



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

**ALTERNATIVAS DE CONTROL DE *BOTRYTIS CINEREA* EN *LEUCADENDRON*
(PROTEACEAE)**

MEMORIA DE TITULO

Claudia Andrea Silva González

Talca-Chile
2004

RESUMEN

Para evaluar el efecto de aplicaciones de biocontroladores y de un fungicida en el control preventivo de *Botrytis cinerea* en *Leucadendron* "Safari Sunset", se realizó un experimento en el invernadero de floricultura, ubicado en el Campus Lircay de la Universidad de Talca, VII región.

Las aplicaciones de cepas nativas de especies de *Trichoderma* y del fungicida Tebuconazole fueron realizadas 15 y 8 días antes de la inoculación de *Botrytis cinerea*, respectivamente. El estudio consideró seis tratamientos: *Trichoderma parceanamosum*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma harzianum*, mezcla de cepas de *Trichoderma*, Tebuconazole y Testigo sin ninguna aplicación.

Los tratamientos fueron dispuestos en un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones, estando cada unidad experimental compuesta por 10 plantas. Se realizaron 4 evaluaciones semanales para medir la incidencia y severidad del hongo.

Durante la tercera y cuarta evaluación la incidencia y grado de severidad de *Botrytis cinerea* aumentó considerablemente. Los tratamientos *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens*, mezcla de cepas de *Trichoderma* y Tebuconazole presentaron un menor control, en relación con el tratamiento testigo. El biocontrolador que presentó un buen efecto en el control de la enfermedad fue *Trichoderma parceanamosum*, presentando en las dos últimas evaluaciones menores valores de incidencia y severidad respecto al testigo.

ABSTRACT

The effectiveness of different applications of native stocks *Trichoderma* and a fungicide in the preventive control of *Botrytis cinerea* was evaluated in *Leucadendron* 'Safari Sunset'. The experiment was realized in the Campus Lircay of Universidad de Talca, VII Region. The fungicide and *Trichoderma* application were made 8 and 15 days before the inoculation of *Botrytis cinerea* respectively. Study considered six treatments (*Trichoderma parceanamosum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens*, mixture stocks *Trichoderma*, Tebuconazole and Control). The treatments were arranged in a randomized design, with 4 replications made of 10 homogeneous plants. Four incidence and severity assessments of *Botrytis cinerea*. During the third and fourth evaluation show significant decrease in the incidence and severity of diseases as compared with the controls. However *Trichoderma parceanamosum* the coefficients were low at presenting the incidence and severity compared with the controls.

INDICE

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCION..... 1

REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Proteáceas.....	3
2.2 Género <i>Leucadendron</i>	4
2.3 Enfermedades que afectan a Proteáceas.....	5
2.3.1 Botritis, Tizón de flores.....	5
a) Agente causal.....	5
b) Factores favorables para el desarrollo de la enfermedad.....	6
c) Síntomas y signos.....	6
d) Ciclo de la enfermedad.....	7
2.3.2 Antecedentes en el control de enfermedades producidas por <i>Botrytis cinerea</i>	8
a) Control cultural.....	8
b) Control químico.....	9
c) Control biológico.....	10
2.4 Alternativas de control preventivo para <i>Botrytis cinerea</i> en Proteáceas.....	10
2.4.1 Fungicidas inhibidores de la síntesis de esteroides (IBE).....	10
a) Tebuconazole.....	11
2.4.2 <i>Trichoderma</i> spp.....	12

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del experimento.....	15
3.2 Material vegetal.....	15
3.3 Obtención e identificación de <i>Botrytis cinerea</i>	15
3.4 Pruebas de patogenicidad.....	16
3.5 Evaluación en preinfección del biocontrolador <i>Trichoderma</i> spp. y del producto Tebuconazole en el control de <i>Botrytis cinerea</i>	17
3.6 Inoculación de plantas con <i>Botrytis cinerea</i>	18
3.7 Medición de la incidencia y severidad de la enfermedad.....	19
3.8 Diseño experimental.....	19

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Efecto de aplicaciones de <i>Trichoderma</i> spp. y un fungicida tradicional en el control preventivo de la enfermedad <i>Botrytis cinerea</i> en <i>Leucadendron</i> 'Safari Sunset'.....	21
4.1.1 Análisis de la incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> en <i>Leucadendron</i> 'Safari Sunset'.....	21
4.1.2 Análisis de severidad de <i>Botrytis cinerea</i> en <i>Leucadendron</i> 'Safari Sunset'.....	25

CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	32
ANEXO.....	35

INDICE DE FIGURAS Y CUADROS

CAPITULO 2

Figura 2.1 Ciclo de vida de <i>Botrytis cinerea</i>	8
Figura 2.2 Estructura química de Tebuconazole.....	11

CAPITULO 3

Cuadro 3.1 Tratamientos a evaluar en el control preventivo de <i>Botrytis cinerea</i> en <i>Leucadendron</i> 'Safari Sunset'.....	18
---	----

CAPITULO 4

Figura 4.1 Incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> en plantas de <i>Leucadendron</i> 'Safari Sunset' tratadas preventivamente con <i>Trichoderma</i> y un fungicida tradicional. Primera fecha de evaluación correspondiente a siete días post inoculación con el patógeno.....	22
Figura 4.2 Incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> en plantas de <i>Leucadendron</i> 'Safari Sunset' tratadas preventivamente con <i>Trichoderma</i> y un fungicida tradicional. Segunda fecha de evaluación correspondiente a 14 días post inoculación con el patógeno.....	23
Figura 4.3 Incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> en plantas de <i>Leucadendron</i> 'Safari Sunset' tratadas preventivamente con <i>Trichoderma</i> y un fungicida tradicional. Tercera fecha de evaluación correspondiente a 21 días post inoculación con el patógeno.....	23
Figura 4.4 Incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> en plantas de <i>Leucadendron</i> 'Safari Sunset' tratadas preventivamente con <i>Trichoderma</i> y un fungicida tradicional. Cuarta fecha de evaluación correspondiente a 28 días post inoculación con el patógeno.....	24
Figura 4.5 Porcentajes de plantas de <i>Leucadendron</i> 'Safari Sunset' con distintos grados de severidad tratadas preventivamente con <i>Trichoderma</i> y un fungicida tradicional. Primera fecha de evaluación correspondiente a siete días post inoculación con el patógeno.....	27
Figura 4.6 Porcentajes de plantas de <i>Leucadendron</i> 'Safari Sunset' con distintos grados de severidad tratadas preventivamente con <i>Trichoderma</i> y un fungicida tradicional. Segunda fecha de evaluación correspondiente a 14 días post inoculación con el patógeno.....	28
Figura 4.7 Porcentajes de plantas de <i>Leucadendron</i> 'Safari Sunset' con distintos grados de severidad tratadas preventivamente con <i>Trichoderma</i> y un fungicida tradicional. Tercera fecha de	

evaluación correspondiente a 21 días post inoculación con el patógeno.....	28
Figura 4.8 Porcentajes de plantas de <i>Leucadendron</i> 'Safari Sunset' con distintos grados de severidad tratadas preventivamente con <i>Trichoderma</i> y un fungicida tradicional. Cuarta fecha de evaluación correspondiente a 28 días post inoculación con el patógeno.....	29
 CAPITULO 6	
Cuadro 6.1 Incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> en plantas de <i>Leucadendron</i> 'Safari Sunset' tratadas preventivamente con <i>Trichoderma</i> y un fungicida tradicional. Primera fecha de evaluación correspondiente a siete días post inoculación con el patógeno.....	35
Cuadro 6.2 Incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> en plantas de <i>Leucadendron</i> 'Safari Sunset' tratadas preventivamente con <i>Trichoderma</i> y un fungicida tradicional. Segunda fecha de evaluación correspondiente a 14 días post inoculación con el patógeno.....	35
Cuadro 6.3 Incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> en plantas de <i>Leucadendron</i> 'Safari Sunset' tratadas preventivamente con <i>Trichoderma</i> y un fungicida tradicional. Tercera fecha de evaluación correspondiente a 21 días post inoculación con el patógeno.....	36
Cuadro 6.4 Incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> en plantas de <i>Leucadendron</i> 'Safari Sunset' tratadas preventivamente con <i>Trichoderma</i> y un fungicida tradicional. Cuarta fecha de evaluación correspondiente a 28 días post inoculación con el patógeno.....	36
Cuadro 6.5 Porcentajes de plantas de <i>Leucadendron</i> 'Safari Sunset' con distintos grados de severidad tratadas preventivamente con <i>Trichoderma</i> y un fungicida tradicional. Primera fecha de evaluación correspondiente a siete días post inoculación con el patógeno.....	37
Cuadro 6.6 Porcentajes de plantas de <i>Leucadendron</i> 'Safari Sunset' con distintos grados de severidad tratadas preventivamente con <i>Trichoderma</i> y un fungicida tradicional. Segunda fecha de evaluación correspondiente a 14 días post inoculación con el patógeno.....	37
Cuadro 6.7 Porcentajes de plantas de <i>Leucadendron</i> 'Safari Sunset' con distintos grados de severidad tratadas preventivamente con <i>Trichoderma</i> y un fungicida tradicional. Tercera fecha de evaluación correspondiente a 21 días post inoculación con el patógeno.....	38
Cuadro 6.8 Porcentajes de plantas de <i>Leucadendron</i> 'Safari Sunset' con	

