



UNIVERSIDAD DE TALCA  
FACULTAD DE CS. AGRARIAS  
ESCUELA DE AGRONOMÍA

**“EVALUACIÓN *in vitro* DE TRES CEPAS NATIVAS DE  
*Trichoderma* spp. COMO CONTROLADOR BIOLÓGICO DE  
AISLADOS DE *Stemphylium vesicarium* OBTENIDOS DE  
ESPÁRRAGO”.**

**MEMORIA DE TÍTULO**

**JACKSEN LILIANA ACUÑA ARAVENA**

**TALCA-CHILE  
2006**

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

**“EVALUACIÓN *in vitro* DE TRES CEPAS NATIVAS DE  
*Trichoderma* spp. COMO CONTROLADOR BIOLÓGICO DE  
AISLADOS DE *Stemphylium vesicarium* OBTENIDOS DE  
ESPÁRRAGO”.**

**POR:**

**JACKSEN LILIANA ACUÑA ARAVENA**

**MEMORIA DE TÍTULO**

**Presentada a la  
Universidad de Talca como  
parte de los requisitos para optar al título de:**

**INGENIERO AGRÓNOMO**

**TALCA – CHILE**

**2006**

## Hoja de Aprobación

---

Profesor guía:                    Ing. Agr. M. Sc. Dr. Claudio Sandoval Briones  
  Profesor Escuela de Agronomía  
  Facultad de Ciencias Agrarias  
  Universidad de Talca

---

Profesor Informante:            Ing. Agr. M. Sc. PhD. Mauricio Lolas Caneo  
  Profesor Escuela de Agronomía  
  Facultad de Ciencias Agrarias  
  Universidad de Talca

Fecha Defensa de Memoria de Título 28 de julio de 2006

*Dedicada con todo mi amor a lo más  
valioso que tengo en la vida  
mis padres  
MANUEL y FILOMENA*

## AGRADECIMIENTOS

Concluye una etapa importante en mi vida, llena de esfuerzos, sacrificios y muchas alegrías, no hubiese sido posible sin la ayuda de Dios, además del apoyo incondicional y el gran amor que me entregan mis padres, quienes junto a mi hermano Jorge son mi gran fortuna.

Agradezco a mis profesores Claudio Sandoval y Mauricio Lolos, por permitirme trabajar con ellos y darme el privilegio de conocer a dos maravillosas personas.

A la familia Muñoz Veas, que me acogió cariñosamente en su hogar los últimos tres veranos, dándome la oportunidad de realizar mis practicas y lograr mis primeras experiencias laborales, y obtener "Papás adoptivos", Don Fernando y Señora Lucy.

Al profesor Hernán Paillán, que sin ser parte de esta memoria, me facilitó mucha información, libros, y documentos, además de responder dudas y dedicar parte de su tiempo.

Los espárragos protagonistas de este estudio fueron donados por la señorita Carolina Vásquez, que gentilmente aportó con el material vegetal.

A todos quienes trabajan en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Talca, en especial a la señorita Anita Ibarra por su colaboración y amistad.

Quiero manifestar toda mi gratitud y cariño a todas mis amistades, que con su apoyo y comprensión me dieron aliento para seguir adelante, mención honrosa merecen las siguientes "maravillas", Fernando Alcántara, Olga Soto, Miguel Cuevas y mis amiguis de agronomía, Francisca Jiménez, Pablova Marabolí, Gaby Torres, Gaby Carrasco, Loreto Rojas, Cecilia Espinosa, Guillermina Cea, hoy todas colegas, con las cuales compartí momentos maravillosos, creando lazos fuertes de amistad, cada una de ustedes forma parte de mi vida y sobretodo ocupan un lugar en mi corazón.

A mis sobrinos regalones Jarlhyn y Bastián, que con sus juegos y travesuras hacen que mi vida se convierta en un hermoso recreo, además de ser mi gran orgullo.

Tres angelitos ayudaron a que este sueño fuera posible, mi hermano Luchito, mi amiga Claudia y mi tía Eliana, que siempre cuidan de mí.

Y concluyo agradeciendo profundamente a Manuel Fernando Muñoz Veas, la persona más importante que conocí en la Universidad, un gran compañero, mi amigo, mi apoyo, y sobretodo mi gran amor.

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

Yo, **Jacksen Liliana Acuña Aravena**, cédula de Identidad N° **12.954.697-2** 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.

<b>Título de la memoria o tesis:</b>	<b>Evaluación <i>in vitro</i> de tres cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp. como controlador biológico de aislados de <i>Stemphylium vesicarium</i> obtenidos de espárragos.</b>
<b>Unidad Académica:</b>	<b>Facultad de ciencias agrarias</b>
<b>Carrera o Programa:</b>	<b>AGRONOMÍA</b>
<b>Título y/o grado al que se opta:</b>	<b>Licenciado en ciencias agrarias. Ingeniero Agrónomo</b>
<b>Nota de calificación</b>	<b>Trabajo escrito: 5,8 Defensa de memoria: 6,0 Promedio: 5,9</b>

**Firma de Alumno**



**Rut: 12.954.697-2**

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	3
2.1. Cultivo del espárrago	3
2.1.1 Importancia del espárrago	4
2.1.2. Importancia del espárrago en Chile	4
2.2. Enfermedades del follaje del espárrago	5
a. Pudrición gris	5
b. Esclerotinosis	5
c. Muerte de yemas	6
d. Roya	6
2.3. Mancha púrpura ( <i>Stemphylium vesicarium</i> )	6
2.3.1. Clasificación y Morfología del agente causal	7
2.3.2. Síntomas	7
2.3.3. Ciclo de la enfermedad	8
2.3.4. Control	9
2.4. Control biológico	9
2.4.1. Control biológico de la enfermedad	10
2.4.2. Empleo de controladores biológicos en distintas enfermedades del espárrago	10

2.5. <i>Trichoderma</i>	11
2.5.1. Morfofisiología de <i>Trichoderma</i> spp.	12
2.5.2. Requerimientos de <i>Trichoderma</i> spp.	12
2.5.3. Mecanismo de acción	12
2.5.4. <i>Trichoderma</i> como controlador biológico	13
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	14
3.1. Desarrollo del ensayo	14
3.2. Origen del material vegetal	14
3.3. Obtención de <i>Trichoderma</i> spp	15
3.4. Obtención del hongo desde tejido de espárrago infectado	15
3.5.. Tratamientos	16
3.5.1. Evaluación	17
3.5.2. Diseño Experimental	18
3.6. Evaluación <i>in vivo</i>	18
3.6.1. Tratamientos	18
3.6.2. Evaluación	19
3.6.3. Diseño Experimental Y análisis de resultados	20
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	21
4.1. Evaluación del efecto inhibitorio de las cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp. Queule, Trailles, Sherwood, sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>stemphylium vesicarium</i>	21
4.1.1. Evaluación a temperatura ambiente	21
4.1.2. Evaluación a 4°C	23
4.2. Evaluación de la actividad preventiva de las cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre inoculaciones artificiales de <i>Stemphylium vesicarium</i> en tejidos de	

sobre inoculaciones artificiales de <i>Stemphylium vesicarium</i> en turiones de espárragos	25
4.3. Comparación de la actividad biocontroladora in vitro y en turiones de las cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>S. vesicarium</i>	26
<b>V. CONCLUSIONES</b>	27
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b>	28

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 3.1</b> Tratamientos evaluados en el control <i>in vitro</i> de <i>Stemphylium vesicarium</i> , por cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp.	16
<b>Cuadro 3.2</b> Tratamientos evaluados en el control <i>in vivo</i> de <i>Stemphylium vesicarium</i> , por cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp.	19
<b>Cuadro 4.1</b> Inhibición del crecimiento de <i>Stemphylium vesicarium</i> por distintas cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp., incubados <i>in vitro</i> por 14 días a temperatura ambiente.	22
<b>Cuadro 4.2</b> Efecto inhibitorio de tres cepas de <i>Trichoderma</i> sobre <i>S. vesicarium</i> incubados <i>in vitro</i> por 85 días a 4°C.	23

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 3.1</b> Representación esquemática del ensayo que indica la ubicación en las placas petri de los trozos de agar con micelio de <i>Stemphylium vesicarium</i> y <i>Trichoderma</i> spp.	17
<b>Figura 4.1</b> Porcentajes de inhibición del crecimiento de <i>Stemphylium vesicarium</i> por distintas cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp. a temperatura ambiente.	22
<b>Figura 4.2</b> Porcentajes de inhibición del crecimiento de <i>S. vesicarium</i> por distintas cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp. a 4°C.	23
<b>Figura 4.3</b> Efecto biocontrolador de tres cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp., y una mezcla de ellas, sobre la incidencia de la enfermedad Mancha púrpura en turiones de espárragos artificialmente inoculados con <i>S. vesicarium</i> .	25

## RESUMEN

Se evaluó la actividad antagónica *in vitro* e *in vivo* de tres cepas nativas de *Trichoderma* spp. (Sherwood, Trailes, y Queule), en el control de *Stemphylium vesicarium* aislado de espárrago. En ambas evaluaciones los tratamientos se ordenaron en un diseño completamente al azar (DCA). Tanto los porcentajes de inhibición para el estudio *in vitro*, como los porcentajes de incidencia para el estudio *in vivo* fueron analizados por medio de un ANDEVA y la separación de medias se realizó a través de la prueba de Tukey (HSD) ( $p \leq 0,05$ ). A temperatura ambiente, no existieron diferencias significativas entre los tratamientos, presentando cada una de las cepas en forma individual capacidad biocontroladora sobre *Stemphylium vesicarium*. A 4°C no hay diferencias estadísticas entre los tratamientos y la capacidad de inhibición por parte del biocontrolador es baja o nula, dependiendo de la cepa. La evaluación *in vivo* mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos, siendo el testigo el con mayor incidencia (78%) del patógeno. Las tres cepas de *Trichoderma* y la mezcla de ellas fueron estadísticamente similares y mostraron una acción preventiva sobre inoculaciones artificiales de *Stemphylium vesicarium* en turiones de espárragos.

