *B. cinerea* aún no ha sido del todo aclarada a nivel fisiológico y bioquímico. Pero hay cada vez más evidencia que ciertas oxidasas juegan un papel fundamental en el proceso infectivo. Estas oxidasas, cuando hidrolizan determinados carbohidratos (glucosa, xilosa, galactosa), liberan peróxido de hidrógeno y radicales libres de oxígeno, que son altamente tóxicos y capaces de atacar o degradar barreras importantes del hospedero como la cutina (Edlich *et al.* 1989). Una vez abierta una brecha por estas barreras, al hongo le es mucho más fácil infectar al huésped descargando toda una batería de enzimas.

Sin embargo, los azúcares mencionados no están en cantidades suficientes sobre la superficie normal de la planta y se requiere entonces de heridas y otras aberturas lesivas o tejidos senescentes donde exista disponibilidad de tales nutrientes, liberados desde el interior de la planta. Las flores y otras partes de la planta, después que entran en senescencia, presentan tejidos debilitados y

membranas y paredes alterados que desprenden nutrientes y constituyen, por lo tanto, un sustrato ideal para la germinación, penetración y luego propagación del hongo hacia el tejido sano (Baker y Cook, 1974).

No obstante, *B. cinerea* también es capaz de infectar flores sanas provocando un atizonamiento y muerte floral, cuando persisten las condiciones climáticas favorables para el desarrollo del hongo, teniendo como consecuencia la ausencia de desarrollo de frutos (Chou y Preece, 1968; Eck y Childers, 1989; Esterio y Auger, 1997; Babadoost, 2000; Ellis, 2001; Mertely *et al.* 2002; Harmon, 2004). Además, es capaz de infectar otros órganos y tejidos nuevos o tiernos, dependiendo de las condiciones ambientales y del hospedero. Como se verá más adelante, se han demostrado que las infecciones asintomáticas o latentes del fruto de fresa realmente se inician apenas el botón floral se abre y el pistilo queda expuesto al aire. Al parecer, en estas infecciones de tejido sano es de fundamental importancia la exudación de ciertas sustancias nutritivas, principalmente azúcares y aminoácidos, cuya composición no es constante, sino que varía con el estado fenológico del órgano, la edad de la planta e incluso la variedad o cultivar de una misma especie de hospedero. En ciertos casos se ha demostrado que la presencia de polen también favorece la infección (Chou y Preece, 1968).

2.1.1 Condiciones ambientales predisponentes a la infección por *B. cinerea*.

La humedad es un factor necesario para que se produzca la infección, y en general, es más limitante que la temperatura, ya que el rango de humedad relativa del aire requerido para la germinación de las conidias está entre: 93-100% (Coley-Smith *et al.* 1980), en tanto que el rango de temperatura de germinación es más amplio, pudiendo variar entre 0 y 26°C (Jarvis, 1977; Person y Goheen, 1996; Agrios, 1997; Babadoost, 2000; Mertely, *et al.* 2002; Harmon, 2004). En cuanto al desarrollo micelial, la mayoría de los estudios han demostrado que *B. cinerea* crece dentro de un rango óptimo de 20-25°C, pero puede manifestar apreciable crecimiento incluso a 0°C. Sobre los 25°C la tasa de crecimiento disminuye notablemente, aunque puede crecer hasta los 35°C sobre

ciertos sustratos, como agar papa sucrosa (PSA) (Jarvis, 1977; Ciampi *et al.* 2000; Mertely *et al.* 2002; Harmon, 2004).

Cabe señalar que las temperaturas óptimas para ciertas fases de crecimiento de *Botrytis* como la germinación, el desarrollo del tubo germinativo, la formación del apresorio y el desarrollo del micelio, difieren considerablemente. Así, se ha encontrado que a 25°C la elongación de los tubos germinativos se ve favorecida notablemente, pero en perjuicio de la formación del apresorio, cuya temperatura óptima corresponde a 27-28°C. También, se ha estudiado que las temperaturas favorables al desarrollo de micelio disminuyen la producción de esclerocios y vice-versa (Jarvis, 1977).

En general, se puede decir que las epifitias causadas por *Botrytis* ocurren en lugares de climas lluviosos, frescos y húmedos; condiciones que favorecen la esporulación y la infección y que pueden, además, predisponer al hospedero (Coley-Smith *et al.* 1980). La temperatura y la humedad de la superficie del hospedero son factores fundamentales y actúan en conjunto en la infección inicial a partir de esporas; además, probablemente son determinantes en la transición de las infecciones latentes y lesiones no agresivas hacia lesiones agresivas (Coley-Smith *et al.* 1980). Así, se ha encontrado que el tiempo en que se mantiene mojada la superficie del órgano susceptible (por ej.: uvas, fresas) es importante en la incidencia de ataque por *Botrytis*, pero tal incidencia depende a la vez de la temperatura ambiente y de la humedad relativa atmosférica, siendo necesario un período mayor de humedad superficial cuando las temperaturas son bajas o menores al óptimo, o cuando son fluctuantes.

Estudios sobre el efecto del raleo de hojas alrededor de los racimos en vides han demostrado que el deshoje puede disminuir significativamente el ataque por *Botrytis* en los racimos de uva (Phillips *et al.*, 1990; Broome *et al.*, 1991). El espaciamiento entre las plantas y la orientación de las filas del cultivo respecto de los vientos prevalecientes también pueden ser de importancia considerable en la severidad de la enfermedad (Coley-Smith *et al.* 1980).

Aparte de los efectos del agua en las enfermedades causadas por *Botrytis*, hay un número de otros factores climáticos edáficos, ecológicos y culturales que tienen marcados efectos en el desarrollo de las epidemias. Varios de estos

factores determinan un daño físico a las plantas, ya sea por heridas u otras alteraciones del tejido vegetal, lo que facilita la infección. Tales factores incluyen daño por heladas, escaldado o calentamiento solar excesivo, viento, polutantes atmosféricos, insectos, nemátodos, bacterias y otros hongos, etc. (Coley-Smith *et al.* 1980).

2.2 *B. cinerea* como agente fitopatógeno de la fresa

En la fresa, *B. cinerea* se comporta como un serio patógeno habiéndose estudiado con bastante profundidad la etiología de este hongo en dicho hospedero. Los daños que provoca en fresa y otros cultivos son de consideración y han determinado la necesidad de controlar la *Botrytis* por diversos métodos. Estos aspectos se analizan a continuación.

2.2.1 Etiología de *B. cinerea* en la fresa.

Las enfermedades más importantes que afectan la fresa son causadas por hongos, algunas bacterias, virus y desórdenes fisiológicos. Posiblemente, la enfermedad más seria desde el punto de vista económico es la pudrición del fruto, causado por un complejo de hongos (*B. cinerea*, *Rhizopus oryzae*, *Alternaria* sp., varios *Penicillium* spp. y *Rhizoctonia* sp.) de los cuales, *B. cinerea* es el más importante en Chile (Cansino, 1973). A nivel mundial, este hongo es considerado el principal agente patógeno que afecta la producción y la comercialización de las fresas (McNicol *et al.* 1985), siendo un serio problema a nivel de campo y en postcosecha en países como Escocia (Williamson *et al.* 1987). Este hongo también puede atacar otros órganos y tejidos de la fresa, pero generalmente su incidencia es menor o no reviste tanta importancia como en el fruto.

B. cinerea es el agente causal del llamado “moho gris”, que se manifiesta como un micelio algodonoso, blanco al principio que luego se torna gris ceniciento o parduzco, cuando esporula. En el fruto, al principio se manifiesta como una pudrición acuosa, afectando sólo parte del aquenio se descolora y se hunde, posteriormente, surge el micelio blanco, que puede adquirir la coloración cenicienta típica. (Jennings, 1988; Pearson y Goheen, 1996).

La pudrición es importante especialmente cuando el clima es frío y húmedo durante la floración y la cosecha, época en que el hongo produce conidias, que son transportadas por el viento a la superficie de los frutos. La enfermedad empieza durante el período de floración cuando el hongo infecta los órganos florales que entran en senescencia, e incluso antes, apenas el botón floral abre. Mientras el fruto se desarrolla el hongo permanece inactivo y luego, sobre todo si el clima se presenta húmedo, comienza su crecimiento activo y sobre el fruto se desarrolla el típico micelio blanco (Jennings, 1988).

En los últimos años se ha ido aclarando mejor el desarrollo del moho gris en fresas, y las investigaciones más recientes han demostrado que habrían dos formas de desarrollo de la enfermedad. La primera es una infección latente o asintomática, con presencia del hongo dentro del fruto. Esta infección, llamada también *Botrytis* endógena, resulta de la germinación de las conidias que han caído sobre los estigmas florales y su posterior desarrollo miceliar en que las hifas penetran a través del estilo hasta el carpelo, en el ovario, donde se detiene el crecimiento del micelio, manteniéndose en estado de latencia hasta la madurez del fruto. Posteriormente, los cambios fisiológicos asociados al proceso de maduración provocarían la salida del estado de latencia del micelio endógeno hacia un estado más activo o agresivo, manifestándose como el típico moho gris sobre los frutos en el período de cosecha o postcosecha. La segunda forma de infección sería la externa, a partir de conidias que se han depositado sobre la superficie de los frutos maduros o por contacto de frutos sanos con frutos infectados y otras partes enfermas de la planta (McNicol *et al.* 1985; Williamson *et al.* 1987; Dashwood y Fox, 1988).

2.2.2 Importancia económica de *B. cinerea* en el cultivo de fresa.

El rápido desarrollo de las pudriciones del fruto en postcosecha acorta la vida del fruto y es uno de los principales factores que restringen las ventas de fruta fresca en mercados distantes a los centros de producción. Esta enfermedad es particularmente común cuando predominan condiciones de clima húmedo o lluvioso durante la floración o la maduración de los frutos (Jennings, 1988). En tales circunstancias el manejo descuidado puede dar lugar a importantes

pérdidas. Según Jennings, (1988), posiblemente un gran porcentaje de las infecciones ocurre por la invasión de la superficie de los frutos, especialmente a través de pequeñas heridas infringidas en el momento de la cosecha o posteriormente. El autor cita un caso ocurrido en Canadá, en que el 64 al 93% de los frutos manifestó pudrición entre las 40 y 60 horas después de la cosecha, en circunstancias que la incidencia en el campo fue menor al 1%. Sin embargo, el autor no especifica las condiciones en que fueron mantenidos los frutos en postcosecha, por lo que no hay que descartar que esta alta incidencia bien pudiera deberse a la *Botrytis* endógena, cuya importancia ha sido claramente puesta en evidencia en las investigaciones de los últimos años. En todo caso las medidas de control en postcosecha, como la temperatura y atmósfera controlada pueden aumentar significativamente la vida del fruto en condiciones de almacenaje (Moyls *et al.* 1996).

Actualmente la fresa ocupa el tercer lugar en superficie cultivada y en producción entre los arbustos frutales menores en nuestro país (Odepa, 2006). La tendencia de este cultivo es de crecimiento acelerado ya que la superficie plantada con fresas en la temporada 99/2000 en Chile fluctuaba entre 700 y 900 hectáreas, en la actualidad supera las 1700 hectáreas, superficie que se distribuye entre la IV y la X Región. Esta superficie no solo permite el abastecimiento del mercado nacional, sino que ha permitido que Chile incursione en la exportación de este producto en forma congelada. En la temporada 2003/2004 se exportaron aproximadamente 16.099 toneladas de fresas congeladas, principalmente al mercado norteamericano y asiático, aumentando inesperadamente los volúmenes exportables. Se estima que Chile no podrá entrar al mercado europeo y norteamericano con cantidades importantes, mientras no mejore significativamente la calidad del producto (Gambardella, 1996). De este modo, la importancia que ha adquirido el rubro ha determinado una gran necesidad de controlar adecuadamente la *Botrytis*.

2.2.3 Métodos actuales de control de *B. cinerea* en fresas

Actualmente en Chile, como en la mayoría de los países productores de frutillas el control de *Botrytis* se basa fundamentalmente en el uso de fungicidas

aplicados en mezclas, o bien, alternadamente. Los productos de mayor utilización en la actualidad son dicarboximidas como vinclozolín e iprodiona, y en menor medida, benomilo (benzimidazol) más captan (ftalimida) (Montealegre, 1996; Auger y Esterio, 1997). Auger *et al.* (1991) señala que la efectividad de un programa de control químico depende de la buena elección de los fungicidas utilizados y de la época en que se usan, de la presión de inóculo y las condiciones ambientales.

En el caso de aplicaciones de fungicidas, estas deben realizarse acorde con las condiciones climáticas y niveles de inóculo desde la floración y hasta la cosecha. Al respecto, se debe considerar la existencia en Chile y en el extranjero la presencia de cepas resistentes a fungicidas de los grupos de los Benzimidazoles y Dicarboximidas (Washington *et al.* 1992).

Otras medidas de control complementarias, de gran importancia, pero no siempre practicadas son las de tipo cultural: como por ejemplo, una adecuada plantación para evitar exceso de humedad por poco espaciamiento entre las plantas y follaje muy denso, lo que conlleva una mala ventilación y sombreado excesivo; limpieza de frutos enfermos (factor muy importante en la epifitiología de la enfermedad), la eliminación de malezas en los cultivos y uso de mulch; el cuidado en la fertilización nitrogenada, pues el exceso de nitrógeno se ha observado que aumenta en general la predisposición a las enfermedades que afectan la fresa (Montealegre, 1996). Como ejemplo, se ha demostrado que afecta el fruto en postcosecha, volviéndolo más susceptible a la pudrición por *Botrytis* para disminuir la incidencia de la enfermedad en postcosecha, se recomienda cosechar temprano en la mañana y almacenar los frutos rápidamente a 0°C (Montealegre, 1996). También se incluye entre estas medidas el tipo de riego, preferible por surco o por goteo, evitando el riego por aspersión.

2.3 Control biológico de *B. cinerea*

Durante décadas el uso de fungicidas pareció suficiente para controlar a *B. cinerea*, al igual que respecto de la mayoría de los hongos patógenos de plantas. Sin embargo, por las razones ya indicadas en el capítulo 1 y otras que se expondrán más adelante, los fungicidas y otros agroquímicos tendrán en el futuro

un uso cada vez más restringido, surgiendo el control biológico como una alternativa de creciente importancia. No obstante, la investigación sobre el uso de inoculantes microbianos en agricultura, sobre todo en cuanto al empleo de agentes antagonistas a fitopatógenos, está en plena fase de desarrollo y aún requiere de mayores estudios en la mayoría de los casos para lograr el objetivo de obtener productos garantizados, comparables en eficiencia a los químicos o que puedan cumplir con las necesidades de los usuarios.

Muchos ejemplos que se señalan en el capítulo 2.3.3 se refieren al control de *B. cinerea* en situaciones de enfermedades que no se presentan o carecen de importancia en Chile, como por ejemplo, el moho gris en manzanas. Pero estos estudios son útiles como marco de referencia y fuente de información para proyectar las posibilidades de aplicar el control biológico de *Botrytis* en Chile, adaptando o creando metodologías de acuerdo a la realidad chilena.

2.3.1 Conceptos y factores relacionados con el control biológico.

De acuerdo con Burges, (1981) el control biológico de patógenos vegetales puede definirse como “la manipulación de microorganismos antagonistas a fitopatógenos para reducir o prevenir las enfermedades de las plantas”.

Sin embargo, para ingeniar formas de aumentar los efectos de tales microorganismos, es necesario comprender la naturaleza de su microhabitat especializado (Blakeman y Fokkema, 1982). Tal microhabitat puede estar ubicado en la parte subterránea de la planta (rizósfera), o bien, en la parte aérea (filósfera o filoplano) que para las poblaciones microbianas epifitas corresponde al hábitat determinado por la superficie de las hojas o del follaje.

La actividad, ya sea de saprófitos o de patógenos sobre las hojas, es dependiente de las condiciones microclimáticas en la superficie vegetal, como también del ambiente químico. Varias son las características morfológicas sobre la superficie de las hojas que pueden tener una importante influencia. La irregular provisión de agua sobre las hojas resulta en un crecimiento intermitente de microorganismos, particularmente bacterias y hongos filamentosos, y determina problemas de supervivencia durante los períodos secos. La temperatura sobre las hojas puede fluctuar ampliamente dentro de un período de 24 horas. Esto

contrasta con el ambiente de la raíz, el cual es un hábitat mucho más estable para el desarrollo microbiano (Blakeman y Fokkema, 1982).

Windels y Lindow (1985) han señalado que debido a estos factores sería más difícil un control biológico exitoso en el filoplano. Sin embargo, a la fecha hay suficientes antecedentes de control biológico eficaz en la parte aérea de la planta como para incentivar la investigación en esta área.

Se ha observado que cualquier cambio en los factores ambientales tales como depositación de polen, mielecilla de áfidos y agroquímicos (como fungicidas) pueden afectar el balance entre saprófitos y patógenos, lo que ocasionalmente puede resultar en un aumento inesperado de una enfermedad (Blakeman, 1981). Esto revela la existencia de un control natural, y es indicativo de la posibilidad de hallar antagonistas adecuados, sobre todo allí donde un patógeno no se presenta, ha disminuido, o no puede desarrollarse, a pesar de la presencia de un hospedero susceptible (Baker y Cook, 1974).

Las introducciones de agentes de control biológico pueden ser de tipo inoculativo, cuando se busca que el antagonista se establezca ocupando un nicho permanente en el ecosistema; o bien de tipo inundativo, cuando se persigue principalmente que el antagonista actúe rápidamente sobre el organismo patógeno, sin la necesidad de que el agente permanezca después de haberlo eliminado. Lo importante es que el organismo antagonista se mantenga en un nivel poblacional suficiente como para controlar en forma eficaz al fitopatógeno durante el período de susceptibilidad del hospedero. Esto se puede conseguir a veces con formulaciones apropiadas del inoculante que contiene el antagonista. Hay varios antecedentes sugerentes en este sentido, que demuestran la importancia de manejar ciertos factores que pueden ser determinantes en la supervivencia de un antagonista, para aumentar las posibilidades de éxito de un ensayo de control biológico.

Así, por ejemplo, Leben y Daft (1965) demostraron que con suspensiones celulares de una bacteria epífita pudieron reducir la antracnosis del pepino, el tizón temprano del tomate y el tizón foliar nortino del maíz, en pruebas de tratamientos de protección. Estos autores encontraron además que las

suspensiones celulares conteniendo nutrientes eran más efectivas en reducir la enfermedad que las suspensiones en agua sola.

Posteriormente, Leben *et al.* (1965) ensayaron distintos tratamientos con un cultivo de una bacteria epífita antagonista de *Colletotrichum lagenarium*, hallando que la adición de harina de soya al cultivo bacteriano reducía en gran medida la pérdida de células del antagonista sobre las hojas de pepino en invernadero. Sin la harina de soya, que actuaba como agente humectante, ocurría un 99% de pérdida de células por desecación, después de un día de la aplicación.

Otro ejemplo es el trabajo de Spurr (1981a), quien estudiando formulaciones y métodos de aplicación de *Bacillus thuringiensis* para controlar la mancha foliar del nogal halló que los ingredientes de formulación tales como azúcares y detergentes pueden mejorar notablemente la eficacia de los antagonistas bacterianos, ya que actúan como adherentes, humectantes, dispersantes y otras formas de mejorar el contacto, distribución y supervivencia del antagonista sobre el hospedero (Spurr, 1981b).

2.3.2 Naturaleza del antagonismo.

Antes de hacer referencia a los antecedentes de control biológico de *B. cinerea* es conveniente hacer distinción de los conceptos de antagonismo involucrados en el control biológico de patógenos vegetales en general. De acuerdo con Baker y Cook (1974) el antagonismo incluiría tres tipos de actividad.

1. Antibiosis y lisis. Antibiosis es la inhibición de un organismo por el producto metabólico de otro. Lisis es un término general para la destrucción, desintegración, disolución o descomposición de materiales biológicos. La endolisis puede ser causada por antibiosis y debe distinguirse de la exolisis que es considerada una forma de parasitismo.
2. Competencia. La competencia corresponde al “esfuerzo de dos o más organismos para obtener la cantidad que cada uno requiere del suministro de un sustrato, en la forma y condiciones específicas en que tal sustrato es presentado, cuando dicho suministro no es suficiente para ambos”. Baker y Cool (1974) señalan que en esencia, la competencia es por nutrientes y posiblemente ciertos factores de crecimiento, e incluso por oxígeno o por

espacio, pero no por potencial hídrico, ni temperatura o pH. Actualmente existe un gran interés por bacterias del género *Pseudomonas*, que producen metabolitos como los sideróforos, en condiciones limitantes de hierro, que actúa como agentes quelantes específicos del ión férrico, teniendo un gran potencial en el control biológico de hongos y bacterias fitopatógenas (Whipps, 2001; Diaz *et al.* 2002).

3. Parasitismo y predación (también denominados en conjunto como explotación, por otros autores). El parasitismo incluye la digestión parcial de paredes celulares de hongos por un organismo externo (exolisis) que puede ser otro hongo o bacterias. El género *Bacillus* es estudiado por la presencia de glucanasas, B 1,3-glucasa; B 1,4; B 1,6 glucanasa y proteasas en la aplicación de Actinomycetes (Whipps, 2001; Montealegre *et al.* 2003). También está la endolisis provocada por virus (fagos) en bacterias. La predación implica una acción alimenticia de tipo mecánica, como por ejemplo, ciertos nemátodos fungívoros que introducen sus estiletes dentro de las hifas, dirigiendo sus contenidos con su saliva y luego succionando a través del estilete.

Backer y Cook (1974) destacan que los límites entre estos tres tipos de antagonismo son bastante confusos. Así, las bacterias pueden activar la muerte del micelio en una serie de rangos desde la muerte rápida, que puede involucrar competencia por el sustrato, pasando a través de endolisis de contenidos celulares por antibiosis, hasta llegar a parasitismo y exolisis, en la cual las paredes celulares son digeridas. Sin embargo, muchos trabajos de control de *Botrytis in vitro* e *in vivo* con diversos microorganismos, demuestran que la inhibición del patógeno se debe a una forma bien definida de antagonismo, como por ejemplo, la parasitación de esclerocios de *B. cinerea* por ciertos hongos, la inhibición de germinación de conidias de *Botrytis* causada por ciertas bacterias y levaduras que sustraen nutrientes y otros casos que se verán más adelante.

2.3.3 Antecedentes sobre el control biológico de *B. cinerea*

Asthana (1936) citado por Jarvis (1977) podría considerarse el primero en investigar la pudrición gris desde el contexto del control biológico. Sin embargo,

estudios más acabados recién comienzan en 1951 con Newhook (1951a, 1951b) y Wood (1951), en forma independiente. Newhook (1951a, 1951b) demostró que era posible controlar la patogénesis desarrollada por *B. cinerea* en hojas de lechuga con diversas bacterias y hongos antagonistas aislados de tejido muerto de lechuga. Este control *in vivo*, lo consiguió aplicando previamente los antagonistas sobre lesiones que simulaban daño por heladas en las hojas, hallando que las temperaturas altas (15-25 °C) hacían más efectivo el control que a la temperatura normal del cultivo. Por su parte Wood (1951) obtuvo algún control de *B. cinerea* en plantas jóvenes de lechuga mantenidas en macetas bajo vidrio, asperjándolas con diversos antagonistas antes de la inoculación con *Botrytis*. Sin embargo, no logró los mismos resultados en ensayos de campo. Wood (1951) sugirió que el establecimiento de los antagonistas en el campo es mucho más difícil debido a factores ambientales (dsecación, remoción por lluvia, temperaturas externas más bajas, etc.). Con todo, el autor sugiere que el antagonismo saprofítico, podría ser responsable de algún grado de control natural de *B. cinerea* en el campo.

Numerosos estudios con otros hospederos de *B. cinerea* parecieran apoyar la idea de antagonismo saprofítico. Así, Fokkema y Lorbeer (1974) demostraron que *Aureobasidium pullulans* inhibía el crecimiento de *Botrytis* sobre hojas de cebolla, y que tal antagonismo posiblemente se debía a antibiosis. Por su parte Bhatt y Vaughan (1963) encontraron que hongos saprófitos aislados de fresa, tales como *Penicillium* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium herbarum* y *Dendrophoma obscurans* eran antagonistas a *B. cinerea* en cultivo. Bhatt (1962) logró demorar e incluso prevenir la infección de frutos si en el último estado de floración las plantas eran inoculadas con suspensiones de esporas de varios de estos hongos. Vaughan (1960) había demostrado anteriormente que la aplicación de fungicidas a fresas aumentaba la incidencia de *B. cinerea*, al verse afectada la microflora de los receptáculos que contenía antagonistas. Esto es otra prueba del control natural de *B. cinerea* en el campo, tal como se ha demostrado también al esterilizar el suelo, lo que a veces provoca ataques severos de *Botrytis* a los cultivos (Jarvis, 1977).

Interesantes investigaciones se han efectuado con hongos del género *Trichoderma*. Tronsmo y Dennis (1977) asperjando flores de fresas con solución de esporas de diferentes especies de *Trichoderma* redujeron la incidencia de *B. cinerea* en pre y post cosecha casi tanto como con diclofluanida. Las aspersiones, aplicadas cada 14 días, cubrieron desde floración temprana hasta dos semanas después de la primera cosecha. *T. harzianum* y *T. viride* resultaron ser los antagonistas más eficientes, aunque la mayoría ejercía algún control. Sin embargo, a bajas temperaturas perdían su eficiencia, pues *Botrytis* puede crecer en el campo hasta con 3°C y sólo dos especies de *Trichoderma* podían crecer bien a 2°C, el resto necesitaban temperaturas sobre 5°C.

La limitación causada por la temperatura, también se ha dado respecto de *T. pseudokoningii*, el cual ha resultado muy buen antagonista de *B. cinerea* en manzanas, actuando tanto por hiperparasitismo como produciendo antibióticos. Sin embargo, su temperatura mínima de crecimiento es 9°C, lo que limita su utilidad práctica hasta que se logre obtener cepas mejor adaptadas a temperaturas menores (Tronsmo y Raa, citados por Blakeman, 1981).

Dubos y sus colaboradores, citados por Blakeman (1981), dieron a conocer en 1978 los resultados de sus ensayos para controlar el moho gris en viñas del área de Bordeaux, Francia, en donde aplicaron aspersiones de *T. viride* a una concentración de 108 esporas/ml, logrando una protección comparable a la obtenida con diclofluanida. Los autores enfatizan la importancia de tratamientos antes y después de la floración de los vides, lo que permite a *T. viride* colonizar la base nutritiva proporcionada por las partes florales senescentes. El establecimiento saprofítico inicial de *Botrytis* es, de este modo, limitado y la aparición de los primeros signos de moho gris es retrasado por cerca de un mes.

En esta línea de control de la *Botrytis* en vides, han continuado otros estudios similares con *Trichoderma* spp., pero además combinando los antagonistas con fungicidas, demostrándose que estos organismos pueden ser tan efectivos ya sea aplicados solos o en combinación con productos químicos (Shimshoni *et al.* 1988); también la efectividad de diferentes cepas y especies de *Trichoderma* en relación a factores como temperatura, humedad y nutrientes

(Gullino *et al.* 1989) como también ensayos contra razas de *B. cinerea* resistentes a fungicidas (Jailloux y Foidefond, 1987).

En otros cultivos también se han ensayado *Trichoderma* contra el patógeno. Es así que Tronsmo e Ystaas, (1980) lograron controlar biológicamente a *B. cinerea* en manzanas, a nivel de campo, utilizando *T. harzianum*, gracias al cual obtuvieron una incidencia del “eye rot” de sólo un 6,3%. Este resultado fue casi tan bueno como el obtenido con la mezcla de diclofluanida y benomilo (4,1 % de incidencia).

En frejoles (*Phaseolus vulgaris* L.), utilizando cepas de *Trichoderma* spp. aisladas del follaje, se ha logrado reducir la pudrición de vainas hasta en un 94-97%, comparable a la obtenida con vinclozolin (Nelson y Powelson, 1988). En este caso, el posible mecanismo de control biológico estaría en la producción de ciertos inhibidores volátiles por parte de *Trichoderma* spp.

En manzanas, no solo con hongos del género *Trichoderma* se han obtenido buenos resultados en controlar *Botrytis*. Así, Janisiewicz (1985) hace referencia a bacterias y levaduras aisladas de los frutos, de las hojas y del suelo del huerto de manzanas, con las que se obtuvo un control total *in vivo*, por medio de aplicaciones de esporas en solución acuosa a una concentración aproximada de 5×10^7 ufc/ml.

Posteriormente, Janisiewicz y Roithmann (1988) determinaron que el compuesto antifúngico de un antagonista aislado de hojas de manzana, *Pseudomonas cepacia*, correspondía al antibiótico pirrolnitrina, el que aplicado a una concentración mínima de 10 mg/l otorgó protección total contra *B. cinerea* en peras y manzanas.

Un grupo importante de microorganismos como fuente de antagonistas a fitopatógenos, sobre todo por la gran variedad de antibióticos que producen son los actinomicetes, entre los cuales posiblemente hayan buenos candidatos para el control de *B. cinerea*. Aparte de los estudios efectuados por Newhook (1951b) con actinomicetes para controlar la *Botrytis* en lechuga, últimamente se ha confirmado la posibilidad de utilizar estas bacterias contra *B. cinerea* en dicho hospedero (Tahvonen y Lahdenpera, 1988).

Antecedentes de control de *B. cinerea* por antagonismo competitivo quizá no sean tan numerosos como en caso de la antibiosis. Sin embargo, son muy sugerentes como puede desprenderse de los estudios de inhibición de la germinación de conidias por sustracción de nutrientes, principalmente por ciertas bacterias y levaduras (Sztejnberg y Blakeman, 1973; Mansfield y Deverall, 1974; Yoder y Whalen, 1975; Clark y Lorbeer, 1977a, 1977b; Blakeman y Fraser (1971) citados por Coley-Smith *et al.* 1980; Wildman y Parkinson, 1981).

Trabajos más recientes han resultado muy prometedores desde el punto de vista práctico. Así, Redmond *et al.* (1987) lograron reducir la incidencia de *B. cinerea* en rosas (donde produce el llamado tizón de la flor) utilizando varios antagonistas aislados de los pétalos y botones florales. Uno de estos antagonistas, *Exophiala jeanselmei*, redujo la incidencia de *Botrytis* en aproximadamente un 63%, comparado con una reducción del 74% lograda con iprodiona. Importante también es el trabajo de Janisiewicz (1988), quien encontró un fuerte antagonismo contra *B. cinerea* en pruebas de frutos de laboratorio. Aplicando una mezcla de *Acremonium breve* y *Pseudomonas sp.* inhibió lesiones producidas por *Botrytis* y *Penicillium* en manzanas. Aunque el modo de acción de los antagonistas no fue explicado en su trabajo, posiblemente se trataba de un fenómeno de competencia, dado los resultados de ciertas pruebas.

Resultados obtenidos en frambuesa demuestran que dos cepas de antagonistas estudiadas (A47 y A38, dos especies de *Bacillus* diferentes) pueden controlar *B. cinerea* retardando significativamente la aparición de pudriciones de post-cosecha en los frutos. El mecanismo de acción de los antagonistas hacia el patógeno en tejidos del hospedero no está claro, salvo que actúan inhibiendo por un prolongado período el desarrollo de la botrytis endógena o asintomática. Las pruebas *in vitro* demostraron que el principio de antagonismo ejercido por las dos cepas es una antibiosis mediada por metabolitos antifúngicos, que en el caso de la cepa A47 es (son) termoestable (s). Este estudio constituye el primer antecedente de control biológico de *B. cinerea* en el frambueso, utilizando agentes bacterianos nativos, y demuestra la factibilidad de aprovechar organismos de la propia microflora epífita del hospedero para inhibir al patógeno

in vivo. Asimismo, se concluye que las cepas A47 y A38 tienen un interesante potencial para controlar a *B. cinerea* en el frambueso y posiblemente en otros cultivos hospederos (Silva, 1992).

En cuanto a antecedentes de parasitación, si bien también son escasos, hay estudios muy promisorios por los distintos estados en que *B. cinerea* se muestra susceptible o vulnerable a ser atacado ya sea por parásitos de conidias, como ciertas amebas (Coley-Smith *et al.* 1980); por hongos parásitos de esclerocios como *Teratosperma oligocladum* (Ayers y Admas, 1981); o parásitos de micelio como ciertas subespecies de *Fusarium oxysporum* (Vajna, 1985).