distintos grados de severidad tratadas preventivamente con *Trichoderma* y un fungicida tradicional. Cuarta fecha de evaluación correspondiente a 28 días post inoculación con el patógeno..... 38

1. INTRODUCCIÓN

El rubro de la floricultura se ha convertido en una interesante opción para la agricultura en Chile. Al parecer esto se explicaría porque la producción de flores de corte proporciona mejores retornos por unidad de superficie en comparación a otros productos agrícolas (Figueroa, 1996).

Dentro de las especies introducidas al país como flor de corte se encuentran las pertenecientes a la familia *Proteaceae*, donde los géneros más importantes son: *Protea*, *Leucadendron*, *Leucospermum*, *Serruria* y *Telopea*.

Una de las principales características de las plantas pertenecientes a esta familia, es que se pueden cultivar bajo condiciones de sequía, en suelos pobres en nutrientes, pero de buen drenaje, siendo en general resistentes a muchas enfermedades. Además, las flores y follaje son vigorosos y erectos, lo que las hace ideales para flor de corte (Mc Lennan, 1993).

Sin embargo, en la producción de Proteáceas los patógenos ocasionan importantes pérdidas, las que se reflejan en baja productividad, disminución de sus características estéticas, y rechazos fitosanitarios durante la exportación (Taylor, 2001).

Uno de los hongos más frecuentemente asociado a Proteáceas es *Botrytis cinerea*, el que se presenta en la mayoría de las especies de plantas. Así, afectaría a todas las variedades en algún grado. Los signos de la enfermedad se presentan con una cubierta uniforme de micelio sobre las escamas y hojas afectadas, atacando en especial ápices de crecimiento, yemas florales y hojas inmaduras. Las variedades presentan diferentes grados de resistencia, pero en general todas las variedades de Proteáceas presentan algún grado de susceptibilidad a este patógeno (Harre, 1988).

Recientemente *Botrytis cinerea* ha sido determinada afectando plantas de Proteas en distintas zonas de cultivo en Chile, disminuyendo la calidad comercial de las flores.

Si bien, a través de métodos culturales como, fertilización balanceada o una adecuada aireación de las plantas, es posible reducir la incidencia de este hongo durante periodos de alto

riesgo, esto debe apoyarse con aplicaciones de productos químicos preventivos, para así evitar la diseminación de la enfermedad una vez que ésta se ha establecido (Harre, 1988).

Aunque no se han definido claramente medidas de control, aplicaciones de fungicidas recomendados para el control de *Botrytis cinerea* en otros cultivos, serían efectivos en el control del patógeno en Proteáceas. Adicionalmente *Trichoderma* spp. también podría ser efectivo dentro de un manejo de control preventivo. Este controlador biológico ha sido evaluado efectivamente en el control de *Botrytis cinerea* en otros cultivos.

Considerando lo anterior ésta memoria se ha planteado como objetivo general:

- Evaluar un fungicida comercial y cepas del controlador biológico *Trichoderma* spp. en el control preventivo de *Botrytis cinerea* en *Leucadendron* 'Safari Sunset'

Por otra parte, como objetivos específicos se señalan :

- Evaluar la incidencia y severidad de *Botrytis cinerea* en *Leucadendron* 'Safari Sunset', tratadas preventivamente con un fungicida comercial y tres cepas de *Trichoderma* spp. en distintas fechas de aplicación.
- Definir el o los tratamientos más efectivos en el control de *Botrytis cinerea* en *Leucadendron* 'Safari Sunset'.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 Proteáceas

La familia *Proteaceae* incluye a algunas subfamilias como *Grevilleoidae* en la que se encuentran los géneros *Banksia*, *Grevillea* y *Macadamia*, conocidos principalmente en Australia. En la subfamilia *Proteoideae*, se encuentran los géneros *Protea*, *Leucadendron*, *Leucospermum* y *Serruria*, entre otras (Malan, 1992).