## ABSTRACT

The antagonistic activity *in vitro* and *in vivo* of three native *Trichoderma* strains against *Stemphylium vesicarium*. Isolated from asparagus was evaluated.

In both experiments the treatments were ordered in a completely random design, and the results obtained were analyzed statistically through an ANOVA and the averages compared using the Tukey test ( $p \leq 0,05$ ). At room temperature there were no differences among treatments having all of them an inhibitory effect. At 4°C the *Trichoderma* strains did not show an effect on the growth of the pathogens.

The *in vivo* experiment showed significant differences between the control treatment and those with *Trichoderma* applications. All the strains presented a preventive effect on the control of the pathogen.

## I. INTRODUCCIÓN

El espárrago *Asparagus officinalis* es una de las especies hortícolas que mayor desarrollo ha presentado como respuesta a la apertura comercial de nuestro país, comenzando su auge desde 1992, año en que por primera vez, Chile exporta volúmenes comerciales de espárragos verde fresco a Estados Unidos. Actualmente se cultiva desde la V a la X Región, concentrándose en las regiones VII y VIII. La superficie cultivada alcanza las 3.943 ha (ODEPA, 2005).

Esta especie pertenece a la familia de las liliáceas, y su vida productiva en condiciones óptimas es de 7 u 8 años (Benages, 1990). Sin embargo, al ser perenne los microorganismos patógenos tienen mayor posibilidad de establecerse e interactuar con la planta, dando origen a enfermedades de difícil control. Los problemas fitopatológicos que afectan a los espárragos se asocian fundamentalmente a hongos y bacterias, produciendo diversos síntomas (González y del Pozo, 1999). Una de ellas corresponde a “Mancha púrpura” causada por *Stemphylium vesicarium*, cuya fase sexuada es conocida *Pleospora herbarum*. Este patógeno produce daños en los turiones, afectando su calidad, limitando su exportación y comercialización. Hacia el final de la temporada, puede producir defoliación de los helechos, lo que afectará la acumulación de carbohidratos en la corona y por lo tanto la vida útil de la esparraguera.

Considerando que es una enfermedad potencial para los cultivos de espárrago, principalmente cultivados en zonas de primaveras húmedas y frías, en nuestro país las primeras investigaciones fueron realizadas en la década de los ochenta, donde autores como Acuña y Fajardo (1988) estudiaron su incidencia a nivel de los turiones. Debido al difícil control de la “Mancha púrpura” se señaló el control cultural como efectivo, aunque estudios posteriores coinciden en que es necesario buscar alternativas de control biológico.

El empleo de agentes biocontroladores como por ejemplo *Trichoderma* spp., es sin duda una opción ecológicamente conveniente, sin los problemas de contaminación y de residuos químicos que puede implicar el uso de fungicidas (Altieri, 1990). Además es uno de los hongos que están presentes en casi todos los suelos agrícolas. La versatilidad, adaptación y fácil manipulación de los hongos del género *Trichoderma* ha permitido su uso en el control biológico (Fernández- Larrea, 2001).

De acuerdo a lo anterior, la presente memoria de título ha planteado como hipótesis que cepas nativas de *Trichoderma* son capaces de inhibir el crecimiento del micelio *in vitro* de *Stemphylium vesicarium*. Del mismo modo este antagonista a través de su aplicación a los turiones permite prevenir la infección por este hongo.

El objetivo general de esta memoria fue evaluar la eficacia de tres cepas nativas de *Trichoderma* spp. en el control biológico de *Stemphylium vesicarium* causante de la enfermedad Mancha Púrpura en espárrago.

Junto al objetivo general, se tienen los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar el efecto inhibitorio del crecimiento *in vitro* de *Stemphylium vesicarium*, por la acción de las cepas nativas de *Trichoderma* spp.
- Evaluar la actividad de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en prevenir la infección de *Stemphylium vesicarium* en turiones.
- Comparar la actividad biocontroladora *in vitro* y en turiones de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre *Stemphylium vesicarium*.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Cultivo del espárrago

El espárrago es una planta cuyo origen cabe situarlo en los suelos arenosos del sur de Europa y Asia. Conocido por el hombre desde épocas muy antiguas, viene siendo cultivado desde hace más de 2000 años. Fue una hortaliza muy apreciada por los griegos y romanos. Tras las invasiones bárbaras, su cultivo sólo se conservó en España hasta el final de la Edad Media, en que se volvió a cultivar en el centro y norte de Europa. Las actuales variedades parece ser que proceden de selecciones realizadas en Holanda a partir del siglo XVIII. Se aprovecha por sus tallos y turiones, que son consumidos principalmente en fresco y en conservas (Maroto, 2002).

El espárrago, *Asparagus officinalis* L., pertenece a la familia de las Liliáceas, cuya vida productiva es de 7 u 8 años (Benages, 1990) Es una especie monocotiledónea perenne que presenta un sistema radical extensivo y profundizador, formado por raíces adventicias generadas a partir del rizoma que se diferencia en la zona de transición de la parte aérea y radical de la planta, y por raíces absorbentes que se generan a partir del cambium vascular de las raíces adventicias (Krarup y Konar, 1997). Es una planta dioica, es decir hay individuos con flores masculinas y otros con flores femeninas (Maroto, 2002).

La planta del espárrago está constituida por una parte subterránea, compuesta por un rizoma y el sistema radical, que en conjunto se denomina corona y una parte aérea compuesta de tallos erectos, ramas y hojas modificadas, que constituyen el helecho; sobre éste se desarrollan las flores y frutos (González y del Pozo, 1999). Los turiones empiezan a desarrollarse en la primavera, cuando las temperaturas alcanzan los 10° - 12°C. A una altura aproximada de 15 ó 20 cm se ramifican, se empiezan a lignificar y aparecen las hojas, que son muy finas y cortas denominándose cladodios (Benages, 1990). El óptimo para un adecuado desarrollo vegetativo se ubica entre los 18 y 25°C y la humedad relativa óptima para el crecimiento de turiones es de 60% a 70%.

En cuanto al suelo aquellos de textura franca, con inclinación a franco arenosa o limosa son a los que mejor se adapta. Sin embargo, tolera suelos franco arcillosos. El pH óptimo está comprendido entre 7,5 y 8, aunque admite suelos de pH 6,5 (Infoagro, 2004).

Aunque es un cultivo que se desarrolla en forma óptima bajo riego, es una planta que resiste bastante bien la sequía. Las mayores necesidades de agua las tiene durante el verano, cuando hace más calor y el desarrollo de la masa foliar es considerable (Benages, 1990). Generalmente el riego se realiza por surcos o por cintas debiendo efectuarse uno en el establecimiento del cultivo, seguido por riegos frecuentes durante las primeras semanas, para asegurar y acelerar la germinación de la semilla y la emergencia de la plántula.

### **2.1.1 Importancia del espárrago**

El espárrago es un cultivo de larga vida que puede permanecer productivo por 15 a 20 años, siempre que se mantenga sano (González y del Pozo, 1999).

Las reservas formadas en su parte aérea son acumuladas en forma de hidratos de carbono y proteínas en las raíces principales, de consistencia carnosa. Estas reservas determinan de manera importante la emisión de turiones al año siguiente, desde la plataforma rizomática (Maroto, 2002).

La producción de espárragos a nivel mundial se ha constituido durante los últimos años, en una actividad con un creciente auge especialmente en las importaciones, por ser un producto con un nivel preferencial en el mercado internacional que le permite obtener elevados beneficios, dado el incremento de su consumo (Infoagro, 2004).

### **2.1.2 Importancia del espárrago en Chile**

El cultivo de espárrago se hizo, en pequeña escala, por muchos años para la producción de espárrago blanco. Sin embargo, a partir de la década de los ochenta, se iniciaron las exportaciones de producto fresco, principalmente a Estados Unidos

En Chile es actualmente una de las principales hortalizas de exportación, como producto fresco y congelado, aunque en la temporada 2003 se registró una disminución en 34% del valor exportado respecto de la temporada anterior (ODEPA, 2005). Su producción se concentra en las regiones del Maule y Bío Bío. Los principales mercados de destino son Estados Unidos y la Unión Europea, con más del 90% de los retornos en los últimos años.

