



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**“Efecto de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. como inductores de
resistencia en plantas de maíz a *Maize dwarf mosaic virus*-
MDMV (virus del mosaico enanizante del maíz)”**

MEMORIA DE TÍTULO

DANIEL ANTONIO SOTELO GAETE

TALCA-CHILE

2006

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA DE AGRONOMÍA

“Efecto de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. como inductores de resistencia en plantas de maíz a *Maize dwarf mosaic virus*-MDMV (virus del mosaico enanizante del maíz)”

POR

DANIEL ANTONIO SOTELO GAETE

MEMORIA DE TÍTULO

Presentada a la

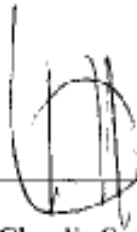
Universidad de Talca como

Parte de los requisitos para optar al título de

INGENIERO AGRÓNOMO

TALCA, 2006

HOJA DE APROBACIÓN

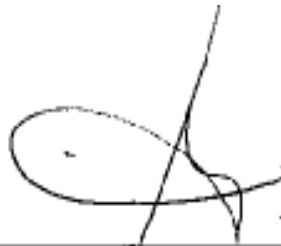


Profesor Guía: Ing. Agr. Ph. D. Claudio Sandoval Briones

Profesor de la Escuela de Agronomía

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad de Talca



Profesor Informante: Ing. Agr., Ph. D. Mauricio Lolas Canco

Profesor de la Escuela de Agronomía

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad de Talca

*“Hoy he terminado un capítulo de mi vida,
Pero tengo la convicción que me quedan
Muchos más por escribir...”*

*Gracias a Dios y a todas las personas
Que me acompañaron en este duro proceso
Y aunque algunos ya no estén
Siempre vivirán en mi corazón.
Gracias, a mis amigos, profesores
Y sobre todo a mi familia en especial
A mis abuelos y mi tía.*

**Autorización para la publicación
de memorias de Pregrado y tesis de Postgrado**

Yo, **Daniel Antonio Sotelo Gaete**, cédula de Identidad N° 12.008.496-8 autor de la memoria o tesis que se señala a continuación, autorizo a la Universidad de Talca para publicar en forma total o parcial, tanto en formato papel y/o electrónico, copias de mi trabajo.

Esta autorización se otorga en el marco de la ley N° 17.336 sobre Propiedad Intelectual, con carácter gratuito y no exclusivo para la Universidad.

Título de la memoria o tesis:	" Efecto de Trichoderma spp y Bacillus spp como inductores de resistencia en planta de Maiz a Maize dwarf mosaic virus -MDMV (virus del mosaico enanizante del maiz)"
Unidad Académica:	
Carrera o Programa:	
Título y/o grado al que se opta:	Ingeniero Agrónomo/ Licenciado en Ciencias Agrarias
Nota de calificación	6,3

Firma de Alumno



Rut: 12.008.496-8

RESUMEN

En la temporada 2005/2006 se realizó un ensayo destinado a determinar el efecto del virus del mosaico enanizante del maíz al ser inoculado en plantas de maíz previamente tratadas con aplicaciones de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. en forma separada por cada tratamiento y en un tercer tratamiento inoculado con el virus pero sin la aplicación de dichos biocontroladores. También se dejó un cuarto tratamiento sin la aplicación de biocontroladores y sin la inoculación del virus, de modo de comprobar que la semilla de maíz estaba libre del virus.

Este ensayo se desarrollo en un invernadero ubicado en el sector sur-oriente del Campus Lircay de la Universidad de Talca.

Como se mencionó anteriormente se evaluaron tres tratamientos uno con la aplicación de *Trichoderma* spp. en pre inoculación del virus, otro con la aplicación de *Bacillus* spp. también en pre inoculación del virus, un tercer tratamiento fue inoculado con el virus, pero no fue tratado con ningún biocontrolador y finalmente de dejo un cuarto tratamiento como testigo absoluto sin la aplicación de biocontroladores ni inoculación del virus.

Al mes y medio de la inoculación del virus se realizaron diferentes evaluaciones como medición del peso promedio por planta, altura de estas , junto con la prueba serológica DAS-ELISA realizada en el laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Talca, para ver que tratamiento logró reducir los síntomas característicos del virus. Adicionalmente se efectuó un conteo del número de hojas por planta, de modo de tener una idea del estado de desarrollo en que se encontraban al momento de la evaluación.

En cuanto a los resultados obtenidos, solo *Bacillus* spp. fue eficaz en la reducción de la concentración del patógeno en la planta. Sin embargo en las otras evaluaciones tales como altura y peso promedio por plantas no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

ABSTRACT

During the season of 2005/2006, an experiment was carried out to determine the *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. applications in corn plants inoculated with Mize dwarf mosaic virus. This experiment was conducted under greenhouse conditions.

As it was mentioned before, three treatments were tested; one with the application of *Trichoderma* spp. in pre-inoculation of the virus. Another with the application of *Bacillus* spp. also in pre-inoculation of the virus. A third treatment was inoculated with the virus, but not treated with any biocontroller. Finally, a fourth treatment was not treated and used as a absolute control.

Six weeks after inoculation of the virus, the average weight of every plant and their height was determined; also the presence of the virus was proved to traverse serological test DAS-ELISA

Besides, the number of leaves of each was quantified plant to have an idea of the phase of development of the plants at the moment of the evaluation.

The results demonstrated that only *Bacillus* spp. was efficient in the reduction of the virus concentration in the plant. In the other evaluations such as average weight and height of every plant, there were no significant differences between the treatments.

ÍNDICE

	Pág.
1. Introducción.....	1
1.1 Hipótesis.....	2
1.1.1 Objetivos Generales.....	2
1.1.2 Objetivos Específicos.....	3
2. Revisión Bibliográfica.....	4
2.1 Antecedentes del cultivo.....	4
2.2 Enfermedades del maíz.....	5
2.2.1 Control de las enfermedades del maíz.....	8
2.3 Enfermedades de origen viral que atacan al maíz	9
2.3.1 Virus del Mosaico Enanizante del Maíz.....	12
a) Ciclo de la enfermedad.....	13
b) Especies Hospederas.....	13
c) Sintomatología y daño.....	14
d) Epidemiología y transmisión.....	15
e) Detección e identificación del virus.....	16
f) Control.....	17
2.4 <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus</i> spp. como inductores de resistencia.....	18
3. Materiales y Métodos.....	20
3.1 Ubicación del ensayo.....	20
3.2 Producción de plantas.....	20
3.3 Obtención del material de inoculación de MDMV.....	20
3.4 Preparación del inóculo e inoculación.....	21

3.5 Aplicación de biocontroladores.....	21
3.6 Evaluación.....	22
3.6.1 Medición de la severidad.....	22
3.6.2 Presencia de MDMV por unidad experimental.....	23
3.6.3 Medición de altura, peso seco promedio y estimación de los estados de desarrollo.....	24
3.7 Diseño experimental y tratamientos.....	25
3.8 Análisis de resultados.....	26
4. Resultado y Discusión.....	27
4.1 Presencia del patógeno en la planta.....	27
4.2 Resultado del análisis de ELISA.....	29
4.3 Estado de desarrollo de las plantas al momento de la evaluación, altura y peso de plantas.....	31
4.3.1 Altura de plantas.....	32
4.3.2 Peso seco por planta.....	33
5. Conclusiones.....	35
6. Bibliografía.....	36