Las especies de la familia Proteácea se caracterizan por poseer flores exóticas que son de gran atractivo. Esta familia está dividida en 14 géneros, de los cuales los siguientes siete son de importancia comercial: *Protea*, *Leucospermum*, *Leucadendron*, *Serruria*, *Aula*, *Mimetes* y *Paranomus* (Aguilera, 2001).

Muñoz (1996) describe en Chile algunas especies nativas de Proteáceas tales como: *Gevuina avellana* (avellano), *Embothrium coccineum* (notro), *Lomatia ferruginea* (romerillo o palmilla), *Lomatia dentata* (avellanillo), *Orites myrtoidea* (radal enano) y *Lomatia hirsuta* (radal).

Actualmente las proteas se cultivan principalmente como flor de corte o follaje decorativo en varios países del mundo, habiendo sido introducidas al país en 1993. Pueden ser cultivadas en suelos muy pobres y degradados, lo cual constituye una alternativa en zonas costeras, ya que además de sus particulares requerimientos de suelo, necesita climas con vientos permanentes y preferentemente sin heladas o bien de corta duración o intensidad (Rodríguez, 2002).

La mayoría de las Proteáceas tienen algunas características en común: son esclerófilas, tienen hojas duras coriáceas, lo que les permite tolerar déficit hídrico, no requieren de una alta humedad ambiental, y sus hojas son relativamente resistentes al viento. Por otra parte, las yemas foliares no están protegidas por hojas escamosas, de modo que son susceptibles a daño por frío. Las plantas de la mayor parte de los géneros producen raíces proteoides que las

ayudan a absorber los nutrientes cuando el nivel de éstos en el suelo es muy bajo. Finalmente, es posible observar una gran variabilidad dentro de una misma especie (Salinger, 1991).

2.2 Género *Leucadendron*

Dentro de éste género existen plantas hembras y machos (dioicas) con lo que se asegura la polinización cruzada. En ambos sexos las ramas poseen en el ápice cabezas florales terminales. La flor femenina produce conos leñosos que contienen los frutos y semillas, mientras que las flores masculinas no forman conos y sólo producen polen. Los conos de las plantas hembras están rodeados por brácteas coloreadas dispuestas en forma espiral, las que lo cubren parcialmente. Las brácteas que rodean la flor de *Leucadendron* son menos numerosas que las brácteas del género *Protea* y mucho más abiertas que éstas.

La floración de *Leucadendron* ocurre desde el otoño en adelante hasta finales del invierno. Las flores tienen la característica de que las hojas que envuelven el cono central toman una coloración rojiza que va cambiando su tonalidad a través de la temporada. Estas tienen una larga vida en poscosecha, de hasta dos meses si se les cambia el agua diariamente (McLennan, 1993).

2.3 Enfermedades que afectan a Proteáceas

Se han identificado varias especies de hongos afectando en algún grado a Proteáceas, ocasionando enfermedades del sistema radical, flores, hojas y brotes de las plantas. Taylor (2001), encontró que las enfermedades producidas en *Leucadendron* se debían principalmente a la acción de *Botryosphaeria dothidea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Elsinoe leucospermi*, *Fusicoccum* sp., *Pestalotiopsis* spp., *Phytophthora cinnamomi* y *Pythium* sp. Moura (2001), señala además a *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* y *Penicillium* sp., como responsables de algunas de las enfermedades que afectan a *Leucadendron*.

2.3.1 Botritis, Tizón de flores

Constituye la más común de las patologías que afectan a Proteáceas (Harre, 1988). El tizón que produce constituye una enfermedad impredecible, que afecta botones florales y el ápice de los brotes jóvenes, de varios géneros (*Banksia*, *Leucospermum*, *Leucadendron*, *Protea* y *Serruria* spp.). Antiguamente el tizón de las flores se desarrollaba en poscosecha, después del embalaje; sin embargo en la actualidad el patógeno se desarrolla principalmente a nivel de campo de cultivo (Von Broembsen, 1989).

a. Agente causal

Botrytis cinerea Pers.ex.Fr (teleomorfo *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel), es un hongo polífago, parásito de plantas cultivadas y malezas, o saprófito de materia orgánica en descomposición. Tiene gran capacidad reproductiva, fácil diseminación por el viento, amplia adaptación termal, y secreta enzimas pectolíticas que degradan las paredes celulares (Agrios, 1988).