A nivel nacional las perspectivas de mercado se han visto seriamente afectadas, principalmente por un fuerte incremento de la superficie productiva de algunos países como Perú y China (Benson, 2002a). Esta situación resulta crítica para nuestro país, ya que la producción peruana compite con nuestro período de producción, a contraestación del hemisferio norte

## **2.2 Enfermedades del follaje en espárrago**

Las enfermedades que afectan a esta especie son producidas en su mayor parte por hongos (Benages, 1990) En general, las enfermedades radiculares son las más importantes produciendo pérdida de vigor y muerte de plantas, mientras que las enfermedades foliares causan disminución en la calidad (González y del Pozo, 1999), como es el caso de las que se enuncian a continuación.

**a) Pudrición gris**, pudrición de flores (*Botrytis cinerea*). Esta enfermedad ataca especialmente al turión, dando lugar a una podredumbre blanda que posteriormente se cubrirá con un moho grisáceo, que corresponde al conjunto de micelios, y esporas. del patógeno Bajo la superficie del suelo se desarrollan corpúsculos negros, de consistencia dura correspondientes a los esclerocios. Los daños se asocian a una pérdida de turiones y disminución de la capacidad fotosintética (Infoagro, 2004)

**b) Esclerotinosis**, pudrición blanca (*Sclerotinia sclerotiorum*). Aparece, junto con la pudrición gris, en esparragueras con follaje denso y en condiciones ambientales de alta humedad relativa. Su incidencia es relativamente baja, pero cuando está presente puede producir pudrición basal en los helechos, marchitez y muerte del follaje, con abundante producción de un micelio algodonoso blanco y esclerocios del hongo (Snowdon, 1992).

**c) Muerte de yemas (*Phoma asparagi*).** Se manifiesta a través de la muerte de brotes ubicados en la zona media de la planta los que se presentan secos y doblados, sin prosperar en su desarrollo. El organismo causal corresponde al hongo *Phoma asparagi*, el cual produce largos cirrus cargados de esporas desde el interior de sus cuerpos frutales, mas conocidos como picnidios. Los conidios son liberados sólo cuando existe agua libre, por lo que la enfermedad se favorece cuando hay lluvias o riego por aspersión. (Snowdon, 1992)

**d) Roya (*Puccinia asparagi* DC).** En plantaciones de primer año aparecen en la parte aérea manchas elípticas de color verde amarillento, de consistencia débil y pegajosa. En plantaciones adultas no aparece esta fase del hongo y directamente surgen al comienzo del otoño abultamientos en los tallos, que a los 15-20 días se abren apareciendo pústulas pardo rojizas, correspondientes a los uredosoros, los que contienen numerosas uredosporas que constituyen el mecanismo de dispersión del hongo (CORFO, 1982).

### **2.3 Mancha Púrpura (*Stemphylium vesicarium*).**

Este patógeno fue reportado por primera vez en Japón (Suzui, 1973; citado por Acuña y Fajardo, 1988) y desde 1982 ha sido registrada afectando al follaje y turiones de espárragos en Estados Unidos y Nueva Zelandia. *Stemphylium versicarium* agente causal de esta enfermedad, produce manchas moradas, ovaladas, con borde rojizo en los turiones de los espárragos (Giacconi *et al.*, 1997). Este hongo se desarrolla en condiciones climatológicas de humedad alta y temperaturas moderadas, entre 18° y 25°C (Benages, 1990).

El ataque de este patógeno ocasiona severas pérdidas económicas por reducción de la calidad de los turiones debido al desarrollo de lesiones sobre ellos, las que generalmente son más prevalentes después de primaveras frías y húmedas (Acuña y Fajardo, 1988). Por esto su incidencia es mayor en zonas donde se produce acumulación de agua.

Esta enfermedad ha ido en aumento en la zona productora de espárrago, debido a la mayor presencia de inóculo en el ambiente y a la implementación de algunas prácticas de manejo que favorecen el ciclo de la enfermedad como es la incorporación al suelo del follaje al final de la temporada, el que muchas veces se encuentra infectado, pasando a constituir fuente de inóculo para la temporada siguiente (González y del Pozo, 1999).

### **2.3.1 Clasificación y Morfología del agente causal**

*Stemphylium vesicarium* se clasifica dentro del grupo de los Deuteromycetes, orden Moniliales. Este hongo presenta hifas septadas regularmente, sus conidióforos son rectos a curvados, simples y ocasionalmente uniramificados. Las conidias son oblongas u ovals con 1 - 7 septas transversales y 1 - 2 series completas o casi completas de septas longitudinales; son de color café claro o café oliváceo con sus paredes externas verrucosas. Puede desarrollar su fase sexual en la superficie de los restos de tejidos que quedan en la esparraguera produciendo ascosporas en la primavera siguiente; estas constituyen el inóculo primario el cual es liberado después de las lluvias. Las ascosporas son arrastradas por el viento e infectan los tejidos del hospedante penetrando a través de los estomas (Falloon *et a.*, 1987; citado por Montealegre, 1988)

### **2.3.2 Síntomas**

Los primeros síntomas que aparecen son puntos negros en las escamas secas de los tallos principales, en la parte baja de la planta. Estos corresponden a conjuntos de esporas del hongo productor de esta enfermedad. Luego se van desarrollando en la zona de las escamas infectadas manchas triangulares de aspecto aceitoso, que poco a poco se tornan ovaladas, más claras, con la zona central de color grisáceo y rodeado de un halo marrón-rojizo. Estas tienen aproximadamente 4 mm de longitud (Benages, 1990).

Posteriormente, la enfermedad afecta al helecho, produciendo defoliación, que puede ser severa según el grado de infección de la planta. Sobre los tallos muertos es posible observar el desarrollo de numerosos peritecios, estructuras esféricas que contienen gran cantidad de ascosporas en su interior (González y del Pozo, 1999).

### 2.3.3 Ciclo de la enfermedad

El hongo inverna en rastrojos de espárragos y en la forma de *Pleospora herbarum*. Al inicio de la temporada de crecimiento, e influenciado por las lluvias, los peritecios del hongo liberan sus ascosporas, los que darán origen al inóculo inicial, responsable de las primeras lesiones en los turiones, en las que luego se producirá la siguiente fase del hongo, que corresponde a *Stemphylium vesicarium*. Esta fase asexuada es mucho más productiva en inóculo y las esporas se producen sobre las lesiones cada vez que exista alta humedad relativa y precipitaciones. Este ciclo asexuado se repite hasta que se inicia el invierno, donde el hongo pasa a la fase sexuada y permanece latente hasta el inicio de la temporada de crecimiento siguiente. (Snowdon, 1992; González y del Pozo, 1999).

### 2.3.4 Control

La primera medida para reducir el inóculo primario es eliminar el follaje tan pronto las plantas entran en senescencia (González y del Pozo, 1999). La destrucción y eliminación de los restos de tejidos muertos durante el invierno ayuda a disminuir la incidencia de la enfermedad ya que con ello se evita la formación de peritecios que producen la fuente del inóculo primario en la primavera siguiente (Montealegre, 1988).

Debido a la necesidad de precipitaciones para el desarrollo y diseminación del inóculo del hongo, en nuestro país la enfermedad prevalece hacia el sur, en sectores sombríos y que mantienen por más tiempo el follaje mojado. Las ascosporas son liberadas de los ascos por la lluvia y son transportadas por el viento a nuevos tallos del espárrago, en donde causan la infección primaria de la estación de crecimiento (Snowdon, 1992) En consecuencia, la orientación de las hileras en el sentido de los vientos predominantes y el mayor espacio entre éstas, favorece el rápido secado del follaje reduciendo la incidencia de la enfermedad (González y del Pozo, 1999).

Aplicaciones de clortalonil, sólo o mezclado con flutriafol o flusilazol, pueden resultar eficaces para el control de esta patología (Maroto, 2002).

## 2.4 Control biológico

Una alternativa de manejo integrado que tuvo sus inicios alrededor de 1920 (Nelson, 1989), y que ha concentrado la atención de los investigadores durante los últimos 20 años, es el control biológico, el que se basa en la utilización de microorganismos como antagonistas de patógenos de cultivos de interés económico. (Altieri, 1990).

El control biológico se podría definir como la reducción de la cantidad de inóculo, desarrollo, actividad o daño del patógeno afectado por uno o más organismos distintos al hombre (Baker y Cook, 1974). En términos generales, consiste en el control de plagas y enfermedades por medio de la utilización de otros agentes biológicos tales como hongos, bacterias, levaduras, entre otros. Estos biocontroladores actúan ya sea por parasitismo del patógeno y muerte de éste o bien por competencia o acción tóxica indirecta (etileno) (Cook y Baker, 1983).