Finalmente, ejemplos de predación sobre *B. cinerea* tal vez sean los más raros de encontrar, sin embargo, Jarvis (1977) hace referencia a la destrucción de esclerocios en material de vid almacenado para injertos, por nemátodos, ácaros y ciertas larvas de insectos. En Chile se han realizado numerosas investigaciones sobre agentes biológicos para el control de *B. cinerea* y otros agentes fitopatógenos, dentro de estos microorganismos evaluados, en diversos hospederos se encuentran el *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* (cepa A47), *Ulocladium atrum* (7 cepas nativas del norte grande, norte chico y zona central de Chile). Actualmente los organismos de control biológico disponibles comercialmente en Chile para controlar *B. cinerea*, en diversos hospederos, están *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma harzianum* + *Trichoderma longibrachiatum* (COO-FIA, 2005).

2.3.4 Importancia del control biológico.

Las razones que explican e impulsan el estudio de metodologías relacionadas con la utilización de organismos biológicos para controlar patógenos vegetales son diversas, la mayor parte de las cuales son aplicables a escala mundial, sin embargo, también hay motivos de carácter mas racional o propios de países en vías de desarrollo como el nuestro.

La búsqueda de alternativas a la extensiva aplicación de los plaguicidas químicos obedece en primer lugar al perjuicio ambiental por la contaminación y la alteración al equilibrio ecológico, resultantes del abuso de estos productos en vista de su mayor efectividad en comparación con otros métodos utilizados hasta

la fecha para el control fitosanitario, sin dejar de reconocer los obvios beneficios que han aportado en el aumento de la productividad agrícola mundial (Spurrier, 1990; Stephens, 1990).

Los ejemplos más claros de desequilibrio en perjuicio de los propios objetivos de la utilización de plaguicidas tradicionales son ya bastante conocidos. Por una parte, está la generación de poblaciones y razas de patógenos con resistencia a pesticidas debido a la presión de selección causada por aplicaciones sostenidas (Dekker, 1976), y por otra parte, el surgimiento de las llamadas enfermedades iatrogénicas; es decir, enfermedades de cultivos que han surgido ó han aumentado en severidad por el abuso de algún pesticida específico (Griffiths, 1981).

Otros problemas han derivado de la dificultad de colocar y mantener en el mercado pesticidas de amplio espectro, que justifiquen el prolongado tiempo de desarrollo y los altos costos de producción. En particular para los fungicidas, los hechos están confirmando las proyecciones más pesimistas lanzadas varios años atrás en relación a la vida de estos productos en el mercado (Stephens, 1990). Este autor señala también que la rentabilidad de la agricultura como actividad integral es otro de los factores que explicarían el renovado interés en la búsqueda de estrategias alternativas, pues los márgenes de beneficio ya no son tan grandes como lo eran hace 10 años atrás en EE.UU., para la mayoría de los cultivos hortícolas. Los agricultores han descubierto que el uso de métodos más integrados para el control de plagas, puede reducir los costos y aumentar los márgenes de ganancia, de mejor manera que la simple rutina de aspersiones de plaguicidas cada 7 días.

Las consecuencias en la salud humana sin duda constituyen o deberían ser la razón de mayor peso para frenar o disminuir significativamente la dependencia de estos productos químicos. En EE.UU. el acumulo de información sobre el aumento de lugares con residuos o desperdicios tóxicos, el incremento en las tasas de cáncer en la vecindad de lugares contaminados y la relación entre pesticidas y el cáncer ha generado un consenso del público para presionar por una nueva legislación más restrictiva concerniente a residuos químicos (Stephens, 1990). Cabe destacar que los criterios de evaluación de riesgo de

cáncer por residuos de plaguicidas químicos en los alimentos están apareciendo cuestionados, ya que las actuales estimaciones de riesgo pueden variar en varios órdenes de magnitud, dependiendo de los supuestos utilizados en los cálculos (Archibald y Winter, 1989). El establecimiento de criterios en base a datos más rigurosos y precisos seguramente conducirá a mayores exigencias en los niveles de residuos de algunos plaguicidas en los productos alimenticios.

En cuanto a razones de tipo nacionales cabe destacar que los estudios sobre control biológico y otros relacionados con la biotecnología son cada vez más necesarios en países subdesarrollados o en vías de desarrollo, toda vez que, de acuerdo con Monckeberg (1988) la menor complejidad y costos razonables de la biotecnología en comparación con la industria pesada, la petroquímica u otras tecnologías mucho más avanzadas en países desarrollados, hacen de la bioingeniería y la biotecnología más factibles de implementarse en países como el nuestro. Además, hay que considerar que en EE.UU. el mercado de productos biotecnológicos agrícolas proyectado para el año 2002 es de alrededor de 2600 millones de dólares, lo que implicaría un aumento de casi 18 veces el mercado existente en 1990 en dicho país (Duery, 1991). Otros pronósticos señalan que el futuro mercado mundial de productos biotecnológicos podría alcanzar los 15.000 millones de dólares, el 12% del cual correspondería a productos microbianos (Cook, 1991).

Estos datos advierten de la enorme importancia que está adquiriendo la biotecnología a nivel mundial y nos dan a entender que debemos preocuparnos por multiplicar esfuerzos en desarrollar dicha área, para acortar cada vez más la brecha que nos separara de las naciones más industrializadas, en un campo en el que sí podemos competir y mantener ventajas comparativas (Monckeberg, 1988). En el caso específico del desarrollo de pesticidas biológicos y otras metodologías relacionadas con el uso de microorganismos en la agricultura, está surgiendo la necesidad de estudiar en mayor extensión y profundidad la ecología microbiana, área en que existe un bajo nivel de conocimientos (Blakeman, 1981; Windels y Lindow, 1985; Campbell y MacDonald, 1989). Es relativamente simple aislar, por ejemplo, antagonistas a un patógeno determinado, pero generalmente el conocimiento es escaso o casi no se sabe nada de las características requeridas

por un organismo para integrarse al ecosistema, sobrevivir y ser activo de una manera deseada, cuando es introducido a ambientes complejos, como la rizósfera o el filoplano (Campbell y MacDonald, 1989). La diversidad de la microbiota y sus interacciones como fuente de antagonistas y de mecanismos para el control biológico de fitopatógenos ha sido especialmente destacada por Baker (1991) e ilustra claramente el enorme potencial disponible y utilizable aplicando diversas metodologías, incluyendo la ingeniería genética. Sin embargo, respecto de esto último, conviene tener presente lo señalado por Campbell y MacDonald (1989), en el sentido de que toda la sofisticada biología molecular en el mundo sería incapaz de ayudarnos si es que no aumentamos los conocimientos en el campo de la ecología microbiana, en sus fundamentos mas que en sus aplicaciones. En este contexto, el estudio de la propia microflora nativa representa indudablemente una ventaja comparativa para el desarrollo de técnicas y productos biotecnológicos nacionales capaces de competir con tecnologías y productos extranjeros.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material

En este punto se incluyen los lugares donde se realizó el trabajo de investigación, el material de laboratorio que se utilizó para el estudio y aislamiento de las cepas de *B. cinerea* y microorganismos antagonistas.

3.1.1 Lugar de realización del estudio

Las experiencias *in vitro* se realizaron en el Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Agronomía de la Universidad Católica de Temuco.

3.1.2 Material de laboratorio

En este trabajo se usaron los materiales comúnmente requeridos para el aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos (Anexo 1), utilizándose como medio de cultivo general agar papa dextrosa (PDA) (Anexo 3).

3.1.3 Origen de las cepas utilizadas de *B. cinerea*

Con la finalidad de aislar y seleccionar las cepas de antagonistas, se consideró necesario disponer de una colección de cepas de *B. cinerea*. Tales cepas se obtuvieron a partir de los mismos frutos de fresa colectados dentro de varias localidades de la IX Región de Chile (Figura 1). Se seleccionaron localidades con diferentes condiciones ambientales, de modo de contar con un cepario de *B. cinerea* que tenga cierta amplitud de características adaptativas y de esta manera aumentar la variabilidad genética.

3.1.4 Origen de las cepas de antagonistas

La selección de antagonistas se efectuó obteniendo cepas de microorganismos de diversas partes del cultivo de fresa: filoplano, rizoplano, rizosfera y frutos. Puesto que el órgano más susceptible al ataque de *B. cinerea* es el fruto (Cansino, 1973), se colectaron frutos sanos en los mismos lugares donde se efectuó el muestreo para obtener cepas de *B. cinerea*. El procedimiento para aislar los microorganismos antagonistas y las cepas de *B. cinerea* se efectuó

en base a las metodologías descritas por Cercos (1957); French y Hebert (1980) y Agrios (1996).

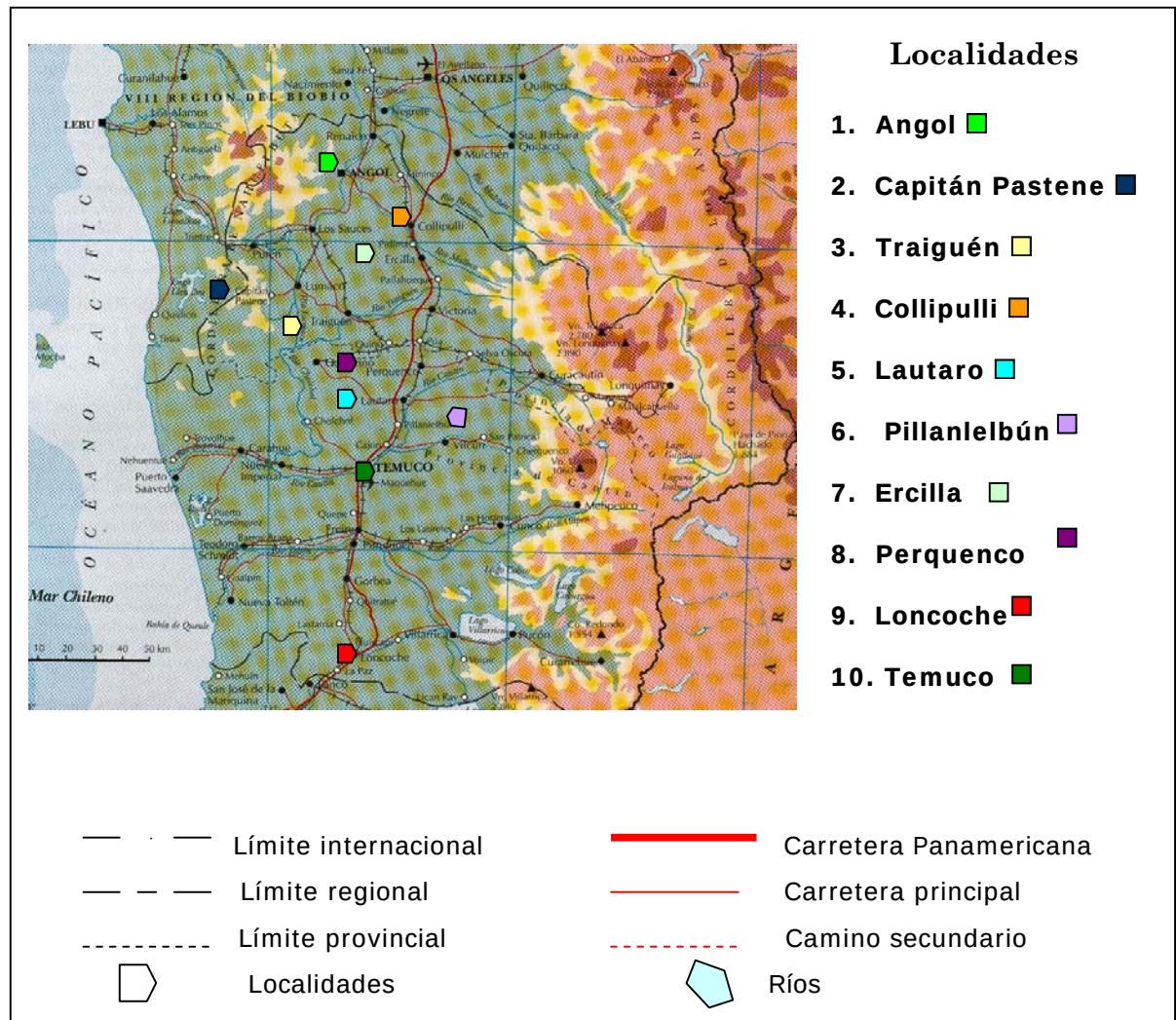


Figura 1. Mapa de la IX Región de Chile en el que se indican los lugares donde se tomaron muestras de fresa (cv. Chandler) para aislar cepas de *B. cinerea* y seleccionar microorganismos antagonistas.

3.2 Métodos

Durante la investigación se utilizaron métodos de aislamientos, selección de antagonistas, pruebas de detección de la capacidad saprofítica de los antagonistas, detección de capacidad inhibitoria de los antagonistas *in vitro* con el fin de determinar tanto las concentraciones de *B. cinerea*, capaz de causar pudrición observable, como de antagonista capaz de controlar el desarrollo del moho gris.

3.2.1 Aislamiento de *B. cinerea* a partir de tejido enfermo

Para aislar el patógeno se tomaron varias muestras de frutos de fresa, aparentemente sanos, de diferentes plantas durante el período de producción y se guardaron en bolsas de papel estéril para su traslado al laboratorio. Estos frutos se incubaron en cámaras húmedas estériles (Anexo 2). El hongo se aisló a partir del signo típico de *Botrytis*, que corresponde a una esporulación grisácea, previa observación al microscopio óptico de conidióforos típicos y conidias, desde los cuales se sembraron placas Petri con agar papa dextrosa, PDA (Anexo 3).

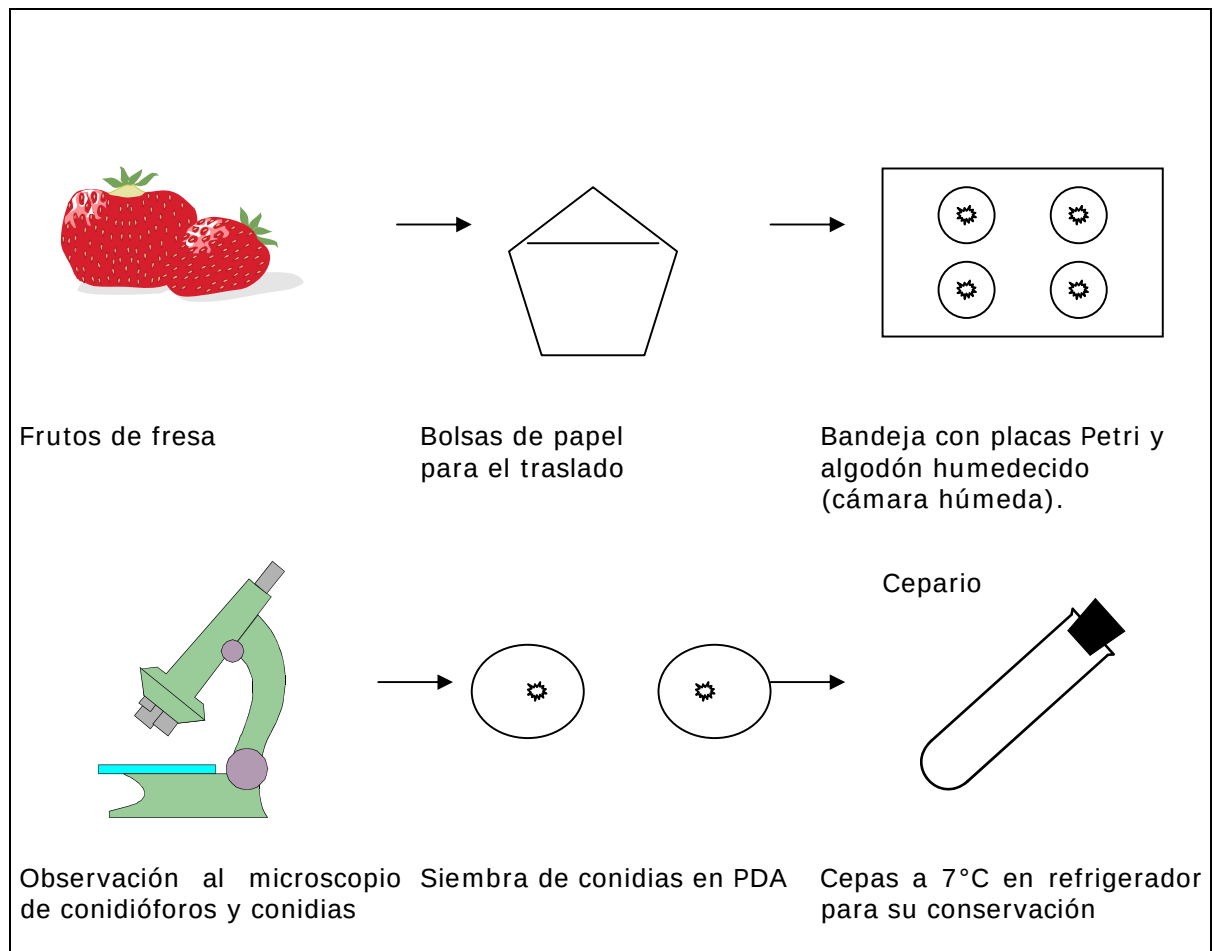


Figura 2. Procedimiento utilizado para el aislamiento de *B. cinerea*.

En la Figura 2 los aislamientos de *B. cinerea* se mantuvieron como cepario en tubos de ensayo con PDA inclinado y almacenados a 7 °C aproximadamente.

3.2.2 Aislamiento de antagonistas a partir de material de fresa

Considerando los diferentes hábitats que ofrece el hospedero a los distintos organismos que constituyen la microflora epífita, se efectuaron aislamientos a partir de varias fuentes: superficie de hojas (filoplano), superficie radical (rizopalno), frutos de fresa, y suelo que se encuentra próximo a una raíz viva (rizósfera) (Agrios, 1996; Ciampi, 2002).

3.2.3 Aislamiento de antagonistas a partir del suelo de cultivos de fresa.

En bolsas estériles se tomaron más o menos unos 50 a 100 g de muestra del lugar. De ésta se tomó un gramo y se colocó en 10 ml de agua destilada más una gota de detergente comercial, luego 0,1 g fue sembrado en placa con rastrillo. Las colonias aisladas se ubicaron en placas Petri en torno a un disco con *B. cinerea* proveniente de un cultivo nuevo, colocado al centro de la placa Petri. Las placas se dejaron en cámara de incubación a 20 °C, durante 2 ó 4 días. De los extremos cortados de los trozos surgieron colonias de hongos y bacterias que crecieron extendiéndose sobre el agar hasta encontrarse con el margen del micelio de *Botrytis*. Figura 3.

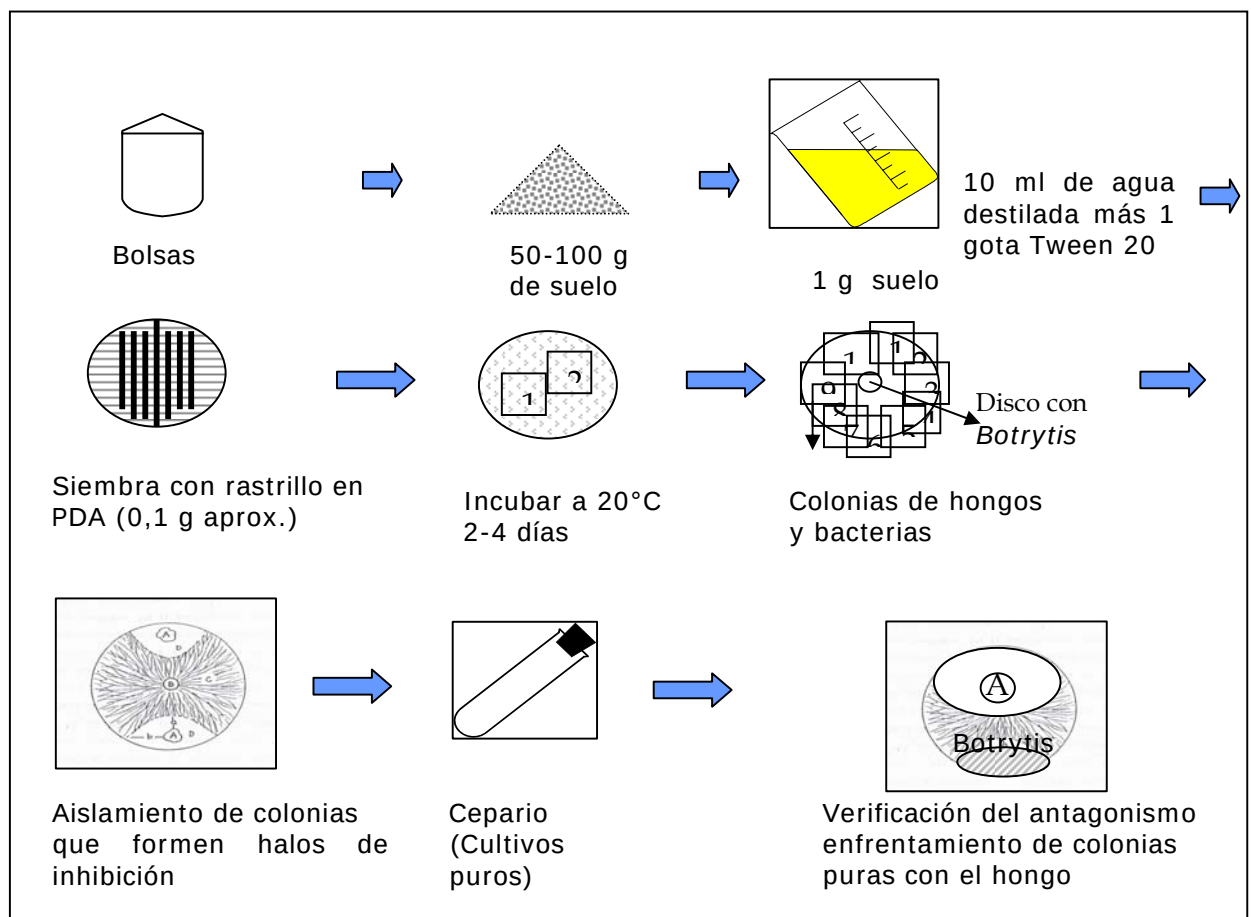


FIGURA 3. Aislamiento de antagonistas a partir del suelo de cultivo de fresa.

Aquellas colonias que formaron un halo de inhibición a su alrededor, donde no creció el micelio de *Botrytis*, fueron aisladas sembrándose en estrías en placas

con medio PDA para obtener cultivos puros. Posteriormente se verificó para cada cepa su antagonismo a *Botrytis* en placas con PDA enfrentando colonias puras con el hongo.

La metodología descrita anteriormente para el aislamiento de antagonistas a partir de suelos, es la misma que se utilizó para realizar los aislamientos a partir de superficie radical (rizoplaneo).

3.2.4 Aislamiento de antagonistas a partir de frutos.

De cada muestra, constituida por frutos con sus receptáculos y sépalos, cosechados directamente de la planta, se tomaron 7g los que se agregaron a 10 ml de agua destilada. Después de 15 a 20 minutos de agitación se tomaron 100 μ l diluyéndose en 1 ml de agua destilada. De cada dilución se tomaron 20 y 40 μ l y se depositaron en placas con PDA. Luego, se pasó rastrillo estéril sobre las gotas para distribuir el inóculo, y se sembraron discos con *B. cinerea* en el centro de la placa. Figura 4.

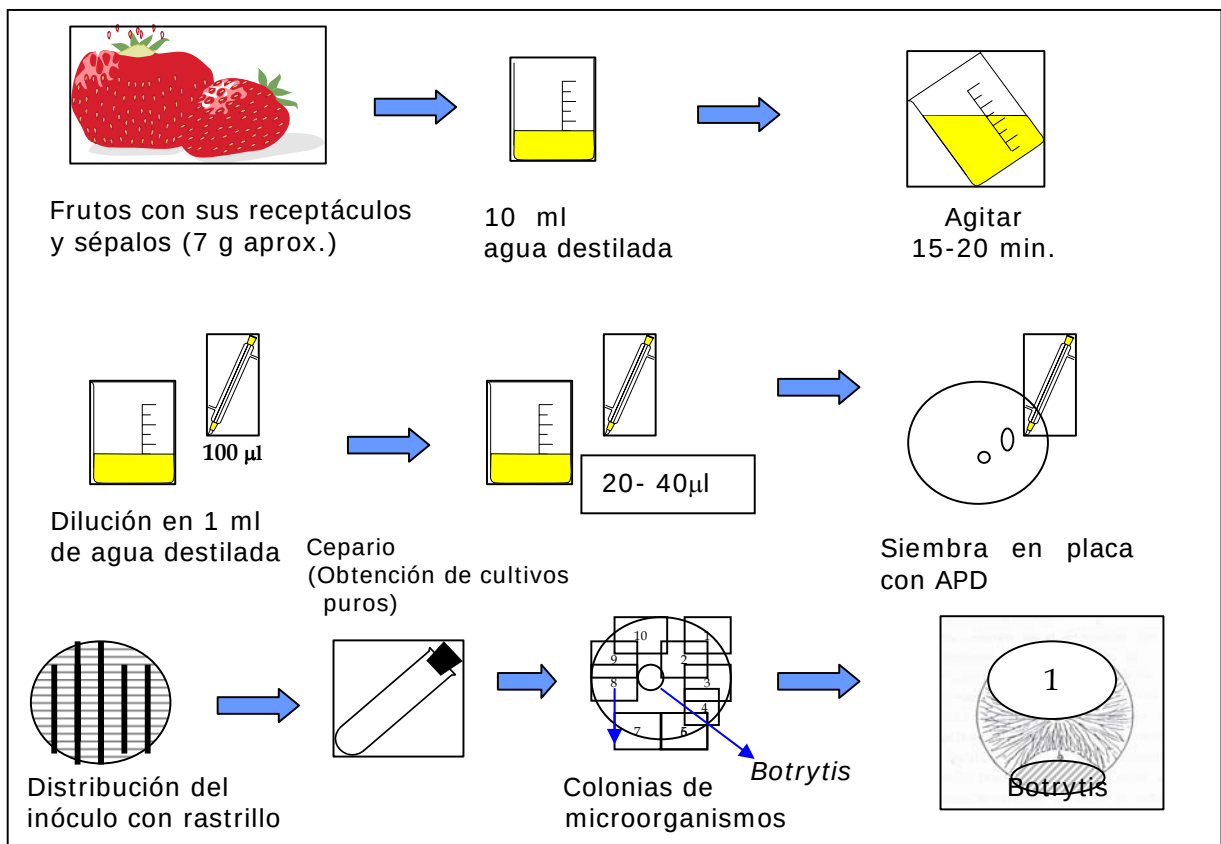


FIGURA 4. Aislamiento de antagonistas a partir de frutos.

Cuando las colonias de microorganismos se desarrollaron y evidenciaron halos de inhibición hacia *Botrytis*, se repicaron a placas para obtener cultivos puros y posteriormente verificar actividad antagonista como en el procedimiento anterior.

3.2.5 Aislamiento de antagonistas a partir de hojas.

Se siguieron dos protocolos. Uno a partir de trozos rectangulares de hojas de fresa colocadas directamente, sin lavar, sobre el agar se obtuvieron colonias periféricas a cada trozo. Figura 5.

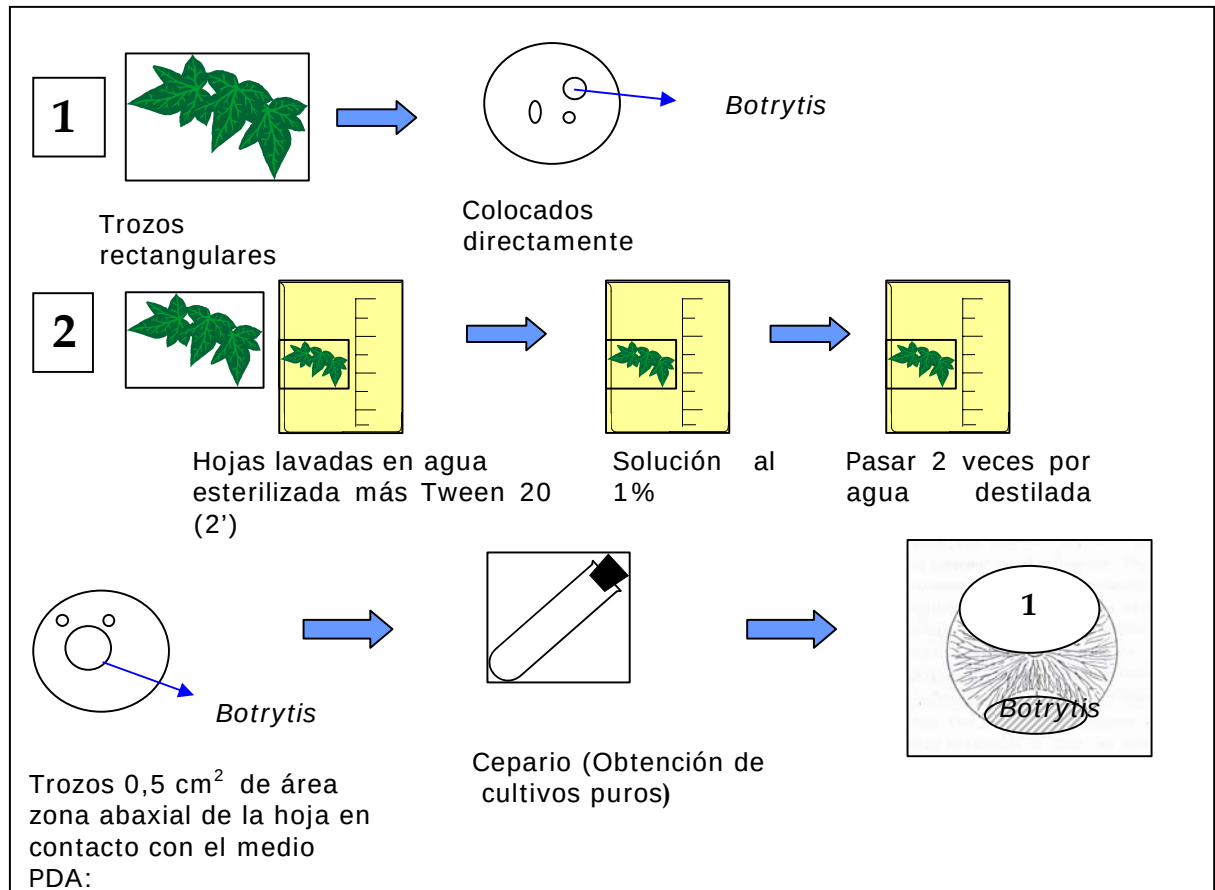


FIGURA 5. Aislamiento de antagonistas a partir de hojas.

El segundo protocolo consistió en lavar las hojas con agua estéril más Tween 20, solución al 1% por dos minutos, se llevó por cinco minutos a una solución de 1% NaClO (producto comercial "Clorex") posteriormente se pasaron dos veces por agua destilada estéril, depositándose trozos de más o menos 0,5 cm² de área, quedando la zona abaxial de la hoja en contacto con el medio PDA (Silva, 1992). Se siguió el mismo protocolo de los casos anteriores para obtener cultivos puros y la posterior comprobación de su antagonismo contra *Botrytis*.

3.3 Caracterización de las cepas de *B. cinerea*.

Los aislamientos de *B. cinerea* se sembraron en placas con agar PDA para observar y medir algunas características que permitieron distinguir la existencia de cepas con diferentes rasgos de agresividad. De este modo se midió su velocidad de crecimiento a una temperatura de 20°C ± 2°C, favorable para el hongo, se registró su capacidad de esporulación, formación de esclerocios y el color de las colonias miceliares desarrolladas sobre el agar. La velocidad de crecimiento se determinó midiendo diariamente (cada 24 h) el diámetro de las colonias creciendo sobre el agar hasta los tres días de incubación. La esporulación se determinó por apreciación visual y la formación de esclerocios contando el número de los mismos producidos en cada placa por la respectiva cepa. También se efectuó una prueba de virulencia sobre hojas de fresa, colocando rodajas de agar con micelio nuevo de las cepas de *B. cinerea*, en el centro de las hojas, las cuales se mantuvieron en cámara húmeda a 20°C ± 2°C por 48 h. Figura 6.