Es probablemente el patógeno que más daño causa en la agricultura, a pesar de que no es un parásito especializado. Es un hongo oportunista de amplio espectro. Produce

conidióforos pigmentados, con células conidiogénicas que producen numerosas conidias unicelulares por yemación sincrónica. En ocasiones el micelio puede formar esclerocios, es decir, estructuras compactas y negruscas de resistencia (Lolas, 2001).

b. Factores favorables para el desarrollo de la enfermedad

La magnitud del daño producido por *Botrytis cinerea*, depende de la interacción planta-patógeno-medio ambiente. La temperatura óptima para la germinación de las conidias es 20°C, esporulando el hongo a 15°C, sin embargo el micelio es capaz de crecer a temperaturas cercanas a 0°C. Las bajas temperaturas constituyen un factor negativo en la patogenicidad del hongo ya que crece con menor velocidad conforme la temperatura disminuye (Auger, 1988).

Botrytis cinerea ataca a un amplio rango de cultivos. Las abundantes esporas producidas son rápidamente dispersadas por la lluvia y el viento; siendo la enfermedad favorecida en Proteas, por condiciones de alta humedad y temperatura, pudiendo desarrollarse rápidamente (Von Broembsen, 1989). Lubbe (2001), señala al respecto que una pequeña película de agua y bajas temperaturas, unido a condiciones de alta humedad relativa, favorecen el rápido desarrollo del patógeno.

Cuando existen condiciones favorables las esporas de *Botrytis cinerea* germinan y forman hifas que penetran en los tejidos de la planta, destruyéndolos. Luego las hifas crecen en superficie y forman las conidias, las que actúan como inóculo para el desarrollo de nuevas infecciones (Morales, 1985).

c. Síntomas y signos

Este hongo causa tizón en las varas florales y en las cabezas de la flor. Las manchas de color café se pueden desarrollar tanto sobre las hojas, como en flores y brotes. Cuando las lesiones se extienden, las cabezas florales pueden llegar a morir, ya que la necrosis en ocasiones se extiende por debajo de la flor hasta el pedúnculo, causando una caída de ésta.

Cuando la infección avanza hacia los brotes apicales, éstos se necrosan y mueren. Por otra parte, si el desarrollo de la enfermedad es detenido, debido a un cambio de condiciones ambientales, las flores continúan su crecimiento, pero se deforman. A este hongo comúnmente se le denomina moho gris, porque produce abundante micelio de ese color sobre las lesiones (Lubbe, 2001).

Las flores inicialmente se tornan defectuosas o decoloradas en los sitio de infección, y si las condiciones para la enfermedad son favorables, los tejidos afectados colapsan y mueren. La masa de esporas es visible a simple vista (Von Broembsen, 1989).

d. Ciclo de la enfermedad

Durante la primavera las condiciones son adecuadas en cuanto a humedad y temperatura, permitiendo que los esclerocios germinen produciendo conidias, las cuales son transportadas por acción del viento a los órganos florales, los que son colonizados por el hongo (Montealegre, 1987).

El patógeno se establece inicialmente en los pétalos de flores, los cuales son más susceptibles, y en ese lugar produce micelio en abundancia. Los tejidos colonizados se arrugan y deshidratan y el hongo produce esclerocios aplanados de color negro sobre la superficie o hundidos en el tejido, los que pueden permanecer como estructura de sobrevivencia del patógeno (Agrios, 1996).