Para aumentar la eficiencia del biocontrolador es recomendable realizar prácticas culturales para crear un ambiente favorable a los antagonistas (Cook y Baker, 1983). Lo anterior, con el fin de estimular la colonización de la superficie de las plantas, por los antagonistas y así disminuir el inóculo de los patógenos (Blackeman y Fokkema, 1982; Sanchez *et al.*, 1998). Por esta razón el biocontrol de patógenos incluye frecuentemente la aplicación de microorganismos benéficos a la planta, así como todas las labores que estimulen las poblaciones de antagonistas residentes (Papavizas, 1981; Sanchez *et al.*, 1998).

Hasta ahora el enfoque más prometedor consiste en el acrecentamiento de los agentes de control biológico cambiando el equilibrio microbiano en o alrededor de la planta para suprimir el patógeno, o introduciendo directamente agentes microbianos en el terreno para suprimir los patógenos de las plantas producidos por el suelo. Este enfoque implica estimular poblaciones de organismos benéficos conocidos, que existen naturalmente en el suelo y también la creación de las condiciones mortíferas para el desarrollo de patógenos (Altieri, 1990).

Para introducir antagonistas al medio, las consideraciones de importancia a tomar en cuenta son la viabilidad, formulación y concentración del antagonista; las clases de coadyuvantes usados; la eficacia y tiempo de aplicación; condiciones de microclima durante y después de la aplicación y el costo del producto (Suton y Peng, 1993)

#### **2.4.1 Control biológico de la enfermedad**

Existen requisitos que debe cumplir un controlador biológico con respecto al patógeno, tales como, ser activo en las mismas condiciones ambientales, compatibles con otros biocontroladores, y ser capaz de colonizar la planta o suelo donde se encuentra; todo lo anterior caracteriza al hongo *Trichoderma* spp.; el cual se instala desplazando hongos patógenos que habitan el suelo (Agrios, 1997).

Dentro de los representantes de hongos utilizados como agentes de control biológicos, se encuentran: *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., *Penicillium* spp (Cooky Baker, 1983; Sutton y Peng, 1993). Estos hongos son fácilmente cultivables, pudiendo ser producidos económicamente en grandes cantidades, para luego liberarlos principalmente como inóculos en forma de esporas o fragmentos micelares al medio ambiente (Wainwright, 1992).

El uso de hongos en el control de hongos patógenos se ha basado principalmente en el uso de inoculantes. El más promisorio ha sido *T. harzianum* en el control de *Sclerotium rolsifii* en tomates de invernadero. Tales estudios discuten la producción, liberación y sobrevivencia de especies de *Trichoderma* en el suelo (Wainwright, 1992; Papavizas, 1985).

#### **2.4.2 Empleo de controladores biológicos en distintas enfermedades del espárrago**

Se señala el empleo de biocontroladores en enfermedades radiculares, no así en enfermedades del follaje y de poscosecha.

En pudrición del cuello o raíz (*Phytophthora megasperma*), se ha demostrado que ciertas medidas tienen efecto en la disminución de *Phytophthora*. Estas son harinas de alfalfa y leguminosas (2-4%), guano de gallina (2-4%), cualquier residuo o compost con baja relación C:N. Aparentemente, la reducción de *Phytophthora* se debe al aumento de amonio en el suelo y competencia por microorganismos (González y del Pozo, 1999). El control biológico, mediante antagonismo microbiano e hiperparasitismo, es otra alternativa de control de *Phytophthora*. A pesar que se ha demostrado que más de 40 microorganismos tienen propiedades antagónicas a *Phytophthora* (Malajczuk, 1983; citado por González y del Pozo, 1999) sólo algunas especies se utilizan en la práctica.

Para Fusariosis (*Fusarium* spp.) el control se ha enfocado al uso de hongos micoparásitos, tales como *Trichoderma*. Las recomendaciones y cuidados con este tipo de control son similares a las descritas para el caso de *Phytophthora*. Se debe tener presente que es un tipo de control preventivo, en el que uso de ciertos fungicidas en la esparraguera está contraindicado y que estos pesticidas requieren condiciones muy diferentes al manejo tradicional de los pesticidas de síntesis química (González y del Pozo, 1999).

Los antagonistas más efectivos y prácticos de utilizar, por su facilidad para ser multiplicados artificialmente, han resultado ser *Trichoderma*, *Gliocadium*, *Bacillus* y *Streptomyces*. En varios países se comercializan preparados de una o más especies de *Trichoderma harzianum*, *T. lignorum*, *T. polysporum*, *T. viride* y *Gliocadium roseum*; los cuales actúan por producción de antibióticos, parasitismo de hifas esporangios y oosporas (Papavizas, 1985).

## **2.5 Trichoderma**

Este género fue determinado por Persoon, existiendo confusión desde ese momento, en situar que especies pertenecen o no a él. En 1871, Hartz logró determinar claramente su clasificación. Pertenece a la subdivisión Deuteromycotina, siendo un hongo imperfecto que carece de estructuras de reproducción sexual. Estas especies se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo, estando presentes en casi todos los suelos y hábitat naturales, especialmente los que contienen materia orgánica. Su distribución está asociada a condiciones de pH, temperatura, humedad, materia orgánica y presencia de otros hongos del suelo (Papavizas, 1985). Son agentes de biocontrol de fitopatógenos del suelo y de la parte foliar, que pueden degradar una amplia gama de materiales complejos, naturales o xenobióticos; producen una gama de metabolitos secundarios entre ellos, una variedad de antibióticos (Ghisalberti y Silvasithampam, 1991); son potenciales agentes de control biológico (Papavizas, 1985). Tienen requerimientos nutricionales mínimos, y crecen rápidamente con abundante esporulación (Eveleigh, 1985, Nelson, 1989; Harman y Lumsden, 1990).

### **2.5.1 Morfofisiología de *Trichoderma* spp.**

Es un hongo anamorfo perteneciente a la clase Hyphomycetes, cuyo estado sexual o teleomorfo correspondería a un hongo Ascomycotina del genero *Hypocrea*; caracterizándose por la formación de peritecios (Alexopoulos, 1996). Su estructura de esporulación son conidios asexuales, y su estructura de resistencia, clamidosporas. Éstas últimas son similares a las de otros hongos, siendo 5 a 10 veces más grandes que los conidios, por sus grandes reservas de lípidos (Cohen *et al.*, 1983). Posee conidióforos erectos o arrastrados, altamente ramificados, más o menos cónicos en los que al final se agrupan en forma de pelotas. Las colonias de esporas son de rápido crecimiento, con micelio compacto y de coloración blanco a verde (Cook, 1989).

### **2.5.2 Requerimientos de *Trichoderma* spp.**

Para su establecimiento, requieren de humedad adecuada, entre 87y 97%, un pH más bien ácido para un buen desarrollo en el suelo, y una fuente de alimentación (materia orgánica con actividad microbiológica alta (Cook, 1989). Las distintas especies del genero *Trichoderma* exhiben crecimiento frente a un amplio rango de temperaturas. Sin embargo, su óptimo, se sitúa en el rango de 15° - 35°C, si bien 30°C representa un buen promedio para muchas cepas. La temperatura máxima se encuentra entre los 30 y 36°C y el pH óptimo entre 3,7 y 4,7 a concentraciones normales de CO<sub>2</sub>. Un potencial osmótico de -40 bares en el medio es bien tolerado por el hongo (Domsch *et al.*, 1990)

### **2.5.3 Mecanismo de acción**

Los mecanismos de acción que utilizaría *Trichoderma* en la planta son: competencia, producción de antibióticos y micoparasitismo. Aunque no todos estos pasos ocurren en una interacción en particular en todos los organismos involucrados, la clave es la transferencia de los nutrientes desde la presa al micoparásito (Campbell, 1989).

La forma de acción de *Trichoderma* spp. como controlador de otros hongos, es por competencia y predación, enrollando su micelio alrededor de las hifas del patógeno presa

estrangulándolo. Se ha visto además que hifas susceptibles son penetradas, siendo vacuoladas, colapsando y siendo finalmente desintegradas; posteriormente el micoparásito se alimenta de este sustrato (Cook y Baker, 1983). Por lo tanto el daño causado por *Trichoderma* al hongo que es colonizado es severo; altera y degrada la pared celular, desorganiza el citoplasma, retrae la membrana plasmática de la pared, afecta además la replicación celular inhibiendo la germinación de esporas y la elongación del tubo germinativo. Existen también algunas especies y razas de *Trichoderma* capaces de producir antibióticos especialmente a pH bajos (Cook, 1989). *Trichoderma* se puede encontrar dentro de la rizósfera y también fuera de ella; coloniza ésta y protege las raíces de las plantas.

#### **2.5.4 *Trichoderma* como controlador biológico**

Comenzó a ser utilizado en 1960 como degradador de celulosa y desde ese momento, se ha utilizado en la industria química, textil y alimenticia y la del control biológico (Harman, 1998).