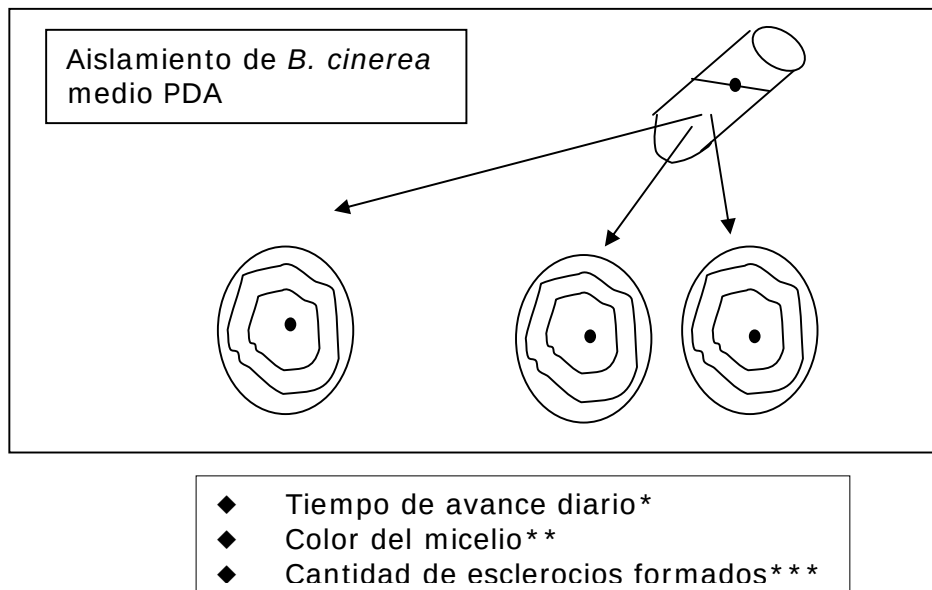


FIGURA 6. Caracterización de las cepas de *B. cinerea*.

* Incremento diario del radio de la colonia miceliar (en mm). Promedio de 3 días.

**Coloración: Gris, gris oscuro, gris muy claro, gris crema, crema, blanco cremoso.

***Formación de esclerocios evaluada a los 7 días de incubación a 20°C. Clave: (-): ausente; (+-): escasa; (+): abundante; (++): muy abundante.

La evaluación se realizó observando el crecimiento del micelio sobre las hojas y la presencia de manchas necróticas en torno a los discos de agar con *B. cinerea*.

3.4 Identificación preliminar de las cepas de antagonistas.

Los antagonistas seleccionados se sembraron en PDA, a partir de lo cual se realizó su identificación para observar características de tinción (tinción de Gram), culturales (capacidad para crecer en diferentes medios), bioquímicas y morfológicas basadas en Gordon *et al.* (1973), Norris *et al.* (1983) y Sneath *et al.* (1986).

3.5 Pruebas de antagonismo a *B. cinerea* *in vitro*.

A partir de cultivos puros de microorganismos antagonistas (hongos y/o bacterias) se sembraron con asa estéril en placas con PDA con un disco de agar con *Botrytis* al centro de la placa, usualmente distribuyendo los antagonistas según el método de los 4 puntos (Cercos, 1957) (Figura 7).

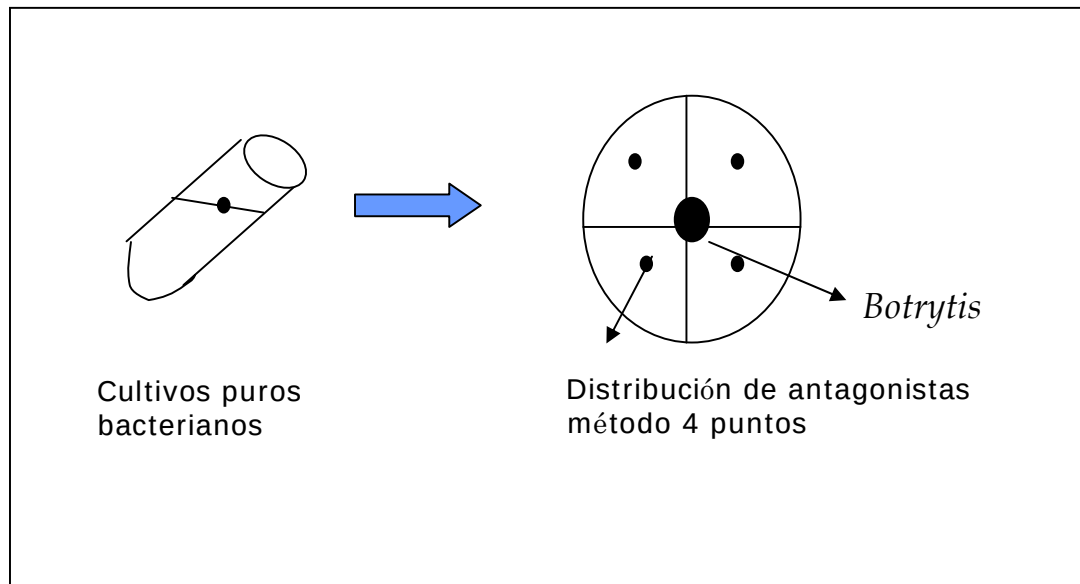


FIGURA 7. Pruebas de antagonismo a *B. cinerea* *in vitro*.

El grado de antagonismo se determinó por el diámetro de los halos de inhibición y la duración de la misma constituye el principal criterio de selección de los potenciales agentes de control de *B. cinerea*. Los mejores antagonistas seleccionados se enfrentaron contra cada cultivo del cepario de *B. cinerea*, para determinar posibles diferencias en la magnitud de la inhibición de los distintos cultivos del hongo, comprobando de esta manera el grado de eficacia y el espectro de acción frente a la potencial variabilidad genética de *B. cinerea*. En estas pruebas se efectuaron dos repeticiones más un testigo por cada cultivo de *B. cinerea* enfrentado a los antagonistas. La magnitud de las inhibiciones en cada placa se determinó promediando la distancia máxima y la distancia mínima entre la colonia del antagonista y el margen del micelio de *B. cinerea*, en el halo de inhibición (Figura 8).

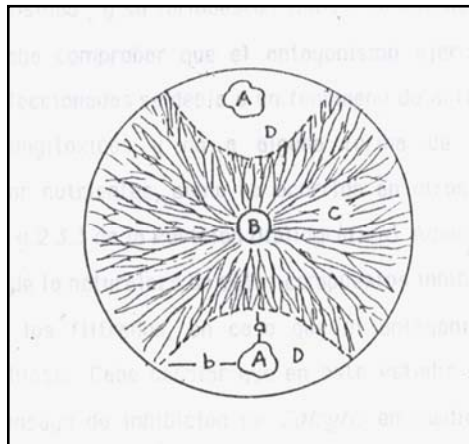


Figura 8. Esquema de la inhibición del micelio del hongo producida por microorganismos antagonistas.

- A. Colonia del antagonista;
- B. Disco con inóculo de *B. cinerea*
- C. Micelio de *B. cinerea*
- D. Halos de inhibición (a: distancia mínima de separación del halo de antagonismo
b. Distancia máxima de separación del halo de antagonismo).

Se estableció la diferencia entre los valores de las repeticiones, para comprobar si algún factor como el grosor del agar en cada placa, o la densidad de inóculo de los antagonistas pudiese influir en grado significativo en la magnitud de las inhibiciones.

Se comparó el crecimiento diario del micelio en las placas de antagonismo con el crecimiento del mismo en las placas testigo de *B. cinerea*. Además se contó el número de esclerocios en la zona próxima a los respectivos antagonistas, con el objeto de observar algún efecto de estos organismos sobre el desarrollo general del hongo, aparte de la inhibición evidente en los halos. Para este efecto se trazó una línea sobre las placas dividiéndola en dos mitades, de modo que ambos antagonistas quedaron ubicados en el área de la mitad respectiva en posiciones opuestas. Una línea similar se dibujó sobre las placas testigo, sembradas solamente con *B. cinerea*. Se midió diariamente el diámetro del micelio en las placas de antagonistas y en las placas testigo, desde la siembra del

hongo hasta que el micelio cubrió las placas. Las placas se mantuvieron en incubación a 20 °C hasta la formación de los esclerocios.

3.6 Detección de la capacidad saprofítica de los antagonistas.

Uno de los objetivos importantes de todo trabajo relacionado con el uso de microorganismos para el control de enfermedades en vegetales de importancia agrícola, consiste en probar que los inoculantes que se emplean, estén constituidos por células inofensivas para las plantas, animales y humanos. Bajo este criterio las cepas antagonistas de *B. cinerea* fueron evaluadas para determinar si constituían patógenos de frutos de fresa. Para realizar estas pruebas se utilizaron frutos de fresa sin signos de *B. cinerea* y sin heridas obtenidos de un huerto comercial del predio Santa Margarita, perteneciente a la Sociedad Agrícola Vallebert Ltda., Temuco Novena Región. Para determinar la capacidad enzimática de las cepas antagonistas sobre el tejido del fruto de fresa, se estudió el posible efecto que éstas tienen sobre los tejidos. Para ello, cada cepa antagonista seleccionada fue sembrada en los medios de cultivo TSA y PDA, e incubada por 24 h a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se prepararon soluciones de 1,0 de densidad óptica (D.O.) a una longitud de onda de 600 nm en dos vasos de precipitado con 400 ml de solución por cada bacteria seleccionada, incluyendo 2 vasos de precipitado con agua destilada como testigos (Flores, 1992). Es reconocida la habilidad de las bacterias, para parasitar y degradar esporas de hongos de la familia *Actinoycetes*, existiendo interacciones específicas de lisis y degradación de las hifas como las encontradas en la asociación *Arthrobacter-Pythium* (Whipps, J. 2001).

En cada vaso se sumergieron 10 frutos de fresa, previamente desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio, producto comercial "CLOREX" al 1% por 2 minutos y luego fueron enjuagados con agua destilada estéril por dos veces, sacando el remanente de agua con papel absorbente esterilizado. Los frutos seleccionados no debían presentar defectos externos visibles.

Las pruebas de capacidad saprofítica se realizaron según el procedimiento indicado por (Flores, 1992) tomando en consideración el siguiente procedimiento:

Suspensión bacteriana. Se tomaron los duplicados de los vasos de precipitados preparados en el proceso anterior, manteniendo los frutos sumergidos durante 10 minutos en la suspensión bacteriana. Figura 9.

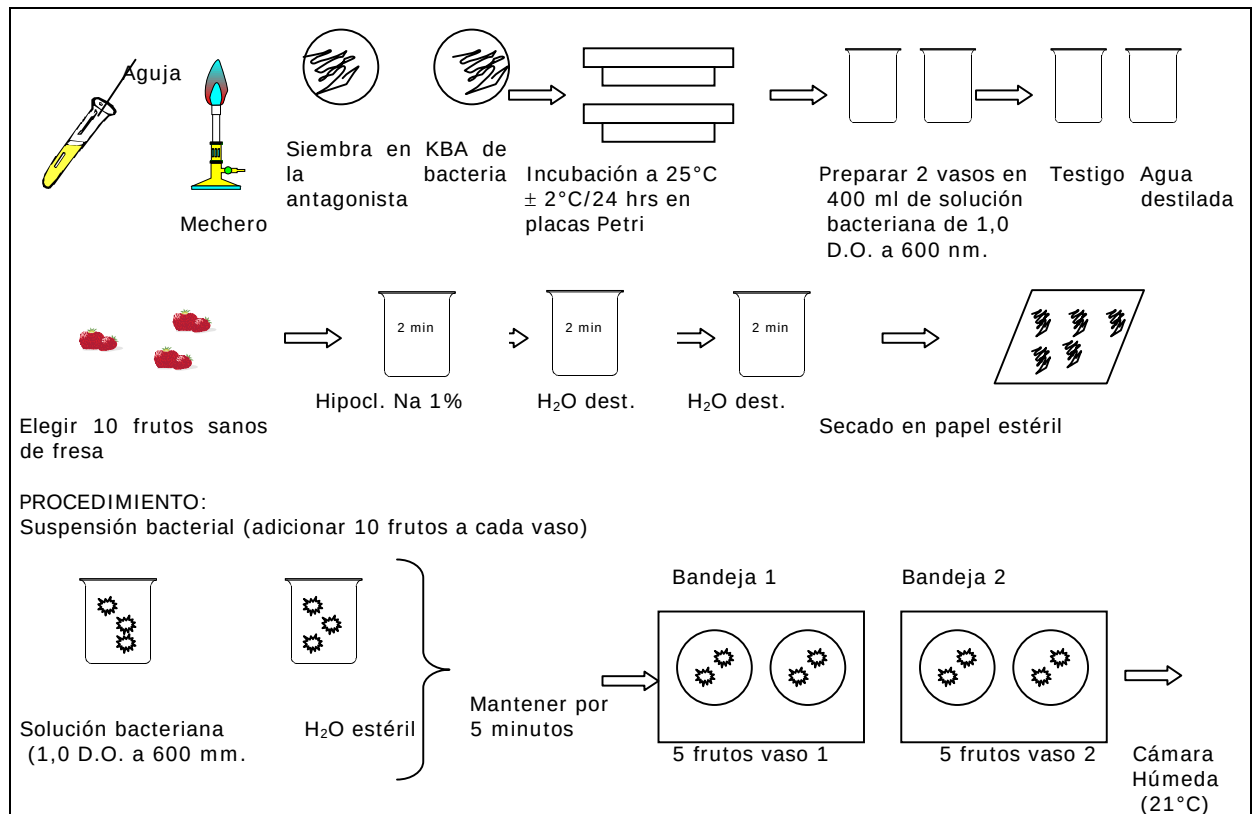


Figura 9. Detección de la capacidad saprofítica de los antagonistas en frutos de fresa.

Los frutos tratados se llevaron posteriormente a una cámara húmeda (Anexo 2) se colocaron 2 placas Petri abiertas y esterilizadas. Cada bandeja correspondió a un tratamiento, y cada placa Petri llevó 3 frutos de un mismo vaso de precipitado, quedando así en una bandeja una cepa antagonista más un testigo tratado con agua destilada. Las bandejas se sellaron con plástico transparente (Alusaplast) y se incubaron en una estufa a $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Durante el ensayo las bandejas fueron rotadas en el interior de la estufa. Para corroborar el saprofitismo de los antagonistas, además se efectuaron inoculaciones en rodajas de papa, a las que previamente se les hizo un

sacabocado, de un cm de diámetro por tres mm de profundidad en el centro. Después se agregó 5 ml de agua destilada en la cavidad de cada rodaja y se inoculó con una cepa antagonista mediante un asa estéril. Luego estas rodajas se colocaron sobre vidrio reloj en cámara húmeda (una pudrición blanda y oscura extendiéndose desde el borde de la cavidad es señal de producción de pectinasas).

3.6.1 Evaluación.

Los tratamientos se mantuvieron cerrados observándose cada 12 h para comprobar si se presentaba alteración de tejidos. A las 48 h la bandeja fue abierta, evaluándose, por placa los frutos que presentaron pudrición.

Posteriormente, se sacó de cada fruto un trozo de tejido, con la ayuda de un asa, se sembró en placas que contenían el medio de cultivo, a partir de frutos que mostraron alteración de tejidos y de aquellos que no presentaron.

Con cultivos puros de 48 h de las mismas bacterias inoculadas se comprobó que se aisló la misma bacteria.

3.7 Preparación de los inóculos para el ensayo de control biológico de *B. cinerea* en frutos de fresa.

Se eligieron las mejores bacterias antagonistas seleccionadas en las pruebas de antagonismo *in vitro* y que no causaron alteración de los tejidos en frutos, para efectuar pruebas de control de *B. cinerea* en frutos de fresa.

Los ensayos de control de *B. cinerea in vitro* consistieron en la inmersión de frutos en suspensiones estandarizadas de los antagonistas.

Para asegurar la presencia de una carga de *B. cinerea* que permita observar efectivamente pudrición, se asperjaron los frutos previamente con una suspensión estandarizada del hongo.

Ambas suspensiones fueron determinadas previamente en un bioensayo.

3.7.1 Estandarización de la concentración de *B. cinerea*.

Para ello primero se procedió a obtener conidias maduras de *B. cinerea* y luego se determinó la concentración.

3.7.1.1 Obtención de conidias maduras de *B. cinerea*.

Se eligió la cepa de *B. cinerea* que presentó mejor crecimiento del micelio y formación de conidias. Una vez cultivado el hongo sobre medio PDA por 13 días (los primeros 8 días en oscuridad y los siguientes 5 días en régimen de 12 h de luz y 12 h de oscuridad a 20°C), se logró obtener conidias uniformes en su germinación y de alta capacidad germinativa (Popper *et al.*, 1989).

3.7.1.2 Determinación de la concentración que causa colonización visible de *B. cinerea*.

A partir de las conidias con un pincel en un vaso precipitado se inoculó 100 ml de agua destilada con una carga alta (denso); se midió la D.O. y se procedió a realizar un conteo en placa (Anexo 4). Luego se sumergieron 5 frutos desinfectados previamente por 10 minutos.

De este vaso precipitado, previo a la inmersión de los frutos, se tomó 10 ml y lo resuspendimos en 90 ml de agua destilada. Nuevamente se midió la D.O. y se realizó un conteo en placa. Posteriormente 5 frutos desinfectados fueron sumergidos por 10 minutos. A partir de este vaso se tomó nuevamente 10 ml, agregándole 90 ml de agua destilada obteniendo así la dilución 10^{-2} a la cual se le midió la D.O. y se realizó un conteo en placa sumergiendo posteriormente frutos desinfectados por 10 minutos. Se realizó una dilución adicional a la que se le determinaron los mismos parámetros.

Los frutos sumergidos en cada concentración fueron incubados en una cámara húmeda (Anexo 2) por 96 horas a $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.7.1.3 Evaluación.

Cada fruto se evaluó al cuarto día, de acuerdo a una escala arbitraria (Flores, 1992) y relacionado con la D.O.

0%	= 1	sin " <i>B. cinerea</i> "
1% - 25%	= 2	$\frac{1}{4}$ del fruto con " <i>B. cinerea</i> "
26% - 50%	= 3	$\frac{1}{2}$ del fruto con " <i>B. cinerea</i> "
51% - 75%	= 4	$\frac{3}{4}$ del fruto con " <i>B. cinerea</i> "
76% - 100%	= 5	fruto entero con " <i>B. cinerea</i> "

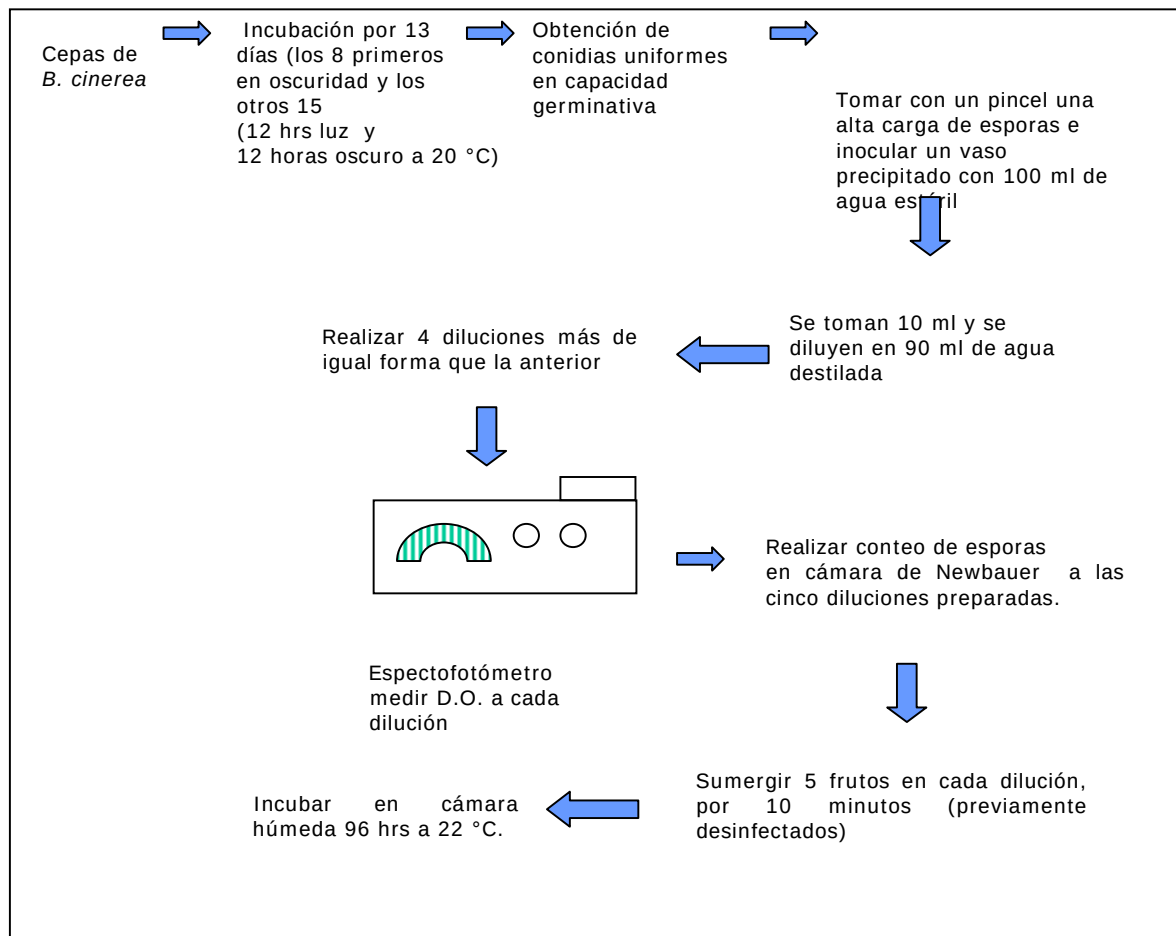


FIGURA 10. Esquema de la estandarización de la concentración de *B. cinerea*.

Aquella D.O. que permitió tener el 50% o sobre ésta de presencia de *B. cinerea* fue la seleccionada. Figura 10.

Cada D.O. está referida a un inóculo determinado por el resultado del crecimiento en placa.

3.7.2 Estandarización de la concentración de metabolitos antagonistas.

Con los antagonistas seleccionados que no causaron alteración de tejidos en los frutos se sembró en PDA cultivos puros de antagonistas y se incubó por 48 horas a 22° C. Al cabo de este tiempo se procedió a tomar un inóculo alto de este cultivo fresco para obtener una suspensión (So) en caldo agar casaaminoácido peptona glucosa, CPG (Anexo 3) a la cual se le midió la D.O. y se le practicó un

conteo en placa. Posteriormente de este mismo inóculo se tomó 0,1 ml que fué filtrado ($0,22 \mu$), depositándose el filtrado en un posillo de una placa con PDA en 3 repeticiones más un posillo control que contenía solo el medio de cultivo líquido (CPG). Luego la suspensión inicial (S_0) fue sometida a incubación por 24 horas a 22°C con agitación. Cada una hora se tomó una muestra hasta completar 24 horas, con la cual se procedió del modo señalado para la (S_0). Las placas con posillos fueron incubadas por 24 horas al cabo del cual se le agregó un disco con *B. cinerea* de 3 días de crecimiento equidistante de los posillos anteriores incubándose por 3 días.

3.7.2.1 Evaluación.

Se procedió a constatar y medir halos de inhibición formados por las distintas concentraciones producidas por los metabolitos de antagonistas para cada momento del período de incubación o crecimiento del antagonista.

Se procedió a elegir aquellas cepas bacterianas que causen una evidente inhibición en el crecimiento del hongo, como lo muestra la Figura 5.

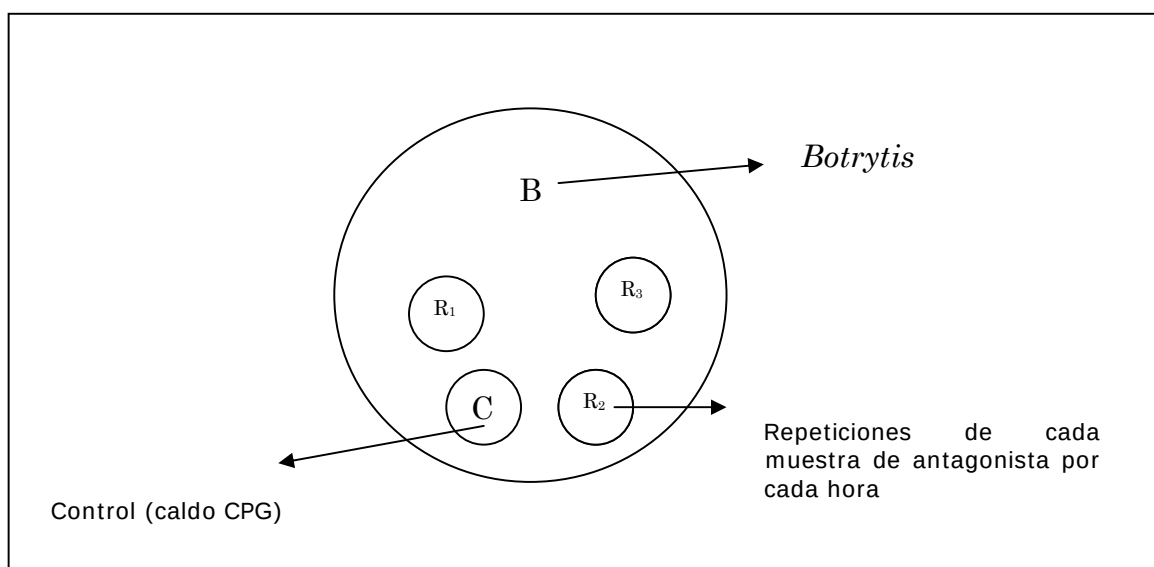


Figura 11. Esquema de la inhibición del micelio del hongo producida por microorganismos antagonistas.

3.8 Estandarización de la concentración de la cepa de *Stenotrophomonas maltophilia*.

El antagonista seleccionado y activado, se sembró en medio agar TSA (Anexo 3) y se incubó por 48 horas a 25°C. Al cabo de este tiempo se procedió a tomar un inóculo alto de este cultivo fresco para obtener una suspensión en caldo soya (Anexo 3). A partir de este cultivo se procedió a leer la D.O. (a 600 nm), luego se tomó 1 ml y se diluyó en 9 ml de agua destilada y se procedió a agitar fuertemente.

De estos 10 ml se tomó nuevamente 1 ml y se volvió a diluir en 9 ml de agua destilada, repitiéndose la operación hasta obtener 4 diluciones más. De cada una de éstas diluciones, se tomaron 0,1 ml y se sembró en placa con medio de cultivo TSA, en dos repeticiones por 24 horas, posterior a lo cual se realizó el conteo de colonias para conocer el número de unidades formadoras de colonia (UFC), en las placas que contenían entre 30 y 300 colonias. La suspensión inicial se mantuvo en constante agitación a una temperatura de 25 °C, y a espacios de una hora se volvió a tomar una muestra de 4 ml aproximadamente procediéndose a leer su D.O. y luego se realizaron los mismos procedimientos antes señalados para el conteo en placa. La D.O. de la suspensión inicial, se midió cada una hora hasta completar 24 horas. Ello se realizó con el objetivo de poder elaborar una curva de crecimiento bacteriano, para determinar la fase de la curva en la cual se obtiene el mayor efecto inhibitorio producido por la suspensión bacteriana.

3.9 Ensayo de control biológico *in vitro* de *B. cinerea* en frutos.

Una vez verificada la concentración de *B. cinerea* que causa presencia en el fruto superior al 25 % y la curva de crecimiento de la bacteria antagonista, se eligieron tres concentraciones correspondientes a tres puntos de la curva, asumiendo que junto con obtener concentraciones progresivas de bacterias, también se obtendría una progresión en la capacidad antagonista de ésta relacionada con la fase de su crecimiento.

El ensayo de control de *B. cinerea* en laboratorio consistió en la aplicación de suspensiones de tres estados de desarrollo del antagonista, sobre los frutos de fresa mantenidas en laboratorio, para luego aplicar suspensión de *B. cinerea* sobre el mismo fruto y luego evaluar el control.

Habiéndose estandarizado la concentración de los inóculos, tanto del patógeno como del antagonista, se procedió a probar el efecto *in vitro* del antagonista seleccionado sobre el desarrollo de *B. cinerea* en frutos de fresas.

Los frutos, previa desinfección con hipoclorito de sodio al 5% por 20 minutos y lavados con agua estéril, fueron sumergidos en una suspensión de los antagonistas seleccionados por 10 minutos y se colocaron en cámara húmeda por 24 horas, al cabo de ese tiempo se asperjó *B. cinerea* y se dejó en cámara húmeda a $21^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$.

Los tratamientos con 3 repeticiones y con 10 frutos cada uno se distribuyeron en las siguientes bandejas:

A = Cepa antagonista sola.

B = Cepa antagonista más *B. cinerea*.

C = Botrytis sola.

D = Agua destilada (testigo absoluto).

Se utilizó la menor concentración de antagonistas, la media y la máxima, que controlara totalmente la mínima concentración de *B. cinerea* donde se evidenciara producción de moho gris.

Por lo tanto al aplicar el ensayo, cada bandeja quedó de la siguiente manera:

Bandeja N°1 (con tres repeticiones)

A = Agua destilada (testigo absoluto)

B = *B. cinerea* sola

C = Concentración 1 de cepa antagonista sola

D = Concentración 1 cepa antagonista más *Botrytis*

Bandeja N°2 (con tres repeticiones)

A = Agua destilada (testigo absoluto)

B = *B. cinerea* sola

E = Concentración 2 de cepa antagonista sola

F = Concentración 2 cepa antagonista más *B. cinerea*

Bandeja N°3 (con tres repeticiones)

A = Agua destilada (testigo absoluto)

B = *B. cinerea* sola

G = Concentración 3 de cepa antagonista sola

H = Concentración 3 cepa antagonista más *B. cinerea*

3.10 Criterios de evaluación de la pudrición gris de los frutos.

La incidencia de ataque de los frutos que recibió el efecto de los distintos tratamientos a ensayar se estimó mediante dos índices:

- a) El porcentaje de incidencia de la enfermedad (PIE) o porcentaje de los frutos de cada tratamiento que presentaron síntomas o signos de *B. cinerea* (pudrición gris) al cabo de un período dado después del ensayo.

$$PIE = \frac{\text{N° frutos con pudrición gris} \times 100}{\text{N° total de frutos}}$$

- b) El período asintomático medio (PAM) o número promedio de días en que los frutos de un tratamiento no manifestaron signos de pudrición gris dentro de un período determinado (7 días). Para cada fruto tratado se registró el número de días sin *B. cinerea* en cámara húmeda. Estos valores se sumaron y se dividieron por el total de frutos del tratamiento.

$$PAM = \frac{\sum \text{días sin pudrición gris en los frutos}}{\text{N° total de frutos}}$$

Cada fruto fue evaluado al cuarto día, de acuerdo a la siguiente escala arbitraria:

0%	= 1	sin " <i>B. cinerea</i> "
1% - 25%	= 2	$\frac{1}{4}$ del fruto con " <i>B. cinerea</i> "
26% - 50%	= 3	$\frac{1}{2}$ del fruto con " <i>B. cinerea</i> "
51% - 75%	= 4	$\frac{3}{4}$ del fruto con " <i>B. cinerea</i> "
76% - 100%	= 5	fruto entero con " <i>B. cinerea</i> "

3.11 Análisis estadístico

Como primer paso se comprobó si los datos del experimento cumplían con los supuestos estadísticos, situación que no ocurrió. Por lo tanto se procedió a realizar una transformación de rangos y la aplicación de la prueba de Kruskal-Wallis, contraste no paramétrico similar al test de ANOVA. No obstante, también se realizó un análisis de varianza tradicional y posteriormente, la comparación de ambos test.

Esto último basado en lo señalado por Montgomery (1991), quien recomienda realizar ambas pruebas de hipótesis señalando que cuando hay similitud en los resultados en las dos pruebas, probablemente la suposiciones del análisis de varianza se satisfacen razonablemente bien y resulta adecuada su utilización.

Además agrega que sólo en aquellos casos en que los valores son estadísticamente congruentes se debiera privilegiar el contraste de hipótesis de Kruskal- Wallis.

Dado que se cumplió lo señalado por Montgomery (1991) se trabajó con ANOVA y posteriormente se aplicó la prueba de Scheffé para establecer la comparación entre los grupos en evaluación

4 RESULTADOS

4.1 Aislamiento de *B. cinerea* a partir de frutos.

De la recolección realizada en 10 localidades de la IX Región (Figura 1), durante los meses de Enero y Febrero de 2002, se logró obtener un total de 138 aislamientos de *B. cinerea* a partir de tejido enfermo de frutos de fresa.

El número de cepas de *B. cinerea* aisladas, se indican en el Cuadro 1, con su fecha de recolección y lugar de procedencia.

CUADRO 1. Cepas de *B. cinerea* aisladas de diferentes lugares de la IX Región (Chile), provenientes de tejido enfermo de frutos de fresa.

Número	Cepas	Fecha	Localidad
B1	12	Enero 2002	Angol
B2	18	Enero 2002	Capitán Pastene
B3	15	Enero 2002	Traiguén
B4	22	Enero 2002	Collipulli
B5	13	Enero 2002	Lautaro
B6	12	Febrero 2002	Pillanlelbún
B7	10	Febrero 2002	Ercilla
B8	8	Febrero 2002	Perquenco
B9	20	Febrero 2002	Temuco
B10	8	Febrero 2002	Loncoche

De los 138 aislamientos de *B. cinerea*, se seleccionaron 30 cepas para los ensayos de control biológico in vitro por presentar un mayor crecimiento en placa en medio PDA.