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
1. Cuadro 2.1: Patologías de importancia que atacan al cultivo del maíz.....	7
2. Cuadro 2.2: Principales virus que afectan al cultivo del maíz.....	11
3. Cuadro 2.3: Principales pulgones presentes en Chile los cuales corresponden a vectores del virus del mosaico enanizante del maíz-MDMV.....	16
4. Cuadro 3.1: Tratamientos a evaluar en el ensayo de determinación de la acción de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus</i> spp. como inductores de resistencia sobre <i>Maize dwarf mosaic virus</i> -MDMV en plantas de maíz.....	25
5. Cuadro 4.1: Evaluación de la severidad de Maize dwarf mosaic virus-MDMV en plantas de maíz tratadas con <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus</i> spp. en post inoculación, testigo sin la aplicación de biocontroladores y testigo absoluto (sin biocontroladores ni inoculación del virus).....	28
6. Cuadro 4.2 : Número de hojas a los 45 días post inoculación en plantas de maíz inoculadas con <i>Maize dwarf mosaic virus</i> -MDMV tratadas en pre inoculación con <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus</i> spp., en plantas sin la aplicación de biocontroladores y en aquellas usadas como testigo absoluto.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. Figura 2.1: Relación entre los factores que influyen en el desarrollo de una enfermedad.....	6
2. Figura 4.1: Valores de absorbancia obtenidos de la prueba serológica DAS-ELISA en muestras de plantas de maíz inoculadas con <i>Maize dwarf mosaic virus</i> -MDMV tratadas en pre inoculación con <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus</i> spp., en plantas sin aplicación de biocontroladores y en aquellas usadas como testigo absoluto.....	29
3. Figura 4.2: Altura promedio de plantas de maíz inoculadas con <i>Maize dwarf mosaic virus</i> -MDMV tratadas en pre inoculación con <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus</i> spp., en plantas sin aplicación de biocontroladores y en aquellas usadas como testigo absoluto.....	32
4. Figura 4.3: Peso seco promedio de plantas de maíz inoculadas con <i>Maize dwarf mosaic virus</i> -MDMV tratadas en pre inoculación con <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus</i> spp., en plantas sin aplicación de biocontroladores y en aquellas usadas como testigo absoluto.....	34

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo del maíz es uno de los más diversificados en el mundo. Se encuentra a nivel mundial después del trigo y el arroz, y cobra gran importancia en la alimentación tanto humana como animal (Peratori *et al.*, 1995).

En Chile se cuenta con aproximadamente 126 mil hectáreas (ODEPA, 2005). El país posee condiciones naturales, de clima y suelo, aptas para su cultivo y además dispone de semillas de alto potencial de producción, como lo son los híbridos y variedades mejoradas. Esto permite a los agricultores alcanzar rendimientos potenciales de hasta 140 qqm/ha (Peratori *et al.*, 1995).

Una de las principales razones de bajas en el rendimiento son los ataques de enfermedades y plagas. Dentro de las enfermedades se encuentran las relacionadas con virus, estos si bien poseen una estructura submicroscópica, son capaces de causar importantes pérdidas económicas (Fuentes, 1997). Entre los virus que producen un alto daño al cultivo se encuentra *Maize dwarf mosaic virus*-MDMV (virus del mosaico enanizante del maíz), que puede llegar a producir pérdidas del orden del 45% cuando el grado de severidad es alto (Tsai y Falk, 2000). Es una de las enfermedades virales más dañinas que ataca al cultivo del maíz (Pataky *et al.*, 1990)

Chile se ha transformado en uno de los principales países de América del sur en la producción de semillas, de las cuales gran parte son exportadas, además como se mencionó anteriormente cuenta con condiciones medioambientales y fitosanitarias óptimas (Peratori *et al.*, 1995), por ende nace la necesidad de descubrir mecanismos de control, que nos

permitan como país, mantener bajo control las distintas amenazas que pueda llegar a tener dicho cultivo, y de ese modo asegurar calidad de grano y altos rendimientos.

En el siguiente trabajo se evaluará dos tipos de controladores biológicos para observar que tan efectivo resultaría la aplicación de estos en el control preventivo de *Maize dwarf mosaic virus*-MDMV.

1.1. Hipótesis

Los microorganismos *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. junto con actuar como biocontroladores, de acuerdo con estudios realizados también estimularían la activación de distintos mecanismos de defensa de la planta. Estos actuarían reduciendo en las plantas los síntomas característicos de este virus. Estos actuarían aumentando la resistencia a distintos patógenos entre ellos virus. De acuerdo a esto, plantas de maíz inoculadas con estos biocontroladores serían menos susceptibles al ataque del *Maize dwarf mosaic virus*-MDMV (virus del mosaico enanizante del maíz).

1.1.1 Objetivo General

Determinar el efecto de la aplicación de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp. en plantas de maíz sobre la concentración de MDMV y la expresión de sus síntomas característicos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar si la aplicación de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp. actúan como inhibidores del desarrollo de MDMV o solo retardan sus síntomas.
- Realizar una comparación entre la concentración del virus en la planta, tanto para la aplicación de *Bacillus* spp. como para *Trichoderma* spp.
- Comparar alturas y peso seco de las distintas plantas tratadas con su correspondiente controlador biológico (*Bacillus* spp. o *Trichoderma* spp.)
- Contar el número de hojas extendidas de cada planta, de modo de poder comparar el estado de desarrollo de las plantas al final del ensayo

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antecedentes del cultivo del maíz

A nivel mundial la especie constituye uno de los tres cereales más importantes junto con el arroz y el trigo, siendo cultivada en todas las zonas templadas, subtropicales y tropicales en las que las lluvias o el riego es adecuado.

El cultivo del maíz representa un importante porcentaje de la totalidad de las hectáreas dedicadas a cultivos anuales. En Chile es el que ocupa la mayor superficie sembrada, con 126.000 hectáreas, lo que representa un 16.7% del total de superficie dedicada a cultivos anuales cultivadas durante la pasada temporada (2005/2006) (ODEPA, 2005).

La importancia del maíz radica en su amplio espectro de sus usos, ya sea en alimentación animal, consumo humano, uso industrial, y producción de semillas.

Por lo anterior podemos inferir que este cultivo posee un amplio mercado, lo que significa un apreciable retorno por hectárea siempre y cuando se obtengan buenos rendimientos y no se produzcan sobreproducciones a nivel mundial.

Chile posee condiciones naturales óptimas, tanto de clima como suelo para su cultivo y dispone de semillas de alto potencial de producción. (híbridos y variedades mejoradas). Ello permite obtener en siembras comerciales rendimientos de 140 quintales por hectárea o más. (Paratori *et al.*, 1995).

Estos al igual que la mayoría de los cultivos anuales se han ido incrementando en los últimos años adjudicando esta alza a la introducción de variedades mejoradas y un buen manejo agronómico.

2.2. Enfermedades de maíz

Cada componente de la planta, tallos hojas y raíces; pueden potencialmente contraer distintos tipos de enfermedades, cuya importancia radica en la disminución de los rendimientos y la calidad del grano.

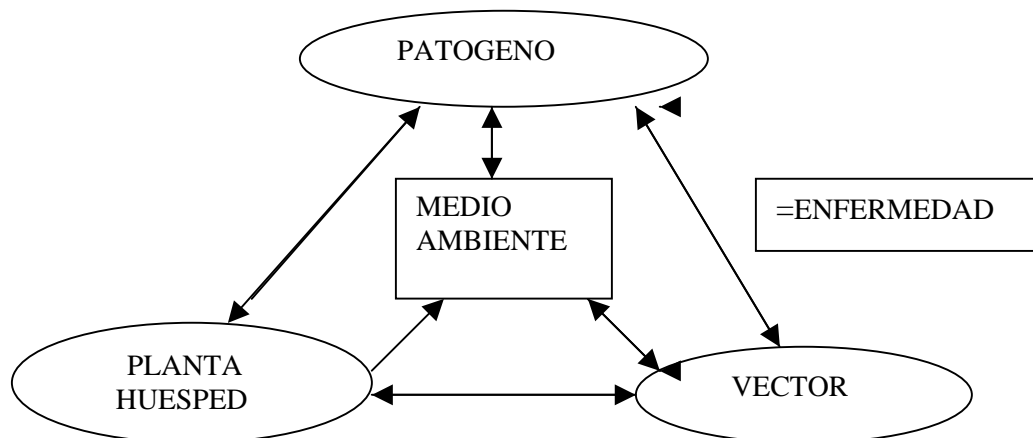
Dichas enfermedades se pueden clasificar en parasitarias (infecciosas), o no parasitarias (no infecciosas). Las primeras se deben a; hongos, bacterias, virus, microplasma, nemátodos y plantas parásitas. Las no parásitas resultan de condiciones de crecimiento desfavorable (Servicio de Extensión Cooperativo, Universidad de Illinois, y Servicio de Extensión Departamento de Agricultura EUA, 1980).

Las enfermedades son procesos dinámicos, variables en magnitud e intensidad (Latorre, 2004), exclusivos de los sistemas vivientes que incumbe a todos los niveles de organización biológica. (García-Arenal y Fraile, 1996). Así se explica la considerable variabilidad en la expresión externa de los cambios fisiológicos o síntomas de una enfermedad.