Las razones para utilizar los hongos de este genero son dadas por el alto grado de adaptabilidad demostradas por su distribución cosmopolita, en casi todos los suelos del mundo, bajo diferentes condiciones ambientales y su capacidad de utilizar distintos substratos utilizables por su carácter de saprófito (capaz de degradar materia orgánica en descomposición). Esto genera su capacidad competitiva (Harman, 1998). Además, sus mecanismos de interacción con el patógeno y planta, varían dependiendo del patógeno a controlar, de la especie de *Trichoderma* utilizada e incluso del aislado (Stankeviciene, *et al.*, 1999). Todo lo anterior, unido al bajo nivel de riesgo para los mamíferos y el ecosistema, lo hace uno de los mejores biocontroladores que existen en el mundo.

Han sido numerosos investigadores los que destacan sus propiedades como controlador biológico, de múltiples patógenos de plantas. Esto ha implicado un alto grado de desarrollo tecnológico, que ha dado como resultado en los últimos años la aparición de múltiples formulados comerciales, de distintas cepas para el control biológico de enfermedades.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Desarrollo del ensayo

Este ensayo se realizó entre los meses de Septiembre de 2005 y Marzo de 2006, en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Talca. Se consideraron dos etapas, siendo la primera la aislación del hongo desde tejido de espárrago enfermo y la segunda ensayos *in vitro* e *in vivo*, con el fin de evaluar tres cepas de *Trichoderma* spp. en el control de *Stemphylium vesicarium*.

#### 3.2 Origen del material vegetal

Los turiones de espárragos utilizados en la evaluación *in vivo*, fueron obtenidos de una esparraguera orgánica. Esta corresponde a una unidad de validación administrada por la Universidad de Talca, establecida durante octubre – noviembre de 1999 con plantas de un año del cultivar UC-157 F2. La parcela se encuentra ubicada en el sector de Matancillas (35° 23" de latitud sur y 71° 50" de longitud oeste), al noroeste de la comuna de Pencahue, provincia de Talca, VII región.

En relación a las características del suelo, la parcela se sitúa en la serie los Puercos, de origen aluvial; de estratificados profundos; de color pardo oscuro; textura franco arenosa y franca en profundidad (Ciren, 1985).

Los manejos de fertilización de esta esparraguera han sido en base a compost elaborados a partir de guanos y restos vegetales, además de guano rojo.

La mantención del cultivo corresponde a riegos, los que se han dado de acuerdo a las condiciones ambientales en las épocas respectivas, además de la eliminación de malezas a través de picas.

Se han observado daños a nivel del cuello de los helechos producido por gusanos cortadores, lo cual ha sido controlado con aplicaciones de Dipel (*Bacillus thuringiensis*)

### **3.3 Obtención de *Trichoderma* spp.**

Se utilizaron en este ensayo tres cepas nativas de *Trichoderma* spp. y una mezcla de ellas. Estas cepas fueron aisladas, identificadas, y evaluadas durante tres años de estudios, a través de un proyecto de desarrollado en la Universidad de Talca con financiamiento FIA (C98-1-A-072), siendo seleccionadas por su mayor agresividad y capacidad de colonizar los suelos en forma natural. Las cepas empleadas en el ensayo corresponden a Sherwood (*Trichoderma virens*), Queule (*Trichoderma harzianum*) y Trailes (*Trichoderma parcenamosum*).

### **3.4 Obtención del hongo fitopatógeno desde tejido de espárrago infectado**

Como se señaló en un principio, la primera etapa de esta investigación consistió en el aislamiento del patógeno desde turiones de espárragos que presentaban síntomas atribuibles al hongo *Stemphylium vesicarium*. Para este fin se recolectaron muestras de esparragueras ubicadas en el sector de Linares, VII Región. Estos se almacenaron en bolsas plásticas dispuestas en neveras para ser llevadas al laboratorio para su análisis.

Desde la zona de avance de la enfermedad se tomó tejido, el que fue lavado con agua destilada, cortando luego trozos de este de 2 - 5 mm, los que se desinfectaron con etanol al 70%, para eliminar posibles contaminantes. Posteriormente, fueron sembrados colocando cuatro trozos por cada placa petri, las que tenían como medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA). Estas placas se llevaron a una cámara de incubación a 25°C con el fin de dar las condiciones adecuadas para que se desarrollara el patógeno.

Una vez desarrolladas las colonias del hongo, fueron observadas bajo un microscopio óptico para su identificación y comprobar si efectivamente se trataba del patógeno en cuestión. Para esto se consideraron las características de la colonia, morfología del micelio y el tipo de conidias. Una vez identificado el patógeno fue replicado en placas petri con PDA, para su multiplicación y obtención de cultivos puros.

### 3.5 Tratamientos

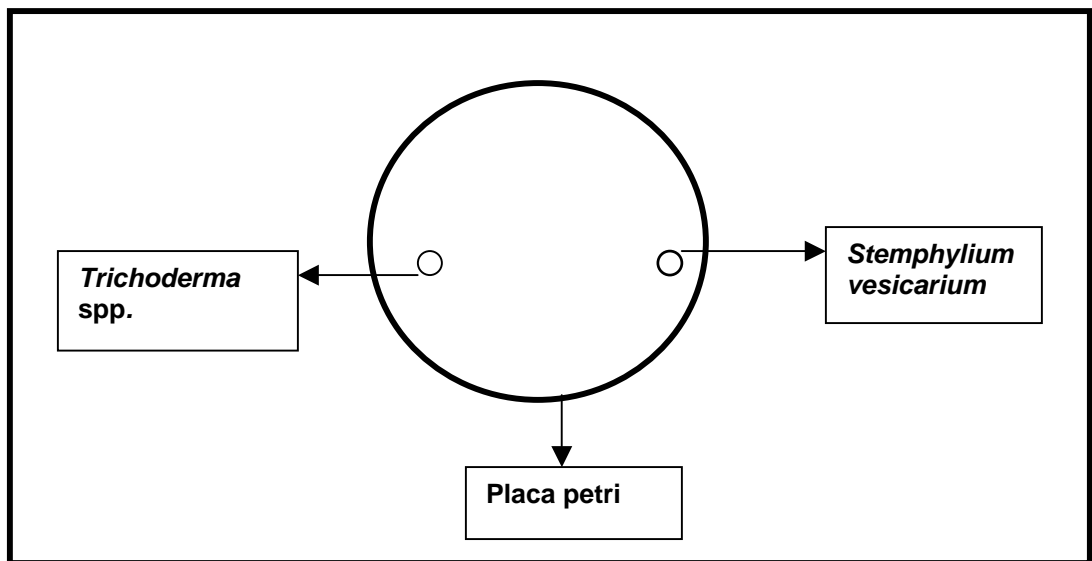
Los tratamientos evaluados fueron tres, los cuales correspondieron a distintas cepas de *Trichoderma* spp. (Cuadro 3.1). Se usó un tratamiento testigo como referencia del crecimiento *in vitro* de *Stemphylium vesicarium*, sin la presencia del biocontrolador.

**Cuadro 3.1** Tratamientos evaluados en el control *in vitro* de *Stemphylium vesicarium*, por cepas nativas de *Trichoderma* spp.

	<b>Tratamientos</b>
<b>T1</b>	<b>Cepa Queule Nativa (<i>T. harzianum</i>)</b>
<b>T2</b>	<b>Cepa Trailes Nativa (<i>T. parcenamosum</i>)</b>
<b>T3</b>	<b>Cepa Sherwood Nativa (<i>T. virens</i>)</b>

Para llevar a cabo la evaluación, en cada extremo de las placas petri se dispuso, como lo indica la Figura 3.1, un trozo de agar con el hongo *Stemphylium vesicarium* y otro con la cepa de *Trichoderma* según el tratamiento que correspondiera. En el caso del testigo, la placa solo se sembró con un trozo de agar con micelio del patógeno.

**Figura 3.1** Representación esquemática del ensayo que indica la ubicación en las placas petri de los trozos de agar con micelio de *Stemphylium vesicarium* y *Trichoderma* spp.



El ensayo fue realizado bajo dos condiciones de temperatura (ambiente y 4°C), considerando el rápido crecimiento de *Trichoderma* spp.

### 3.5.1 Evaluación

Se midió cada dos días el crecimiento radial expresado en centímetros (cm) del patógeno en cada placa. Las mediciones finalizaron en el momento en que *S. vesicarium* correspondiente al tratamiento testigo completó la placa o dejó de crecer. Este valor se consideró como un 100% de crecimiento ó 0% de inhibición.

Los porcentajes de inhibición (I) se calcularon mediante la fórmula señalada por Sid Ahmed *et. al.*, (1999).

$$I = 100 - (100 R_2 / R_1)$$

Donde: I = Inhibición del crecimiento miceliar de *S. vesicarium*.

R<sub>1</sub>= Crecimiento radial logrado por el testigo, *S. vesicarium* (cm).

R<sub>2</sub>= Crecimiento radial logrado por *S. vesicarium* ante la presencia de *Trichoderma* spp.

### **3.5.2 Diseño Experimental**

Los distintos tratamientos se ordenaron en un Diseño experimental Completamente al Azar (DCA), con tres tratamientos y cuatro repeticiones, donde cada placa petri correspondió a una unidad experimental. Los porcentajes de inhibición se analizaron a través de un análisis de varianza (ANDEVA) utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus. Para una mayor precisión, las medias fueron comparadas a través de la prueba de Tukey (HSD) ( $p \leq 0.05$ ).