CUADRO 2. Número de cepas de *B. cinerea* aisladas por localidad muestreada de diferentes lugares de la IX Región (Chile), provenientes de tejido enfermo de frutos de fresa.

Cepas	Fecha	Localidad	Comuna	Hospedero
B1	Enero 2002	Los Confines	Angol	Fresa
B2	Enero 2002	El Parque	Angol	Fresa
B3	Enero 2002	Los Confines	Angol	Fresa
B4	Enero 2002	Chanco	Lumaco	Fresa
B5	Enero 2002	Chanco	Lumaco	Fresa
B6	Enero 2002	El Maitén	Lumaco	Fresa
B7	Enero 2002	El Maitén	Lumaco	Fresa
B8	Enero 2002	El Maitén	Lumaco	Fresa
B9	Enero 2002	Guacolda	Traiguén	Fresa
B10	Enero 2002	Huiñilhue	Traiguén	Fresa
B11	Enero 2002	Collipulli	Collipulli	Fresa
B12	Enero 2002	Collipulli	Collipulli	Fresa
B13	Enero 2002	Collipulli	Collipulli	Fresa
B14	Enero 2002	Collipulli	Collipulli	Fresa
B15	Enero 2002	Perquenco	Lautaro	Fresa
B16	Enero2002	Huilquilco	Lautaro	Fresa
B17	Enero 2002	La Cantera	Lautaro	Fresa
B18	Febrero 2002	Pillanlelbún	Lautaro	Fresa
B19	Febrero 2002	Pailahueque	Ercilla	Fresa
B20	Febrero 2002	Pailahueque	Ercilla	Fresa
B21	Febrero 2002	Pailahueque	Ercilla	Fresa
B22	Febrero 2002	Tromen Alto	Temuco	Fresa
B23	Febrero 2002	Tromen Bajo	Temuco	Fresa
B24	Febrero 2002	Monte Verde	Temuco	Fresa
B25	Febrero 2002	Boyeco	Temuco	Fresa
B26	Febrero 2002	Chivilcán	Temuco	Fresa
B27	Febrero 2002	Rengalil	Temuco	Fresa
B28	Febrero 2002	Sapaco	Loncoche	Fresa
B29	Febrero 2002	Sapaco	Loncoche	Fresa
B30	Febrero 2002	Sapaco	Loncoche	Fresa

4.2 Aislamientos de antagonistas de *B. cinerea*.

Durante el mes de Enero y Febrero de 2002 se logró obtener aproximadamente 98 aislamientos microbianos propios de la microflora del cultivo, provenientes del filoplano, rizoplano, rizósfera y frutos de fresa del cultivar Chandler recolectadas de 10 localidades de la IX Región (las mismas de las cuales se obtuvieron los aislamientos de las cepas de *B. cinerea* y que se ilustran en la Figura 1). Estos aislamientos se ensayaron en pruebas de antagonismo *in vitro* contra *B. cinerea*.

Los antagonistas obtenidos en estos aislamientos se señalan en el Cuadro 3 con su fecha, material de origen y lugar de procedencia. Además en el mismo cuadro se señala el número total de colonias bacterianas aisladas.

CUADRO 3. Origen, procedencia, fecha y número de antagonistas obtenidos a partir de los aislamientos bacterianos ensayados en pruebas de inhibición *in vitro* contra *B. cinerea*.

N° colonias aisladas	Fecha de aislamiento	Material de origen	Lugar de procedencia	N° de antagonistas
8	Enero 2002	Rizoplano, Filoplano	Angol	1
6	Enero 2002	Fruto, Filoplano	Capitán Pastene	2
5	Enero 2002	Fruto, Filoplano	Traiguén	0
10	Enero 2002	Fruto, Filopalno, Rizosfera	Collipulli	1
12	Enero 2002	Rizosfera, Fruto Filoplano	Lautaro	2
9	Febrero 2002	Filoplano, Fruto	Pillanlelbun	5
7	Febrero 2002	Rizosfera, Rizoplano Fruto, Filoplano	Ercilla	0
8	Febrero 2002	Rizosfera, Rizoplano Fruto, Filopalno	Perquenco	0
13	Febrero 2002	Rizosfera, Rizoplano Fruto, Filoplano	Loncoche	0
20	Febrero 2002	Rizosfera, Rizoplano Fruto, Filoplano	Temuco	1

Total: 98

12

CUADRO 4. Material de origen, procedencia y fecha de aislamiento de las 12 cepas antagonistas, señaladas en el Cuadro 3.

Número	Designación Cepas Antagonistas	Material de origen	Lugar de procedencia	Fecha
1	A4	Filoplano	Angol	Enero, 2002
2	A10	Filoplano	Capitan Pastene	Enero, 2002
3	A14	Fruto	Capitan Pastene	Enero, 2002
4	A25	Fruto	Collipulli	Enero, 2002
5	A35	Fruto	Lautaro	Enero, 2002
6	A39	Rizosfera	Lautaro	Enero, 2002
7	A43	Fruto	Pillanlelbún	Febrero, 2002
8	A45	Fruto	Pillanlelbún	Febrero, 2002
9	A47	Fruto	Pillanlelbún	Febrero, 2002
10	A48	Filoplano	Pillanlelbún	Febrero, 2002
11	A50	Filoplano	Pillanlelbún	Febrero, 2002
12	A86	Fruto	Temuco	Febrero, 2002

4.3 Caracterización de las cepas de *B. cinerea*

De las 10 localidades en las cuales se realizaron los 138 aislamientos de *B. cinerea*, a partir de tejido enfermo de frutos de fresa, se seleccionaron 30 cepas, para caracterizarlas en función de coloración del micelio, capacidad para formar cuerpos de resistencia (esclerocios), crecimiento diario del micelio a una temperatura de 20 °C. Cabe señalar que para ésta evaluación a cada cepa de cada localidad, se le agregaron 3 repeticiones para respaldar el estudio y los resultados. Las mediciones se realizaron cada 24 horas, hasta que el crecimiento del micelio lograra cubrir la totalidad de la superficie de la placa, lo que se logró al cuarto día de evaluación. Figura 12.

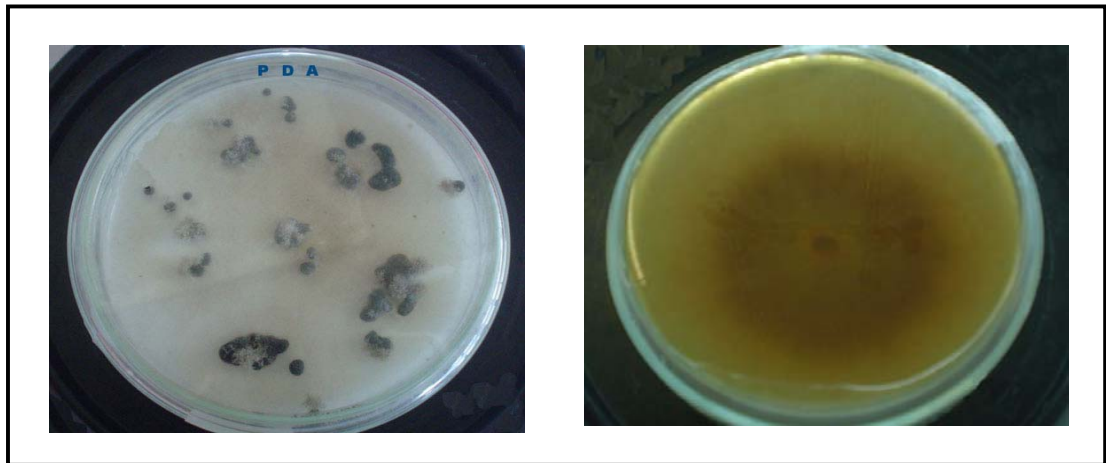


FIGURA 12. Placas con agar papa dextrosa (PDA), ilustrando crecimiento micelial de *B. cinerea* a 4 días de incubación (derecha), y con desarrollo de estructuras de resistencia (esclerocios), a los 20 días de incubación a $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

En el Cuadro 5 se indica la coloración del micelio, el grado de esporulación y la capacidad de formar esclerocios de 30 cultivos que conformaron el cepario de *B. cinerea*. También se señala la tasa diaria de crecimiento micelial, durante los 3 primeros días de cultivo a 20°C .

Por observación microscópica se verificó que los 30 aislamientos (Cuadro 5), corresponde a *B. cinerea*, sin embargo, varias cepas presentaron características notablemente diferentes entre ellas. Contrastadas, por ejemplo, las cepas, B8, B16, B19 y B23 del resto de los aislamiento por su abundante esporulación a los 7 días de cultivo, en tanto las cepas B13, B18, B25 y B30 de coloración muy clara no presentaron conidióforos durante el mismo periodo de incubación (posteriormente, también, estas cepas esporularon).

También se encontraron aislamientos que presentaron diferencias en la formación de esclerocios, la tasa de crecimiento, en la patogenicidad y se encontraron cepas que en una semana desarrollaron numerosos esclerocios, y otros no lo formaron en el mismo periodo.

En el Cuadro 5, se presenta el resumen de la caracterización de las cepas de *B. cinerea* aisladas.

CUADRO 5. Coloración del micelio, capacidad para formar cuerpos de resistencia (esclerocios), crecimiento a 20 ° C y esporulación del micelio de 30 cepas de *B. cinerea*, correspondientes a las localidades de muestreo.

Cepa	Coloración del micelio	Formación de esclerocios (1)	Tasa de crecimiento a 20°C. (2)	Esporulación del micelio (3)
B1	Gris crema	(-)	10	(+)
B2	Gris crema	(-)	11.2	(++)
B3	Gris crema	(-)	9.3	(+)
B4	Gris crema	(-)	11.5	(+)
B5	Gris oscuro	(-)	7.8	(+-)
B6	Gris oscuro	(-)	10.2	(+)
B7	Gris oscuro	(-)	9.3	(+)
B8	Gris oscuro	(-)	9.9	(+++)
B9	Gris oscuro	(++)	8.6	(++)
B10	Gris oscuro	(++)	10.1	(++)
B11	Gris oscuro	(++)	10.4	(-)
B12	Gris oscuro	(++)	9.5	(+)
B13	Crema	(+)	11.3	(+-)
B14	Crema	(+)	11.0	(+)
B15	Gris muy oscuro	(++)	10.2	(+)
B16	Gris crema	(-)	9.3	(+++)
B17	Gris	(-)	4.2	(+)
B18	Blanco cremoso	(-)	11.1	(-)
B19	Cremoso	(++)	11.5	(+)
B20	Cremoso	(+)	10.1	(-)
B21	Gris Crema	(+)	10.4	(++)
B22	Gris crema	(-)	9.2	(+)
B23	Gris	(-)	11.2	(+++)
B24	Gris	(++)	11.4	(++)
B25	Blanco crema	(+)	9.7	(-)
B26	Gris	(-)	10.7	(+)
B27	Gris	(++)	9.6	(+)
B28	Crema	(-)	9.3	(+-)
B29	Gris crema	(+-)	11.1	(+)
B30	Blanco crema	(+-)	10.6	(+-)

¹Formación de esclerocios evaluados a los 7 días de incubación a 20°C. Clave: (-): ausente; (+-): escasa; (+): abundante; (++): muy abundante.

(++) Presencia abundante de esclerocios en la placa al cuarto día de evaluación.

²Incremento diario del radio de la colonia miceliar (en mm). Promedio de 3 días.

³Esporulación evaluada a los 7 días en incubación a 20°C. Clave: (-): ausente; (+-): escasa;

(+): abundante; (+++): muy abundante.

4.4 Identificación de las cepas antagonistas.

Antes de realizar la identificación de las cepas bacterianas antagonistas, cabe señalar que del total que resultó ser antagónica a *B. cinerea*, evaluadas en pruebas *in vitro* (un total de 12) se eligieron las cinco mejores antagonistas que resultaron de ésta prueba para llevarlas a su identificación.

Para identificarlas se recurrió al sistema automatizado Biolog Microlog 3, versión 4ª (Biolog, INC., USA), disponible en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA-Carillanca).

De acuerdo a las características culturales, tintoriales y bioquímicas de las cepas A4, A10, A39, A48 y A50, antagonistas de *B. cinerea* se identificaron las siguientes bacterias: *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella movilis* y *Enterobacter cloacae*.

4.5 Pruebas de antagonismo a *B. cinerea* *in vitro*.

Para proceder a desarrollar las pruebas de antagonismo a *B. cinerea* *in vitro* fue necesario activar el cepario de *B. cinerea*.

A partir de los esclerocios extraídos de un cepario (Figura 13), fue posible, a los tres días de incubación, obtener desarrollo de micelio.



FIGURA 13. Cepario de *B. cinerea* en tubo de agar inclinado y en placa Petri con PDA, mostrando la formación de esclerocios, almacenados a 7 °C.

La activación de *B. cinerea* a partir de esclerocios irregulares en tamaño y forma, y que alcanzaron hasta los 15 mm de diámetro, resultó ser efectiva luego de haberlos desinfectado con hipoclorito de sodio al 1% por 2 minutos y enjuagados con agua destilada estéril.

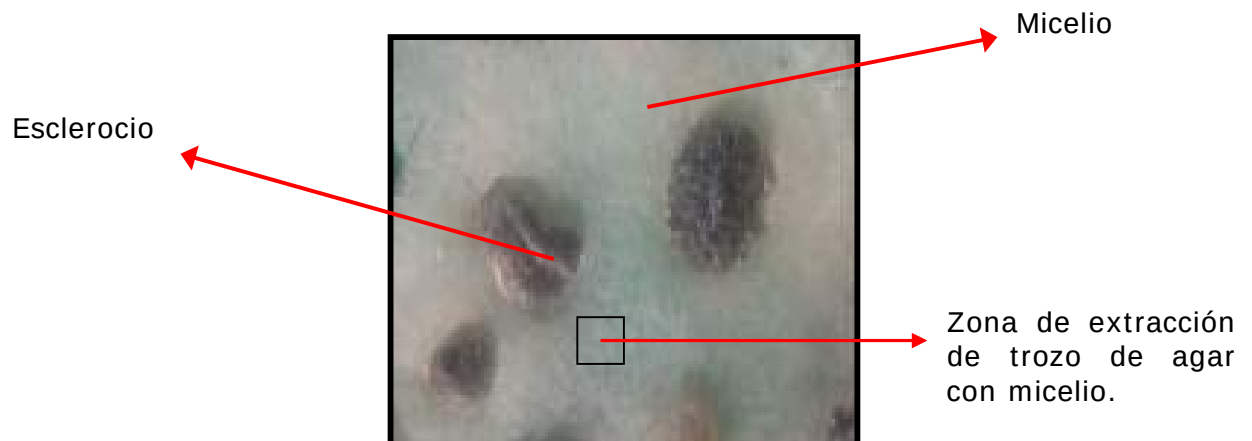


FIGURA 14. Formación de micelio a partir de esclerocio de *B. cinerea* en PDA, después de tres días de incubación a 25 ± 2 °C

La zona de la cual se extrajo un trozo de agar que contenía en su superficie micelio de *B. cinerea* (Figura 14), resultó ser adecuada al colocarlo en forma invertida en el centro de una placa con PDA, para llegar a obtener nuevo desarrollo de micelio (Figura 15), de donde se obtuvo sin problemas conidias maduras para el ensayo de control biológico.

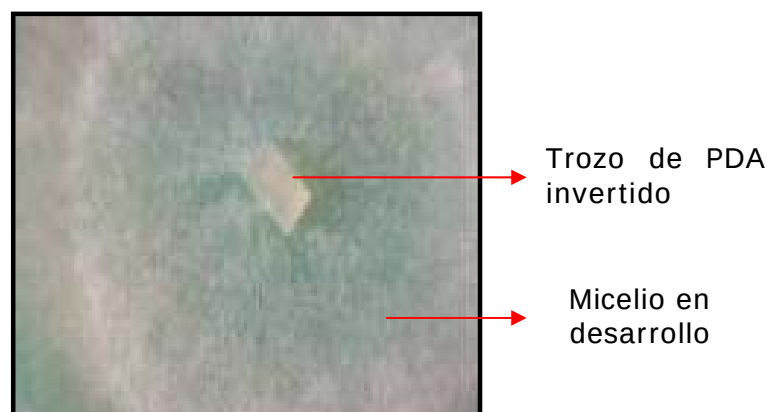


FIGURA 15. Trozo PDA con micelio de *B. cinerea* en desarrollo.

Para desarrollar las pruebas de antagonismo in vitro, primero fue necesario activar las bacterias antagonistas

La obtención de tres bacterias activas, se logró a las 24 h de incubación a una temperatura de 25 °C.

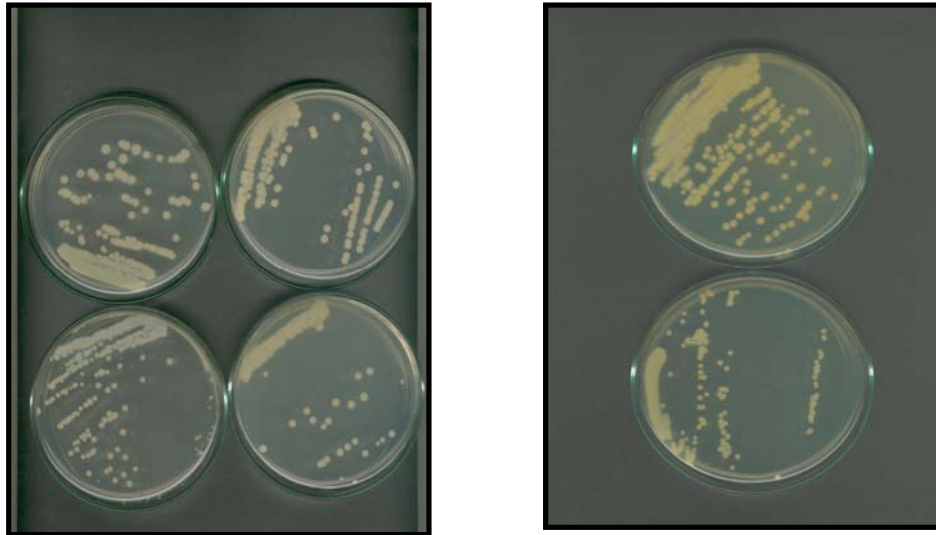


FIGURA 16. Colonias bacterianas de *Stenotrophomonas maltophilia*, desarrolladas por el método de estrías en placas con medio de cultivo TSA.

Sobre la base del rango de temperaturas de crecimiento de las bacterias, se dividen frecuentemente en tres grupos, en primer lugar aquellas que pueden crecer a valores bajos. Existen dos formas la psicrófila obligada, que crece con temperaturas cercanas a 0 °C, óptima 15 °C, máxima 20 °C y la psicrótrofa las cuales aunque crecen cerca de 0 °C, su temperatura óptima es de 25 a 30 °C y una máxima de 35 °C. En el segundo grupo están las mesófilas que crecen entre 25 a 45 °C como máxima y como mínima cercana a los 0 °C de temperatura, bajo el cual el crecimiento es prácticamente nulo. Por último, el tercer grupo está formado por las termófilas que crecen entre los 45 a 55 °C de temperatura (Stanier *et. al.* 1976).

De los 98 aislamientos bacterianos, 12 cepas resultaron con antagonismo sobre *B. cinerea* en medio PDA, 5 de las cuales se seleccionaron para su identificación y una para el ensayo de control en frutos sobre *B. cinerea* bajo

condiciones de laboratorio. De éstas 5 finalmente se seleccionaron 3 por presentar los mayores halos de inhibición en placa. Figura 17a, b y c

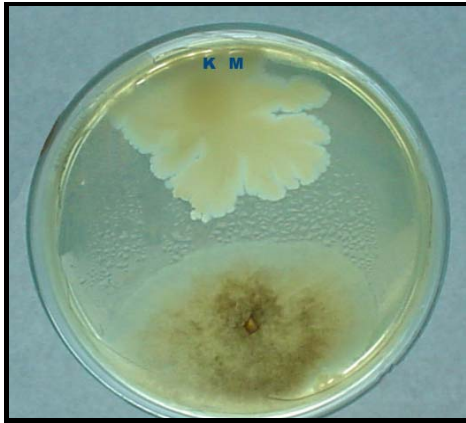


Figura 17a. *B. cinerea* en presencia de la bacteria antagonista *K. movilis*, con formación de halo de inhibición.



Figura 17b. *B. cinerea* en presencia de la bacteria antagonista *E. cloacae*, con formación de halo de inhibición.

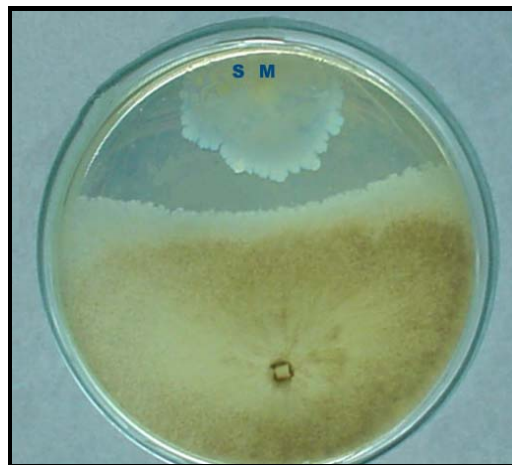


Figura17c. *B. cinerea* en presencia de la bacteria antagonista *S. maltophilia*, con formación de halo de inhibición.

Cuadro 6. Acción *in vitro* de las bacterias antagonistas sobre la inhibición de micelio, esporulación y formación de esclerocios en cepas de *B. cinerea*.

	INHIBICIÓN ¹		ESPORULACIÓN ²		FORMACIÓN DE ESCLEROCIO ³	
	ANTAGONISTAS					
Cepas de <i>B. cinerea</i>	A10	A39	A10	A39	A10	A39
B1	+	+	+	+	+	-
B2	++	+	+	-	+	-
B3	++	+	+	-	+	-
B4	+	++	+	-	+-	-
B5	+++	+	+	-	+-	-
B6	+	+	+	-	-	-
B7	+	+	+	+-	-	-
B8	+	+	+	-	+	-
B9	+	++	+	-	+	-
B10	+++	++	+	-	+	-
B11	+	+	+	-+	+	-
B12	++	+	+	-	-	-
B13	+	+	+	-	-	-
B14	+	+	+	-	-	-
B15	+	+	+	-	-	-
B16	+++	++	+	-	+-	-
B17	++	+	+	+-	+-	-
B18	++	+	+	-	+	-
B19	++	+	+	-	+-	-
B20	+	+++	+	-	-	-
B21	+	+	+	-	-	-
B22	+	+	+	-	-	-
B23	+++	+	+	-	-	-
B24	+	+	+	-	-	-
B25	+	++	+	-+	+-	-
B26	+	+	+	-	+-	-
B27	++	++	+	+-	-	-
B28	++	+	+	-	+	-
B29	+++	+	+	-	+	-
B30	+	+	+	-	+	-

¹Determinada como distancia de separación entre el hongo y el antagonista, en el halo de inhibición
Clave: (+): 3-6 mm; (++): 6.1-9 mm; (+++): 9.1-13 mm.

²Determina la zona de micelio próxima al halo de inhibición. La esporulación negativa se refiere a una franja de 2-10 mm de ancho donde el micelio se presenta escaso, sin esporular, con una zona incolora y otra más interna de color pardo oscuro. Clave: (-): presencia de franja sin esporular claramente definida; (+): ausencia de franja, margen esporulado; (+-): presencia de franja no bien definida.

³Se registró el número de esclerocios presentes en ambas mitades de cada placa Petri donde se sembraron las respectivas cepas antagonistas. También se contabilizaron los esclerocios de las placas testigos (sin antagonistas). Clave: (-): menos del 20% de la cantidad de esclerocios observada en el testigo; (+-): 20-50%; (+): más del 50%.

Las 2 cepas bacterianas antagonistas que fueron seleccionadas se enfrentaron con los cultivos del cepario de *B. cinerea*. Los resultados de la inhibición en todos los casos fue positiva pero de diferente grado (Cuadro 6), producidas por los antagonistas, *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia*, las cuales presentaron halos de inhibición en promedio 8 mm y 12 mm respectivamente. Su origen y fecha de aislamiento se indican en el Cuadro 3 y 4.

4.6 Detección de la capacidad de los antagonistas de causar pudrición en los frutos.

La evaluación de los frutos a las 48 horas de su inoculación mostró los resultados que se indican en el Cuadro 7.

Para determinar la capacidad enzimática de las cepas antagonistas que fueron seleccionadas y posteriormente identificadas, que podrían ejercer sobre el tejido, se realizó la metodología indicada en el Capítulo 3.6.

CUADRO 7. Detección de la capacidad de causar pudrición sobre frutos de fresa, de 5 bacterias antagonistas seleccionadas.

Bacteria N°1 (*Klebsiella movilis*)

Placa N°	Fruto N°	Reacción
1	1	+
	2	+
	3	+
	4	+
	5	+
2	1	+
	2	+
	3	+
	4	*
	5	-
3	1	+
	2	-
	3	+
	4	+
	5	+
4	1	*
	2	*
	3	+
	4	+
	5	+
T1	1	+
	2	+
	3	-
	4	*
	5	+
T2	1	*
	2	*
	3	-
	4	*
	5	*

(+) Frutos que presentaron pudrición bacteriana; (-) Frutos sanos; (*) Frutos con presencia de contaminantes.

Bacteria N°2 (*Xanthomonas campestris*)

Placa N°	Fruto N°	Reacción
1	1	+
	2	+
	3	+
	4	+
	5	-
2	1	+
	2	+
	3	+
	4	+
	5	+
3	1	*
	2	+
	3	+
	4	+
	5	+
4	1	+
	2	-
	3	+
	4	+
	5	+
T1	1	*
	2	*
	3	-
	4	+
	5	*
T2	1	*
	2	*
	3	-
	4	*
	5	-

(+) Frutos que presentaron pudrición bacteriana; (-) Frutos sanos; (*) Frutos con presencia de contaminantes.

Bacteria N°3 (*Enterobacter cloacae*)

Placa N°	Fruto N°	Reacción
1	1	*
	2	*
	3	-
	4	*
	5	*
2	1	*
	2	+
	3	*
	4	-
	5	+
3	1	*
	2	*
	3	*
	4	*
	5	*
4	1	*
	2	*
	3	*
	4	*
	5	*
T1	1	*
	2	*
	3	-
	4	*
	5	*
T2	1	*
	2	*
	3	*
	4	*
	5	+

(+) Frutos que presentaron pudrición bacteriana; (-) Frutos sanos; (*) Frutos con presencia de contaminantes.

Bacteria N°4 (*Pseudomonas aeruginosa*)

Placa N°	Fruto N°	Reacción
1	1	+
	2	+
	3	+
	4	+
	5	+
2	1	+
	2	+
	3	+
	4	+
	5	+
3	1	+
	2	+
	3	+
	4	+
	5	+
4	1	+
	2	+
	3	+
	4	+
	5	+
T1	1	*
	2	*
	3	-
	4	*
	5	*
T2	1	*
	2	*
	3	-
	4	-
	5	*

(+) Frutos que presentaron pudrición bacteriana; (-) Frutos sanos; (*) Frutos con presencia de contaminantes.

Bacteria N°5 (*Stenotrophomonas maltophilia*)

Placa N°	Fruto N°	Reacción
1	1	-
	2	+
	3	-
	4	-
	5	-
2	1	-
	2	-
	3	+
	4	-
	5	-
3	1	*
	2	*
	3	-
	4	-
	5	-
4	1	-
	2	-
	3	-
	4	-
	5	-
T1	1	-
	2	-
	3	-
	4	*
	5	-
T2	1	-
	2	*
	3	-
	4	-
	5	-

(+) Frutos que presentaron pudrición bacteriana; (-) Frutos sanos; (*) Frutos con presencia de contaminantes.

Los resultados de las inoculaciones de estas cepas en frutos de fresa muestran que cuando los frutos fueron inoculados en una suspensión bacteriana, con las cepas antagonistas, solamente la bacteria *S. maltophilia* no causaba daños a los frutos. Las otras bacterias causaron alteración de tejido, atribuible este daño probablemente a la acción de las propias bacterias aplicadas. Sin embargo, debido al el pequeño número de frutos tratados no es posible descartar totalmente la posibilidad de que se activen las bacterias presentes

endogenamente. Al desarrollar esta prueba en rodajas de papas se corrobora los resultados obtenidos anteriormente.

De las cinco bacterias estudiadas, *S. maltophilia* resultó ser la que no causaba daños a los frutos, y fue la que se eligió para los procedimientos posteriores. Antes de ello se aisló del tejido afectado para comprobar que fuese la misma bacteria aplicada.

4.7 Preparación de los inóculos para el ensayo de control biológico de *B. cinerea* en frutos de fresas.

4.7.1 Estandarización de la concentración de *B. cinerea*.

Las conidias maduras obtenidas de acuerdo a la metodología del punto 3.7.1.1, se muestran en la figura 10. Éstas fueron uniformes en su germinación y de alta capacidad germinativa a los trece días de incubación a 25 ± 2 °C, lo que concuerda con las investigaciones realizadas por Popper *et. al.* 1989.

La metodología propuesta resultó ser efectiva para preparar una solución con una carga alta de esporas del hongo y proceder a su estandarización. Los resultados se ilustran en el Cuadro 8.

CUADRO 8. Lecturas de densidades ópticas para cinco diluciones, el número de esporas/cc, aplicadas a cada fruto y obtención del rango incidencia de *B. cinerea*.

Dilución	Densidad Óptica (D.O.)	N° de esporas de <i>B. cinerea</i> /cc	Fruto n°	Rango de incidencia de <i>Botrytis</i> (*)
10^{-1}	0,456	127 esporas/cc	1	1
			2	1
			3	4
			4	4
			5	4
10^{-2}	0,328	107 esporas/cc	1	3
			2	3
			3	3
			4	4
			5	4
10^{-3}	0,225	77 esporas/cc	1	4
			2	2
			3	2
			4	4
			5	3
10^{-4}	0,098	61 esporas/cc	1	1
			2	1
			3	2
			4	2
			5	2
10^{-5}	0,075	53 esporas/cc	1	0
			2	1
			3	1
			4	2
			5	1

(*) Escala de evaluación de la incidencia de *B. cinerea* sobre frutos.

Los resultados obtenidos, señalan que al disminuir las D.O. el número de esporas de *B. cinerea*/cc, a su vez disminuye, correspondiendo a una lectura de 0.456 (D.O). Esto se explica debido a que se comenzó con una dilución concentrada (con una carga alta densa de esporas), que alcanzó las 127 esporas/cc., hasta 0.075 (D.O) para 53 esporas/cc.

Al sumergir los frutos en cada una de las diluciones de la cepa antagonistas y posteriormente incubarlas en una cámara húmeda, se observó que la incidencia de *B. cinerea* fue mayor en las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , donde la mayoría de los frutos fueron afectados sobre el 50% de su superficie.

Por otro lado, en las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} , la incidencia fue menor ya que la carga de esporas era mucho más reducida. Esto demuestra que, aunque la cepa del patógeno se encuentre en bajas concentraciones, es capaz de producir colonización visible de moho gris (Figura 18).



FIGURA 18. Cámara húmeda con tres frutos por placa, inoculados con cada dilución.

La densidad óptica que nos permitió asegurarnos de tener frutos con infección y que se utilizó en el bioensayo fue 0,225 con 77 esporas/cc, la que tenía sobre el 25% de presencia de *B. cinerea* en los frutos inoculados. Por lo tanto, podríamos considerar que la dilución 10^{-3} es la mínima capaz de evidenciar presencia de *B. cinerea* (sobre el 25% de la superficie del fruto).

4.7.2 Estandarización de la concentración del antagonista.

En el cuadro 9, se presentan las lecturas de densidades ópticas de la cepa antagonista y además el promedio de las unidades formadoras de colonia (UFC) en cada hora de toma de muestra por un tiempo de 24 h. (El detalle del número de UFC, para cada D.O se muestra en el anexo 5).

CUADRO 9. Lecturas de densidades ópticas (D.O.) y número de unidades formadoras de colonia (UFC) por dilución, realizada con la cepa bacteriana antagonista, *S. maltophilia* en medio de cultivo TSA en diferentes tiempos (horas).