Al principio de la enfermedad por lo general las alteraciones son mínimas y no se traducen necesariamente en modificaciones visibles, sin embargo a medida que el proceso infeccioso se desarrolla, se intensifican los desordenes fisiológicos, apareciendo las primeras manifestaciones de la patología. El conjunto de síntomas propios de una patogénesis constituye el síndrome de la enfermedad. (Latorre, 2004).

Los distintos factores que influyen en la gravedad y magnitud de la enfermedad dependen del tipo de patógeno, el medio, ambiente, la presencia de vectores y la susceptibilidad del huésped en este caso del maíz. Estos factores deben estar presentes y en equilibrio para que se pueda desarrollar la patología.

Figura 2.1: Relación entre los factores que influyen en el desarrollo de una enfermedad



Fuente: Servicio de extensión cooperativo, Universidad de Illinois y Servicio de Extensión Departamento de Agricultura EUA (1980).

Las enfermedades no solamente tienen el potencial de destruir las cosechas; aún en los casos en que no causan pérdidas totales, por lo general reducen en forma crónica el rendimiento de la mayoría de los cultivos, obligando a la toma de medidas de control que implícitamente aumentan los costos de producción y afectan la calidad de los productos cosechados (González, 1985).

Es importante destacar que existe un número considerable de enfermedades que atacan al maíz, pero en Chile este se restringe por diversos factores medioambientales, lo que constituye una ventaja comparativa.

Según Latorre (2004), en nuestro país se han descrito aproximadamente 10 patologías de importancia que afectan este cultivo. (Cuadro 2.1.).

Cuadro 2.1: Patologías de importancia que atacan al cultivo del maíz.

ENFERMEDAD	AGENTE CAUSAL
Carbón Común	<i>Ustilago zeaе</i>
Carbón de la Mazorca	<i>Sphacelotheca reiliana</i>
Fusariosis	<i>Fusarium moniliforme</i>
Pudrición de la Mazorca	<i>Bipolaris zeicola</i>
Moho del maíz almacenado	<i>Aspergillus spp., Penicillium spp., Rhizopus spp., Mucor spp., Alternaria spp.</i>
Pudrición de semillas y caídas de plántulas	<i>Fusarium spp., Phytium spp., Rhizoctonia spp.</i>
Mildiù	<i>Sclerophthora macrospora</i>
Royal	<i>Puccinia sorghi</i>
Virus del mosaico enanizante del maíz	<i>Maize dwarf mosaic virus-MDMV</i>

Fuente: Latorre, 2004

2.2.1. Control de las enfermedades del maíz

El objetivo principal del control de enfermedades radica en destruir la combinación de los factores necesarios para su aparición (condiciones medio ambientales, huésped, patógeno y vector), y esto se basa en el conocimiento de ellos.

El control de la enfermedad se puede lograr mediante un solo procedimiento, pero para que sea satisfactorio en la mayoría de los casos requiere la aplicación de diversas medidas, apuntando últimamente a la combinación de alternativas, que es lo que se conoce como control integrado.

Los procedimientos de control de las enfermedades se pueden dividir en cuatro categorías que se detallan a continuación:

- Resistencia a la enfermedad
- Control químico
- Manejo agronómico y cultural
- Eliminación del patógeno.

(Servicio de Extensión Cooperativo Universidad de Illinois y Servicio de Extensión Departamento de Agricultura EUA, 1980).

2.3 Enfermedades de origen viral que atacan al maíz.

Los patógenos de origen viral se encuentran entre los agentes causales de enfermedades más complejos, ampliamente diseminados y más importantes en el mundo.

Desde el punto de vista práctico nos basta considerar que el virus se comporta como un parásito obligado, eminentemente infeccioso, y, en general, específico de una planta determinada, sin otro objetivo que la reproducción. Sus síntomas externos se manifiestan generalmente en toda la planta, ya sea como mosaicos, necrosis y diversas deformaciones en hojas, frutos o tallos (Domínguez, 1972).

En maíz se han descrito más de 25 virus, pero de ellos solo algunos pueden llegar potencialmente a infectar a la planta, y corresponden a aquellos que son capaces de desarrollarse en forma natural en el campo.

La complejidad de los virus radica en que con los mínimos componentes pueden llegar a parasitar una planta. Están compuestos principalmente por un ácido nucleico (RNA o DNA) rodeado por una cápsula proteica. Dicho ácido nucleico puede ser de hebra simple (ss) o de doble hebra (ds), No obstante la gran parte de los virus que infectan vegetales están compuestos por RNA hebra simple (ssRNA) (Schumann, 1991).

De acuerdo con Latorre (2004), pueden adoptar diversas formas: bastón, esféricos o poliédricos, mostrando una gran especificidad por las plantas que parasitan y en las cuales se multiplican, para lo que usan precursores y obtienen la energía necesaria de la célula hospedera. Se han descrito más de 400 virus reunidos en 35 géneros, que producen daños a las plantas (García-Arenal y García, 1996).

Las enfermedades causadas por este tipo de patógenos son frecuentemente detectadas por los síntomas que estos causan en las plantas los que por ejemplo a nivel foliar comúnmente consisten en cambios en coloración del órgano en cuestión.

Es muy difícil poder relacionar con toda certeza un tipo de virus a un cierto tipo de síntomas, ya que muchas veces estos son muy confusos y también pueden deberse a deficiencias minerales o anormalidades genéticas (Vincelli y Bessin, 2001).

Cuando la sintomatología es confusa, y con el fin de descartar tanto anormalidades genéticas como deficiencias minerales se pueden utilizar distintas técnicas de diagnóstico como:

- 1.- Transmisión a plantas indicadoras (pruebas biológicas).
 - 2.- Microscopía electrónica de tejido enfermo para observar las partículas del virus o de los cuerpos semejantes a fitoplasmas o bacterias fastidiosas.
 - 3.- Serología para detectar relaciones homólogas con virus vegetales conocidos
- (Servicio de Extensión Cooperativo, Universidad de Illinois y Servicio de Extensión Departamento de Agricultura EUA, 1980).

Según Agrios (1996), este tipo de enfermedades se multiplican dentro de las células vivas de la planta huésped, teniendo la habilidad de desarrollar los síntomas característicos de la patología a la que corresponde, causando así la enfermedad. En primer lugar los virus se introducen en la célula huésped, a través de una herida en la planta susceptible liberando ácido nucleico viral, el que luego se replica y comienza a colonizar a la célula (Matthews, 1991) a través de los plasmodesmos. A continuación siguiendo con el proceso infectivo, el virus se moviliza a largas distancias por medio del floema, para luego transmitirse a nuevas

plantas huésped (García-Arenal y García, 1996; Shumann, 1991; Matthews, 1991). Esto puede ser mecánico ya sea por heridas o bien mediante vectores que diseminan el virus, de los cuales los más importantes son los áfidos.

Para el caso del maíz existen pocos virus que se puedan transmitir por semillas, lo más común es que éstos sobrevivan en malezas bianuales o perennes, en el mismo cultivo y como se mencionó anteriormente en insectos. (Servicio de Extensión Cooperativo, Universidad de Illinois y Servicio de Extensión Departamento de Agricultura EUA, 1980).

Cuadro 2.2: Principales virus que afectan al cultivo del maíz.

VIRUS	FORMA DE TRANSMISIÓN
Virus del mosaico de la caña de azúcar (<i>Sugar cane mosaic virus-SCMV</i>)	Mecánica y áfidos
Virus del mosaico del maíz (<i>Maize mosaic virus-MMV</i>)	<i>Peregrinus maydis</i> (insecto)
Virus del mosaico amarillo del trigo (<i>Wheat streak mosaic virus-WSMV</i>)	Mecánica y áfidos
Virus del rayado fino del maíz (<i>Maize fine stripe virus-MRFV</i>)	<i>Dalbulus maydis</i> (Langostino)
Virus del enanismo clorótico del maíz (<i>Maize chlorotic dwarf virus-MCDV</i>)	Insecto del grupo de los saltamontes
Virus del mosaico o estriado del maíz (<i>Maize streak virus-MSU</i>)	Insectos del grupo de <i>Perigrinus maydis</i>
Virus del mosaico enanizante del maíz (<i>Maize dwarf mosaic virus-MDMV</i>)	Mecánica y más de 25 especies de áfidos

Fuente: Adaptado por el autor a partir de Malateguti (2000), Lipps y Mills (2001), Servicio de extensión cooperativo, Universidad de Illinois y Servicio de Extensión Departamento de Agricultura EUA (1980).