### **3.6 Evaluación *in vivo***

Este ensayo se realizó en forma paralela al anterior, entre los meses de Noviembre y Diciembre de 2005. Se emplearon espárragos, seleccionando una cantidad de 300 turiones, los que se agruparon en 5 tratamientos, con 60 turiones cada uno de ellos, se trataron con las distintas cepas de *Trichoderma* evaluadas *in vitro*, siendo luego inoculados con el patógeno.

Las inoculaciones, incubación y posterior evaluación, se llevaron a cabo en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Talca.

#### **3.6.1 Tratamientos**

Los tratamientos evaluados fueron cinco; los que se indican en el cuadro 3.2. Se incluyó un testigo sin aplicación y una mezcla de las tres cepas.

**Cuadro 3.2** Tratamientos evaluados en el control *in vivo* de *Stemphylium vesicarium*, por cepas nativas de *Trichoderma* spp.

	Tratamientos	Dosis (Conidias/ml)
T1	Testigo	0
T2	(a) Cepa Queule Nativa ( <i>T. harzianum</i> )	10 <sup>9</sup>
T3	(b) Cepa Trailes Nativa ( <i>T. parcenamosum</i> )	10 <sup>9</sup>
T4	(c) Cepa Sherwood Nativa ( <i>T. virens</i> )	10 <sup>9</sup>
T5	Mezcla (a+b+c)	10 <sup>9</sup>

Los turiones se sumergieron por un minuto en una suspensión de conidias ya sea de la cepa de *Trichoderma* correspondiente, la mezcla de ellas, o en agua (testigo) según el tratamiento. Posteriormente fueron asperjados con una suspensión en agua destilada estéril de conidias del patógeno en concentración 10<sup>9</sup> conidias/ml. Esta se preparó a partir de los aislados obtenidos de *Stemphylium vesicarium*, según lo indicado para los ensayos *in vitro*.

### 3.6.2 Evaluación

Los turiones inoculados se mantuvieron a temperatura ambiente. A los 7 días pos-inoculación se procedió a contabilizar aquellos que presentaban síntomas de Mancha Púrpura en cada unidad experimental. Este valor se expresó como incidencia de acuerdo a la fórmula empleada por Ogawa (1986), la que se expresó en porcentaje:

$$\text{Incidencia (I)} = (\text{N}^\circ \text{ de individuos afectados} / \text{Total de individuos}) * 100$$

### **3.6.3 Diseño Experimental y Análisis de resultados**

Los distintos tratamientos se ordenaron en un Diseño Completamente al Azar, con cinco tratamientos y cuatro repeticiones. Cada unidad experimental correspondió a 60 turiones.

Los porcentajes de incidencia fueron transformados a valores angulares ( $\text{Arcsen } (\%/100)^{1/2}$ ), de manera de homogenizar las varianzas. Luego se analizaron por medio de un ANDEVA.

Como el ANDEVA resultó ser significativo se realizó la separación de medias y fueron comparadas a través de la prueba de Tukey (HSD) ( $p \leq 0,05$ ).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Evaluación del efecto inhibitorio de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. Queule, Trailes, Sherwood, sobre el crecimiento *in vitro* de *Stemphylium vesicarium*

#### 4.1.1 Evaluación a temperatura ambiente

El desarrollo micelial de *Stemphylium vesicarium* en las placas petri, fue medido cada dos días, por un periodo de dos semanas, desde el 2 al 16 de septiembre de 2005, momento en que el tratamiento testigo detuvo su crecimiento. En todos los tratamientos fue posible observar desarrollo de *Stemphylium vesicarium*, lo que indica que ninguna de las cepas de *Trichoderma* spp. fue capaz de inhibir en un 100% el crecimiento del patógeno.

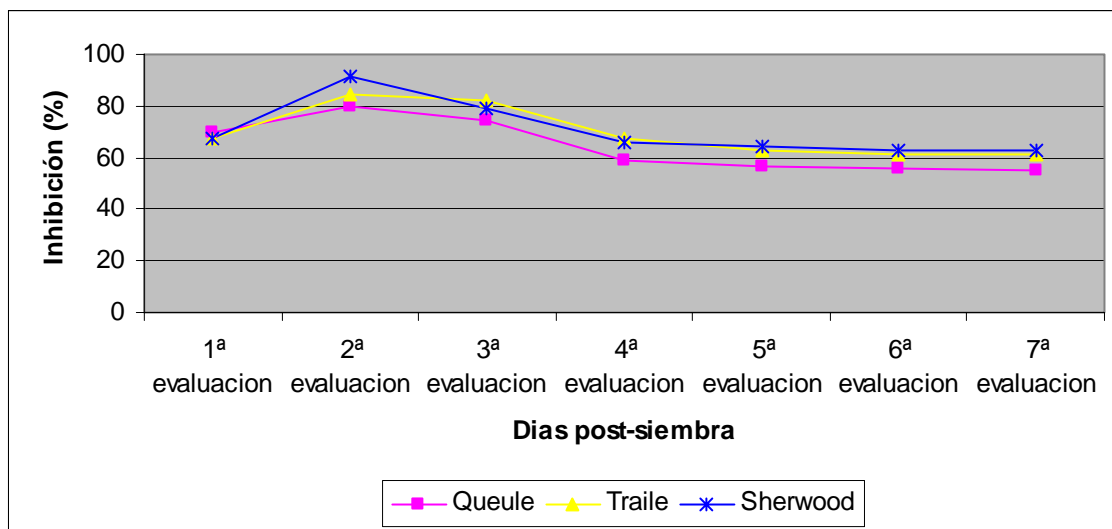
Al analizar el Cuadro 4.1, no se observan diferencias estadísticas entre las distintas cepas nativas de *Trichoderma* spp. presentando valores de inhibición del patógeno por sobre el 50%.

En términos absolutos, las tres cepas obtuvieron buenos resultados fluctuando el porcentaje de inhibición entre 55 y 62,5%. Este último corresponde a *T. virens* que fue la cepa que obtuvo un mayor desarrollo micelial, provocando una reducción del tamaño de la colonia del patógeno. Coincide con lo expresado por Cook (1989), quien señala el rápido crecimiento de colonias de *Trichoderma*, con micelio compacto y coloración verde. Además concuerda con las investigaciones realizadas por la Universidad de Talca, a través del proyecto FIA C98-1-A-072 "Evaluación de formulaciones de microorganismos para el control de enfermedades y plagas de importancia regional" (Informe Final, 2001), en donde se demuestra la actividad *in vitro* de distintas cepas de *Trichoderma*, destacándose la cepa Sherwood de *T. virens* en la inhibición del crecimiento de otros hongos fitopatógenos como *B. cinerea*.

**Cuadro 4.1** Inhibición del crecimiento de *Stemphylium vesicarium* por distintas cepas nativas de *Trichoderma* spp., incubados *in vitro* por 14 días a temperatura ambiente.

Tratamientos	Inhibición (%) <sup>1</sup>
Cepa Queule Nativa ( <i>T. harzianum</i> )	55,0
Cepa Trailes Nativa ( <i>T. parcenamosum</i> )	61,0
Cepa Sherwood Nativa ( <i>T. virens</i> )	62,5
<b>Significancia</b>	n.s

<sup>1</sup> Porcentaje de inhibición con respecto al testigo de *S. vesicarium* el cual creció en las mismas condiciones de incubación pero sin la presencia del hongo biocontrolador.



**Figura 4.1** Porcentajes de inhibición del crecimiento de *Stemphylium vesicarium* por distintas cepas nativas de *Trichoderma* spp. a temperatura ambiente.

En la Figura 4.1 se aprecian los valores de inhibición para las distintas fechas de evaluación, observándose una rápida acción biocontroladora por parte de las cepas de *Trichoderma*. Es así como *T. virens* muestra en las primeras dos evaluaciones ( 2 y 4 días postsiembra) el mayor porcentaje inhibitorio y a partir de la tercera evaluación *T. parcenamosum* y *T.harzianum* ( 6 días postsiembra) comienzan a comportarse de manera similar a la anterior. Al finalizar el ensayo las tres cepas igualan su acción inhibitoria.