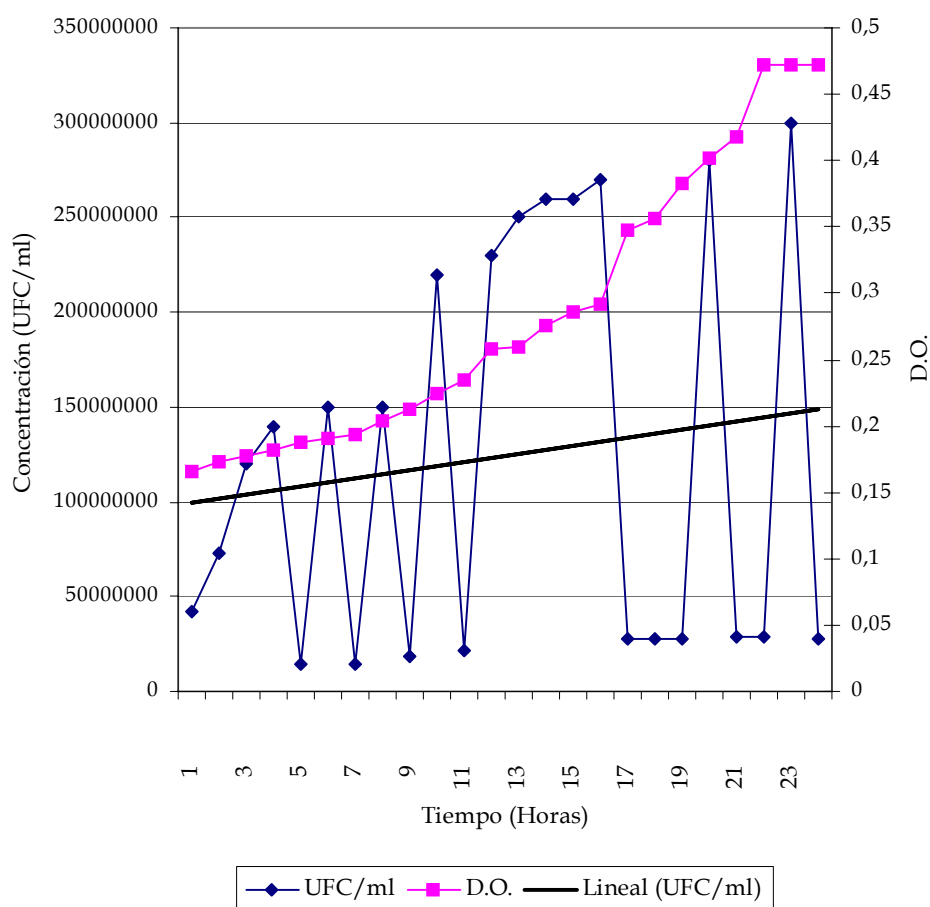
Tiempo (horas)	D.O (Densidad Óptica)	Recuento de la cepa antagonista (UFC/ ml)	LOG 10
1	0.166	42×10^6	7.6
2	0.173	73×10^6	7.9
3	0.178	12×10^7	8.1
4	0.182	14×10^7	8.1
5	0.187	14×10^6	7.1
6	0.190	15×10^7	8.2
7	0.194	14×10^6	7.1
8	0.204	15×10^7	8.2
9	0.212	18×10^6	7.3
10	0.225	22×10^7	8.3
11	0.234	22×10^6	7.3
12	0.258	23×10^7	8.4
13	0.260	25×10^6	8.4
14	0.276	26×10^6	8.4
15	0.286	26×10^7	8.4
16	0.292	27×10^7	8.4
17	0.348	28×10^6	7.4
18	0.356	28×10^6	7.4
19	0.382	28×10^6	7.4
20	0.402	28×10^7	8.4
21	0.418	29×10^6	7.5
22	0.472	29×10^6	7.5
23	0. 472	30×10^7	8.5
24	0. 472	28×10^6	7.4

Del cuadro anterior podemos señalar que la máxima lectura de D.O. fue de 0.472, lo cual se observó a partir de la hora 22. La mínima lectura de la D.O. fue la inicial, correspondiente a la hora 1 alcanzando un valor de 0,166.

En relación a las UFC no fue posible realizar un recuento en placa a partir de la hora 18 en las dos primeras diluciones y en hora 21 en las cuatro primeras diluciones, debido a que la suspensión se fue concentrando cada vez más por el propio crecimiento poblacional de la cepa.

Entre ambos parámetros existe una relación directa, ya que en el transcurso del tiempo al ir aumentando la D.O., aumenta el número de UFC.

FIGURA 19. Gráfico que ilustra la relación entre las lecturas de densidades ópticas y la concentración (UFC/ml) de la cepa antagonista en función del tiempo (durante 24 h).



De la Figura 19 podemos señalar que la máxima lectura de D.O. fue de 0.472 correspondiente a 28×10^6 UFC/ml, lo cual se observó a partir de la hora 22. La mínima lectura de la D.O. fue la inicial, correspondiente a la hora 1 alcanzando un valor de 0,166 correspondiente a 42×10^6 UFC/ml.

Entre ambos parámetros existe una relación directa, ya que en el transcurso del tiempo al ir aumentando la D.O., aumenta el número de UFC.

Se pudo visualizar la forma del crecimiento microbiano a través de las curvas de crecimiento. Éstas indican cambios en la población microbiana, y son obtenidas por el recuento expresado en logaritmo en el tiempo. Las diferencias existentes en las curvas de crecimiento bacteriano, depende del medio, temperatura y pH, pero generalmente exhibe algunas formas bajo idénticas condiciones de cultivo. Se evidencia la existencia de cuatro fases principales dentro de una curva de crecimiento bacteriano, estas son: la fase de latencia; la fase de crecimiento; la fase exponencial y la fase de muerte.

Cuando un medio de cultivo líquido es inoculado con bacterias, existe un período de tiempo antes del crecimiento exponencial, el cual es denominado fase de latencia. En ésta, las células aumentan de tamaño como resultado de la acumulación de varios componentes celulares e inducción de enzimas, y tiene lugar antes de la fase de crecimiento exponencial.

La presencia de la fase de latencia y su duración, son dependientes de la naturaleza del cultivo utilizado, como el inóculo empleado y otros factores como el pH, la temperatura y el oxígeno. Posteriormente prosigue una fase de crecimiento exponencial, también denominado como fase de crecimiento logarítmico, en ella la tasa de crecimiento es constante y el logaritmo de células viables comienza una curva lineal durante un cierto período de tiempo.

Seguida la fase anterior, se encuentra la fase estacionaria, en ésta la cantidad de bacterias viables es constante y máxima; en ésta etapa, la tasa de crecimiento se reduce gradualmente debido a que el desarrollo en el ambiente es desfavorable, puesto que existe una deficiencia de oxígeno, un agotamiento de nutrientes requeridos y cambios en el pH.

El crecimiento se reduce en la población y es equilibrada con la muerte, ocurriendo una tasa equivalente, donde el contenido viable que resta no cambia. Por último se encuentra la fase de muerte, en ésta fase las células viables decrecen con el tiempo, debido a que el medio ambiente del cultivo llega a ser cada vez más adverso, las células muertas exceden al contenido de células viables y la tasa de muerte alcanza un valor máximo, resultando en muerte exponencial del cultivo.

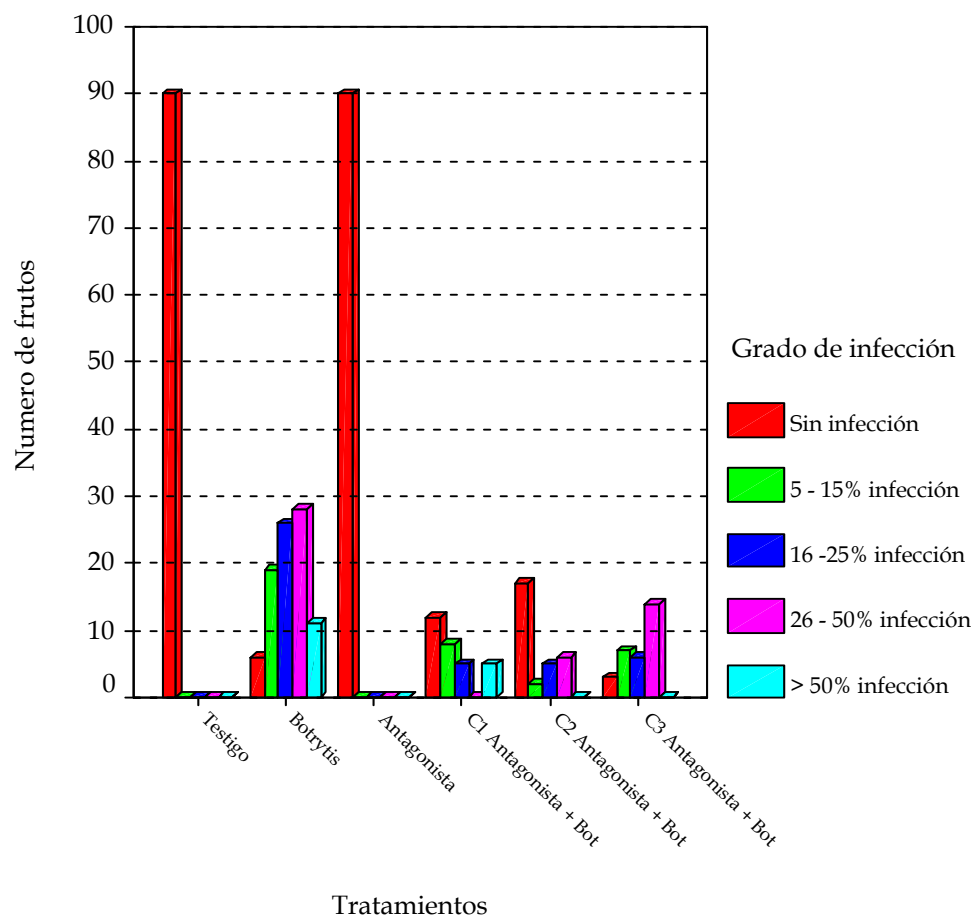
4.8 Ensayos de control biológico de *B. cinerea* bajo condiciones de laboratorio.

Una vez estandarizadas y conocidas las concentraciones tanto del patógeno como del antagonista se realizó el bioensayo, aplicando 77 esporas/cc del patógeno sobre cada fruto que correspondía a la concentración mínima que causaba pudrición gris visible en frutos. Por otra parte, se tomaron tres concentraciones correspondientes a tres puntos de la curva de crecimiento, en la hora 1 (42×10^6 UFC/ml), en la hora 12 (23×10^7 UFC/ml) y en la hora 24 (30×10^7 UFC/ml), debido a que se desconocía en qué momento de la curva de crecimiento se producía la cantidad óptima de metabolitos que fuera capaz de inhibir a *B. cinerea*.

El test de Kruskal-Wallis aplicado para el bioensayo usando tres concentraciones, estableció diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos (concentración uno, concentración 2 y concentración tres del antagonista). La prueba de comparación de medias Scheffé a un nivel de confianza de 95%, en el control de la pudrición, arrojó diferencias entre los tres tratamientos, pero las diferencias más marcadas las arrojó entre los tratamientos dos y tres. Este test, determinó que la concentración 2 (23×10^7 UFC/ml) fue más efectiva en controlar *B. cinerea*, con respecto a las demás concentraciones (Anexo 9).

La Figura 20 muestra gráficamente la capacidad de control del antagonista sobre el desarrollo de *B. cinerea* sobre los frutos, aplicado en sus distintas concentraciones bajo condiciones de laboratorio.

FIGURA 20. Histograma que muestra el efecto de los tratamientos, antagonista a una concentración mínima (42×10^6 UFC/ml), media (23×10^7 UFC/ml) y máxima (30×10^7 UFC/ml) sobre el porcentaje de incidencia de la enfermedad, en frutos evaluados al cuarto día de incubación.



De un total de 360 frutos evaluados, a los que se les aplicó la bacteria antagonista en una concentración de 42×10^6 UFC/ml, correspondiente a la fase de latencia de la curva de crecimiento bacteriano, se logró un 40 % de control del patógeno con 12 frutos completamente sanos, habiéndolos inoculados con una concentración conocida de esporas del hongo. Un 26% de los frutos presentó bajo iguales condiciones 1/8 de su superficie con desarrollo de pudrición gris, 17% con $\frac{1}{2}$ fruto infectado y 17% del total con más de la mitad del fruto

infectado. Probablemente esto se explica por la relación que existe entre las fases de la curva de crecimiento bacteriano y la producción de metabolitos, ya que en los resultados obtenidos con concentraciones del orden de 23×10^7 UFC/ml y que corresponden a la fase de crecimiento de la curva son significativamente efectivos en el control.

Al aplicar 23×10^7 UFC/ml, un 57% de los frutos se presentaron completamente sanos, un 20 % con 1/8 de la superficie del fruto con desarrollo de pudrición, 17% con $\frac{1}{2}$ fruto infectado y un 6% del total de los frutos con más de su mitad infectada.

Se puede señalar, por otra parte, que en este ensayo se presume que el control se debe a un factor de antibiosis, debido que al aplicar el antagonista en su máxima concentración no produce control frente a *B. cinerea*, lo que permite estimar que no existiría competencia entre ambos microorganismos.

Goto (1992), señala que la producción de algunos compuestos naturales, denominados metabolitos es una de las formas de antagonismo, los que impiden el crecimiento del patógeno (antagonismo denominado del tipo actividad antibiótica y lisis).

Al aplicar la bacteria antagonista en una concentración de 30×10^7 UFC/ml, se logró solamente un 10 % de control del patógeno con 3 frutos completamente sanos, 47% de los frutos presentó bajo iguales condiciones de incubación un 1/8 de su superficie con desarrollo de pudrición gris, 20% con $\frac{1}{2}$ fruto infectado y 23% del total con más de la mitad del fruto infectado, lo que significaría que con esta concentración la cepa antagonista no controla en forma significativa a *B. cinerea* y que por otra parte (basándose en la curva de crecimiento), al estar la fase estacionaria de crecimiento, la cantidad de sustancias inhibitorias producidas en este punto serían incapaz de controlar a *B. cinerea* sobre los frutos.

Si tomamos en cuenta las condiciones en las que se desarrolló éste ensayo, en donde los treinta frutos fueron inoculados con *B. cinerea* y colocados en cámara húmeda, se podría esperar un 100% de infección sin control biológico. Sin embargo, los resultados demuestran que más de la mitad de los frutos inoculados se presentaron completamente sanos con aplicaciones de 23×10^7 UFC/ml de la cepa *Stenotrophomonas maltophilia*.

Por otra parte, Brock y Madigan (1993), refiriéndose a la actividad metabólica que presentan las bacterias, describe que existen dos tipos de metabolitos, primarios y secundarios. Entre los primarios se encuentran materiales tales como, alcoholes simples, ácidos aldehídos, dióxido de carbono, hidrógeno, butilos y otros, los cuales son producidos como resultado de la fermentación o metabolismo oxidativo. El nombre de metabolitos secundarios, fue dado a un gran grupo de compuestos naturales que parecen no ser productos de procesos biosintéticos primarios, puesto que, usualmente se tratan de complicadas sustancias químicas, que son producidas en pequeñas cantidades, y a menudo no son evidente función metabólica para el organismo, no están asociados al crecimiento, sino mas bien a la fase estacionaria y muerte. La producción de éstos metabolitos secundarios es de gran significancia práctica, porque antibióticos, pigmentos y una variedad de otros compuestos útiles, son usualmente producidos industrialmente por la acción microbiana.

Bu'lock *et al.* (1982) y Martin y Demain (1980) al respecto señalan que los metabolitos, son generalmente producidos durante la fase de latencia y de crecimiento y durante un breve período de tiempo, ellos son una tasa compleja de compuestos orgánicos, y para su síntesis requieren de la producción de un número de nuevas enzimas

Esto nos permitiría verificar que la cinética de crecimiento que presentó esta cepa bacteriana, logró marcar cada fase de la curva.

Según Wilson y Wisniewski (1989), la producción del antibiótico, parece ser el principal modo de acción de la mayoría de los antagonismos identificados.

Uno de los cambios más visibles en las paredes celulares de las hifas de *B. cinerea*, producida por la antibiosis de *E. Cloacae* (Figura 21), se debe al intenso



Figura 21a. Micelio de 48 horas del hongo *B. cinerea* en presencia de la bacteria *E. cloacae* (antagonismo a 40x de magnificación).



Figura 21b. Micelio de 96 horas del hongo *B. cinerea* en presencia de la bacteria *E. cloacae* (antagonismo a 100x de magnificación).

pardeamiento de la quitina, y el engrosamiento y desintegración de los ápices hifales más expuestos, por lo tanto limita la germinación de las esporas. Lo que contrasta en la Figura 22, donde se muestran hifas de *Botrytis cinerea* sin la bacteria (*E. cloacae*), hifas más delgadas e hialinas.



Figura 22a. Micelio de 48 horas del hongo *B. cinerea* sin presencia de la bacteria *E. cloacae* (antagonismo a 40x de magnificación).



Figura 22b. Micelio de 96 horas del hongo *B. cinerea* sin presencia de la bacteria *E. cloacae* (antagonismo a 100x de magnificación).

En el caso del mecanismo de biocontrol de *Klebsiella movilis*, sobre hongos fitopatógenos no están claros, existen pocos estudio sobre antagonismo bacteriano con *Klebsiella*, perteneciendo a la familia de las enterobacterias, se presume mecanismos similares a los estudiados en bacterias de esta familia, como *E. cloacae*. Figura 23a y b.



Figura 23a. Micelio de 48 horas del hongo *B. cinerea* en presencia de la bacteria *K. movilis* (antagonismo a 100x de magnificación).



Figura 23b. Micelio de 96 horas del hongo *B. cinerea* en presencia de la bacteria *K. movilis* (antagonismo a 40x de magnificación).

La lisis es uno de los mecanismos bacterianos implicados en el biocontrol sobre hongos fitopatógenos. Investigaciones enfocan gran parte de sus estudios en la caracterización de sistemas enzimáticos capaces de degradar los componentes de las paredes celulares de los hongos, del cual las quitinasas son las mas estudiadas. Ciertas razas de *S. maltophilia*, incluyen la producción de antibióticos, actividad de enzimas extracelulares, tales como proteasas, quitinasas y una potencial colonización de la rizósfera (Kobayashi *et al.* 2002). Caracterizaciones químicas y moleculares han revelado que quitinasas similares a otras glicosil hidrolasas, son moduladas en la naturaleza y pueden diferir acorde a su estructura y organización (Kobayashi *et al.* 2002).

5 DISCUSIÓN

Los antecedentes obtenidos en esta investigación sobre el aislamiento de cepas de *B. cinerea*, comprueban claramente que el hongo fitopatógeno está presente en todos los huertos de fresa visitados en la IX Región, tanto en la Provincia de Malleco como Cautín. El agente fue aislado a partir de frutos de fresa, siendo este cultivo uno de los muchos hospederos de este polífago (Agrios, 1996). Los antecedentes de este trabajo permiten confirmar la relevancia de este patógeno, ya que es uno de los principales problemas del sector hortofrutícola, dado que *B. cinerea* o pudrición gris, es la enfermedad más común en frutales, hortalizas y plantas ornamentales. (Silva, 1992; Cruz, 1993; Latorre, 1995; Legart y Mertely, 2000; McMahon *et al.* 2001). Tiene un rango de huéspedes de alrededor de 90 especies, incluyendo malezas como el chamico. (Silva, 1992; Cruz, 1993; Latorre, 1995). Recientemente, (Gioti *et al.* 2006), señalan que *B. cinerea* afecta a más de 200 cultivos de plantas dicotiledóneas y ornamentales, lo que concuerda con lo expuesto por Jarvis (1977) en que señala una lista de 235 hospederos.

Agrios, (1996) corrobora la amplia distribución y lo común de este hongo, siendo un agente necrófago con gran importancia fitopatológica y económica en las zonas templadas y húmedas.

Los mayores problemas causados por *B. cinerea* se deben a pudriciones de pre y postcosecha en frutos de vid, frambueso, fresas, cerezo, cítricos, arándano, castaño, kiwi, moras híbridas y silvestres, grosellas, en cultivos almacenados, transportados y en viveros (Cruz, 1993; Latorre *et al.* 2001; Betanzo, 2005). También provoca pudrición húmeda en corazón de manzanas (Cruz, 1993). En nuestro país la uva de mesa, es un cultivo con más de 50.000 hectáreas plantadas y su principal problema en pre y postcosecha es la pudrición gris causada por *B. cinerea*. (Latorre *et al.* 2001). En hortalizas los problemas más graves debido a *B. cinerea* ocurren en postcosecha, principalmente en zanahoria, coliflor, pepino pimiento, ají, tomate espárrago, y poroto verde (Cruz, 1993).

En la zona centro-sur y sur de Chile, este problema se acentúa en los huertos de berries. Estos frutales menores han tenido un aumento sostenido en la superficie cultivada y en sus exportaciones llegando a superar las 13 mil

hectáreas y con ingresos por concepto de exportación que alcanzan US\$ 2200 millones, que corresponden a un 54% de la fruta que se exporta en fresco y un 46%, de la fruta congelada (MINAGRI, 2006), donde se ha detectado la incidencia de este hongo en huertos de arándanos, frambuesas, fresas, grosellas, moras híbridas y silvestres, y últimamente en vid, limitando su exportación para el consumo en fresco, siendo considerado como uno de los principales hongos fitopatógenos de postcosecha (Silva, 1992; Gioti *et al.* 2006). Probablemente esto se debe a que la mayoría de las pudriciones que ocurren en productos almacenados comienzan en el campo y escapan a la detección, debido a que muchas de esas infecciones son latentes (Ciampi *et al.* 1993).

En la actualidad la mayor parte de las estrategias de control utilizadas hasta el momento se han basado en el empleo de agentes químicos. Sin embargo, la utilización de funguicidas es cada vez menos recomendable y más restringida debido a los problemas de contaminación ambiental que de su aplicación se derivan y por la frecuente aparición de cepas del patógeno resistentes a los funguicidas utilizados (Benito *et al.* 2000).

Las fases de infección de este hongo están dadas fundamentalmente por la adhesión del hospedero y la germinación de las esporas sobre la superficie del hospedero, su posterior penetración en el tejido vegetal, que ocurre a través de heridas o aberturas naturales o por actividad enzimática (Benito *et al.* 2000). El establecimiento del patógeno en la zona de penetración, causa la muerte en la zona adyacente al punto de penetración, dando lugar a una lesión primaria como consecuencia de la expresión de los mecanismos de defensa de la planta. En algunos casos se inicia una fase de latencia, donde los mecanismos de la planta parecen controlar al patógeno que permanece localizado en la zona de necrosis de las lesiones primarias (Villalobos, 2006). Lo que transcurrido un tiempo algunas lesiones primarias, el patógeno es capaz de vencer las barreras defensivas de la planta, iniciando su diseminación en el tejido vegetal, determinando la colonización y la maceración del tejido infectado. Sobre el tejido infectado el patógeno produce una nueva generación de esporas que pueden iniciar un nuevo ciclo de infección (Ciampi, 2002).

Esta investigación tuvo como parte de sus objetivos, aislar agentes biológicos antagonistas que controlen a *B. cinerea*, y que posiblemente se encuentren en determinadas zonas de nuestra región y presentes en la propia microflora del cultivo, seleccionando de diferentes partes de las plantas de fresas (filoplano, rizoplano, rizosfera) y del suelo. La colecta del patógeno y de los antagonistas se realizó en época de verano en los meses de enero y febrero, ya que la producción de fresas en la Novena Región se concentra en estos meses. Los aislamientos efectuados posterior a estas fechas reducen notablemente el porcentaje de antagonistas (Silva, 1992).

Las colectas tanto del patógeno como de los antagonistas se realizaron en las localidades de Angol, Capitán Pastene, Traiguén, Collipulli y Ercilla; Provincia de Malleco; y en Lautaro, Pequenco, Pillanlelbún, Loncoche y Temuco; Provincia de Cautín, esto nos permitió tener un amplio espectro de sectores para aumentar la probabilidad de antagonistas y de un cepario de *B. cinerea*, tal como se aprecia en los Cuadro 1, 2 y 3. Los aislamientos de *B. cinerea* se efectuaron sobre frutos maduros de fresas en la época de mayor abundancia en todo el proceso de muestreo para uniformar la colecta, además el cultivo al estar en época de plena producción y en una época donde las condiciones son más favorables para el ataque de *B. cinerea*. Estas condiciones se presentan en días nublados y con lloviznas, con una humedad relativa alta y con temperaturas moderadas, aumentando la probabilidad de infección en la floración y en los frutos, además del filoplano (Betanzo, 2005). Sus síntomas se observan a principio de primavera, en donde las yemas y los brotes infectados se vuelven marrones, se necrosan y se secan (Pearson y Goheen, 1996; Buzeta, 1997, Ellis, 2001, Drawdy *et al.* 2003). Esto es de suma importancia ya que hay que considerar que la Provincia de Malleco presenta ciertas diferencias climáticas respecto a la Provincia de Cautín, siendo esta última más templada y lluviosa a diferencia de Malleco que presenta un clima más cálido y con menores precipitaciones anuales, existiendo en algunas localidades microclimas (Rouanet *et al.* 1988). La oportunidad de la época de recolección de frutos para realizar los aislamientos, correspondió a los meses de enero y febrero, del 2002, que parecieron ser los más adecuados, puesto que no se presentaron inconvenientes para estos fines, dado que la

temporada fue muy favorable para el desarrollo de hongos debido a las condiciones climáticas imperantes en la temporada. Esto se debió a que en ambos meses se presentaron precipitaciones frecuentes en las áreas muestreadas, aumentando la humedad y temperatura, que son las condiciones favorables para el desarrollo de este hongo.

En este caso en particular no se presentaron dificultades para obtener *B. cinerea* de frutos dispuestos en cámaras húmedas, ya que la frecuencia del hongo fue alta en relación a la cantidad de material colectado en esta época, para este fin. Se logró aislar este hongo de los 10 lugares donde se realizó el muestreo, por medio de la utilización de cámaras húmedas.

Los resultados sobre el aislamiento de *B. cinerea* indican que el hongo está uniformemente en la región ya que se encontró en todos los lugares donde se realizó la colecta. Es un patógeno que al estar presente en frutos su detección no muestra inconvenientes, y que prácticamente es posible y muy fácil de ser aislados en frutos de fresa si se dan las condiciones apropiadas para su desarrollo, y se toman las muestras en la época climática apropiada.

Las diferencias que se presentan entre las cepas de *B. cinerea* son comprensibles, puesto que en la naturaleza existe gran variabilidad en este carácter. Por ejemplo, hay cepas que son más invasoras que otras, en investigaciones sobre este hongo se ha reportado la gran variabilidad genética que presenta *B. cinerea*, donde se incluyen antecedentes sobre aislamientos con formas alteradas de esclerocios, conidias, capacidad metabólica, tipo de crecimiento y otras diferencias genéticas, morfológicas y fisiológicas (Flores, 1992), estas diferencias se deben a la heterocariosis y posiblemente heteroploidia, que produce una alta variabilidad y que se manifiesta como diferencias fenotípicas entre cepas y dentro de una misma cepa (Pollastro *et al.* 1996). Esta característica nuclear es conocida como el factor más importante que influye en la variabilidad natural, sexualidad y conservación de los genes mutantes en hongos.

En relación a la tasa del crecimiento diario del micelio de cepas de *B. cinerea*, se presentó una variabilidad diaria, considerando que se encontraban expuestas a las mismas condiciones de humedad y temperatura. El primer día

todas las cepas tuvieron un crecimiento visiblemente menor que el resto de los días, pero los días dos, tres y cuatro la tasa de crecimiento es variable. Estos antecedentes explican que existe una evidente variabilidad genética en *B. cinerea* (Rebordinos, *et al.* 2000).

El ciclo estacional de la enfermedad comienza con la germinación de los esclerocios que permanecen en los restos de cultivos y plantas hospederas durante el período invernal. Los esclerocios producen micelio, el cual puede esporular originando conidias que son dispersadas por el viento o transportadas por vectores, por lo tanto a partir de esclerocios resulta fácil, a los pocos días de incubación obtener desarrollo de micelio de *B. cinerea* (Agrios, 1996; Betanzo, 2005). Lo cual se confirmó en las pruebas de antagonismo *in vitro*, ya que a partir de los esclerocios extraídos del cepario de *B. cinerea*, fue posible a los tres días de incubación obtener desarrollo de micelio. Estos resultados concuerdan con lo señalado por Herrera y Ulloa, (1990) ya que los esclerocios son estructuras que resisten condiciones desfavorables del medio y están compuestos de una corteza firme, frecuentemente quitinizada y son capaces de germinar y reiniciar un crecimiento vegetativo ya que el esclerocio es un importante estado en el ciclo de vida de las especies de *B. cinerea* (Backhouse y Willets, 1984). Está constituido por filamentos de micelio entrelazado, formando una estructura de consistencia dura de color negro (Molina, 1994; Ellis, 2001; Villalobos, 2006).

Otro análisis para las 30 cepas de *B. cinerea* fue la producción de esclerocios, donde la formación de estas estructuras comenzó al sexto día en la cepa B9, al séptimo en las cepas B19, B24 y B27, al octavo en las cepas B10 y B11, siendo la última en hacerlo la cepa B12 al noveno día. Los esclerocios observados presentaron coloración negra, y estos eran generalmente pequeños, delgados, duros e irregulares, esto concuerda con (Agrios, 1996), quien además señala que en cultivo *in vitro* varias cepas no forman esclerocios, mientras que en otros medios estas estructuras son abundantes. Se puede entonces establecer que la producción, medida y forma de los esclerocios es extremadamente variable en esta especie. Estudios de análisis genéticos demuestran que algunas características del hongo están directamente relacionadas con su grado de patogenicidad (Rebordinos *et al.* 2000; Benito *et al.* 2000) Concretamente, las

cepas que siempre mostraron una morfología tipo, resultaron ser las menos agresivas, mientras que las cepas que producían esclerocios eran las que formaban manchas necróticas de mayor tamaño sobre los frutos.

Por otro lado, las cepas más agresivas presentaban conidias de mayor tamaño que las restantes y las menos infectivas contenían las conidias de menor tamaño.

En relación al número de núcleos en el interior de las conidias de cepas de *B. cinerea*, se ha podido comprobar que las cepas que presentaban un menor número de núcleos, son cepas con menor capacidad infectiva sobre los frutos. Además las cepas más infectivas resultan ser las que presentan un mayor número de núcleos en el interior de sus conidias. Por tanto, se puede afirmar que este es un carácter directamente relacionado con la capacidad infectiva del hongo (Rebordinos *et al.* 2000).

Por lo tanto es recomendable a la luz de los resultados obtenidos en este trabajo analizar a futuro, en mayor profundidad este aspecto de variabilidad de *B. cinerea*, estudiando el comportamiento de un mayor número de cepas. Esto actualmente se sigue estudiando ya que la mayoría de las características citológicas, morfológicas, moleculares o patológicas, son independientes de a) el origen geográfico de las cepas, b) huésped del que fueron aisladas c) año en el que fueron recogidas. La falta de datos de genes implicados en la patogenicidad del hongo sugiere que el control de la fitopatogenicidad en esta especie es extremadamente complejo. Muchos genes podrían estar implicados en la agresividad de cada cepa. Además, muchos otros factores externos podrían provocar algunas variaciones en el fenotipo y enmascarar la variabilidad genética.

Los principales problemas encontrados para desarrollar antagonistas, se debe a la sucesión de la microflora del filoplano para las distintas zonas (Ruíz, 2000). Esta sucesión de la flora microbiana depende de las condiciones climáticas y de los estados fenológicos que determinan diferencias en la microflora epifita dependiendo de las épocas del año. Algunos trabajos señalan que hay una mayor población bacteriana en las épocas de primavera y verano, y que los hongos abundan al final de la temporada. En zonas templadas se ha determinado que al emerger las hojas de los brotes, las bacterias son los únicos colonizadores, esto

se debe a que los niveles de nutrientes son muy bajos y tienen un origen endógeno y exógeno, que incluye una variedad de sustancias de origen orgánico e inorgánico (Ruíz, 2000).

A medida que avanza la temporada, la depositación de restos orgánicos sobre el follaje de las plantas depositadas por insectos como los áfidos u otros del orden homóptera (chanchitos blancos, conchuelas, etc.), aumenta paulatinamente el nivel de nutrientes, el que en un comienzo era sólo aportado por los exudados orgánicos de la planta (Silva, 1992). Además, el filoplano es un hábitat acuoso que constantemente está fluctuando en cantidad y contenido nutritivo. Los nutrientes son liberados en las plantas verdes en forma de exudados foliares, donde se han encontrado ácidos orgánicos, minerales, azúcares, y radicales orgánicos en los exudados foliares (Méndez, 1980). La existencia de pigmentos en los microorganismos epifitos les confiere cierta protección contra las radiaciones ultravioleta, que actúan como germicidas, por lo tanto la mayor frecuencia de estas cromógenas, puedan explicarse como una forma de adaptación. La presencia de esporas, cuerpos fructíferos y micelio pigmentado son beneficiosas en varias formas, los pigmentos carotenoides en ciertos hongos pueden aumentar la tolerancia a la radiación ultravioleta o ser receptores de energía. La melamina se ha estudiado en relación a su función protectora y como fuente de energía, es por ello que en poblaciones de hongos con formas pigmentadas muestran un dominio por sobre las poblaciones apigmentadas (Méndez, 1980; Silva, 1992).