2.3.1 Virus del mosaico enanizante del maíz-MDMV

El mosaico enano del maíz causado por MDMV, es una de las enfermedades virósicas más importantes y de más amplia distribución en maíz (*Zea mays* L.) en las regiones templadas del mundo y una verdadera amenaza para los productores de semillas (Tsai y Falk, 2000).

Fue la primera enfermedad causada por virus que provocó una extensa devastación en cultivos anuales (The cooperative Extension Service, University of Illinois and Extension service, United States Department of Agriculture, 1999).

La incidencia de esta enfermedad en cultivos comerciales es generalmente menor al 5%, pero puede llegar en algunas ocasiones a llegar hasta un 65% (Douglas, 1988). No obstante, las pérdidas del cultivo van a depender del grado de susceptibilidad del genotipo del maíz, de la raza del virus, la edad de la planta y factores medioambientales.

El virus del mosaico enanizante del maíz recibió su nombre de Williams y Alexander y está estrechamente relacionado con el virus de la caña de azúcar (SCMV), el que tiene a lo menos 13 razas (Tsai y Falk, 2000)

La diferencia que existe entre ambos (MDMV y SCMV) radica en que las razas del segundo no infectan al maicillo (*Sorghum halepense*), en cambio todas las razas del primero, con excepción de la cepa B, infectan a dicha maleza (Yassen *et al.*, 1988).

Las razas A y B de MDMV fueron descritas por Mackenzie *et al.*(1966), quien afirmó que la segunda no infecta al maicillo, sin embargo según Loui (1986) esta sería mucho más infectiva que la cepa A, que corresponde a la más común.

Esta enfermedad fue detectada en Chile por Apablaza (1980) en la región Metropolitana e identificada por Jossen *et al.* (1988). Siendo probablemente la cepa B la que se encuentre en el país (Apablaza, 1999).

a) Ciclo de la enfermedad

El MDMV puede sobrevivir entre las cosechas de maíz dentro de los rizomas subterráneos de maicillo. Estos comienzan a brotar durante la primavera y principios de verano y así el virus puede ser transmitido a plantas de maíz por pulgones vectores que se alimentan tanto de la planta de maíz como de la maleza (Vincelli y Bessin, 2001).

De acuerdo con esto se puede decir que existen más de 20 especies de afidos que pueden transmitir la enfermedad (Lipss y Mills, 2001). Dichos vectores adquieren el virus de forma no persistente, es decir, que no lo transmiten por el transcurso de su vida (Vincelli y Bessin, 2001).

Lo adquieren y lo retienen para luego transmitirlo por un período de 15 a 30 minutos, conduciéndolo de esta manera a otras plantas (Lipss y Mills, 2001).

b) Especies hospederas

Según Apablaza (1999), son hospederos naturales importantes de este virus el maíz para grano, maíz dulce, sorgo y maicillo. También malezas como bromo, hualcacho, pasto bermuda y chépica (Gibbs, 1990)

Es importante señalar que otras especies como trigo, cebada, avena y arroz cultivado no son hospederos del virus.

Dicho patógeno (MDMV), está ampliamente distribuido en los lugares donde se cultiva maíz y sorgo (Apablaza, 1999; Gibbs,1990). En el país, se ha detectado desde la V región en la zona de San Felipe hasta la VIII región en San Carlos (Apablaza, 1999).

c) Sintomatología y daño

En el marco de las alteraciones asociadas a MDMV, se pueden distinguir moteados y estrías foliares cloróticas y un leve o severo mosaico foliar, amarillez, enrojecimiento y necrosis parcial de las hojas, con mazorcas parcialmente dentadas, lo que sin lugar a dudas lleva a una disminución del rendimiento.

Cuando la infección se produce tempranamente en el desarrollo del cultivo ocurre un marcado acortamiento de los entrenudos superiores, junto con pudriciones de las raíces, corona y tallo. La infección en variedades sensibles puede disminuir el rendimiento hasta en un 40% (Agrios, 1996; Apablaza, 1999; Latorre, 2004).

Los síntomas pueden aparecer en el campo dentro de los 30 días después de la emergencia de la plántula si ésta se ha generado de semillas infectadas. Por otra parte, el periodo de incubación es de 4 a 12 días si la planta es infectada en estados de desarrollo más avanzados (Servicio de Extensión Cooperativo, Universidad de Illinois y Servicio de Extensión Departamento de Agricultura EUA, 1980).

d) Epidemiología y transmisión

De acuerdo con Schumann (1991), los virus son muy pequeños e incapaces de crecer o moverse por lo que deben entrar a la célula de las plantas a través de heridas.

La transmisión de MDMV ocurre de manera eficiente por áfidos de una manera no persistente, es decir, de modo no circulativo. Así, tanto la adquisición como la inoculación del virus toma lugar en unos pocos segundos (Romero, 2000). Por otra parte la transmisión por semillas es baja y solo puede llegar hasta un 0.5%. La enfermedad no se transmite por polen, ni por contacto entre las plantas de maíz (Tsai y Falk, 2000; Gibas, 1990).

Según Apablaza (1999), MDMV inverna en malezas como maicillo y lo diseminan al menos 20 especies de áfidos. También puede ser transmitido aunque en un muy bajo porcentaje mediante vía mecánica (por heridas).

La eficiencia de transmisión varía mucho dependiendo de la especie del áfido, las condiciones medioambientales, la raza del virus y la presencia de malezas hospederas. Un punto importante de considerar es la presencia de corrientes de aires las que pueden ayudar a los vectores a moverse en grandes distancias (Tsai y Falk, 2000).

A continuación en el cuadro 2.3.1 se presentan algunas especies conocidas como vectores de MDMV, ordenados de mayor a menor en cuanto a la eficiencia de transmisión.

Cuadro 2.3: Principales pulgones presentes en Chile los cuales corresponden a vectores del virus del mosaico enanizante del maíz-MDMV.

NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO
Pulgón negro de la alfalfa	<i>Aphis craccivora</i>
Pulgón de la haba	<i>Aphis fabae</i>
Pulgón del melón	<i>Aphis gossypii</i>
Pulgón de la arveja	<i>Acyrtosiphum pisum</i>
Pulgón verde del duraznero	<i>Myzus persicae</i>
Pulgón de la espiga	<i>Sitobion avenae</i>
Pulgón negro de los cereales	<i>Rhopalosiphum padi</i>
Pulgón de la papa	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>
Pulgón del maíz	<i>Rhopalosiphum maidis</i>
Pulgón de las crucíferas	<i>Brevicoryne brassicae</i>

Fuente: Adaptado por el autor a partir de Apablaza (1999) y González (1988).

e) Detección e identificación del virus

Al tener la duda de que un virus es el origen de una enfermedad, se debe realizar una serie de pruebas para determinar su identidad.

Por una parte se realizan pruebas biológicas inoculando las especies que son hospederas de dicho virus y en las cuales se producen los mismos síntomas. Estas actúan como plantas indicadoras. También se debe verificar el tipo de transmisión, es decir, si éste se transmite en forma mecánica, por insectos, por ambos, o por otros medios.

Una vez que se sospecha de la identidad del virus, deben aplicarse pruebas serológicas como la prueba de DAS-ELISA (Double antibody sandwich-Enzyme linked immunosorbent assay) utilizando anticuerpos específicos y en caso que estos resultados

arrojen positivo, puede hacerse una identificación más precisa a través de técnicas moleculares (Agrios, 1996)

La técnica de ELISA es la más usada en virología vegetal y posee ciertas ventajas en comparación con otros métodos, como lo son su facilidad de aplicación, la posibilidad de analizar un gran número de muestras y la rapidez con que se obtienen los resultados. Una de las variante de esta técnica es la del Double antibody sandwich-ELISA (DAS-ELISA) (Romero, 2000).

f) Control

Una vez que la planta ha adquirido el virus es imposible, erradicarlo. De aquí radica la importancia de implementar medidas de control preventiva como por ejemplo:

1.-El uso de híbridos resistentes: existen muchos híbridos comerciales con un alto nivel de tolerancia al MDMV. Estos poseen el gen de resistencia *mdm1* ubicado en el cromosoma 6. También es importante señalar que existen niveles de resistencias para las distintas razas del virus, es decir, una variedad puede ser resistente para una raza y susceptible a otra.