#### 4.1.2 Evaluación a 4°C

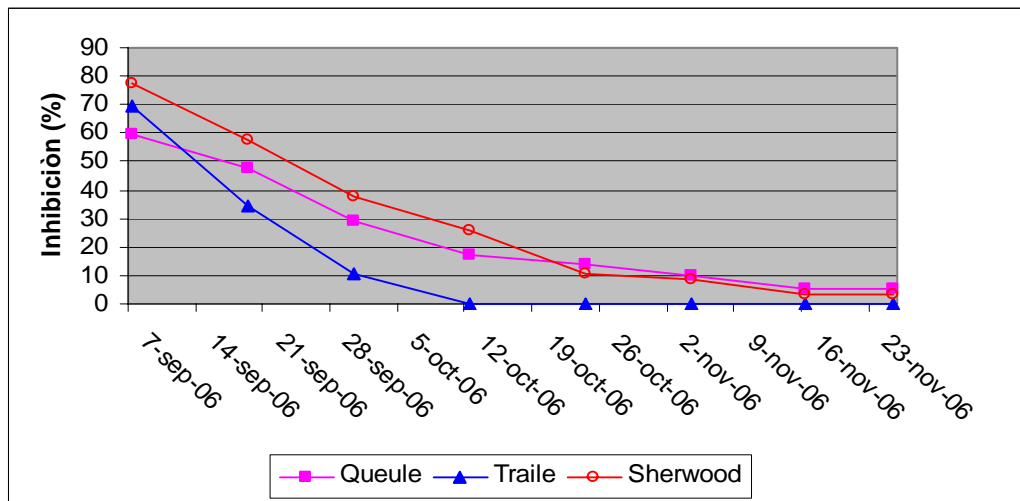
Al igual que en la evaluación anterior, se midió el desarrollo de *Stemphylium vesicarium* en los distintos tratamientos, con una frecuencia de dos días. Luego de 85 días de incubación de las placas petri a 4°C, periodo comprendido entre el 2 de septiembre y 25 de noviembre de 2005, se finalizó el ensayo al observar una detención en el crecimiento del tratamiento testigo.

El Cuadro 4.2 presenta los resultados finales de este ensayo.

**Cuadro 4.2** Efecto inhibitorio de tres cepas de *Trichoderma* sobre *S. vesicarium* incubados *in vitro* por 85 días a 4°C.

Tratamientos	Inhibición (%) <sup>1</sup>
Cepa Trailes Nativa ( <i>T. parcenamosum</i> )	5,4
Cepa Queule Nativa ( <i>T. harzianum</i> )	0
Cepa Sherwood Nativa ( <i>T. virens</i> )	3,3
Significancia	<b>n.s</b>

<sup>1</sup> Porcentaje de inhibición con respecto al testigo de *S. vesicarium* el cual creció en las mismas condiciones de incubación pero sin la presencia del hongo biocontrolador.



**Figura 4.2** Porcentajes de inhibición del crecimiento de *S. vesicarium* por distintas cepas nativas de *Trichoderma* spp. a 4°C.

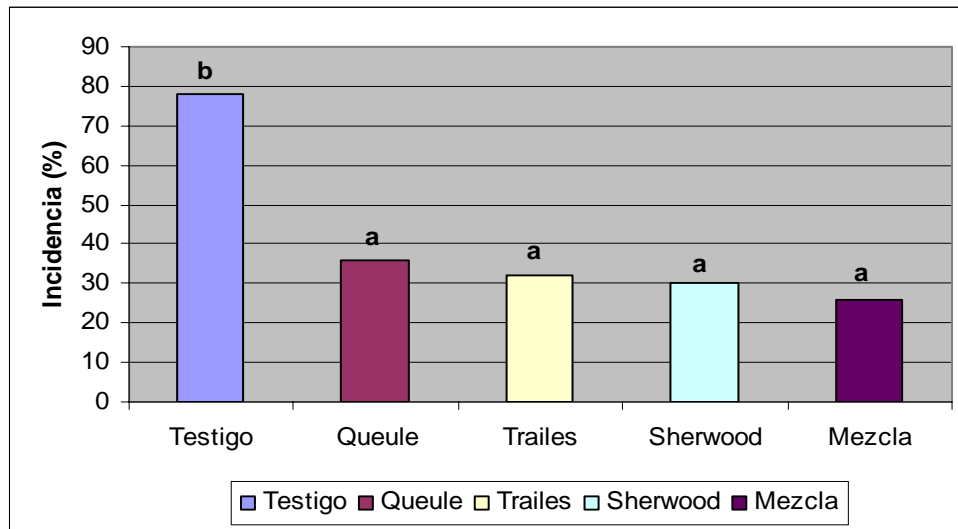
Del cuadro 4.2 se desprende que no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos. Dos de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. evaluadas arrojan porcentajes de inhibición muy bajos, y una nulo al final del ensayo, lo que demuestra que éstas, no tuvieron la capacidad de inhibir el desarrollo del patógeno, pudiendo ser las bajas temperaturas un factor relevante que afectó su acción inhibitoria. Estos resultados se contraponen a los obtenidos por Castillo (2004); quien evaluó el control *in vitro* de las mismas cepas a 4°C sobre *Sclerotium rolfsii*. Aquí el porcentaje más bajo de inhibición correspondió a *T. virens* (45,8%) y el mayor a *T. harzianum* (67,2%), no observándose un efecto de la temperatura sobre la acción del biocontrolador. Rodríguez y Arcia (1993, a, b), indican que las temperaturas requeridas para el crecimiento de *Trichoderma* (25 a 30°C) no son necesariamente las óptimas para expresar su antagonismo, ya que esas mismas cepas de *Trichoderma* mostraron una habilidad antagónica prácticamente nula a 30°C. Puntualmente en este estudio el antagonista enfrentado a *Stemphylium vesicarium*, requeriría de altas temperaturas para inhibir eficazmente al patógeno.

La Figura 4.2 muestra la evolución de los porcentajes de inhibición en el tiempo. En el se observa que desde la segunda semana de evaluación (14 días postsiembra) las tres cepas tienen un notorio descenso en su poder inhibitorio, siendo *T. parcenamosum* la que presenta una caída mas brusca. Por otra parte, *T. harzianum* y *T. virens* tienden durante todo el ensayo a comportarse en forma similar, si bien también muestran una disminución en su acción inhibitoria a través del tiempo, con una mayor reducción en los últimos días del ensayo. Finalmente las tres terminan en valores cercanos a cero.

Si bien en un comienzo todas las cepas de *Trichoderma* spp. presentaron un antagonismo frente al patógeno, durante el ensayo no mostraron un abundante crecimiento micelial lo que probablemente influyó en que no produjeran una inhibición del crecimiento de *S. vesicarium*. Por lo anterior podría deducirse que a esta temperatura, las cepas de *Trichoderma* spp., ven afectada su acción, no actuando por competencia, sino que empleando otro mecanismo. Aunque escasa, la inhibición observada en el primer mes del ensayo, podría deberse a la síntesis de antibióticos liberados por parte de *Trichoderma* que difunden a través del agar, limitando el crecimiento de *S. vesicarium*. McAllister *et al.* (1994), indican que en la relación antagónica *Trichoderma- Glomus mossae*, no se observa enrollamiento del micelio, a pesar de estar las hifas del biocontrolador en contacto con las de *Glomus*, aseverando que el mecanismo de acción no sería el micoparasitismo, sino la producción de antibióticos peptídicos.

#### 4.2 Evaluación de la actividad preventiva de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre inoculaciones artificiales de *Stemphylium vesicarium* en turiones de espárragos.

Durante 7 días (25 de octubre al 1 de noviembre de 2005) se evaluó la incidencia de Mancha Púrpura sobre turiones tratados en preinfección con distintas cepas de *Trichoderma* spp. y su mezcla. Lo anterior con el fin de determinar la efectividad del antagonista como alternativa de control preventivo de esta patología.



**Figura 4.3** Efecto biocontrolador de tres cepas nativas de *Trichoderma* spp., y una mezcla de ellas, sobre la incidencia de la enfermedad Mancha púrpura en turiones de espárragos artificialmente inoculados con *S. vesicarium*.

La Figura 4.3 muestra diferencias estadísticas altamente significativas entre los tratamientos, siendo el tratamiento testigo el con mayor porcentaje de incidencia (78%). Sin embargo tanto las tres cepas de *Trichoderma* spp., como la mezcla de ellas, fueron estadísticamente similares.

Si bien *T. harzianum* arrojó un porcentaje de incidencia de 36% no fue la más efectiva para este estudio, pero si lo ha sido para otras evaluaciones realizadas. Sid Ahmed et al., 2000, evaluaron la inducción de un sistema de resistencia en plantas de pimentón (*Capsicum annuum*), señalando que aplicaciones de *Trichoderma harzianum* inducen un sistema de defensa de la

planta en contra de *P. capsici*, reduciendo a la mitad la necrosis del tallo, síntoma que provoca la caída de plantas en pimentón causada por este hongo.

Como dato anexo, se observó que aquellos turiones que fueron asperjados con la mezcla del biocontrolador, presentaron una apariencia bastante deshidratada, en comparación con los demás tratamientos, en donde los turiones conservaron un aspecto fresco, menos deshidratado.

#### **4.3 Comparación de la actividad biocontroladora *in vitro* y en turiones de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre *S. vesicarium*.**

La capacidad inhibidora por parte de las cepas nativas de *Trichoderma* spp., Sherwood, Trailles y Queule evaluadas, fue lograda a temperatura ambiente. A 4°C hubo poco desarrollo micelial del biocontrolador, y escasa o nula inhibición por parte de éstas del desarrollo del patógeno. De acuerdo a esto, la temperatura de incubación en el caso de este ensayo, sería un factor limitante al momento de inhibir la acción de *Stemphylium vesicarium*.