En la mayoría de los hongos, las esporas de estos organismos son depositados en las hojas durante la época de crecimiento, aumentando en el término de la estación, cuando abunda el inóculo en el aire, especialmente después de las lluvias, con el aumento de la humedad se ve favorecida la actividad saprofítica (Agrios, 1996).

Este patógeno produce abundante micelio y varios conidióforos largos y ramificados, cuyas células apicales producen los racimos de conidias que se asemejan a un racimo de uvas. Su germinación depende significativamente de la temperatura y del tiempo de incubación (Latorre y Rioja, 2001). *B. cinerea* libera

fácilmente sus conidios cuando se presentan las condiciones apropiadas (Agrios, 1996).

Trabajos realizados sobre control biológico con agentes antagonistas, señalan que es probable obtener éxito a nivel de campo cuando se incrementa artificialmente las poblaciones de antagonistas específicas. Uno de los ejemplos es la selección de bacterias bioantagonistas sobre el control de *R. solani* en tomate, donde se consideró el efecto directo sobre el desarrollo del patógeno, además de tomar en cuenta las condiciones donde el bioantagonista se desarrolla, como por ejemplo, la salinidad y el pH de los suelos, la temperatura, entre otras (Montealegre *et al.* 2003).

Los hongos filamentosos son más útiles como agentes biocontroladores sobre material senescente, previniendo el establecimiento de patógenos que son capaces de dispersarse o propagarse hacia partes sanas de la planta, ya sea por invasión directa o indirecta de los tejidos, por formación de esporas que se dispersan a otros follajes de la planta (Silva, 1992).

Existen también antecedentes de control biológico de *B. cinerea* mediante el hongo antagonístico *Trichoderma harzianum*, aplicado sobre flores de manzano (Cruz, 1993) estas investigaciones pueden conducir a efectivos métodos de control integrado. Silva, (1992) señala que *T. viride*, coloniza la base nutritiva proporcionada por las partes florales senescentes, limitando así, el establecimiento saprofítico inicial de *B. cinerea*. Existiendo otras especies de *Trichoderma* asociadas como los *T. Logibrachiatum* y *T. Harzianum* (COO-FIA, 2005).

Para establecer estrategias de control de *B. cinerea* con inoculantes biológicos apropiados, ya sea en flores de frambuesas o fresas u otros cultivos, es imprescindible muestrear en todo el periodo de producción y en las distintas zonas para obtener los antagonistas en las distintas etapas fenológicas durante el periodo de susceptibilidad del hospedero.

En consecuencia a lo expuesto, se puede mencionar que a fin de diseñar estrategias de control de *B. cinerea*, con inoculantes biológicos adecuados, ya sea para el caso de las fresas, frambuesos o arándanos u otros cultivos hospederos, se deben obtener antagonistas de agentes fitopatógenos haciéndose necesario

efectuar un gran número de aislamientos y de ensayos de antagonismos *in vitro*, el número de aislamientos microbianos requeridos para detectar agentes antagonistas seleccionados en este trabajo, es comparable con trabajos relacionados con la obtención de antagonistas para el control de *B. cinerea* (Roberts, 1990, Silva, 1992, Flores, 1992).

Las pruebas de antagonismo *in vitro* realizadas en el presente estudio entre cepas bacterianas aisladas y el hongo *B. cinerea* se aplicó un criterio de selección preliminar basado en características visuales. Por lo tanto los estudios se realizaron con colonias bacterianas que presentan características morfológicas destacables, como la forma de la colonia, textura y coloración, esto dado a la baja frecuencia de antagonistas pertenecientes a otros grupos de agentes microbianos, tales como levaduras y hongos, obtenidos en los aislamientos, los esfuerzos se dirigieron a la obtención de antagonistas bacterianos.

En este trabajo la selección de los antagonistas se basó en la inhibición del patógeno sobre agar PDA en placa Petri, es importante señalar que otras formas de antagonismo, distinta a la antibiosis no se manifiestan en los ensayos *in vitro*, por la competencia de nutrientes entre los microorganismos que habitan el filoplano.

Con levaduras se han reportado buenos resultados por la competencia de nutrientes con *B. cinerea*, previniendo las infecciones que el patógeno produce en sus hospederos (Roberts, 1990). Estos antecedentes no sólo entregan evidencias sobre el control de *B. cinerea* y otros agentes fitopatógenos.

En frutos como peras y manzanas se deben principalmente a las condiciones nutritivas favorables en la superficie del hospedero, lo que se conoce en manzana como pudrición húmeda en corazón del fruto (Cruz, 1993).

En este trabajo, de evaluación *in vitro* no es fácil determinar una mayor cantidad de potenciales agentes antagonistas dada la diferente infección de *B. cinerea* sobre frutos de fresa. En estudios realizados en esta área, donde se trabajó con un tipo de infección y de hospedero diferente, las pudriciones de los frutos en postcosecha, se deben principalmente a condiciones nutritivas favorables en la superficie del hospedero, dada además la madurez de estos que deja más expuestos los tejidos internos por las heridas provocadas, por lo tanto el

origen de la infección es externo. La mayoría de las infecciones en frutas y hortalizas almacenadas ocurren por medio de las heridas, y para poder contrarrestar a los patógenos se debe aplicar antagonistas efectivos que sean capaces de colonizar las heridas e inhibirlos. Las infecciones latentes y los patógenos que infectan a través de las lenticelas pueden ser más difíciles de controlar, biológicamente, ya que requieren del uso de antagonistas o de productos de ellos que sean capaces de invadir o habitar los tejidos internos del hospedero. Esta realidad es aplicable a todos los berries y probablemente otros frutos como las uvas. En el caso de las fresas está demostrado que la infección de *B. cinerea* es endógena o asintomática, lo que se debe principalmente a que cuando los brotes florales se abren, la planta queda expuesta a la infección latente de los frutos, ya que los estambres y estigma quedan expuestos al contacto con las conidias del hongo, que son dispersadas por el viento o por vectores.

Por lo tanto la recomendación para controlar *in vivo* a *B. cinerea*, se debe orientar a la aplicación en la floración del cultivo, donde se eleva la infección endógena.

Las diferencias observadas entre los agentes antagonistas, se realizó principalmente observando el halo de inhibición de los aislamientos de *B. cinerea* que mostraron susceptibilidad frente a los antagonistas. Estas diferencias observadas entre las cepas antagonistas no son elementos que permitan descartar una de ellas, ya que ambos antagonistas pueden controlar a todas las cepas de *B. cinerea*, a pesar de la variabilidad del hongo que pudiese existir a nivel de cepas. Todos los aislamientos de *B. cinerea* se mostraron susceptibles frente a los antagonistas, mostrando diferentes halos de inhibición, de los 12 agentes antagonistas se seleccionaron cinco bacterias que presentaban los mayores halos de inhibición, las diferencias entre los halos de inhibición se podrían deber principalmente a las condiciones experimentales, como por ejemplo el espesor del medio de cultivo y la cantidad de inóculo de los antagonistas.

El antagonismo positivo que presentaron las bacterias evaluadas contra *B. cinerea* provenientes de las distintas localidades, eran prometedores ya que la

variabilidad genética del patógeno no pareció mostrar diferencias en la susceptibilidad del mismo frente a la antibiosis de las bacterias, ya que se da el caso que bacterias fitopatógenas inhiben determinadas cepas de *B. cinerea*, pero no inhiben a otras cepas de distintas zonas. Esto se debe principalmente a los factores de patogenicidad del patógeno (*B. cinerea*).

Los resultados de los ensayos *in vitro* sustentan el control de *B. cinerea*, por medio de los agentes antagonistas *E. cloacae*, *S. maltophilia* y *K. movilis*. Sin embargo es prematuro concluir que a partir de estos estudios realizados con estos agentes, hasta que no sean evaluados *in vivo*, sin duda abren una posibilidad cierta sobre el control biológico de *B. cinerea*, para la región y los agentes involucrados.

Uno de los casos exitosos de antagonismo, es la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, la cual inhibe a *Gaeumanomices graminis* en trigo, esta bacteria produce metabolitos altamente activos denominados ácido phenazine-1-carboxilic y ácido antranílico (Thomashow y Weller, 1990). En hongos antagonistas se da una situación similar como es el caso de *Gliocladium virens*, es un antagonista importante de fitopatógenos de suelo, tales como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* y *Pythium ultimum* (Roberts y Lumsden, 1990), demostrando que extractos de cultivos líquidos de este hongo eran inhibitorios para el crecimiento de *Pythium ultimum*, debido a un compuesto activo llamado gliotoxina. Sin ir más lejos este mismo género (*Gliocladium roseum*) ha sido estudiado para el control de *B. cinerea* en fresa, presentando excelentes resultados en pruebas *in vitro* lo que también se corroboró en campo (Chávez y Wang, 2004). Una situación similar se produce con el hongo *Laetisaria arvalis*, que inhibe a *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* y *Phoma betae*, tanto en laboratorio como en el campo, por la acción de una sustancia inhibitoria denominada ácido 8-hydroxyocta deca-9(Z), 12-(Z)-dienoic o simplemente ácido laetisárico (Bowers *et al.* 1986). Otros antecedentes del control de *B. cinerea* por antagonismo por bacterias del género *Pseudomonas*, a través de un compuesto antifúngico, que corresponde al antibiótico pirrolnitrina, el que aplicado a una dosis mínima de 10mg/l otorgó protección total de *B. cinerea* en peras y manzanas (Silva, 1992).

Subsecuentemente sigue la etapa de filtrado de las sustancias inhibitorias producidas por los agentes antagonistas. Los extractos de cultivos o filtrados libre de células, se realizan para determinar la antibiosis en el control biológico, estas metodologías permiten demostrar estas propiedades en los agentes bacterianos antagonistas, por lo demás en filtrados que se sometieron a temperaturas elevadas, no se produjeron cambios visibles en el proceso de inhibición, que se pudiesen atribuir a las elevadas temperaturas. Demostrando así que las sustancias inhibitorias no sufrirían cambios aparentes, pudiéndose afirmar que presenta un cierto grado de estabilidad térmica.

En filtrados con otras especies antagonistas como *P. aeruginosa*, la biosíntesis de metabolitos va a depender significativamente dependiendo del medio de cultivo que se esté utilizando, además de la concentración de Fe para la producción de sideróforos por parte de *P. aeruginosa*, cuando este elemento se eleva provoca una disminución en la concentración de sideróforos, lo que permitió concluir en las etapas de filtrado que el aumento de la producción de este metabolito se incrementa utilizando un medio glutámico sin hierro (Díaz *et al.* 2002).

Trabajos sobre la patogenicidad de *B. cinerea*, muestran que existen diferencias morfológicas claras entre las distintas cepas, estableciéndose relaciones directas entre la producción de esclerocios y la patogenicidad. El tamaño de los conidios y el número de núcleos por conidio fueron características muy variables entre las cepas (Rebordinos *et al.* 2000). Desde principios de siglo se ha conocido la capacidad de *B. cinerea* para producir enzimas pectinolíticas que maceran la pared celular por la disolución de la lamela media (Tortora, 1993)

Uno de los mecanismos y modos acción de *B. cinerea* es que este hongo secreta un gran número de enzimas degradativas de la pared celular durante el proceso de infección. Las celulasas catalizan la degradación de la β - 1,4 unidos en el polímero celulosa, y tres tipos son distinguidos por su modo de acción: las endo β -1,4 glucanasa, las cuales internamente dividen uniones glicosídicas, obteniéndose cadenas cortas de polisacáridos, cillobiohidrolasas; exo β - 1,4 glucanasas, que liberan sucesivas unidades de glucosa desde el polímero final; β glucosidasas, completan los procesos de hidrólisis de celulosa a glucosa. El rol

extracelular de la endo β - 1,4 glucanasas en la potogenesis de *B. cinerea* es un principal y crucial componente en el sistema de degradación, desde entonces es generado por polímeros que finalmente pueden ser usados como sustrato por otras enzimas (Espino *et al.* 2005).

El antagonismo, está directamente relacionado dentro del control biológico, el cual incluye tres tipos de actividades: a) antibiosis y lisis, b) competencia y c) parasitismo y predación. La producción de algunos compuestos naturales, denominados metabolitos es una de las formas de antagonismo, los cuales impiden el crecimiento del patógeno (antagonismo denominado del tipo de actividad antibiótica y lisis).

Existen dos tipos de metabolitos, primarios y secundarios, entre los primarios se encuentran materiales tales como, alcoholes simples, ácidos aldehídos, dióxido de carbono, hidrógeno, butilos y otros, los cuales son producidos como resultado de la fermentación o metabolismo oxidativo.

El nombre de metabolitos secundarios, fue dado a un gran grupo de compuestos naturales que parecen no ser productos de procesos biosintéticos primarios, puesto que, usualmente se tratan de complicadas sustancias químicas, que son producidas en pequeñas cantidades, y a menudo no son evidente función metabólica para el organismo, no están asociados al crecimiento, sino mas bien a la fase estacionaria y muerte. La producción de estos metabolitos secundarios es de gran significancia práctica, porque antibióticos, pigmentos y una variedad de otros compuestos útiles, son usualmente producidos industrialmente por la acción microbiana. Dentro de los metabolitos producidos en el mecanismo de antibiosis, se ha detectado la producción en forma natural de concentraciones de graminicidim en diferentes aislados de *Bacillus*, teniendo una fuerte actividad antagonista contra conidias y micelios de *B. cinerea* (Walker *et al.* 1998).

Se ha reportado la producción de metabolitos antagonistas como butyrolactones, 2,4-diacetyl phloroglucinol (Ph1), kanosamine, oligomycin A, oomucin A, phenazine-1-carboxylic acid (PCA), pyoluterin, entre otros, todos producidos por bacterias in vitro que pueden tener actividad in vivo, en algunas razas de *Pseudomonas* (Whipps, J. 2001).

Los metabolitos, son generalmente producidos durante la fase de latencia y de crecimiento y durante un breve período de tiempo, ellos son una tasa compleja de compuestos orgánicos, y para su síntesis requieren de la producción de un número de nuevas enzimas (Brock y Madigan, 1993).

En el caso de *Enterobacter cloacae* uno de los mecanismos de acción encontrados sería la producción de metabolitos de sideróforos hidroxamate y diferentes volátiles y no volátiles antagonistas. Además la competición por nutrientes y la habilidad de colonización de la rizosfera, eran consideradas como posibles mecanismos.

La actividad quitinolítica de estas bacterias son restringidas a una sola raza de *Enterobacter cloacae*, siendo de gran importancia ya que muchas paredes de hongos están constituidas por un polímero lineal insoluble (quitina), de N-acetylglucosomina, en una ligación β -1,4, como constituyente estructural, evidencia de estas enzimas quitinolíticas son las responsables de la degradación de las paredes celulares de las hifas de los hongos (Chernim *et al.* 1995), como se aprecia en la Figura 21 a y b.

En el caso de *B. cinerea* (Silva, 1992), explica que ciertas razas de estas cepas bacterianas pueden liberar dosis subletales de metabolitos fungitóxicos, permitiendo así activar un sistema de defensa del hongo fitopatógeno, lo que conlleva no sólo la biosíntesis de enzimas sino que además aumenta la esporulación y la formación de esclerocios, como una forma de sobrevivencia, en condiciones de adversidad. Sin duda esto es un parámetro a considerar en la selección de los futuros agentes biocontroladores en un proceso industrial más avanzado, ya que se debe considerar la eficacia del producto, modo de acción, formulación y aplicación del producto, para que sea atractivo para el productor.

En esta investigación las tres bacterias antagonistas fueron aisladas del filoplano, del cultivo de fresa, que corresponde al mismo hospedero del patógeno que se quería eliminar y que forman parte de la microflora epífita nativa entre la cual probablemente se encuentran microorganismos saprófitos y otros patógenos en estado inactivo o en fase saprofítica, de acuerdo con referencias en relación a la flora bacteriana de las superficies foliares. En las pruebas de inoculación de los antagonistas sobre rodajas de papa para observar la capacidad de agredir tejidos

vegetales, las bacterias, dieron lugar a pudriciones, lo que implicaría que son capaces de producir pectinasas o bien simplemente hidrolizar almidón (la prueba de hidrólisis del almidón, resultó positiva para las cepas, pero no necesariamente que sean patógenas). El rol de las enzimas pectolíticas en la patogénesis es complejo y no necesariamente determinante de la enfermedad, por varios factores. En primer lugar estas enzimas son producidas por muchos organismos, los cuales no todos son patógenos; además, su producción es más importante en la fase saprofítica o comensal en algunos patógenos (y no tanto en la fase patogénica), y operan sólo como un componente dentro del complejo de factores de la enfermedad, durante la patogénesis; por último, recientes investigaciones indican que las enzimas en cuestión tienen múltiples efectos en los tejidos del hospedero, no todos favorables al patógeno.

Por otra parte, no existen antecedentes de problemas fitosanitarios, causados por estos géneros bacterianos en fresa; y en el caso de otros hospederos como *Solanum tuberosum*, la presencia de *bacillus* en pudriciones de tubérculos se ha encontrado asociada a la patogénesis de *Erwinia* y *Pseudomonas* y en la cual las especies de *bacillus* no serían agentes patógenos *per se*, sino que actuarían como oportunistas capaces de ocupar lugares en los nichos degradativos resultantes de la actividad de las verdaderas bacterias patógenas que inician el proceso.

De modo que en base a estos antecedentes y considerando que en las aspersiones sobre las frutas en los ensayos en laboratorio, no se observaron síntomas de toxicidad o efectos perjudiciales en el hospedero, se puede concluir que las cepas antagonistas estudiadas no son organismos patógenos para la frutilla y probablemente se trata de bacterias saprofíticas, residentes comunes del filoplano.

El procedimiento analizado en este estudio muestra que el método de inoculación en frutos con una suspensión bacteriana, no provoca en general alteración de tejidos de los frutos inoculados. Esto podría deberse a varios posibles factores. En primer lugar a pesar que los frutos de fresa en estas condiciones, están esterilizados superficialmente, no son absolutamente estériles, y puede activar bacterias que estén latentes y que penetraron al fruto al estado

de flor. Otra posibilidad es que bacterias latentes en el interior del fruto tengan una acción sinérgica con las que se utilizan para estas pruebas, y por último que la pudrición es producida por las mismas bacterias aplicadas. Idealmente se debería contar para estas pruebas con frutos absolutamente libres de microorganismos, lo que no fue posible en el presente ensayo.

Los resultados obtenidos estarían indicando que la bacteria *S. maltophilia* se presenta con buenas posibilidades para estudios posteriores como controlador biológico ya que no produce alteraciones en los frutos de fresa.

Sin embargo, para su eventual uso se requiere de evaluaciones previas más precisas, para determinar posibles riesgos principalmente en otros cultivos.

Se describió por primera vez, en el año 1960 a *Stenotrophomonas maltophilia*, la que en un principio se denominó *Pseudomonas maltophilia*, posteriormente *Xantomonas malthophilia* y, por último, *Stenotrophomonas maltophilia*. Es un bacilo, aerobio, gram negativo y su medio ambiente está comunmente asociado a la rizósfera (Bollet *et al.* 1995).

Palleroni (1984), al respecto de esta bacteria señala que se denomina a la especie como *maltophilia*, lo que quiere decir amiga de la malta, porque crece favorablemente en medios que contengan como nutrientes malta. Señala que forman colonias de color amarillo y que en forma individual o en pares miden entre 0.5 x 1.5 μm . No se desarrolla con temperaturas menores a 4°C. o superiores a 41°C., y que para su crecimiento requiere de aminoácidos específicos como metionina y cisteína. Bello, (2002) realizó control biológico sobre semillas que eran afectadas por *Fusarium graminearum*, hongo que causaba damping-off en cereales, reduciendo de una manera significativa su germinación. Para controlar esta enfermedad usó tres agentes antagonistas, y *S. maltophilia* fue quien logró disminuir significativamente la presencia de *Fusarium*.

S. maltophilia es un agente asociado tanto al filoplano como a la rizósfera y es una especie de potencial importancia agronómica (Dunne *et al.* 1997; Giesler, *et al.* 1998), esta bacteria se asocia con un mecanismo de biocontrol que incluye la producción de antibióticos, actividad de enzimas extracelulares tales como proteasas y quitinasas, además de la potencial colonización de la rizosfera (Kobayashi *et al.* 2002).

Por otro lado, Dunne *et al.* (1998), realizaron control biológico *in vitro* sobre *P. ultimum*, aplicando *P. fluorescens* y *S. maltophilia*, estudio que entregó resultados positivos aplicando ambas cepas.

En este ensayo la reactivación de *S. maltophilia*, se obtuvo a las 24 horas de incubación a una temperatura de 25°C.

En relación a la temperatura Brock y Madigan (1993), afirman que la temperatura de crecimiento, es uno de los factores ambientales mas importantes, que afectan el crecimiento y sobrevivencia de cualquier especie bacteriana, debido a que con el ascenso de la temperatura, las reacciones químicas y enzimáticas, en la célula, pueden presentar una tasa más rápida y el crecimiento llega a ser más seguro, además de que proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares son sensibles a las altas temperaturas y pueden ser inactivados irreversiblemente.

Entre los aspectos que deben ser considerados, durante el crecimiento de cualquier especie bacteriana se encuentran la temperatura, el pH y el requerimiento de oxígeno. Por otra parte, proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares son sensibles a las altas temperaturas y pueden ser inactivados irreversiblemente (Brock y Madigan, 1993).

En estudios realizados por Ortega (1998), con distintas cepas bacterianas logró obtener crecimiento bacteriano en placas con medio de cultivo a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, lo que nos permite afirmar que la metodología aplicada para la reactivación de la cepa resultó la más adecuada.

Las bacterias se clasifican en relación al rango de crecimiento de los distintos géneros sobre la base del rango de temperaturas de crecimiento de las bacterias, se dividen frecuentemente en tres grupos, en primer lugar aquellas que pueden crecer a valores bajos. Existen dos formas, la psicrófila obligada, que crece con temperaturas cercanas a 0°C, óptima 15°C, máxima 20°C y la psicrótrofa las cuales aunque crecen cerca de 0°C, su temperatura óptima es de 25 a 30°C y una máxima de 35°C. En el segundo grupo están las mesófilas que crecen entre los 25 a 45°C como máxima y como mínima cercana a los 0°C de temperatura, bajo el cual el crecimiento es prácticamente nulo. Por último, el

tercer grupo está formado por las termófilas que crecen entre los 45 a 55°C de temperatura (Stanier, 1976).

Según Palleroni (1984), *S. maltophilia* es una bacteria que se desarrolla adecuadamente entre los 25 a 30°C. Esto corrobora que las condiciones de temperatura a la cual fue sometida la cepa bacteriana para su reactivación está correcta, por tratarse de una bacteria mesófila.

Poner en marcha prácticas agronómicas tendientes a producir en Chile alimentos sanos, libres de residuos de plaguicidas y que no contaminen el medio ambiente, representa hoy un gran desafío para el sector agrario del país. Desarrollar un sistema de producción integral que se base en el respeto por los ecosistemas naturales conlleva una serie de interrogantes e inquietudes para quienes lo asumen como objetivo. En el tema del control de enfermedades, la oferta de información destinada a sistemas productivos convencionales es bastante completa. Sin embargo, cuando se trata de acceder a alternativas de manejo para la agricultura sustentable y limpia, la información es escasa y no suficientemente clara.

En el grupo de las *Pseudomonas* (bastones o coco Gram negativos aeróbicos) se ubican tres familias de importancia agronómica. Dentro de esta familia se encuentran los géneros *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Xanthomonas*, que poseen representantes que son fitopatógenos. El género *Xanthomonas*, se caracteriza por ser oxidasa (-) o débil; catalasa (+); presenta xantomonadina (xantano), que es un heteropolisacárido que le da un color amarillento a las colonias. Por otra parte bacterias antagonistas a *B. cinerea* corresponden a las familias de las Enterobacteriaceae (bastones Gram negativos facultativamente anaeróbicos, que viven en el interior del tracto digestivo del hombre y animales). Dentro de la familia existen representantes móviles por flagelos peritricos, pero también existen representantes inmóviles, también existen representantes que poseen cápsulas, pero también hay no capsulados. No forman esporas ni son ácido resistentes. Son quimiorganotróficos, aeróbicos o facultativamente anaeróbicos. Son catalasa (+) y oxidasa (-).

Entre los géneros de importancia económica que producen enfermedades en el hombre se encuentran *Escherichia* (se encuentra en el intestino y pueden

tener flagelos peritricos o ser inmóviles son oxidasa (-), citrato (-) y fermentación de la glucosa y carbohidratos (+); *Salmonella* (movil por flagelos peritricos, produce gas a partir de glucosa, usualmente citrato (+)); *Shigella* (se encuentra en el intestino), *Klebsiella* (no movil, capsulada, oxidasa (-)); *Proteus* y *Yersinia* (no poseen como hábitat el intestino pero se parecen a *Escherichia coli*). Estimo que la importancia que esta metodología tiene en la evaluación del posible daño causado por bacterias que actúan como controladores biológicos es un aspecto que deberá ser profundizado en futuras investigaciones.

Considerando la importancia de este tema para el adecuado desarrollo de la agricultura orgánica en Chile, se estimó oportuno impulsar la realización de esta investigación mediante la selección de microorganismos antagonistas a *B. cinerea* en la microflora propia del cultivo, durante la temporada 2002. Así fué seleccionada la bacteria (*Stenotrophomonas maltophilia*) y que dió origen al ensayo de control biológico, *in vitro*, de la presente investigación, lo cual nos permitió descartar estudios en enterobacterias.

Cabe señalar que resulta relevante estandarizar la concentración de conidias de *B. cinerea* que se aplica sobre el fruto, ya que ello permitiría conocer el número de conidias/cc que se inoculan sobre éste además de conocer la mínima cantidad de dichas conidias que sería capaz de causar pudrición visible del moho gris, afectando en este caso un 25% de la superficie del fruto.

En estudios de control biológico de *B. cinerea*, realizados por Flores, (1992) en condiciones *in vitro* con frutos de frambuesa, se aplicó el patógeno sobre los frutos con la ayuda de un pincel. Sus resultados confirmaron que cierta bacteria era capaz de controlar a *B. cinerea*, pero no queda claro sobre que cantidad de inóculo del patógeno ya que se desconocía la cantidad de conidias maduras que se presentaban sobre los frutos. Por lo tanto, de esa forma no sería posible determinar que cantidad de conidias de *B. cinerea* está controlando al antagonista, que en ese caso fue una cepa de *Pseudomonas fluorescens*.

Por otra parte, el conocer el número de conidias/cc de *B. cinerea* que se aplicó sobre los frutos, nos permitió asegurar la presencia de este patógeno sobre los frutos.

En cuanto a la efectividad de las bacterias (cepas), antagonistas en controlar a *B. cinerea in vivo*, los resultados de un estudio desarrollado por Silva (1992) demuestran que ello es posible, a pesar de la notable diferencia entre los resultados de los ensayos bajo condiciones de campo y bajo condiciones de invernadero. El ensayo en campo, mostró una pobre acción de los tratamientos con los antagonistas sobre la incidencia de pudrición gris en postcosecha se explicaría como consecuencia de una baja concentración de los inoculantes antagonistas ($10^5 - 10^6$ UFC/ml) en relación a lo que probablemente se requería, toda vez que los factores ambientales de radiación solar, temperatura, humedad, etc., tienen gran importancia en la sobrevivencia y actividad de los microorganismos en el filoplan (Windels y Lindow, 1985). Ejemplos de aplicaciones de antagonistas, *in vivo*, donde se han utilizado concentraciones bacterianas del orden de 10^7 y 10^8 UFC/ml., que logran ejercer algún control de los patógenos.

En este caso de un total de 360 frutos evaluados, a los que se les aplicó la bacteria antagonista en una concentración de 42×10^6 UFC/ml, correspondiente a la fase de latencia de la curva de crecimiento bacteriano, se logró un 40 % de control del patógeno con 12 frutos completamente sanos, habiéndolos inoculados con una concentración conocida de esporas del hongo. Un 26% de los frutos presentó bajo iguales condiciones 1/8 de su superficie con desarrollo de pudrición gris, 17% con ½ fruto infectado y 17% del total con más de la mitad del fruto infectado. Esto se explicaría por la relación que existe entre las fases de la curva de crecimiento bacteriano y la producción de metabolitos, ya que en los resultados obtenidos con concentraciones del orden de 23×10^7 UFC/ml, y que corresponden a la fase de crecimiento de la curva son significativamente efectivos en el control.

Al aplicar 23×10^7 UFC/ml, un 57% de los frutos se presentaron completamente sanos, un 20 % con 1/8 de la superficie del fruto con desarrollo de pudrición, 17% con ½ fruto infectado y un 6% del total de los frutos con más de su mitad infectada.

Podemos señalar por otra parte que en este ensayo se presume que el control se debe a un factor de antibiosis, debido a que al aplicar el antagonista en

su máxima concentración no produce control frente a *B. cinerea*, lo que permite estimar que no existiría competencia entre ambos microorganismos.

Goto (1992), señala que la forma de visualizar el crecimiento microbiano es a través de las curvas de crecimiento. Estas indican cambios en la población microbiana, y generalmente son obtenidas por el recuento expresado en logaritmo en el tiempo. Las diferencias existentes en las curvas de crecimiento bacteriano, depende del medio, temperatura y pH. Cuando un medio de cultivo líquido es inoculado con bacterias, existe un período de tiempo antes del crecimiento exponencial, el cual es denominado fase de latencia. En ésta, las células aumentan de tamaño como resultado de la acumulación de varios componentes celulares e inducción de enzimas, y tiene lugar antes de la fase de crecimiento exponencial. La presencia de la fase de latencia y su duración, son dependientes de la naturaleza del cultivo utilizado, como el inóculo empleado y otros factores como el pH, la temperatura y el oxígeno. Posteriormente prosigue una fase de crecimiento exponencial, también denominado como fase de crecimiento logarítmico, en ella la tasa de crecimiento es constante y el logaritmo de células viables comienza una curva lineal durante un cierto período de tiempo. Seguida la fase anterior, se encuentra la fase estacionaria, en ésta la cantidad de bacterias viables es constante y máxima; en esta etapa, la tasa de crecimiento se reduce gradualmente debido a que el desarrollo en el ambiente es desfavorable, puesto que existe una deficiencia de oxígeno, un agotamiento de nutrientes requeridos y cambios en el pH. El crecimiento se reduce en la población y es equilibrada con la muerte, ocurriendo una tasa equivalente, donde el contenido viable que resta no cambia. Por último, se encuentra la fase de muerte. En ésta fase, las células viables decrecen con el tiempo debido a que el medio ambiente del cultivo llega a ser cada vez más adverso, las células muertas exceden al contenido de células viables y la tasa de muerte alcanza un valor máximo, resultando en muerte exponencial del cultivo (Goto, 1992).

El hecho de que en la curva de crecimiento obtenida en este trabajo existan sucesivos incrementos y reducción en los recuentos celulares, podría relacionarse con la capacidad de crecimiento de la cepa bacteriana. Esto le permite desarrollarse en su forma vegetativa en condiciones óptimas de

crecimiento y, en caso contrario, le proporciona capacidad de adaptarse a condiciones adversas o de estrés durante su desarrollo.

Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Ortega (1998), trabajando con tres cepas bacterianas antagonistas en donde una característica general de las tres cepas y en cada uno de los caldos de cultivo estudiados en esta investigación, fue que presentaran el mismo tipo de curva durante la fase de crecimiento.

Por otra parte, Brock y Madigan (1993), refiriéndose a la actividad metabólica que presentan las bacterias, describe que existen dos tipos de metabolitos, primarios y secundarios, entre los primarios se encuentran materiales tales como, alcoholes simples, ácidos aldehídos, dióxido de carbono, hidrógeno, butilos y otros, los cuales son producidos como resultado de la fermentación o metabolismo oxidativo. El nombre de metabolitos secundarios, fue dado a un gran grupo de compuestos naturales que parecen no ser productos de procesos biosintéticos primarios, puesto que, usualmente se tratan de complicadas sustancias químicas, que son producidas en pequeñas cantidades, y a menudo no son evidente función metabólica para el organismo, no están asociados al crecimiento, sino mas bien a la fase estacionaria y muerte. La producción de éstos metabolitos secundarios es de gran significancia práctica, porque antibióticos, pigmentos y una variedad de otros compuestos útiles, son usualmente producidos industrialmente por la acción microbiana.

Al analizar la Figura 26 que muestra la gráfica de crecimiento de la cepa bacteriana y basándose en la descripción de las etapas de la curva de crecimiento bacteriano, la concentración aplicada en este estudio, correspondería a la fase de crecimiento, en donde se presume que se estarían produciendo la mayor cantidad de sustancias inhibitorias.