2.- Adecuado control de malezas hospederas y control de insectos vectores: Se debe realizar un buen manejo cultural para destruir el maicillo u otros huéspedes reservorios que permiten la sobrevivencia invernal del virus y así evitar que los vectores lo transmitan (The Cooperative Extension Service, University of Illinois and Extension service, United States Departament of Agriculture, 1999).

3.- Utilizar material libre de la enfermedad.

2.4 *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. como inductores de resistencia.

El genero *Trichoderma* spp. corresponde a un hongo saprófito, habitante común del suelo que pertenece a la subdivisión Deuteromycota, siendo un hongo imperfecto que carece de estructuras de reproducción sexual. Se encuentra ubicado en la clase Hyphales y sus esporas asexuales, las cuales se forman sobre hifas o en su interior, se encuentran expuestas libremente a la atmósfera (Agrios, 1996).

Además existe evidencia de estimulación de raíces en algunas especies forestales y hortícolas, así como de fortalecer las plantas tratadas con el biocontrolador.

Por otra parte *Bacillus* spp. corresponde a una bacteria Gram positiva (+) del género *Bacillus*, familia *Bacillaceae*, es el mayor del orden *Bacillales* (Prescott *et al.*, 2004).

Existe muy poca información en cuanto a la acción de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp., como inductores de resistencia ante el ataque de virus. Sin embargo desde hace mucho tiempo se ha trabajado en dichos microorganismos como controladores biológicos tanto para enfermedades fungosas como para plagas e insectos.

Ya en 1993 se cultivaban cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*, con el objetivo de ser usados como biopesticidas (Meza-Basso *et al.*. 1993)

Las plantas poseen métodos de defensa que pueden ser activados en respuesta a distintos niveles de ataques de patógenos y parásitos, en ambientes extremos, es decir, desde virus microscópicos hasta insectos herbívoros. El tiempo de estas respuestas de defensas de las plantas pueden ser críticos, y pueden significar la diferencia entre la adaptación o muerte de ésta.

Existen dos formas de inducir resistencia a una planta. Por una parte se encuentra la resistencia adquirida sistémica, SAR “Systemic acquired resistanse” y la resistencia inducida sistémica, ISR, “Induced systemic resistanse”. Estas son las dos formas de inducir resistencia donde la defensa de la planta se desarrolla una vez que la planta es infectada. En este trabajo se busca lograr que las plantas desarrollen una resistencia sistémica inducida (ISR), en este contexto la planta captaría el estímulo de los biocontroladores a nivel de las raíces las que activarían la producción de ácido jasmonico y etileno, los que se volatilizarían y serían captados por el resto de la planta ya sea tallos y hojas, preparándose estas para el ataque de algún patógeno en este caso MDMV (Vallad and Goodman, 2004).

En cuanto a inducción de resistencia a virus, se puede mencionar un trabajo publicado en el 2003 en el que se evaluaron Rhizobacterias como promotores de crecimiento e inductores de resistencia a la infección de *Cucumber mosaic virus*-CMV. Los resultados mostraron que los tratamientos con plantas tratadas con la biopreparación resultaron efectivos tanto en la inducción de crecimiento como en la protección contra la infección por CMV (Vallad y Goodman, 2004).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Ubicación del ensayo

El ensayo se realizó dentro de los invernaderos ubicados en el sector sur-oriente del Campus Lircay, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad de Talca durante la temporada 2005/2006.

3.2. Producción de plantas

Las plantas utilizadas en el ensayo corresponden al híbrido Rio Balcer de la empresa Winter Seed.

Las semillas se encontraban libres del virus, *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. Con estos materiales se procedió a la siembra en forma manual sobre sustrato (tierra de hojas) en bolsas plásticas (1 litro de capacidad). Se emplearon 130 bolsas para un mismo número de plantas, sembrándose 3 semillas por bolsa de modo de asegurar la germinación y así el establecimiento de la totalidad de las plantas.

3.3. Obtención del material de inoculación de MDMV

Como fuente de MDMV se utilizó hojas de maíz extraídas de una siembra comercial, las cuales presentaban síntomas propios de mosaico enanizante. La presencia del virus en el tejido fue verificada a través de la prueba serológica de DAS-ELISA,

confirmando así, de esta manera, que los síntomas visuales que se observaron correspondían a la infección de MDMV.

Este material de inoculación una vez seco, fue almacenado en un recipiente conteniendo sílicagel a temperatura ambiente en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Talca.

3.4. Preparación del inóculo e inoculación

El inóculo a utilizar se preparó macerando el tejido vegetal empleando morteros estériles. Este fue diluido en tampón fosfato 10 mM (pH 7.0) en una relación 1:10, es decir, 0,4 g de tejido por cada 4 ml de tampón. Una vez obtenido el extracto se procedió a la inoculación, la que se realizó según el tratamiento que corresponda.

Las plantas se inocularon cuando presentaban 4 hojas verdaderas utilizando un sacabocado estéril. Este se sumergió en el inóculo y luego se realizó una herida con dicho sacabocado en dos hojas por cada planta.

3.5. Aplicación de Biocontroladores

En el ensayo se evaluó el efecto de los biocontroladores *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp., sobre la infección de MDMV. Para el primero se utilizó una mezcla que incluye las cepas Sherwood, Trailes y Queule, las que corresponde a un aislado nativo obtenido por el laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Talca, cuyo nombre comercial es Trichonativa.

En el caso de *Bacillus* spp. se utilizó la cepa Antumávida, la que también corresponde a una cepa nativa obtenida a través de un proyecto FIA desarrollado por el mismo laboratorio.

La aplicación de ambos biocontroladores se realizó utilizando un aspersor manual en cantidades del orden de 10^9 UFC/ml lo que corresponde a 50 ml en 1 litro de agua para la mezcla de *Trichoderma* spp. y 10 g por litro de agua para la cepa de *Bacillus* spp. El majamiento se efectuó hasta el punto de escurrimiento.

De acuerdo a lo anterior el biocontrolador se aplicó 15, 4 y 2 días pre inoculación con el virus.

3.6. Evaluación

Transcurridos 15, 30 y 45 días post inoculación con el virus se midió el grado de severidad que presentaban las plantas y al final del ensayo se junto con la altura, peso seco y estado de desarrollo de las plantas.

3.6.1 Medición de la severidad

Para la determinación de la severidad se utilizó la siguiente escala:

0	Sin síntomas
1	Moteado leve y estrías amarillas
2	Moteado severo
3	Moteado y mosaico severo

Para cada unidad experimental se consideró 13 plantas, se les midió el nivel de daño con respecto a la escala señalada anteriormente y se extrajo la moda por tratamiento, es decir el número que mas se repite, de este modo podemos hacer una comparación objetiva por tratamientos.

3.6.2 Presencia de MDMV por unidad experimental

Para verificar la presencia del virus en las plantas se utilizó la prueba serológica de DAS-ELISA. Para este fin se tomó una muestra compuesta de cada unidad experimental que incluyó trozos de dos hojas por cada planta. Estas muestras fueron pesadas y diluidas 1:20 (p/v) en tampón de extracción general, es decir, 0.2 g de muestra más 4 ml de tampón, siendo maceradas en morteros estériles. Una vez obtenido el extracto se depositaron 200 μ l de éste en celdillas de una placa de poliestireno previamente sensibilizada con un anticuerpo monoclonal que detecta tanto la raza A como B del virus. Para lo anterior el anticuerpo fue diluido en tampón carbonato (0.02 M, pH 9.6) y depositado en las placas, en cantidades de 100 μ l, incubándose 4 horas a 37° C. Después de esto se adicionaron las muestras extraídas anteriormente y se incubaron durante toda la noche a 4° C. Luego se agregaron 100 μ l del anticuerpo conjugado con la enzima, diluida en tampón conjugado 1:500, incubándose 4 horas a 37° C. Por último se agregó nitrato (p-nitrofenil fosfato) diluido en tampón sustrato, midiendo absorbancia a 405 nm a los 15 y 45 minutos. Entre cada paso se efectuaron tres lavados utilizando PBS-Tween. También como una forma de verificar el correcto funcionamiento de la técnica se utilizó un testigo absoluto sano y

otro enfermo los que también fueron empleados de modo de contrastar las distintas lecturas de absorbancia entre los distintos tratamientos.