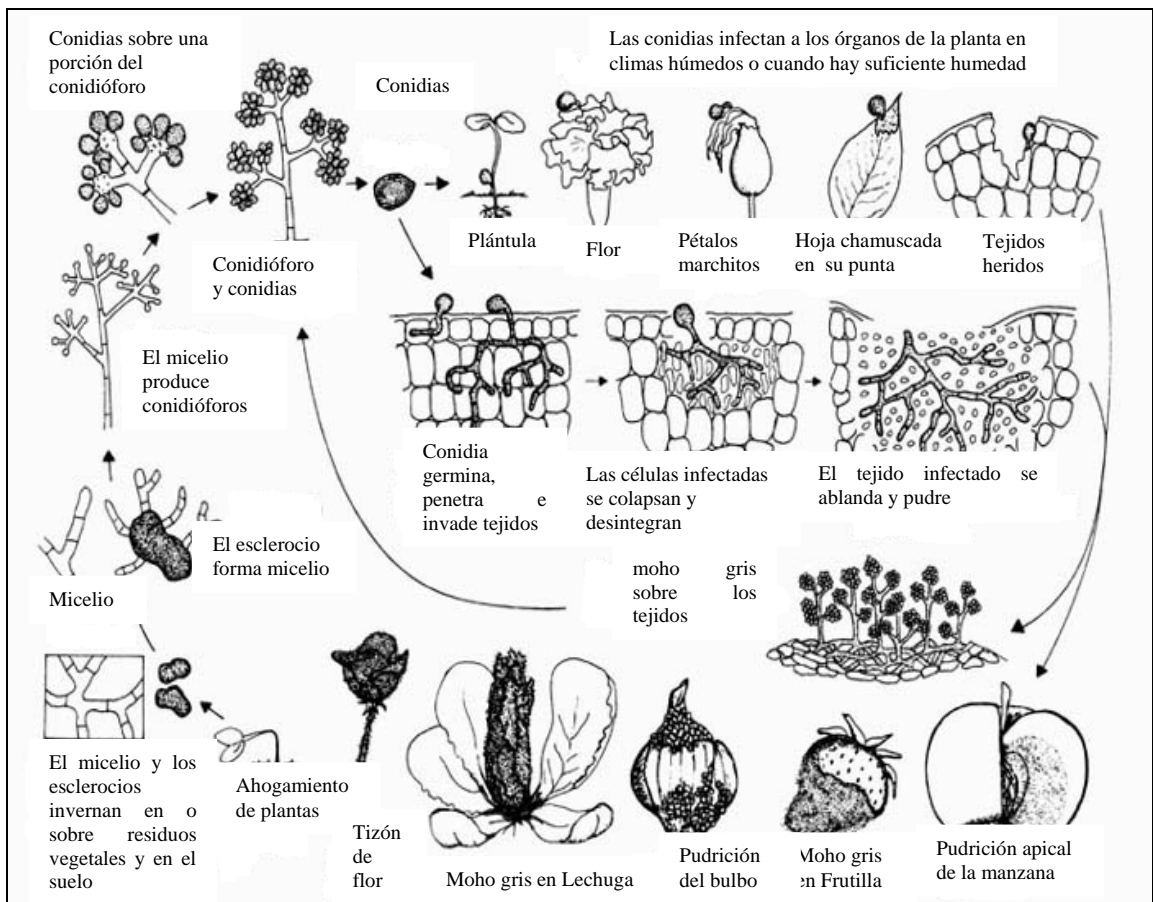


Figura 2.1 Ciclo de vida de *Botrytis cinerea* (Fuente: Agrios,1988)

2.3.2 Antecedentes en el control de enfermedades producidas por *Botrytis cinerea*

a. Control cultural

Dentro de los métodos preventivos es importante considerar el uso de material de propagación libre de la enfermedad. Es importante plantar a una profundidad adecuada, evitando condiciones de mal drenaje, falta de luminosidad y escasa aireación. Las flores deben ser cortadas de plantas madres sanas. En ocasiones se puede recurrir a la aplicación de fungicidas preventivos como medida de protección, en particular cuando se efectúan labores

como cosecha u otras que causan heridas. Las posibles fuentes de inóculo del patógeno deben ser eliminadas de sectores aledaños a plantaciones de Protea, y es importante que el agua de riego esté libre de contaminación.

Una vez establecido el cultivo también es importante que la presencia de enfermedades sea monitoreada regularmente. Además, plantas muertas o partes de plantas enfermas deben ser removidas ya que éstas constituyen una abundante fuente de inóculo. De igual forma, las herramientas utilizadas en poda y cosecha deben ser desinfectadas para evitar la diseminación del patógeno. Los cultivares resistentes o tolerantes deben ser utilizados en lugares donde exista historial de enfermedades.