Esto permitiría verificar que la cinética de crecimiento que presentó esta cepa bacteriana, logró marcar cada fase de la curva.

De la la Figura 27 se puede apreciar claramente el comportamiento del antagonista aplicado en sus distintas concentraciones frente al patógeno, comparando las concentraciones de antagonista aplicadas frente al testigo.

Estadísticamente existen diferencias significativas entre las concentraciones aplicadas.

Si tomamos en cuenta las condiciones en las que se desarrolló éste ensayo, en donde treinta frutos fueron inoculados con *B. cinerea* y colocados en cámara húmeda, se podría esperar un 100% de infección sin control biológico. Sin embargo, los resultados demuestran que más de la mitad de los frutos inoculados se presentaron completamente sanos con aplicaciones de 23×10^7 UFC/ml de la cepa *S. maltophilia*.

De lo anterior se destaca la posibilidad de utilización de una concentración del antagonista, equivalente a la fase de crecimiento de la curva, ya que cuando ésta cepa bacteriana se encuentra en su fase estacionaria y muerte, el control no es efectivo debido a que durante éstas fases la producción de metabolitos comienza a decaer, de acuerdo a lo señalado por (Brock y Madigan, 1993).

Del antagonismo ejercido por la cepa bacteriana *S. maltophilia* contra *B. cinerea*, resulta interesante destacar que éste microorganismo es propio de la microflora del cultivo de fresa, que fue aislado a partir del filoplano. Por tanto esta bacteria es un potencial controlador biológico de *B. cinerea*. Esto concuerda con lo señalado por los autores Burr *et al.* (1978); Kloepper *et al.* (1980); Kloepper (1983); Xu y Gross (1986); Rhodes y Logan (1987); Liao (1989), ya que entre los grupos de microorganismos con potencial para el control biológico, se mencionan los géneros *Pseudomonas* spp.

El gran interés de los científicos en el control biológico de patógenos vegetales es la respuesta, en parte, a la gran preocupación existente en relación con el extensivo uso de los pesticidas químicos, como así también la disponibilidad de nuevas herramientas de biotecnología, las cuales son aplicables a microorganismos (Cooch, 1993).

La fresa es una fruta de distribución mundial muy apreciada para consumo en fresco y para la elaboración de postre, debido a su color aroma y acidez; además es una fruta rica en vitamina A y C (Chaves y Wang, 2004).

Además de la alta percibibilidad de la fruta los productores enfrentan el problema de la *B. cinerea* que limita la producción, y generan gasto por concepto

del uso de plaguicidas. Este patógeno es capaz de afectar el 95% de los frutos después de 48 horas de cosechados (Chaves y Wang, 2004).

Con esto se está ayudando a retardar el riesgo de desarrollo de cepas resistentes de los patógenos en el campo, y donde la resistencia está ya presente, dando una alternativa útil al control químico (Guillino *et al.* 1985).

Muchas investigaciones están siendo conducidas hoy hacia agentes controladores de pestes microbianas, primeramente debido a su corto tiempo y bajos costos necesarios para llevar éste tipo de productos al mercado (Woodhead *et al.* 1990).

En este trabajo ha quedado demostrado que es factible utilizar la cepa bacteriana (*S. maltophilia*) como controlador de *B. cinerea*.

A través de todos estos aspectos se quiere llegar a incentivar la investigación hacia el área agrícola biológica, con el fin de mejorar, incrementar y favorecer la agricultura.

6 CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en la presente tesis, se puede concluir lo siguiente:

- Se acepta la hipótesis general, que entre la gran diversidad de microorganismos saprófitos que tienen como hábitat el suelo se encuentran antagonistas de *B. cinerea*, siendo posible seleccionar y detectar cepas específicas que afectan el desarrollo de *B. cinerea*
- Las pruebas de antagonismo sobre agar en placa Petri demostraron ser útiles como etapa previa a la selección de antagonistas con potencial para controlar a *B. cinerea in vivo*.
- En pruebas in vitro se demostró que existen diferencias entre las cepas antagonistas A10 y A39, en cuanto al tamaño de los halos de inhibición de *B. cinerea*.
- La estandarización de las concentraciones tanto del patógeno como del antagonista, resultó ser una técnica confiable para determinar la cantidad de microorganismos aplicados en el biocontrol.
- Concentraciones del orden de 23×10^7 UFC/ml de *S. maltophilia*, pueden controlar a *B. cinerea*, retardando significativamente la aparición de pudriciones de poscosecha en los frutos.
- El mayor control sobre *B. cinerea* bajo condiciones de laboratorio se explicaría, no sólo por las diferencias de las concentraciones sino que además por el momento en la curva de crecimiento de la bacteria en que se producen el o los metabolitos antifúngicos, al momento de ser aplicada sobre los frutos.

- Los resultados de este estudio, permiten afirmar que las cepas bacterianas de *S. maltophilia*, *K. movilis*, y *E. cloacae*, tienen un interesante potencial como agente de control biológico de *B. cinerea*.
- Uno de los cambios más visibles y generalizados, de las paredes celulares de las hifas de *B. cinerea*, producida por la antibiosis de *E. cloacae*, se presenta con un intenso pardeamiento de la quitina y el engrosamiento y desintegración de los ápices hifales más expuestos, lo que limita la germinación de las esporas.

7 RESUMEN

El excesivo uso de plaguicidas para controlar enfermedades en las plantas cultivadas, ha sido por décadas una solución rápida y eficaz. Sin embargo la utilización consecutiva de este tipo de productos hoy en día no es bien vista por los consumidores, por los problemas que ha generado a la salud humana y al medio ambiente. Como consecuencia de ello ha surgido un real interés por la utilización de agentes biológicos, como un método alternativo para el control de enfermedades.

En nuestro país la vid es uno de los principales cultivos frutícolas de exportación, el cual es afectado por un sin número de enfermedades, siendo su principal problema el moho gris causado por *Botrytis cinerea* Pers. ex Fries, debido a la importancia de este cultivo y la alta incidencia de este hongo fitopatógeno, se ha impulsado el estudio sobre controladores biológicos de *B. cinerea*.

En la actualidad se han estudiado numerosos agentes bacterianos antagonistas de *B. cinerea*, ya sea para cultivos de vid, arándano, frambuesa entre otros. En este trabajo se aisló agentes antagonistas propios de la microflora del cultivo de frutilla y de diversas partes de la planta, filoplano, rizoplano y risósfera. En un comienzo se aislaron 12 antagonistas, y en una etapa intermedia se seleccionaron tres agentes que ocasionaban antagonismo, basándose en los halos de inhibición sobre *B. cinerea*, en pruebas de laboratorio *in vitro*. Estos agentes antagonistas fueron *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella movilis* y *Stenotrophomonas maltophilia*, siendo esta última la que finalmente se evaluó a distintas concentraciones sobre los frutos de fresa en forma de suspensiones celulares para evaluar el efecto que producían sobre *B. cinerea* en condiciones de laboratorio. Además se evaluó *in vitro* la actividad sobre *B. cinerea* de los filtrados bacterianos.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las tres cepas antagonistas estudiadas pueden controlar a *B. cinerea*, retardando significativamente la actividad fitopatógica del moho gris en los frutos.

Sin embargo el agente bacteriano *Stenotrophomonas maltophilia* mostró menos inconvenientes y una mayor eficacia en el control del patógeno en las pruebas *in vitro*. Por lo tanto los resultados sugieren una posterior etapa de evaluaciones en campo de este agente antagonista.

Como consecuencia de lo anterior este trabajo constituye el inicio de estudios realizados para el control biológico de *B. cinerea* en fresa, utilizando agentes bacterianos nativos de la región, demostrando así la factibilidad de utilizar la microflora epífita del hospedero para producir inhibición del agente fitopatológico en campo.

Por otro lado se podría decir que el agente bacteriano *Stenotrophomonas maltophilia* tendría un interesante potencial, para ser utilizado como agente biocontrolador sobre *B. cinerea* en cultivos de fresas.

8 SUMMARY

The excessive use of plaguicides to control diseases in the cultivated plants, has been per decades a fast and effective solution. Nevertheless the consecutive use of this type of products nowadays is not well seen by the consumers, because of the problems that it has generated to the human health and environment. As a result of it a real interest in the biological agents usage has emerged, as an alternative method to control diseases.

In our country the grapevine is one of the main fruit cultures of export, which is affected by a lot of diseases, being its main problem the gray mould caused by *Botrytis cinerea* Pers. ex- Fries, the study on biological controllers of cinerea B. has been promoted, due to the importance of this culture and the high incidence of this phytopathogen fungus.

Nowadays numerous antagonistic bacteriological agents of *B.cinerea* have been studied, either for cultures of grapevine, bilberry or raspberry among others. In this work it was isolated antagonistic agents of the microflora of the culture of strawberry and from diverse parts of the plant, phylloplane, rhizoplane and rhizosphere.

At the beginning 12 antagonists were isolated, and in an intermediate stage three agents were selected, those that caused antagonism, being based on the inhibitory activity on *B. cinerea*, in laboratory tests *in vitro*. These antagonistic agents were *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella movilis* and *Stenotrophomonas maltophilia*, being the last, the one that finally was evaluated at different concentrations on the fruits from strawberry in form of cellular suspensions to evaluate the effect that it produced over *B. cinerea* in laboratory conditions. In addition, the activity of bacterial filtrates over *B. cinerea* was evaluated.

The results obtained in this work show that the three studied antagonistic stocks can control *B. cinerea*, significantly slowing down the phitopathogen activity of the gray mould in the fruits. Nevertheless the bacteriological agent *Stenotrophomonas maltophilia* showed less disadvantages and a greater effectiveness in the control of the pathogen in the in vitro tests. Therefore the results suggest a later stage of evaluations in the field of this antagonistic agent.

As a result of that, this work constitutes the beginning of studies developed by the biological control of *B. cinerea* in strawberry, using native bacteriological agents of the region, demonstrating, therefore, the workability in using the epiphitic microflora of the crops to produce inhibition of the phitopathogen agent in field. On the other hand it would be possible to say that the bacteriological agent *Stenotrophomonas maltophilia* would have an interesting potential, to be used like a biocontroller agent on *B. cinerea* in strawberry cultures.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. 1996. Plant Pathology. Academic Press, London. 803 p.
- ARCHIBALD, S.O, Y WINTER, C.K. 1989. Pesticide residue and cancer risks California Agriculture 43(6):6-9.
- AUGER, J. Y ESTERIO, M. 1997. Botrytis en vides de Chile: Epidemiología y resistencia a fungicidas. In: Botrytis, nuevas estrategias de control cultural, biológico y químico en uva de meza. Santiago (Chile). Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. P 3-9.
- AUGER, J.; ESTERIO, M.; MORALES, P.Y SAINI, R. 1991. Control selectivo de cepas de *Botrytis cinerea* resistentes a fungicidas benzimidazoles mediante el producto S-32165 en *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon: estudio poblacional. Phytopathology 81(6):691.
- AYERS, W.A. Y ADAMS, P.B. 1981. Mycoparasitism of sclerotial fungi by *Teratosperma oligocladum* Can. J. Microbiol. 27:886-892.
- BABADOOST, M. 2000. Gray-mold rot or botrytis blight of vegetables. Plant disease. Departement of crop science. University of Illinois Extension. EAU. N°924. http://web.aces.uiuc.edu/vista/pdf_pubs/942.pdf (16 agosto, 2006).
- BAROFFIO, C.; SIEGFRIED, W. Y HILBER, U. 2003. Long-term monitoring for resistance of *Botryotinia fuckeliana* to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, and hydroxylanilide fungicides in Switzerland. Plant disease. 87: 662-666. . http://findarticles.com/p/articles/mi_qa4066/is_200306/ai_n9273890 (16 agosto, 2006).
- BAKER, K.F. Y COOK, R.J. 1974. Biological control of plant pathogens. W.H. Freeman & Co., San Francisco. 433 p.

- BAKER, R. 1991. Diversity in biological control. *Crop Protection* 10:85-94.
- BENITO, E., ARRANZ, M. Y ESLAVA, A. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea* (On line). Universidad de Salamanca. Revista Iberoamericana de Micología. España. 17: S43 - S46.
<[http://www.revibeammicol.com/2000-17/S43 - S46. pdf](http://www.revibeammicol.com/2000-17/S43-S46.pdf)> (11 octubre, 2006).
- BETANZO, C. 2005. Evaluación de diferentes fungicidas para el control de *Botrytis cinerea* Pers. Ex Fries, agente causal del "Moho Gris" en un huerto de arándano alto o "highbush" (*Vaccinium corymbosum* L.) de la IX Región. Tesis Ing. Agr. Valdivia. Universidad austral de Chile, Facultad de ciencias Agarias. 85 p.
- BHATT, D.D. 1962. The rol of associated fungi in prevention of *Botrytis* rot of strawberries. *Phytopathology* 52:359.
- BHATT, D.D Y VAUGHAN, E.K. 1963. Inter-relationships amogn fungi associated with strawberries in Oregon. *Phytopathology* 53:217-220-
- BLAKEMAN, J.P. 1981. Microbial Ecology of the Phylloplane. Academic Press, New York. 502 p.
- BLAKEMAN, J.P. Y FOKKEMA, N.J. 1982. Potencial for biolgical control of plant diseases on the phylloplane. *Ann. Rev. Phytopathol.* 20:167-192.
- BOWERS, W., HOCH, H., EVANS, P. AND KATAYAMA, M. 1986. Thallophytic allelopathy: isolation and identification of laestiseric acid. *Science* 232: 105-106.
- BROOME, J.C., LATORRE, B.A. Y MAROIS, J.J. 1991. Manejo de la canopia de uva de mesa y su efecto sobre la incidencia de la pudrición gris (*Botrytis*

- cinerea*) p.14 in: Resúmenes del II Congreso Nacional de Fitopatología. Universidad Austral de Chile. 70 p.
- BROCK, T. Y MADIGAN, M. 1993. Microbiología. Sexta Edición. Prentice May Hispanoamericana. Mexico. 965 p.
- BURGES, H.D. 1981. Microbial control of pest and planta diseases: 1970-1980. Academic Press, London. 949 p.
- BUZETA, A. 1997. Fundación Chile: Berries para el 2000. Departamento Agroindustrial. Santiago, Chile. Pág. 133.
- BU'LOCK, J., NISBET, L., Y WINSTANLEY, D. 1982. Bioactive Microbial Products: Search and Discovery. Academic Press, London. 148 p.
- BURR, T., SCHROTH, M. Y SUSLOW, T. 1978. Increased potato yields by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. Phytopathol. 68: 1377-1383.
- CHÁVES Y WANG. 2004. Combate del Moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa mediante *Gliocladium roseum*. Agronomía Costarricense. 28 (2): 73-85.
- CHACÓN, M. V. 2005. Determinación de bacterias fitopatógenas asociadas a poroto (*Phaseolus spp.*) comercializadas por pequeños productores de la comuna de Valdivia (X Región). Tesis para optar al Grado de Licenciado en Agronomía. Valdivia – Chile. 29 p.
- CHERNIN, L., ISMAILOV, Z., HARAN, SHOSHAN., Y CHET, I. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistc to fungal plant pathogens. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 61, N°5, 1720-1726.

- CAMPBELL, R. Y MACDONALD, R.M. 1989. Microbial inoculation of crop plants. Special Publications of The Society for General Microbiology Vol. 25. IRL Press at Oxford University Press. England. 118 p.
- CANSINO, L. 1973. El cultivo de la frutilla. Publicaciones en Ciencias Agrícolas N°3. Publ. Cienc. Agric. Universidad de Chile. Fac. Agronomía, Santiago. 53 p.
- CARREÑO, I. Y ALVAREZ, M. 1989. Razas resistentes de *Botrytis cinerea* a fungicidas dicarboximidas. Aconex 26: 17-20.
- CERCOS, A.P. 1957. Los antibióticos y sus aplicaciones agropecuarias. Salvat Editores, S.A. Barcelona, España. 475 p.
- CIAMPI, L., GONZALEZ, S. Y SCHENETTELER, E. 1993. Enfermedades de arbustos en frutales menores. In: Cultivos no tradicionales. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Sanidad Vegetal. Serie Avances en Producción y Sanidad Vegetal. P 39-62
- CIAMPI, L.R. Y SILVA, S. 1991. Perspectivas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en frambuesa. Aconex 31:5-10.
- CIAMPI, L. 2002. Introducción a la patología vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Editorial Firenze. 25 p.
- CCO-FIA. 2005. Catálogo de insumos para el control de plagas y enfermedades en agricultura orgánica en Chile. Ministerio de Agricultura. Chile. 99 p.
- CHOU, M.C. Y PREECE, T.F. 1968. The effect of pollen grains on infections caused by *B. cinerea* Ann. Appl. Biol. 62:11-22.

- COOK, J. R. 1993. Making greater use of introduce microoganisms for biocontrol of plant pathogens. *Ann Rev. Phytopathol* 31: 53-80.
- CRUZ, A. 1993. Que es exactamente la botrytis. *Revista Chile Agrícola*. 45 p.
- CLARK, C.K. Y LORBEER, J.W. 1977a. The rol of phyllosphere bacteria in pathogenesis by *Botrytis squamosa* and *Botrytis cinerea* on onion leaves. *Phytopathology* 67:96-100.
- CLARK, C.K. Y LORBEER, J.W. 1977b. Comparative nutrient dependency of *Botrytis squamosa* and *Botrytis cinerea* for germination of conidia and pathogenicity on onion leaves. *Phytopathology* 67:212-218.
- COLEY-SMITH, J.R., VERHOEFF, K. Y JARVIS, W.R. 1980. The biology of *Botrytis* Academic Press Inc. London 318 p.
- COOK, K. 1991. Microbial Inoculant in Agriculture. *Shell Agriculture* 9: 23-25.
- DASHWOOD, E.P. Y FOX, R.A. 1988. Infection of flowers and fruits of red raspberry by *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* 37:423-430.
- DRAWDY, J; GRIMES, A; GROOMS, C; HINTON, C; MCDONALD, A; MARTÍN, J. AND YOUNG, R. 2003. Strawberry pest managment strategic plan (PMSP). Florida. E.U.A. 15 p.
<http://www.ipmcenters.org/pmsp/pdf/FIstrawberry.pdf>> (25 agosto, 2006).
- DEKKER, J. 1976. Acquired resistance to fungicides. *Ann. Rev. Phytopathol.* 14:405-428.
- DOMSCH, K.H. GAMS, W. Y ANDERSON, T.H. 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press, London. V. 1. Pp 150-155.

- DIAZ, M.; VILLA, P.; FRÍAS, A. 2002. Evaluation of the siderophores production by *Pseudomonas aeruginosa* PPS. Rev. Latinom. Microbiol. 44(3-4): 112-117.
- DUERY, L. 1991. Impacto de la ingeniería genética en el desarrollo. Artículo del Cuerpo C, pag. 13, de la edición del 6 de julio del diario "El Mercurio".
- DUNNE, C., J. J. COWLEY, Y. MONNE-LOCCOZ, D. N. DOWLING, F. J. DE BRUIJN, AND F. O'GARA. 1997. Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. Microbiology 143: 3921-3931.
- EDLICH, W., LORENZ, H., LYR, H., NEGA, E. Y POMMER, E.H. 1989. New aspects of the infection mechanism of *Botrytis cinerea* Pers. Neth. J. PL. Path. 95(suplement 1): 53-62.
- ECK, P. Y CHILDERS, N. 1989. Blueberry Culture. USA. New Brunswick: Rutgers University. 378 p.
- ESPINO, J., BRITO, N., NODA, J., AND GONZÁLEZ, C. 2005. *Botrytis cinerea* endo- β -1,4 glucanase Cel5A is expressed during infection but is not for pathogenesis. Physiological and Molecular Plant Pathology 66: 213-221.
- ELLIS, A. 2001. Botrytis Fruit Rot "Gray Mold" of Strawberry, Raspberry and Blackberry. Department of Plant Pathology. Fact Extension. Plant Pathology. <http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/3000/3017.html> (14 octubre, 2006).
- FLORES, V., RODRÍGUEZ-CANO, J.A. MORALES, P. Y LATORRE, B. 1991. *Botrytis cinerea* características de las poblaciones resistentes a dicarboximidas observadas en la zona central de Chile. (Abstract) In: Resúmenes del II Congreso Nacional de Fitopatología Universidad Austral de Chile. 70 p.

- FLORES, V. 1992. Biocontrol de *Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr en frutos de frambueso (*Rubus idaeus* L.). Tesis para optar al Grado de Licenciado en Agronomía. Valdivia – Chile. 81 p.
- FOKKEMA, N.J. Y LORBEER, J.W. 1974. Interactions between *Alternaria porri* and the saprophytic mycoflora of onion leaves. *Phytopathology* 64: 1128-1133.
- FRENCH, R.E. Y HEBERT, T.T. 1980. Métodos de investigación fitopatológica Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, San José, Costa Rica. 289 p.
- GAMBARDELLA, M. 1996. El cultivo de la frutilla. Antecedentes históricos y situación actual en el cultivo de la frutilla. Publicaciones misceláneas agrícolas N°44. Universidad de Chile. Santiago. 127 p.
- GIESLER, L. J., AND G. Y. YUEN. 1998. Evaluation of *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 for biocontrol of brown patch disease. *Crop Protection* 17: 509-513.
- GIOTI, A.; SIMON, P.; LE PECHEUR, C. GIRAUD, J. PRADIER. 2006. Expression profiling of *Botrytis cinerea* genes identifies three patterns of Up-regulation in planta and an FKBP12 protein affecting pathogenicity. *J. Mol. Biol.* (358): 372-386.
- GORDON, R.E., HAYNES, W.C. Y PANG, C.H.N. 1973. The genus *Bacillus*. Washington D.C.: Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Handbook N° 427. 283 p.
- GOTO, M. 1992. Fundamentals of bacterial plant pathology. Academic Press, Inc., San Diego, California. 342 p.
- GRIFFITHS, E. 1981. Latrogenic plant diseases. *Ann. Rev. Phytopathol.* 19: 69-82.

- GULLINO, M.L. ; ALOI, C. Y GARIBALDI, A. 1989. Evaluation of the influence of different temperatures, relative humidities and nutritional supports on the antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against grey mould of grape. (Extraído de Review of Plant Pathology, 1990, 69(8), Abst. N° 5110. Original no consultado).
- GUILLINO, M.L.; MEZZALAMA, M. Y GARIBALDI, A. 1985. Biological and integrated control of *Botrytis cinerea* in Italy: experimental results and problems. Quad. Vitic. Enol., Univ. Torino, Italy 9: 299-309.
- HARMON, P. 2004. Plant Pathology Departament. Cooperative Extensio Service. Institute of food and Agricultural Sciences. University of Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/PP/PP11900.pdf> (14 octubre, 2006).
- JAILLOUX, F. Y FOIDEFOND, G. 1987. Evaluation des propriétés antagonistas de 11 souches de *Trichoderma* sur *Botrytis cinerea* a l'aide de pluisieus méthodes de laboratoire. (Extraído de Review of Plant Pathology, 1989, 68(1), Abst. N° 223. Original no consultado).
- JANISIEWICZ, W.J. 1985. Biological control of postharvest diseases of pome fruits. Phytopathology 75(11): 1301.
- JANISIEWICZ, W.J. 1988. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures. Phytopathology 78: 194.198.
- JANISIEWICZ, W.J. Y ROITHMANN, J. 1988. Biological control of the blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia* Phytopathology 78:1697-1700.

- JARVIS, W.R. 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species: taxonomy, physiology and pathogenecity. Research Branch Canada Departament of Agriculture. Ottawa, Canada. Monograph N° 15. 195 p.
- JENNINGS, D.L. 1988. Raspberries and blackberries. Their breeding, diseases and growth. Academic Press, London. 230 p.
- KOBAYASHI, D.; REEDY, R.; BICK, J.; Y OUDEMANS, P. 2002. Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and ist involvement in biological control. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68, N° 3. 1047-1054
- KLOEPPER, J. W., LEONG, J., TEINTZE, M. Y SHROTH, M. N. 1980. *Pseudomonas siderophores*: a mechanism explaining disease suppressive soils. *Curr. Microbiol* 4: 317-320.
- KLOEPPER, J. W. 1983. Effect of seed pieceninoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on population of *Erwinia carotivora* on patato roots and in daughter tubers. *Phytopathol* 73: 217-219.
- LATORRE, B. 1995. Enfermedades de las plantas cultivadas. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 307 p.
- LATORRE, B., LILLO, C., Y RIOJA, M. 2001. Eficacia de los tratamientos funguicidas para el control de *Botrytis cinerea* de la vid en función de la época de aplicación. *Ciencia e Investigación Agraria* 28(2):61-66.
- LEBEN, C. , Y DAFT, G.C. 1965. Influence of an epiphytic bacterium on cucumber anthracnose, early blight of tomato, and northern leaf blight of corn. *Phytopathology* 55: 760–762.

- LEGARD, D. Y MERTELY, J. 2000. Botrytis fruit rot (gray mold) and flower blight of strawberry. Plant pathology department, Gulf Coast Research and Education Center-Dover. Florida. Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/GC/GC00100.pdf>> (24 de junio, 2006).
- LEBEN, C. , Y DAFT, G.C. , WILSON, J.D. y WINTER, H.F. 1965. Field tests for disease control by an epiphytic bacterium. *Phytopathology* 55: 1375–1376.
- LI, J.C.R. 1964, Statistical inference. Vol II. Edwards Brothers, Inc. Ann arbor, Michigan. 658 p.
- LIAO, H. 1989. Antagonism of *Pseudomonas putida* strain pp-22 to phytopathogenic bacteria and its potential use as a biocontrol agent. *Plant Disease* 73: 223-226.
- MANSFIELD, J.W. Y B.J. DEVERALL. 1974. The rates of fungal development and lesion formation in leaves of *Vicia faba* during infection by *Botrytis cinerea* and *B. fabae*. *Ann. appl. Biol.* 76: 77-89.
- MARTIN, J. y DEMIAN, A. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.* 44 (2): 230-251.
- MCMAHON, R., CAMPBELL, K, FERGUSON, K, WICKS, T; BAILEY, P; COLES, R Y BODNARUK, K. 2001. Control of Botrytis bunch rot of grapes. South Australian Research and Development Institute. 2001. <<http://www.sardi.sa.gov.au/pages/horticulture/viti/hortvitibotrytispub.htm:sectID=448&tempID=79>>, (24 junio, 2006)
- McCLELLAN, W.D. Y HEWITT, W.B. 1973. Early Botrytis rot of grapes: time of infection and latency of *Botrytis cinerea* Pers. in *Vitis vinifera* L. *Phytopathology* 63: 1151–1157.

- McNICOL, R.J., WILLIAMSON, B. y DOLAN, A. 1985. Infection of red raspberry styles and carpels by *Botrytis cinerea* and its possible rol in postharvest grey mould. Ann. appl. Biol. 106: 49–53.
- MEDEL, F. 1990. Veinte años de investigación y desarrollo frutícola en el sur de Chile (1970 – 1990). Agro sur 18(2): 119-131.
- MERTELY, J.; MACKENZIE, S. Y LEGARD, D. 2002. Timing of fungicide applications for *Botrytis cinerea* based on development stage of strawberry flowers and fruit. Plant Dis. 86: 1019-1024.
<<http://www.apsnet.apsnet.org/pd/pdfs/2002/0719-01R.pdf>> (23 octubre, 2006).
- MÉNDEZ, A. 1980. Microflora del filopalno de *Coleus amboinicus* y *Lippia hellrii*. Carib. J. Sci. 15 (3-4) 153-157.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA. 2006. Exportaciones de berries. Documento electrónico en línea disponible en:
www.minagri.gob.cl/subsec/relevantes/programa_exportación_berries_enerp_2006 (7 octubre 2006).
- MONTGOMERY, D.1991. Diseño y Análisis de Experimentos. Editorial Iberoamericana, México. 589 pp.
- MOYLS, A.L., SHOLBERG, P.L. Y GAUNCE, A.P. 1996. Modified-Atmosphere, Packaging of grapes and strawberries fumigated with acetic acid. Hortscience 31(3): 414-416.
- MOLINA, A. 1994. Presencia de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fries. endógena y exógena en frutos de frambueso (*Rubus iadaeus* L.) recolectados en tres localidades de la X Región. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 39 p.

- MONCKEBERG, F. 1988. La revolución de la bioingeniería. Publicaciones técnicas mediterráneo, Santiago, Chile. 187 p.
- MONTEALEGRE, J.R. 1996. Enfermedades de la frutilla. Publicaciones misceláneas agrícolas N° 44. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Santiago. 127 p.
- MONTEALEGRE, J.; REYES, R., PÉREZ, L.; HERRERA, R.; SILVA, P.; BESOASIN, X. 2003. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0177-3458.
- MORALES, A. 1990. Uva de mesa: alternativas para mejorar condición en los mercados internacionales. Aconex 29: 15-20.
- MORALES, P., FLORES, V. Y LATORRE, B. 1991. Pudrición gris del tomate cultivado bajo invernadero: sensibilidad de *Botrytis cinerea* a dicarboximidas. (Abstract) in: Resúmenes del II Congreso nacional de Fitopatología. Universidad Austral de Chile. 70 p.
- NELSON, M.E. Y POWELSON, M.L. 1988. Biological control of grey mold of snap beans by *Trichoderma hamatum*. Plant Dis. 72: 727-729.
- NEWHOOK, F.J. 1951a. Microbiological control of *Botrytis cinerea* Pers. I. The role of pH changes and bacterial antagonism. Ann. appl. Biol. 38: 169-184.
- NEWHOOK, F.J. 1951b. Microbiological control of *Botrytis cinerea* Pers. II. Antagonism by fungi and actinomycetes. Ann. appl. Biol. 38: 185-202.

- NISSEN, J. Y HOFFMANN, E. 1998. Evaluación de cuatro sistemas de manejo hídrico sobre la producción de frutilla (*Fragaria x ananassa* D.) en la zona de Valdivia. *Agro sur*, Jul. Vol. 26 N°2, pp 1-11 ISSN 0304 – 8802.
- NORRIS J.R., BERKELEY, R.C.W., LOGAN, N.A. y O' DONNELL, A.G. 1983. The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. in: STARR, M.P. STOLP, H., TRUPER, H.G., BALOWS, A. y SCHLEGEL, H.G. (Eds.). *Phytopathogenic Bacteria*. Springer Verlag, New York. V. 2 pp: 1711-1741.
- ORTEGA, S. 1998. Parámetros microbiológicos para la formulación de medios de cultivo para la producción semindustrial de cepas antagonistas de patógenos vegetales. Tesis para optar al grado de Licenciado en Ingeniería en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Valdivia. 178. p.
- PALLERONI, N. 1984. Family Pseudomonaceae. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Gram-negative aerobic rods and cocci. Vol.1, Part. 4: 141-219.
- PEARSON, R., Y GOHEEN, A. 1996. *Plagas y enfermedades de la vid*. Madrid, España. Editorial Mundi Prensa. Pág. 91.
- PHILLIPS, P.A., FOOTT, J.H. Y RIGHETTI, L. 1990. Grape pruning methods can affect *Botrytis* bunch rot. *California Agriculture* 44(3): 9-10.
- POLLASTRO, S., FERETRA, F., DI CANIO, V., AND GUIDO, A. 1996. Characterization and genetic anlysis of field isolates of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to dichlofluanid, *Eur J. Plant Pathol.* 102: (607-613).
- POPPER, J., AUGER, J. Y ESTERIO, M. 1989. Efecto de bajas concentraciones de anhídrido sulfuroso (SO₂), sobre conidias de *Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr. en distintos estados de desarrollo. *Fitopatología*. 24 (2): 65-70.

- REDMOND, J.C., MAROIS, J.J. Y MacDONALD, J.D. 1987. Biological control of *Botrytis cinerea* on roses with epiphytic microorganisms. Plant Dis. 71: 799-802.
- REBORDINOS, L., VALLEJOS, I., SANTOS, M., COLLADO, I., CARBÚ, M., Y CANTORAL, J. 2000. Análisis genético y relación con patogenicidad en *Botrytis cinerea*. Rev. Iberoam. Micol. 17: S37-S42.
- ROBERTS, D. Y LUMSDEN, R. 1990. Effect extracellular metabolites from *Gliocladium virens* on germination of sporangia and mycelial growth of *Pythium ultimum*. Phytopathology 80: 461-465.
- ROUANET, J., ROMERO, O., Y DEMANET, R. 1988. Áreas agroecológicas en la IX Región: Descripción. Revista Investigación y Progreso Agropecuario, Carillanca. Año 7, N°1.
- RHODES, D. Y LOGAN, C. 1987. A method for selecting *Pseudomonas fluorescens* inhibitor to seed tuber decay. Potato Research 30: 603-611.
- RUÍZ, S. C. 2000. Sustratos como herramientas para el combate biológico de patógenos epífitos. Fundación para la investigación agrícola. Venezuela. Año 4, N°1.
- SHIMSHONI, G., ELAD, Y., COHEN, A., BARAZANI, A., CHET, I. 1988. Biological control of grey mould on grapes. Alon Hanotea 42(10): 991-994 (Extraído de Review of Plant Pathology, 1989, 68(1), Abst. N° 220. Original no consultado).
- SILVA, J. 1992. Control Biológico de *Botrytis cinerea* Pers. Ex Fr. En Frambuesa (*Rubus idaeus* L.) mediante bacterias antagonistas. Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Mención Protección Vegetal. Valdivia – Chile. 178 p.

- SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E. y HOLT, J.G. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wikins, Baltimore, Vol. 2, Part. 1: 1105-1139.
- SPURR, H.W. 1981a. Formulation of bacterial antagonist alters efficacy for foliar disease biocontrol. *Phytopathology* 71(8): 905.
- SPURR, H.W. 1981b. Experiments on foliar disease control using bacterial antagonist. in: BLAKEMAN, J.P. (Eds) 1981. *Microbial Ecology of the Phylloplane* Academic Press, New York. pp. 369-381.
- SPURRIER, E.C. 1990. Pesticides-there will be change. pp. 103-105 in: Symposium "Plant Health Management Issues of Public Concern: Focus on Pesticides", California, November 1988. *Plant Disease* 74(2): 103-110.
- STANIER, R. Y., ADELBERG, E.A. Y INGRAHAM, J.L. 1976. *The Microbial World*. Prentice-Hall, Inc., New Jersey. 871 p.
- STEPHENS, C.T. 1990. Minimizing pesticide use in a vegetable management system. *HortScience* 25(2): 164-168.
- SZTEJNBERG, A. Y BLAKEMAN, J.P. 1973. Studies on leaching of *Botrytis cinerea* conidia and dye absorption by bacteria in relation to competition for nutrients on leaves. *J. gen. Microbiol.* 78: 15-22.
- TAHVONEN, R. Y M.L. LAHDENPERA. 1988. Biological control of *B. cinerea* and *Rhizoctonia solani* in lettuce by *Streptomyces* sp. *Annales Agriculturae Fenniae* 27: 107-116.
- TRONSMO, A. Y DENNIS, C. 1977. The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. *Neth. J. Plant Pathol.* 83 (Suppl. 1): 449-455.

- THOMASHOW, L. Y WELLER, D. 1990. Role of antibiotic and siderophores in biocontrol of "take-all" disease of wheat. *Plant and soil* 129:93-99.
- TRONSMO, A. Y YSTAAS, J. 1980. Biological control of *Botrytis cinerea* on apple. *Plant Dis.* 64: 1009.
- TORTORA, A. 1993. Prospección del hongo causante del moho gris (*Botrytis cinerea* Pers. ex Fries). Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 139 p.
- ULLOA, M. Y HANLIN, R. 2000. Illustrated dictionary of mycology. Minnesota. American Phytopathological Society. 448 p.
- VAJNA, L. 1985. Phytopathogenic *Fusarium oxysporum* Schlecht as a necrotrophic mycoparasite. *Phytopath. Z.* 114: 338-347.
- VAUGHAN, E.K. 1960. Influence of fungicides on microorganisms associated with apparently healthy strawberry. *Phytopathology* 50: 657-658.
- VILLALOBOS, C. 2006. Caracterización morfológicas y patogénicas de aislamientos de *B. cinerea* Pers. Ex. Fries. desde arándano (*Vaccinium corymbosum* y *Vaccinium virgatum* Ait.) resistente a benomilo. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 36 p.
- WASHINGTON, W., M. SHANMUGANATHAN y C. FORBES. 1992. Fungicide control of Strawberry fruit rots, and the field occurrence of *botrytis cinerea* to iprodione, senomyl and dichlofluanid. *Crop protection* 11: 355-360.
- WALKER, R., POWELL, A., Y SEDDON, B. 1997. *Bacillus* isolates from the spermosphera of peas and dwarf french beans with antifungal activity

against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. J. of Applied Microbiology. 84: 791-801.

WILDMAN, H.G. Y PARKINSON, D. 1981. Comparison of germination of *Cladosporium herbarum* and *Botrytis* conidia *in vitro* in relation to nutrient conditions on leaf surfaces. Can. J. Bot. 59: 854-861.

WILLIAMSON, B. , McNICOL, R.J. Y DOLAN, A. 1987. The effect of inoculating flowers and developing fruits with *Botrytis cinerea* on post-harvest grey mould of red raspberry. Ann. appl. Biol. 111(82): 285-294.

WINDELS, C.E. Y LINDOW, S.E. 1985. Biological control on the phylloplane. The American Phytopathological Society (eds.) Minnesota, USA. 169 p.

WILSON, C. Y WISNIEWSKI, M. 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. Annual Review Phytopathology 27: 425-441.

WHIPPS, J. 2001. Microbial interaction and biocontrol in the rhizosphere. J. of Experimental Botany. 52: 487-511.

WOOD, R.K.S. 1951. The control of diseases of lettuce by the use of antagonistic organisms. I. The control of *Botrytis cinerea* Pers. Ann. appl. Biol. 38: 203-216.

WOODHEAD, S., O'LEARY, A., O'LEARY, D: Y RABATIN, S. 1990. Discovery, development, and registration of a biocontrol agent from an industrial perspective. Canadian J. of Plant Pathol. 12: 328-331.

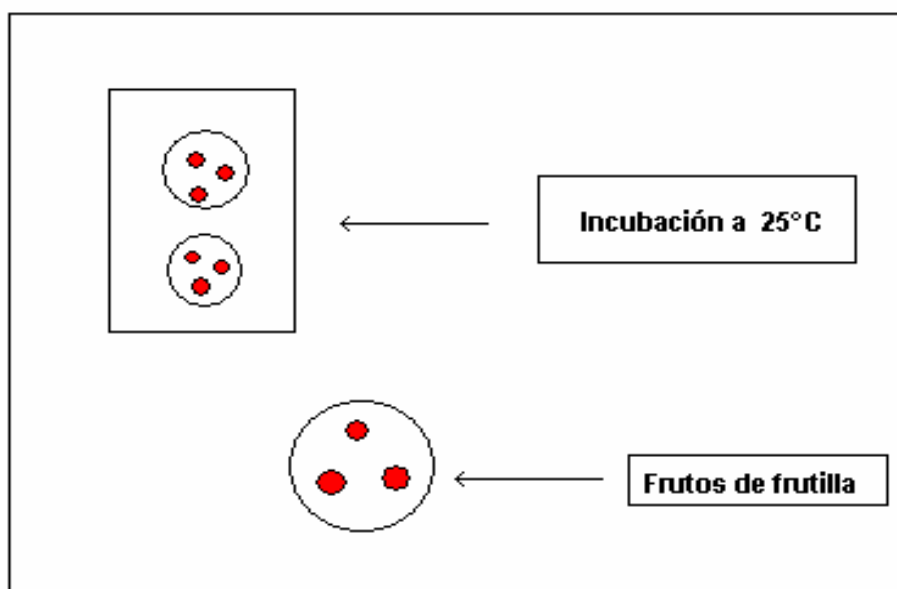
- XU, G. W. Y GROSS, D.C. 1986. Selection of *Pseudomonas fluorescens* antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppressive of potato seed piece decay. *Phytopathol.* 76: 414-442.
- YODER, O.C. Y WHALEN, M.L. 1975. Factors affecting postharvest infection of stored cabbage tissue by *Botrytis cinerea*. *Can. J. Bot.* 53: 691-699.

ANEXO 1**MATERIAL E INSTRUMENTAL DE LABORATORIO**

- Placas Petri
- Tubos de ensayo
- Agua destilada
- Papel absorbente
- Bolsas de papel
- Algodón hidrófilo y cardé
- Alcohol 96°
- Hipoclorito de sodio (Clorex 9,9%)
- Bandejas plásticas (25 x 40 cm)
- Papel aluminio y plástico (Alusa foil y Alusa plas)
- Estufa de cultivo (Heraeus)
- Estufa de esterilización (Orthmann)
- Estufa de secado (Mermmet)
- Autoclave manual (Geared Gauge)
- Refrigerador (Philips)
- Balanza analítica
- Lupa esteroscópica (Carl Zeiss)
- Microscopio (Carl Zeiss)
- Microscopio (Zeiss)
- Sacabocado de 4 y 16 mm de diámetro
- Pinzas
- Aguja enmangada
- Porta y cubre objetos
- Micrómetro ocular y objetivo
- Cuchillo
- Matraces
- Pipetas
- Asas microbiológicas desechables

ANEXO 2**CONFECCIÓN DE CÁMARAS HUMEDAS ESTÉRILES**

Fueron confeccionadas en bandejas plásticas de 25 x 40 cm, y se cubrió el fondo con algodón estéril impregnado en agua previamente esterilizada. Dentro se colocaron placas petri estériles abiertas, depositando sobre ellas el material vegetal. Luego, las bandejas se envolvieron en plástico transparente Alusa Plas y se dejaron incubando por 4 días a temperatura ambiente (25°C).

CÁMARA HÚMEDA ESTERIL

ANEXO 3

MEDIOS DE CULTIVO

Agar Papa Dextrosa (PDA)

- Extracto de papa..... 4 g
- Glucosa..... 20 g.
- Agar..... 15 g.
- Agua destilada..... 1.000 ml

Ajustar a pH final: 5.5 - 5.6 con HCl 1 N, KOH 1 N ó ácido láctico 1 N.

Esterilizar en autoclave a 1 atm y por 20 min.

Agar Casaaminoácido – Peptona – Glucosa (agar CPG)

- Glucosa..... 10 g
- Casaaminoácido..... 1 g
- Peptona..... 10 g
- Agua destilada..... 1000 ml

pH 7.2

Se esteriliza a 1 atm por 15 min.

Agar TSA

- Caldo de soya.....30 g.
- Agua destilada.....1000 ml.
- Agar.....16 g.

Ajustar a pH final: 5.5 - 5.6 con HCl 1 N, KOH 1 N ó ácido láctico 1 N.

Esterilizar en autoclave a 1 atm y por 15 min.

ANEXO 4

METODO PARA DETERMINAR CONCENTRACION BACTERIANA POR DILUCION EN SERIE Y POSTERIOR RECUENTO EN PLACA

El método consiste en tomar 0,1 ml de cultivo líquido de la bacteria antagonista, al momento de alcanzar una D.O. determinada. El inóculo se diluye en 0.9 ml de agua destilada estéril en un tubo de ensayo, luego de agitarlo bien se toman 0.1 ml de esta dilución y se mezclan con otros 0.9 ml de agua destilada estéril. La operación se repite 7 veces, de modo de contar con una serie de diluciones desde un factor de 10^1 a 10^7 , los que se multiplican respectivamente por el número de colonias que surgen después de sembrar 0.1 ml de cada dilución en placas Petri con agar B de King, APD u otro medio apropiado para las bacterias.

ANEXO 5**DETALLE DE LOS DATOS TOMADOS PARA REALIZAR LA CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO**

Tiempo (horas)	D.O.	Recuento de la cepa antagonista (UFC / ml)
1	0.166	42×10^6
2	0.173	73×10^6
3	0.178	12×10^7
4	0.182	14×10^7
5	0.187	14×10^6
6	0.190	15×10^7
7	0.194	14×10^6
8	0.204	15×10^7
9	0.212	18×10^6
10	0.225	22×10^7
11	0.234	22×10^6
12	0.258	23×10^7
13	0.260	25×10^6
14	0.276	26×10^6
15	0.286	26×10^7
16	0.292	27×10^7
17	0.348	28×10^6
18	0.356	28×10^6
19	0.382	28×10^6
20	0.402	28×10^7
21	0.418	29×10^6
22	0.472	29×10^6
23	0.472	30×10^7
24	0.472	28×10^6

ANEXO 6

DETALLE DE LOS DATOS TOMADOS PARA REALIZAR LA EVALUACIÓN DEL BIOCONTROL EN LAS TRES CONCENTRACIONES APLICADAS DEL ANTAGONISTA

- Concentración 1 (42×10^6 UFC/ml)
- Testigo

N° de Fruto	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
1	Sano (1)	Sano (1)	Sano (2)
2	Sano (1)	Sano (2)	Sano (2)
3	Sano (1)	Sano (2)	Sano (2)
4	Sano (1)	Sano (2)	Sano (1)
5	Sano (1)	Sano (1)	Sano (1)
6	Sano (2)	Sano (1)	Sano (1)
7	Sano (2)	Sano (1)	Sano (2)
8	Sano (2)	Sano (1)	Sano (2)
9	Sano (2)	Sano (1)	Sano (1)
10	Sano (2)	Sano (2)	Sano (1)

(1) Frutos completamente sanos.

(2) Frutos contaminados con hongos del ambiente.

- *B. cinerea*

N° de Fruto	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
1	> 50% c/b	15% c/b	> 50% c/b
2	> 50% c/b	15% c/b	> 50% c/b
3	> 50% c/b	15% c/b	> 50% c/b
4	> 50% c/b	> 50% c/b	15% c/b
5	> 50% c/b	25% c/b	15% c/b
6	25% c/b	> 50% c/b	25% c/b
7	25% c/b	25% c/b	50% c/b
8	25% c/b	25% c/b	25% c/b
9	15% c/b	25% c/b	25% c/b
10	15% c/b	25% c/b	15% c/b

c/b= Con *B. cinerea*

- Antagonista solo

N° de Fruto	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
1	Sano	Sano	Sano (*)
2	Sano	Sano	Sano (*)
3	Sano	Sano	Sano
4	Sano	Sano (*)	Sano
5	Sano	Sano (*)	Sano
6	Sano (*)	Sano	Sano
7	Sano (*)	Sano (*)	Sano (*)
8	Sano	Sano	Sano (*)
9	Sano	Sano	Sano (*)
10	Sano	Sano	Sano

(*) Contaminado con hongo del ambiente.

- Antagonista + *B. cinerea*

N° de Fruto	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
1	Sano	15% c/b	Sano
2	> 50% c/b	15% c/b	Sano
3	> 50% c/b	15% c/b	15% c/b
4	> 50% c/b	Sano	15% c/b
5	Sano	25% c/b	25% c/b
6	15% c/b	Sano	15% c/b
7	25% c/b	Sano	Sano
8	Sano	>50% c/b	Sano
9	Sano	25% c/b	>50% c/b
10	Sano	15% c/b	25% c/b

c/b= Con *Botrytis cinerea*

- Concentración 2 (23×10^7 UFC/ml)
- Testigo

N° de Fruto	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
1	Sano (1)	Sano (1)	Sano (1)
2	Sano (2)	Sano (1)	Sano (1)
3	Sano (1)	Sano (1)	Sano (1)
4	Sano (1)	Sano (1)	Sano (1)
5	Sano (1)	Sano (1)	Sano (2)
6	Sano (1)	Sano (1)	Sano (2)
7	Sano (1)	Sano (1)	Sano (2)
8	Sano (1)	Sano (1)	Sano (2)
9	Sano (2)	Sano (1)	Sano (2)
10	Sano (1)	Sano (2)	Sano (2)

(1) Frutos completamente sanos.

(2) Frutos contaminados con hongos del ambiente.

- *B. cinerea*

N° de Fruto	Repetición 1	Repetición 2	Repetición3
1	> 50% c/b	>50% c/b	> 50% c/b
2	25% c/b	>50% c/b	> 50% c/b
3	> 50% c/b	>50% c/b	> 50% c/b
4	> 50% c/b	25% c/b	> 50% c/b
5	> 50% c/b	25% c/b	> 50% c/b
6	25% c/b	25% c/b	> 50% c/b
7	25% c/b	50% c/b	> 50% c/b
8	15% c/b	50% c/b	15% c/b
9	25% c/b	50% c/b	> 50% c/b
10	25% c/b	50% c/b	15% c/b

c/b= Con *B. cinerea*

- Antagonista solo

N° de Fruto	Repetición 1	Repetición 2	Repetición3
1	Sano	Sano	Sano (*)
2	Sano	Sano	Sano (*)
3	Sano	Sano	Sano (*)
4	Sano	Sano	Sano (*)
5	Sano	Sano	Sano (*)
6	Sano	Sano	Sano
7	Sano (*)	Sano (*)	Sano
8	Sano (*)	Sano (*)	Sano
9	Sano	Sano	Sano
10	Sano (*)	Sano	Sano

(*) Contaminado con hongo del ambiente.

- Antagonista + *B. cinerea*

N° de Fruto	Repetición 1	Repetición 2	Repetición3
1	Sano	> 50% c/b	Sano
2	Sano	Sano	Sano
3	Sano	Sano	> 50% c/b
4	Sano	Sano	> 50% c/b
5	Sano	15% c/b	15% c/b
6	> 50% c/b	Sano	25% c/b
7	> 50% c/b	> 50% c/b	25% c/b
8	Sano	Sano	25% c/b
9	Sano	Sano	25% c/b
10	Sano	Sano	25% c/b

c/b= Con *Botrytis cinerea*

- Concentración 3 (30×10^7 UFC/ml)
- Testigo

N° de Fruto	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
1	Sano (2)	Sano	Sano (2)
2	Sano (2)	Sano	Sano (2)
3	Sano (2)	Sano	Sano (2)
4	Sano (2)	Sano	Sano
5	Sano (2)	Sano	Sano
6	Sano	Sano (2)	Sano
7	Sano	Sano (2)	Sano (2)
8	Sano	Sano (2)	Sano
9	Sano	Sano (2)	Sano
10	> 50% c/h.a	Sano	Sano

(1) Frutos completamente sanos.

(2) Frutos contaminados con hongos del ambiente.

- *B. cinerea*

N° de Fruto	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
1	> 50% c/b	Sano	Sano
2	> 50% c/b	15% c/b	Sano
3	> 50% c/b	15% c/b	15% c/b
4	> 50% c/b	15% c/b	> 50% c/b
5	> 50% c/b	25% c/b	> 50% c/b
6	Sano	25% c/b	25% c/b
7	Sano	15% c/b	25% c/b
8	25% c/b	50% c/b	25% c/b
9	15% c/b	50% c/b	25% c/b
10	Sano	15% c/b	15% c/b

c/b= Con *B. cinerea*

- Antagonismo solo

N° de Fruto	Repetición 1	Repetición 2	Repetición3
1	Sano	Sano (*)	Sano
2	Sano	Sano (*)	Sano
3	Sano (*)	Sano (*)	Sano
4	Sano (*)	Sano (*)	Sano
5	Sano (*)	Sano (*)	Sano (*)
6	Sano	Sano	Sano (*)
7	Sano (*)	Sano	Sano (*)
8	Sano (*)	Sano (*)	Sano (*)
9	Sano (*)	Sano	Sano
10	Sano	Sano	Sano

(*) Contaminado con hongo del ambiente.

- Antagonista + *B. cinerea*

N° de Fruto	Repetición 1	Repetición 2	Repetición3
1	> 50% c/b	>50% c/b	> 50% c/b
2	> 50% c/b	25% c/b	> 50% c/b
3	> 50% c/b	>50% c/b	> 50% c/b
4	> 50% c/b	>50% c/b	> 50% c/b
5	15% c/b	>50% c/b	> 50% c/b
6	25% c/b	>50% c/b	25% c/b
7	15% c/b	15% c/b	25% c/b
8	15% c/b	Sano	15% c/b
9	15% c/b	25% c/b	Sano
10	15% c/b	25% c/b	Sano

c/b= Con *B. cinerea*

ANEXO 7

RESULTADOS DEL ENSAYO DE CONTROL BIOLÓGICO, APLICANDO UNA CONCENTRACIÓN DE ESPORAS DEL HONGO CONOCIDA Y TRES CONCENTRACIONES DEL ANTAGONISTA SOBRE UN TOTAL DE 30 FRUTOS, EVALUADOS AL CUARTO DIA DE INCUBACIÓN

Concentración del antagonista	Número de frutos sanos	Número de frutos no controlados
1	12	5 frutos >50% c/b 5 frutos 25% c/b 8 frutos 15% c/b
2	17	6 frutos > 50% c/b 5 frutos 25% c/b 1 frutos 15% c/b
3	3	14 frutos > 50% 6 frutos 25% c/b 7 frutos 15% c/b

c/b= Con *B. cinerea*

ANEXO 8

AGROCLIMATOLOGÍA IX REGIÓN

Descripción climatológica

La Región presenta características climáticas de dos tipos, la primera dada principalmente en la Provincia de Cautín con un clima templado lluvioso con influencia mediterránea, con precipitaciones anuales promedios de 2000 mm, con una distribución mensual, que registra sus valores máximos en invierno y una disminución en los meses estivales. En la provincia de Malleco, parte norte de la Región es el clima templado cálido con estación seca corta menos de cuatro meses. Las temperaturas bajo este clima presentan amplitudes moderadas entre el día y la noche alcanzando valores hasta los 5°C y registros medios anuales de casi 12°C.

Las precipitaciones registran una distribución a través de todo el año, observándose una leve disminución en sus registros mensuales en época de verano, con registros que superan a 1000 mm anuales. En la zona norte de la Región, se caracteriza por presentar precipitaciones distribuidas durante todo el año con una estación seca de 3 a 4 meses en periodos estivales, en los meses de abril a noviembre donde los registros superan los 120 mm. En tanto que el régimen térmico registra una oscilación de 5,0°C con una temperatura media anual de casi 12°, con una temperatura media 8,0°C en el mes más frío y 15°C en el mes más cálido.

ANEXO 9

DETALLE DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO APLICADO PARA LOS RESULTADOS ARROJADOS DESPUÉS DE HABER REALIZADO EL BIOENSAYO

Test de Kruskal-Wallis

Rangos

	Tratamientos	N	Mean Rank
<i>Infección</i>	Testigo	90	109,50
	<i>Botrytis</i>	90	279,61
	Antagonista	90	109,50
	C1 Antagonista + <i>Botrytis</i>	30	211,53
	C2 Antagonista + <i>Botrytis</i>	30	187,83
	C3 Antagonista + <i>Botrytis</i>	30	270,80
	Total	360	

Test estadístico

	Infección
Chi-Square	246,887
Df	5
Diferencia significativa	,000

a Test Kruskal Wallis

b Variable de grupos: tratamiento

ANOVA

Infección

	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F	Sig.
Entre grupos	343,333	5	68,667	97,301	,000
En el grupo	249,822	354	,706		
Total	593,156	359			

Tests Post Hoc

Comparación múltiple

Variable Dependiente: Infección

			Diferencia (I-J) de medias	Error Std.	Sig.	95% Confianza	
	(I) Trat.	(J) Trat.				Lower Bound	Upper Bound

Tukey HSD	Testigo	Botrytis	-2,21	,125	,000	-2,57	-1,85
		Antagonista	,00	,125	1,000	-,36	,36
		C1 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-1,27	,177	,000	-1,77	-,76
		C2 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-1,00	,177	,000	-1,51	-,49
		C3 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-2,03	,177	,000	-2,54	-1,53
	<i>Botrytis</i>	Testigo	2,21	,125	,000	1,85	2,57
		Antagonista	2,21	,125	,000	1,85	2,57
		C1 Antagonista + <i>Botrytis</i>	,94	,177	,000	,44	1,45
		C2 Antagonista + <i>Botrytis</i>	1,21	,177	,000	,70	1,72
		C3 Antagonista + <i>Botrytis</i>	,18	,177	,917	-,33	,69
	Antagonist.	Testigo	,00	,125	1,000	-,36	,36
		<i>Botrytis</i>	-2,21	,125	,000	-2,57	-1,85
		C1 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-1,27	,177	,000	-1,77	-,76
		C2 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-1,00	,177	,000	-1,51	-,49
		C3 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-2,03	,177	,000	-2,54	-1,53
	C1 Antagonist+ <i>Botrytis</i>	Testigo	1,27	,177	,000	,76	1,77
		<i>Botrytis</i>	-,94	,177	,000	-1,45	-,44
		Antagonista	1,27	,177	,000	,76	1,77
		C2 Antagonista + <i>Botrytis</i>	,27	,217	,822	-,35	,89
		C3 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-,77	,217	,006	-1,39	-,15
	C2	Testigo	1,00	,177	,000	,49	1,51

	Antagonist + <i>Botrytis</i>						
		<i>Botrytis</i>	-1,21	,177	,000	-1,72	-,70
		Antagonista	1,00	,177	,000	,49	1,51
		C1 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-,27	,217	,822	-,89	,35
		C3 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-1,03	,217	,000	-1,65	-,41
	C3 Antagonist + <i>Botrytis</i>	Testigo	2,03	,177	,000	1,53	2,54
		<i>Botrytis</i>	-,18	,177	,917	-,69	,33
		Antagonista	2,03	,177	,000	1,53	2,54
		C1 Antagonista + <i>Botrytis</i>	,77	,217	,006	,15	1,39
		C2 Antagonista + <i>Botrytis</i>	1,03	,217	,000	,41	1,65
Scheffé	Testigo	<i>Botrytis</i>	-2,21	,125	,000	-2,63	-1,79
		Antagonista	,00	,125	1,000	-,42	,42
		C1 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-1,27	,177	,000	-1,86	-,67
		C2 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-1,00	,177	,000	-1,59	-,41
		C3 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-2,03	,177	,000	-2,63	-1,44
	<i>Botrytis</i>	Testigo	2,21	,125	,000	1,79	2,63
		Antagonista	2,21	,125	,000	1,79	2,63
		C1 Antagonista + <i>Botrytis</i>	,94	,177	,000	,35	1,54
		C2 Antagonista + <i>Botrytis</i>	1,21	,177	,000	,62	1,80
		C3 Antagonista + <i>Botrytis</i>	,18	,177	,962	-,41	,77
	Antagonist	Testigo	,00	,125	1,000	-,42	,42
		<i>Botrytis</i>	-2,21	,125	,000	-2,63	-1,79
		C1	-1,27	,177	,000	-1,86	-,67

		Antagonista + <i>Botrytis</i>					
		C2 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-1,00	,177	,000	-1,59	-,41
		C3 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-2,03	,177	,000	-2,63	-1,44
	C1 Antagonist+ <i>Botrytis</i>	Testigo	1,27	,177	,000	,67	1,86
		<i>Botrytis</i>	-,94	,177	,000	-1,54	-,35
		Antagonista	1,27	,177	,000	,67	1,86
		C2 Antagonista + <i>Botrytis</i>	,27	,217	,911	-,46	,99
		C3 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-,77	,217	,031	-1,49	-,04
	C2 Antagonist+ <i>Botrytis</i>	Testigo	1,00	,177	,000	,41	1,59
		<i>Botrytis</i>	-1,21	,177	,000	-1,80	-,62
		Antagonista	1,00	,177	,000	,41	1,59
		C1 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-,27	,217	,911	-,99	,46
		C3 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-1,03	,217	,001	-1,76	-,31
	C3 Antagonist+ <i>Botrytis</i>	Testigo	2,03	,177	,000	1,44	2,63
		<i>Botrytis</i>	-,18	,177	,962	-,77	,41
		Antagonista	2,03	,177	,000	1,44	2,63
		C1 Antagonista + <i>Botrytis</i>	,77	,217	,031	,04	1,49
		C2 Antagonista + <i>Botrytis</i>	1,03	,217	,001	,31	1,76
Hochb erg	Testigo	<i>Botrytis</i>	-2,21	,125	,000	-2,58	-1,84
		Antagonista	,00	,125	1,000	-,37	,37
		C1 Antagonista +	-1,27	,177	,000	-1,79	-,74

		<i>Botrytis</i>					
		C2 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-1,00	,177	,000	-1,52	-,48
		C3 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-2,03	,177	,000	-2,56	-1,51
	<i>Botrytis</i>	Testigo	2,21	,125	,000	1,84	2,58
		Antagonista	2,21	,125	,000	1,84	2,58
		C1 Antagonista + <i>Botrytis</i>	,94	,177	,000	,42	1,47
		C2 Antagonista + <i>Botrytis</i>	1,21	,177	,000	,69	1,73
		C3 Antagonista + <i>Botrytis</i>	,18	,177	,996	-,34	,70
	Antagonist	Testigo	,00	,125	1,000	-,37	,37
		<i>Botrytis</i>	-2,21	,125	,000	-2,58	-1,84
		C1 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-1,27	,177	,000	-1,79	-,74
		C2 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-1,00	,177	,000	-1,52	-,48
		C3 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-2,03	,177	,000	-2,56	-1,51
	C1 Antagonist+	Testigo	1,27	,177	,000	,74	1,79
		<i>Botrytis</i>	-,94	,177	,000	-1,47	-,42
		Antagonista	1,27	,177	,000	,74	1,79
		C2 Antagonista + <i>Botrytis</i>	,27	,217	,975	-,37	,91
		C3 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-,77	,217	,007	-1,41	-,13
	C2 Antagonist+	Testigo	1,00	,177	,000	,48	1,52
		<i>Botrytis</i>	-1,21	,177	,000	-1,73	-,69
		Antagonista	1,00	,177	,000	,48	1,52
		C1 Antagonista +	-,27	,217	,975	-,91	,37

		<i>Botrytis</i>					
		C3 Antagonista + <i>Botrytis</i>	-1,03	,217	,000	-1,67	-,39
	C3 Antagonist + <i>Botrytis</i>	Testigo	2,03	,177	,000	1,51	2,56
		<i>Botrytis</i>	-,18	,177	,996	-,70	,34
		Antagonista	2,03	,177	,000	1,51	2,56
		C1 Antagonista + <i>Botrytis</i>	,77	,217	,007	,13	1,41
		C2 Antagonista + <i>Botrytis</i>	1,03	,217	,000	,39	1,67

* La diferencia de medias es significativa con un nivel de .05

Infección

	Tratamiento		1	2	3
Tukey HSD	Testigo	90	,00		
	Antagonista	90	,00		
	C2 Antagonista + <i>Botrytis</i>	30		1,00	
	C1 Antagonista + <i>Botrytis</i>	30		1,27	
	C3 Antagonista + <i>Botrytis</i>	30			2,03
	<i>Botrytis</i>	90			2,21
	Sig.		1,000	,661	,917
Scheffe	Testigo	90	,00		
	Antagonista	90	,00		
	C2 Antagonista + <i>Botrytis</i>	30		1,00	
	C1 Antagonista + <i>Botrytis</i>	30		1,27	
	C3 Antagonista + <i>Botrytis</i>	30			2,03
	<i>Botrytis</i>	90			2,21

	Sig.		1,000	,811	,962
Hochberg	Testigo	90	,00		
	Antagonista	90	,00		
	C2 Antagonista + <i>Botrytis</i>	30		1,00	
	C1 Antagonista + <i>Botrytis</i>	30		1,27	
	C3 Antagonista + <i>Botrytis</i>	30			2,03
	<i>Botrytis</i>	90			2,21
	Sig.		1,000	,879	,996

CURRICULUM VITAE

Gina Natalie Leonelli Cantergiani, Chilena, RUT: 10.447664-3, nació el 21 de Marzo de 1966; hija de Victor y Teresa. Casada con Bruno Bertolotto Roncagliolo, tres hijos, Fiorella, Gina y Bruno.

Profesora de Estado en Biología, Química y Ciencias Naturales, año 1989, Licenciada en Agronomía y titulada como Ingeniero Agrónomo de la Universidad de La Frontera en 1994. Posteriormente ha realizado varios cursos en el área de la producción hortícola y visitado diversos centros de investigación, universidades y productores hortícolas nacionales e internacionales.

Profesionalmente se ha desempeñado como profesora ayudante de la asignatura de Producción Vegetal, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad Católica de Temuco. Como Ingeniero Agrónomo en el Programa de Transferencia Tecnológica de la Universidad. Desde 1995 a la fecha cumple funciones como académico en las cátedras y actividades de laboratorio de horticultura, Escuela de Agronomía, Facultad de Recursos Naturales, Universidad Católica de Temuco.

Ha publicado trabajos científicos de extensión y divulgativos, y ha participado en congresos y simposios nacionales e internacionales en el ámbito de la especialidad.

En gestión administrativa y financiera, ha asumido cargos de responsabilidad como Directora de la carrera Técnico Universitario en Producción Agropecuaria y Directora de la escuela de Agronomía, Facultad de Recursos Naturales, de la Universidad Católica de Temuco.

Durante su permanencia en la Universidad ha integrado equipos de trabajo en diversos comités técnicos, tales como, de docencia, de extensión, de planificación estratégica y de autoevaluación. También ha formado parte a nivel nacional del comité para la innovación agraria en el rubro hortícola, e integrante de la mesa hortícola regional. Ha participado en equipos para elaborar proyectos de desarrollo e investigación con diferentes fuentes de financiamiento, en el área de su especialidad y como consultor técnico de proyectos de investigación de la Fundación para la Innovación Agraria.