3.6.3 Medición de altura, peso seco promedio y estimación de los estados de desarrollo

Al final del ensayo se procedió a medir altura y peso seco promedio por plantas, considerando solo la parte aérea de ellas. Para este fin las plantas una vez cortadas a ras de suelo fueron medidas con una regla desde la base hasta la base de la última hoja extendida.

Por otra parte una vez medidas y habiendo tomado la muestra compuesta para la prueba serológica de DAS-ELISA, se procedió a secar las plantas por tratamiento en bolsas de papel de envolver, para esto se llevó al horno a 70° C por 72 horas peso constante. Luego se dividió el peso del tratamiento por el número de plantas de cada uno, obteniéndose así el peso seco promedio por planta para cada tratamiento.

También se estimó el estado de desarrollo de las plantas al término del ensayo, de modo de poder estandarizar las mediciones y darle validez a éstas. Esta determinación se realizó contabilizando el número total de hojas extendidas que presentaban las plantas, así dos plantas con mismo número de hojas se encuentran en el mismo estado fenológico y cualquier comparación que se realice será correcta, no así comparar por ejemplo, altura en plantas en distinto estado de desarrollo.

3.7. Diseño experimental y tratamientos

Para el ensayo se usó un diseño experimental completamente al azar, con 3 tratamientos, 3 repeticiones por tratamiento y 13 plantas por unidad experimental. Con esto se llegó a un total de 117 plantas en el ensayo. Adicionalmente se dejó un cuarto tratamiento como testigo absoluto el cual estuvo constituido por 13 plantas. Dicho testigo absoluto no fue incluido en el análisis estadístico y solo se empleó para comprobar que las plantas no hallan sido contaminadas por otro factor externo al ensayo.

Cuadro 3.1 Tratamientos evaluados en el ensayo de determinación del efecto de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. sobre la resistencia a *Maize dwarf mosaic virus*-MDMV en plantas de maíz.

TRATAMIENTOS	DESCRIPCION
T1	Aspersión de <i>Trichoderma</i> spp. 15, 4 y 2 días pre inoculación con MDMV
T2	Aspersión de <i>Bacillus</i> spp. 15, 4 y 2 días pre inoculación con MDMV
T3	Testigo, sin aplicación biocontrolador previo a la inoculación con MDMV
T4	Testigo absoluto, sin aplicación de biocontroladores ni inoculación con MDMV

3.8 Análisis de resultados

Los datos obtenidos en las distintas evaluaciones fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA), mediante el programa estadístico Statgraphics Plus para Windows.

En los casos en que la ANDEVA resultó significativa se procedió a realizar la separación de medias según el método de Duncan.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Presencia del patógeno en la planta

Una vez finalizado el ensayo se pudo comprobar la presencia del virus en todos los tratamientos que fueron inoculados con el patógeno. Por otra parte el testigo absoluto sin inoculación de virus, ni aplicación de biocontroladores, no mostró ningún tipo de síntomas, lo que en cierta medida nos indica que:

- La inoculación del virus se llevo a cabo de manera correcta
- La semilla utilizada no estaba contaminada con ningún tipo de patógeno.

Los síntomas mostrados por las plantas inoculadas corresponden a los provocados por la enfermedad, tales como: enanismo, estrías amarillas a lo largo de la nervadura, mosaicos y moteados irregulares de tonos verde claro y oscuros, en todas las hojas de la planta. Además se observó el desarrollo de estrías amarillas muy evidentes a lo largo de las venas de las hojas, síntoma que concuerda con lo citado por Apablaza (1999), Yossen *et al.* (1988) y Davis (2002) para éste patógeno.

Cabe destacar que ningún tratamiento presento este tipo de síntomas de forma severa, desde inoculación hasta el final del ensayo 45 días después. Esto se ve reflejado en los niveles de severidad observados, los que desde la primera evaluación efectuada a los 15 días post inoculación hasta la última realizada un mes y medio después, como lo muestra el cuadro 4.1

Cuadro 4.1 Evaluación de la severidad de *Maize dwarf mosaic virus*-MDMV en plantas de maíz tratadas con *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. en post inoculación, testigo sin la aplicación de biocontroladores y testigo absoluto (sin biocontroladores ni inoculación del virus)

Tratamientos	Días post inoculación		
	15	30	45
T1	1	1	1
T2	1	1	1
T3	1	2	2
T4	0	0	0

Donde se define:

T1: Aplicación de *Trichoderma* spp. en pre inoculación

T2: Aplicación de *Bacillus* spp. en pre inoculación

T3: Testigo inoculado con el virus y sin la aplicación de biocontroladores

T4: Testigo absoluto, sin inoculación ni aplicación de biocontroladores

Y en cuanto a la escala de severidad:

0	Sin síntomas
1	Moteado leve y estrías amarillas
2	Moteado severo
3	Moteado y mosaico severo

Solo el tratamiento inoculado con el virus pero sin aplicación de biocontroladores mostró un leve incremento en la severidad de la enfermedad a través del tiempo.

4.2. Resultados del análisis de DAS-ELISA (Double antibody sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

De cada unidad experimental constituida por 13 plantas se extrajo una muestra compuesta correspondiente a cada tratamiento y repetición a la que se le realizó la prueba serológica de DAS-ELISA.

Los valores de absorbancia obtenidos a los 45 minutos luego de la adición del sustrato se introdujeron al programa estadístico Statgraphics, el cual arrojó diferencia estadística entre ellos. En la Figura 4.1 se resumen estos resultados para cada tratamiento. El testigo absoluto no se sometió al análisis estadístico, utilizándose solo como referencia.

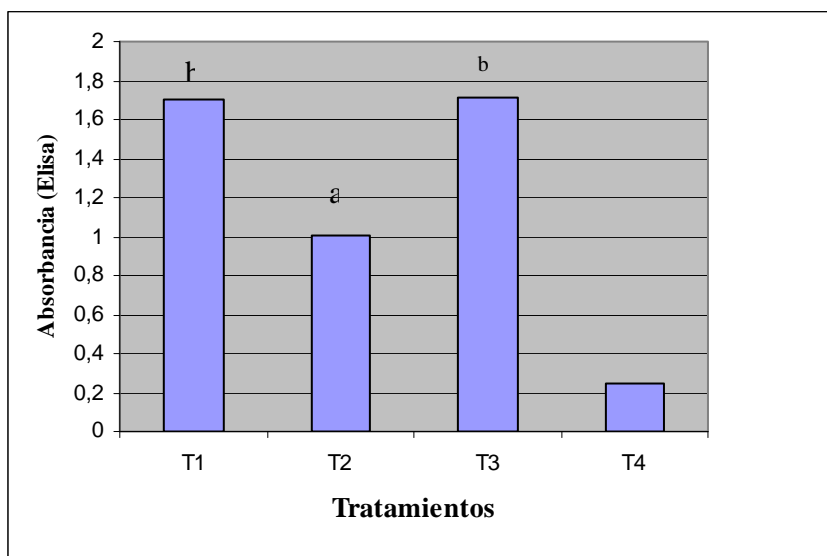


Figura 4.1 Valores de absorbancia obtenidos en la prueba serológica DAS-ELISA en muestras de plantas de maíz inoculadas con *Maize dwarf mosaic virus*-MDMV tratadas en pre inoculación con *Trichoderma* spp y *Bacillus* spp., en plantas sin aplicación de biocontroladores y en aquellas usadas como testigo absoluto.

Donde se define que:

T1: Aplicación de *Trichoderma* spp. en pre inoculación

T2: Aplicación de *Bacillus* spp. en pre inoculación

T3: Testigo inoculado con el virus y sin la aplicación de biocontroladores

T4: Testigo absoluto, sin inoculación ni aplicación de biocontroladores

De la figura podemos inferir, que tanto muestras obtenidas de plantas tratadas con *Trichoderma* spp. en pre inoculación (T 1), como el tratamiento sin aplicación de biocontroladores pero inoculado con el virus (T3), presentan los valores mayores de absorbancia, y por ende de concentración del patógeno. Ambos tratamientos no difieren estadísticamente. Lo anterior indica que *Trichoderma* spp no fue efectivo en inducir mecanismos que redujeran la replicación y concentración del virus en el huésped y estadísticamente no difirió del tratamiento inoculado con MDMV y no tratado.