A temperatura ambiente se generan las condiciones óptimas para el desarrollo micelial y esporulación de *Trichoderma*, inhibiendo eficazmente a *S. vesicarium*. Así este coloniza el micelio del patógeno y esporula en forma abundante, actuando por competencia (de espacio y nutrientes) y parasitismo (Sid Ahmed *et al.*, 1993). Por el contrario a 4°C, la escasa inhibición se explicaría por el mecanismo de antibiosis. De acuerdo a los resultados obtenidos en este ensayo, a esta última temperatura las distintas cepas del biocontrolador pierden la capacidad de actuar por competencia al verse limitado su crecimiento.

Según Benages, (1990) el hongo *Stemphylium vesicarium* se desarrolla bien en condiciones de alta humedad y temperaturas moderadas, entre 18° y 25°C. Sin embargo, bajo las condiciones de este ensayo se logró observar el desarrollo del patógeno a una temperatura de incubación a 4°C.

De la evaluación *in vivo* se obtiene como resultado que todas las cepas de *Trichoderma* spp, son biocontroladores efectivos en el control preventivo de Mancha Púrpura en turiones. Al emplear una mezcla de las tres cepas del biocontrolador, se logró también un buen efecto.

## V. CONCLUSIONES

- Las tres cepas nativas Queule (*T. harzianum*), Trailes (*T. parcenamosum*) y Sherwood (*T. virens*), cada una en forma individual, presentan capacidad biocontroladora *in vitro* sobre el patógeno *Stemphylium vesicarium*, bajo condiciones de incubación a temperatura ambiente.
- A 4°C la capacidad de inhibición por parte de las cepas de *Trichoderma* es nula.
- Las tres cepas nativas de *Trichoderma* spp., y su mezcla presentan una acción preventiva sobre inoculaciones artificiales de *Stemphylium vesicarium* en turiones de espárragos.

#### IV .BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, R. y Fajardo, L.1988. Presencia de la mancha púrpura causada por *Stemphylium Vesicarium* (WALLR) Simmons en viveros y cultivos del Espárrago. Simiente 58 (3-4): 160-162pp.
- Agrios, G. 1997. Plant Pathology. Editorial Limusa. México. 741 pp.
- Altieri, M. 1990¿Es posible el control biológico de las enfermedades de las plantas? Chile Agrícola 163: 450-452 pp.
- Alexopoulos, J., Mims, W. Y Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology. .Fourth edition. John Wiley and Sons, Inc. New York. 886 pp.
- Baker, K. F. y Cook, R.J. 1974. Biological Control of Plant Pathogens. San Francisco: Freeman 433 pp.
- Blakeman, J. and Fokkema, N. 1982 Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. Ann. Rev. Phytopathol. 20: 167- 192.
- Benson, B. 2002b. Second international asparagus cultivar trial final report. Acta Hortic.589:159-166.
- Benson, B.L., R. J. Mullen, and B.B. Dean. 1996. Three new green asparagus cultivars: Apollo, Atlas and Grande and one purple cultivar, Purple passion. Acta Hortic.415:50-56.
- Benajes, S. 1990. El Espárrago. Ediciones Mundi–Prensa. Madrid. 224pp.
- Castillo, E. 2004. Evaluación *in vitro* de la capacidad biocontroladora de tres cepas nativas de *Trichoderma* spp. a tres temperaturas de incubación, sobre *Sclerotium rolfsii*; Agente causal de pudrición blanca en remolacha. 49p.
- CIREN-Corfo.1985.Atlas agroclimatológico de Chile. Región IV a IX.
- Cohen,S., Lewis, A., Papavizas, G. and Bean, G. 1983. Cytological investigations o chlamydoformas of *Trichoderma* spp. (Abstract). Phytopathology 73(6):965.
- Cook, R. and Baker, K. 1983. The nature and practice of biological control of Plant Pathogens. American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota, USA. 539 pp.
- Cook, R. and Baker, K. 1989. The nature and practice of biological control of Plant Pathogens. Second Edition. USA. 239 pp.
- CORFO, 1982. Espárragos antecedentes agronómicos económicos. 192 pp.
- Domsch, K.H., Gams, W. and Anderson, T.H. 1990. *Trichoderma* Pers ex Fr. 1821. Compendium of soil fungi . 2ª ed. Academia Press, London, England. 1023pp.

- Eveleigh, D.E. 1985. *Trichoderma* En: Biology of industrial Microorganisms. A. Demain, M. Salomon (eds). 1ª. De The Benjamin/ Cummings Publ. Co. Inc. Menlo Park. California pp. 487-509.
- Fernandez- Larrea, O. 2001. Microorganismos para el control fitosanitarios. Avance en el fomento de productos fitosanitarios no sintéticos. Costa Rica 62: 96 – 100.
- Ghisalberti, E. L. y Silvasithampam, K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. Soil biology Biochemistry 23:1011-1020.
- Giaconi, V., M. Escaff. 1997. Cultivo de hortalizas. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Editorial Universitaria, Santiago, Chile, pp.166-186. Disponible en <http://www.manejointegrado.cl>. Consultado en Noviembre de 2005.
- González, A y del Pozo, A, 1999. El cultivo del Espárrago. Centro Regional de investigación Quilamapu. 212 p.
- Harman, G.E, Björkman T. 1998. Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. In: Harman GE, Kubicek CP, eds. *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial applications. London: Taylor and Francis, 229–265.
- Harman, G. 2003. *Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system). Disponible en <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/trichoderma.html> Consultado en Junio de 2005.
- Harman, G.E. y Lumsden. 1990. Development Tactics for Biocontrol Agent in Plant Pathology. New Directions in Biological Control. Agricultural Pest and Diseases, pp. 779-792.
- INE.1997. VI Censo nacional agropecuario. Resultados preliminares. Instituto nacional de estadística de Chile. 443 pp.
- Infoagro, 2004. El cultivo del espárrago verde. Disponible en <http://www.infoagro.cl>. Consultado en Noviembre de 2005.
- Informe final, 1998. Proyecto FIA, C98-1-A-072. Evaluación de formulaciones de microorganismo, para el control de enfermedades y plagas en cultivos de importancia regional. Universidad de Talca, Chile.
- Krarp, C., P. Konar. 1997. Hortalizas de estación cálida. Biología y diversidad cultural. P. Universidad Católica de Chile, VRA, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Proyecto de Desarrollo Docente, Santiago, Chile, 111p. Disponible en <http://www.manejointegrado.cl> Consultado en Octubre de 2005.
- Maroto, J.V. 2002. Horticultura herbácea especial. 5ª ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 702pp.
- McAllister, C., Garcia-Romero, I., Godeas, A. and Ocampo, J. 1994. Interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*: Effects on plant growth, arbuscular mycorrhizas and the saprophyte inoculants. Soil Biology and Biochemistry 26 (10): 1363-1367.

- Montealegre, J. 1988 La mancha púrpura del Espárrago. *Revista Frutícola*. 9 (2): 45-46 pp.
- Nelson, E.B. 1998. Current limits to biological control of fungal phytopathogens. En: *Handbook Appl. Mycol. Vol. I Soil and Plants*. Arora, D.K., Rai, R. Mukerji, K. G. & Knudsen, N.G. New York, pp. 327-355.
- ODEPA, 2005. Estadísticas de la agricultura chilena. Comercio exterior silvoagropecuario. Disponible en <http://www.odepa.cl>. Consultado en Diciembre de 2005.
- Ogawa, J.M. 1986. Field test procedures for evaluation of fungicides to control *Monilia laxa* on stone fruits. En: Hicked, K. Ed. *Methods for evaluating pesticides for control of plant pathogens*. American Phytopathological Society Press. pp 152-154.
- Papavizas, G. 1981. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea bean rhizosphere. *Phytopathology* 71: 121-125.
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Biology, ecology and potential for biocontrol. *Annual review of Phytopathology* 23 :23-54.
- Rodríguez, I. y Arcia, A. 1993a. Caracterización fisiológica (temperatura, pH y luz) de 12 aislamientos de *Trichoderma* spp., *in vitro*. (Resumen). *Fitopatol. Venezol.* 6(2): 53
- Rodríguez, I. y Arcia, A. 1994b. Efecto de doce aislamientos de *Trichoderma* spp., sobre el número, tiempo de formación y porcentaje de parasitismo de esclerocios de *Sclerotium rolfsii*, en cuatro temperaturas diferentes. (Resumen). *Fitopatol. Venezol.* 6(2): 54.
- Sanchez, V., Bustamante, E. and Shattock, R. Selección de antagonistas para el control Biológico de *Phytophthora infestans* en Tomate. *Manejo integrado de plagas*. 1998. Costa Rica.
- Sid Ahmed, A., Pérez-Sánchez, C., Egea, C. y Candela, M. 1989. Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in paper plants. *Plant pathology*. 48: 58-65.
- Snowdon, A. 1992. *Color Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of fruit and vegetables*. Volume 2: vegetables. CRC Press, Boston. 416pp.
- Sutton, J. and Peng, G. 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathology* 83: 615-621.
- Wainwright, M. 1992. *An Introduction to fungal Biotechnology*. Wiley, Chichester. England. 202pp.