El riego no debe aplicarse sobre las flores, siendo importante implementar medidas que permitan un adecuado control de la humedad (Lubbe, 2001).

b. Control químico

Estudios realizados para el cultivo de Proteáceas indican la efectividad de fungicidas preventivos como Iprodione, Mancozeb (200g/100L) y Chlorothalonil (275 ml/100L), y como fungicidas curativo se recomienda el uso de Benomil (200g/100L), este último en combinación con fungicidas de contacto del grupo de los ditiocarbamatos (Lubbe, 2001).

Von Broembsen (1989), indica que fungicidas preventivos como Iprodione deben ser rociados sobre los brotes jóvenes dos a tres semanas antes de floración, cuando existan condiciones de humedad y frío moderado.

Benomilo 50% o Carbendazima 50% con una dosis mínima de 50 g/hl, fueron efectivos en el control de *Botrytis cinerea* en condiciones de laboratorio. Ensayos experimentales indican que *Botrytis cinerea* fue controlada por la combinación de Fenbuconazol 5%+ Dinocap 16% o Procimidone 50% (100g/hl) o Metiltiofanato 70% (50 g/hl) o Tebuconazol 10% más Diclofluanida 40% (250 g/hl) (Bethencourt *et al.*, 2001).

c. Control biológico

Trichoderma harzianum rifai, es antagonista de *Botrytis cinerea* y la literatura lo menciona como potencial agente de control biológico. Pruebas de campo en plantas de manzano y plantas de vid, han demostrado que *Trichoderma harzianum* es capaz de ejercer un control preventivo de *Botrytis cinerea* similar a los fungicidas, o reducir las dosis de éstos, cuando son usados en forma simultánea o secuencial con este controlador biológico. El control que *Trichoderma harzianum* ejerce sobre *Botrytis cinerea* se explica a través de mecanismos de competencia, micoparasitismo y antibiosis, todo influenciado por la temperatura (Jalil, 1997).

2.4 Alternativas de control preventivo para *Botrytis cinerea* en *Proteáceas*.

2.41 Fungicidas inhibidores de la síntesis de esteroides (IBE)

Este grupo de fungicidas, comprende una larga y diversa familia; cuya estructura química está formada por compuestos nitrogenados heterocíclicos; que son bastantes efectivos en el control de Ascomycetes (anamorfos) y Basidiomycetes (Royas, carbonos).

Según la composición química los IBE se dividen en seis grupos de fungicidas: triazoles, imidazoles, pirimidinas, morfolinas, piperazinas y piridinas; pero existe un séptimo grupo llamado Alilaminas. El grupo principal corresponde al primero. Estos son capaces de detener la biosíntesis de ergosteroides del hongo fitopatógeno, que corresponden a compuestos celulares característicos de estos organismos. Los hongos necesitan de ellos para la formación y el funcionamiento de las membranas celulares, por lo que si se detiene su síntesis el hongo muere (Latorre *et al.*, 1985).

Los IBE presentan un bajo riesgo de desarrollar en el campo, poblaciones fitopatógenas resistentes (Latorre, 1995). Sin embargo, con excepción de las alilaminas, actúan en uno, dos o tres sitios específicos en el proceso de síntesis de éste compuesto, considerándose fungicidas

sitio específicos, existiendo en consecuencia un riesgo potencial de desarrollo de resistencia necesario de evaluar (Kolles y Scheinpflug, citado por Latorre, 1989).

En la actualidad se dispone de formulaciones comerciales de combinaciones de grupos químicos como triazoles con pirimidinas, con un amplio espectro, con acción de contacto, sistémica y translaminar; que producen un eficaz control preventivo y curativo de *Botrytis cinerea* en distintos cultivos (AFIPA, 2002-2003).

a. Tebuconazole

Pertenece a la última generación de fungicidas triazólicos, caracterizados por un amplio espectro de acción y por ser inhibidores de la biosíntesis del ergosterol.