Por otra parte *Bacillus* spp. (T2) mostró una pequeña disminución en los valores de absorbancia, lo que indica algún efecto en la replicación del patógeno, sin embargo estos resultados no permiten concluir que la aplicación de esta bacteria es realmente efectiva en el control de MDMV. Será necesario entonces la evaluación de otros factores.

También es importante mencionar que el testigo absoluto (T4), aunque no fue considerado en términos del análisis estadísticos presentó el valor más bajo de absorbancia, con lo que se puede asegurar la ausencia del virus en dicho tratamiento.

Además se puede rescatar que no existió contaminación cruzada, es decir, que no habían vectores que podrían haber transmitido el virus al testigo absoluto, ya que éste se encontraba en el mismo invernadero sin ninguna separación física del resto de los

tratamientos y no presentó altos niveles de absorbancia que podrían indicar la presencia del patógeno.

Si bien es cierto los valores de absorbancia del testigo absoluto no fueron 0 sino que aproximadamente 0.2 estos pueden ser atribuibles al error experimental.

4.3.Estado de desarrollo de las plantas al momento de la evaluación, altura y peso de plantas.

Tomando en cuenta que estamos analizando los síntomas provocados por MDMV, es de suma importancia tener en cuenta que uno de sus principales efectos sobre el huésped y al que debe su nombre es el enanismo. Esto no solo lleva a un menor tamaño de las plantas, sino que también puede afectar su desarrollo.

Por lo anterior dentro de las evaluaciones se utilizó la aparición de hojas como un índice del estado de desarrollo en el que se encontraban las plantas, de modo de poder asegurarnos que comparaciones en parámetros como altura eran válidas. Para esto, al momento de la evaluación final se contó el número de hojas de cada planta y los resultados se muestran en el cuadro 4.2:

Cuadro 4.2. Numero de hojas a los 45 días post inoculación en plantas de maíz inoculadas con *Maize dwarf mosaic virus*-MDMV tratadas en pre inoculación con *Trichoderma* spp y *Bacillus* spp., en plantas sin aplicación de biocontroladores y en aquellas usadas como testigo absoluto.

Tratamiento	N° de hojas/planta
T1	7
T2	7
T3	7
T4	7

De acuerdo con estos resultados podemos decir que todas las plantas se encontraban en el mismo estado de desarrollo, de modo que cualquier comparación en cuanto a su altura y peso es válida.

4.3.1. Altura de plantas

Una vez cortadas las plantas, a los 45 días post inoculación, fueron medidas para determinar la altura de cada una de ellas y poder obtener así el promedio por tratamiento para poder ser analizado estadísticamente. El resultado de lo anterior de muestra en la Figura 4.2.:

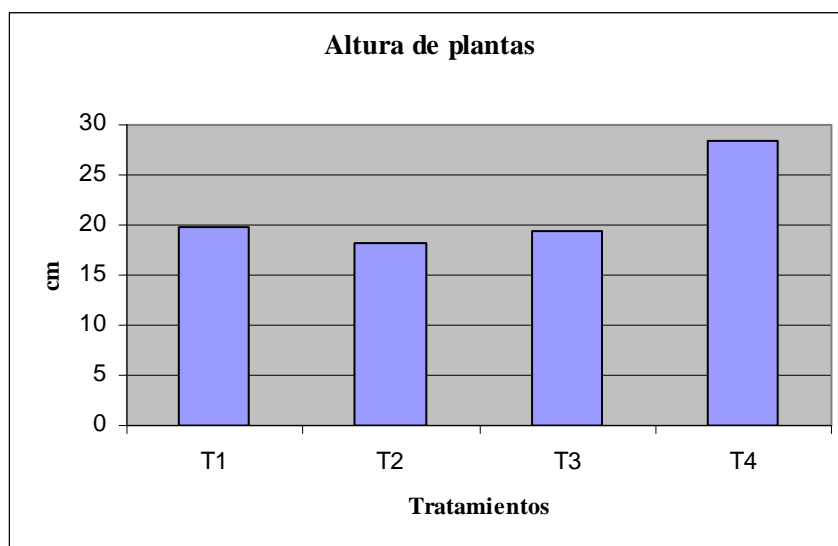


Figura 4.2. Altura promedio de plantas de maíz inoculadas con *Maize dwarf mosaic virus*-MDMV tratadas en pre inoculación con *Trichoderma* spp y *Bacillus* spp., en plantas sin aplicación de biocontroladores y en aquellas usadas como testigo absoluto.

Donde se define que:

T1: Aplicación de *Trichoderma* spp. en pre inoculación

T2: Aplicación de *Bacillus* spp. en pre inoculación

T3: Testigo inoculado con el virus y sin la aplicación de biocontroladores

T4: Testigo absoluto, sin inoculación ni aplicación de biocontroladores

De la figura podemos concluir la no existencia de diferencias estadísticas entre los tratamientos analizados.

Además en comparación con el testigo absoluto se aprecia claramente la existencia de enanismo en todas aquellas plantas inoculadas con el virus (T1, T2 y T3)

De esta forma las plantas mostraron alturas promedio que varían entre e 18.13 y 19.78 cm. El testigo absoluto, sin inoculación y utilizado sólo como referencia alcanzó una altura de alrededor de 28 cm, es decir, un incremento del 50% respecto de los otros tratamientos.

A partir de los resultados se pudo inferir que las aplicaciones tanto de *Trichoderma* spp. como de *Bacillus* spp. no tienen un efecto sobre la altura de plantas inoculadas con MDMV.

4.3.2. Peso seco por planta

Para cada tratamiento y repetición se calculo el peso seco promedio por planta con el fin de determinar si la inoculación con *Bacillus* spp. o *Trichoderma* spp. tenían algún efecto sobre la acumulación de materia seca.

Si bien el peso seco promedio por planta varió entre 5.3 g y 6.6 g para los distintos tratamientos como se observa en la figura 4.3, estos valores no difieren estadísticamente entre ellos.

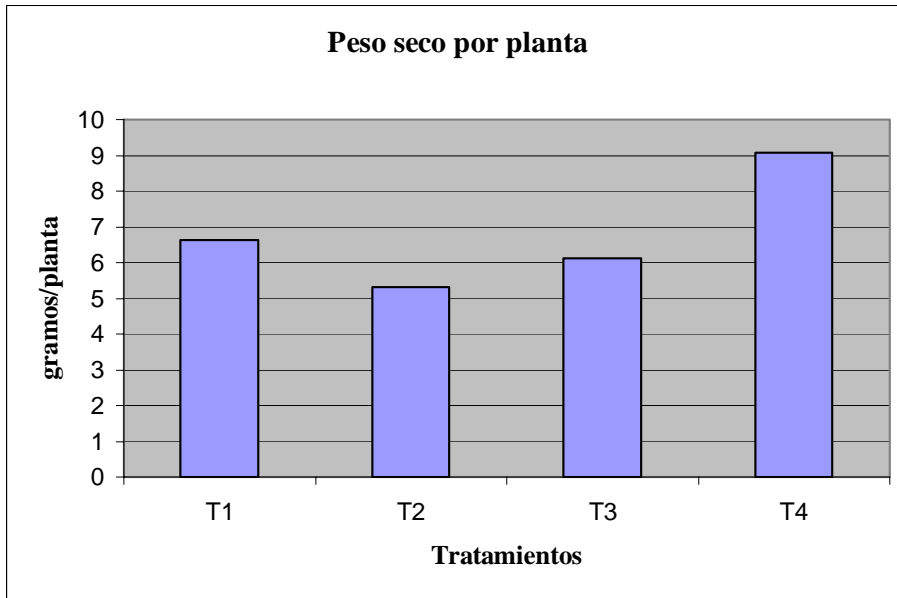


Figura 4.3. Peso seco de plantas de maíz inoculadas con *Maize dwarf mosaic virus*-MDMV tratadas en pre inoculación con *Trichoderma* spp y *Bacillus* spp., en plantas sin aplicación de biocontroladores y en aquellas usadas como testigo absoluto.

De acuerdo con lo anterior *Trichoderma* spp y *Bacillus* spp no fueron efectivos para aumentar la biomasa de las plantas. Sin embargo el testigo absoluto no incluido en el análisis incremento en un 50 % de peso con respecto al los otros tratamientos.

CONCLUSIONES

- La totalidad de las plantas inoculadas con *Maize dwarf mosaic virus*-MDMV, presentaron los síntomas característicos descritos para este patógeno como son enanismo, moteados y estrías amarillas a lo largo de la nervadura.
- En cuanto a los valores de absorbancia de los distintos tratamientos, solo la aspersión en pre inoculación del virus de *Bacillus* spp. produjo una disminución estadísticamente significativa en su valor respecto a los demás tratamientos. De acuerdo a esto solo *Bacillus* spp. redujo la concentración del virus en la planta.
- Los tratamientos con aplicación en pre inoculación de *Trichoderma* spp.(T1) y *Bacillus* spp.(T2) y el inoculado con el virus pero sin la aplicación de biocontroladores (T3), no presentaron diferencias estadísticas en cuanto a altura y peso seco promedio por planta. Sin embargo el testigo absoluto (T4), el que no fue incluido en el análisis estadístico mostró tanto para altura como para peso seco por planta una diferencia apreciable, con lo que podemos asegurar que el material utilizado para el ensayo estaba libre del patógeno.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. **Agrios, N. G. 1996.** Fitopatología. Segunda Edición. Editorial Limusa. 838 p.
2. **Apablaza Hidalgo, G. 1999.** Patología de los Cultivos Epidemiología y Control Holístico. Santiago de Chile. Ediciones Universidad Católica de Chile. 347 p.
3. **Clark K., M. F. y Adams, A. N. 1977.** Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475-483
4. **Davis, R. M. 2002.** *Maize Dwarf Mosaic Virus* (en línea). Plant Pathology. UC Davis. California, United States of America. Disponible en <http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r3101011.html>. Consultado el 10 de oct. de 2005.
5. **De la Riva, R. M. 2002.** Hongos y Virus que afectan al maíz (en línea) España. Disponible en <http://www.delariva.com/es/consultas/0.17htm>. Consultado el 10 de oct. de 2005.
6. **Domínguez G., F. 1972.** Plagas y Enfermedades de Plantas Cultivadas. Cuarta Edición. 955 p.
7. **Douglas, J.J. 1998.** *Maize Dwarf Mosaic Virus*. Extensión Especialist. Plant Pathology. 4 p.
8. **Fuentes Reyes, C. 1997.** Efecto del virus del mosaico del pepino (CMV) sobre el crecimiento, desarrollo y producción de tomate en ambiente controlado. Tesis de Grado, Universidad de Talca, facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Agronomía. 35 p.

9. **García- Arenal, F. y García, J. 1996.** Estructura y expresión de Genoma de los Virus de Plantas. *En:* Llácer, G., López, M., Trapero, A. y Bello, A. Patología Vegetal. España pp. 37-75.
10. **García-Arenal., y Fraile, A. 1996.** Patología vegetal: Ciencia y Técnica. En Llácer, G., López, M., Trapero, A. y Bello, A. Patología Vegetal. España. pp 25-33.
11. **Gibbs, A. J. 1990.** Maize Dwarf Mosaic Virus (en línea). Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/57010039.htm>. Consultado el 19 de oct. de 2005.
12. **González, H. R. 1988.** Insectos y Ácaros de importancia Agrícola y Cuarentenaria en Chile. Universidad de Chile. 309 p.
13. **González, L. 1985.** Introducción a la fitopatología. San José, Costa Rica. 148 p.
14. **Latorre Guzmán, B. 2004.** Enfermedades de las plantas cultivadas. Sexta Edición. Santiago de Chile. Pontificia Universidad Católica de Chile. 628 p.
15. **Lipps, P. and Mills, D. 2001.** *Maize Dwarf Mosaic Virus, Maize Chlorotic Dwarf, Diseases of Corn.* United States. The Ohio state. University. Disponible en: <http://ohioline.ag.ohio-state.edu>. Consultado el 19 de oct. de 2005.
16. **Loui, R. 1986.** Effects of Genotype and Inoculation Protocols on Resistance. Evaluation of Maize Dwarf Mosaic Virus Strains. *Phytopatology.* 76 (8): 769-773.
17. **Mackenzie, D., Werham, C. and Ford, R. 1966.** Differences in *Maize dwarf Mosaic Virus* isolates of the North eastern United States of America. *Plant disease* 50: 814-818.

- 18. Malaguti, G. 2000.** Enfermedades Infecciosas por Virus y Fitoplasmas (en línea) Venezuela. Disponible en: <http://plagas-agricolas.info.ve/doc/html/malaguti.htm/>. Consultado el 10 de oct. de 2005.
- 19. Mathews, 1991.** Transmission and Movement. *En:* Plant Virology. Third edition. Longon, Inland. pp 276-300.
- 20. Meza-Basso L., Espinoza P., Theoduloz C., Vásquez M., Parra C., Zuñiga J., Sáez J. y Gubert E. 1993.** Cepas nativas de *Bacillus thurigiensis*: Una nueva fuente de biopesticidas y su proyección biotecnológica. *Simiente* 63 (2): 71-81.
- 21. Oficina de Estudios y Política Agraria (ODEPA) 2005.** Estadísticas, superficie sembrada y cultivos anuales temporada 2005/2006 (en línea) Santiago de Chile. Disponible en: <http://www.ODEPA.gob.cl/base-datos/estadísticas/cultivos-psa.htm>. Consultado el 23 de sept. de 2005.
- 22. Paratori B., Orlando y Altamirano., Silvia (ed). 1995.** El cultivo del maíz. Instituto de Investigación Agropecuaria (Chile), Centro Regional de Investigación la Platina (Santiago) 173 p.
- 23. Petaky, J. K., Murphy, J. F. y D'arcy , C. J. 1990.** Resistense to Maize Dwarf Mosaic Virus, in Maize by Use of Light Microscopy. *Plant Disease* 76(3): 147-151.
- 24. Prescott, T., Harley, J. y Klein, D., 2004.** Microbiología. Quinta Edición. Mcgrant-Hill-Interamericana de España. España. 1240 p.
- 25. Romero, C. J. 2000.** X Curso Internacional Teórico y Práctico de detección e Identificación de Virus, Tiroides y Fitoplasmas. Departamento de Producción vegetal. INIA. Madrid, España 123 p.
- 26. Sarasola, A. y Rocca, M. 1975.** Fitopatología, Curso moderno. Bacteriosis-Virosis. Buenos Aires, Argentina. Editorial Hemisferio Sur 222 p.

- 27. Schumann, L. G. 1991.** Virus and More Recently Discovered Pathogens. En su: Plant Diseases: Their Biology and Social Impact. Minesota, United States of America pp 287-313.
- 28. Servicio de extensión cooperativo Universidad de Illinois y servicio de extensión departamento de agricultura EUA, 1980.** Compendio de Enfermedades. Estados Unidos, Universidad de Illinois, Editorial Hemisferio Sur S.A. 102 p.
- 29. The cooperative Extension Service, University of Illinois and Extension service, United States Department of Agriculture, 1999.** Compendium of the Corn Diseases. Third Edition, United States, University of Illinois. 78 p.
- 30. Tsai, J. y Falk, B. 2000.** Patógenos del Maíz y sus Insectos Vectores en los Tropicos (en línea) Disponible en: <http://ipmworld.umn.edu/cancelado/spchapter/tsaiSp.htm>. Consultado el 10 de oct. de 2005.
- 31. Vallad, G and Goodman, R., 2004.** Systemic Acquired Resistance and induced Systemic resistance in Conventional Agriculture. Crop Science. 44(6): 1920-1934.
- 32. Vincelli, P. and Bassin, R. 2001.** Virus Diseases of Corn in Kentucky (en línea) University Kentucky, United States of America. Disponible en: <http://www.ca.uky.edu/agc/pubs/ppa/ppa40/ppa40.htm>. Consultado el 19 de oct. de 2005.
- 33. Yossen, V. Nome, S. F., Latorre, B. A. y Conci, L. R. 1988.** Presencia de Virus del Mosaico Enanizante del Maíz-MDMV en Sorghum helepense (L.) Pers., en Chile. Ciencia e Investigación Agraria. 15 (1): 39-45.