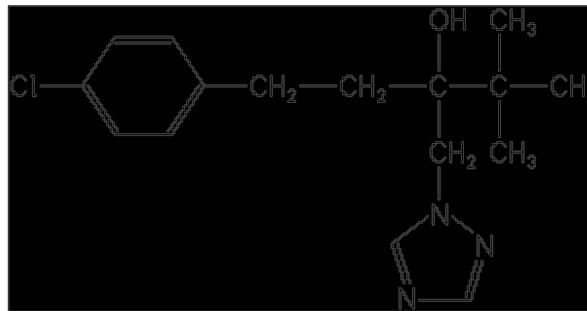


Figura 2.1 Estructura química de Tebuconazole (Fuente: Heliang, 2003)

Se han realizado diversos estudios para determinar el efecto residual del fungicida Tebuconazole en diferentes cultivos. En estos se ha comprobado su compatibilidad en cultivos como cebada, vid, forraje, palto, centeno, tomate, trigo, pomáceas y carozos. Los países donde se realizaron los estudios preliminares en 1994, señalaron sus límites máximos residuales en 2 mg/kg y la carencia en 35 días, para Chile (Duff *et al.*, 1994).

Horizon corresponde al nombre comercial de un fungicida cuyo ingrediente activo es el Tebuconazole, su modo de acción tiene la característica de ser sistémico, preventivo y curativo.

Es un fungicida sistémico y de contacto, de largo efecto residual, recomendado para ser utilizado en estrategias de control preventivo, curativo y erradicante. Controla eficazmente pudrición gris y oídio en uvas de mesa, pisqueras y viníferas, constituyéndose en una excelente herramienta para evitar el desarrollo de resistencia. Simultáneamente, posee una muy buena eficacia en el control de oídio en durazneros, nectarinos y rosas. Inhibe la biosíntesis del ergosterol, afectando la permeabilidad de la membrana celular. Su persistencia de acción se ha estimado en 14 días; y es recomendado en programas de Producción Integrada (Arapeq, 1996).

Estudios realizados en uva de mesa, han demostrado la efectividad del fungicida Tebuconazole (Horizon 25% WP) en el control del patógeno *Botrytis cinerea*, evitando su crecimiento (Rosales, 2000). Estudios en otros cultivos han demostrado que, aplicado un día antes de cosecha en ciruelas cv. Angeleno, y nectarinas cv. Fairlane, reduce considerablemente la incidencia de *Botrytis cinerea*. Además se demostró que este fungicida posee una alta eficiencia en el control del moho gris, impidiendo completamente el desarrollo de lesiones en comparación con otros fungicidas (Araya, 2000).

2.4.2 *Trichoderma* spp.

Quizás la alternativa biológica de control de fitopatógenos más importante, sigue siendo la introducción de un antagonista en el ecosistema. Sin embargo es fundamental que las condiciones de humedad, temperatura y sustrato, sean convenientes para su crecimiento y multiplicación (Baker, 1991).

En condiciones estándares de crecimiento con temperaturas entre 20 y 25°C, las colonias de *Trichoderma* spp., se desarrollan rápidamente formando una masa blanca de micelio vegetativo (Jalil, 1997).

Trichoderma harzianum Rifai presenta antagonismo hacia varios tipos de hongos fitopatógenos, lo cual ha llevado a patentar algunas cepas con acción sobre *Pythium*, *Phytophthora*, *Fusarium* y *Botrytis* spp. El género *Trichoderma* spp., pertenece a la subdivisión

Deuteromycotina (Fungi imperfecti) y es el anamorfo del género *Hipocrea*. No tiene ciclo sexual conocido, y se reproduce asexualmente por conidiosporas (Jalil, 1997).

Los mecanismos propuestos para explicar la acción antagónica de *Trichoderma* spp., se han definido como: antibiosis, competencia, micoparasitismo y lisis (Ayers, 1981, citado en Papavizas, 1985; Cook y Bailey, 1983).

Trichoderma spp. al poseer la capacidad de competición, antibiosis y parasitismo como mecanismos de acción, ha despertado un gran interés como agente biocontrolador en superficies foliares, de patógenos aéreos (Blakeman *et al.*, 1982). En particular, investigaciones realizadas sobre la acción de *Trichoderma* spp. en el control de éste tipo de agentes han resultado positivas debido a la habilidad presentada por el antagonista de sobrevivir en el follaje (Lo *et al.*, 1997).

Se ha argumentado que el control ejercido por *Trichoderma* spp, sobre *Botrytis cinerea*, se debe a una interacción directa, entre los dos hongos o por cambios inducidos en el ambiente por *Trichoderma*. De Meyer, *et al.* (1998), han proporcionado argumentos que permiten sostener que *Trichoderma harzianum* genera una respuesta sistémica de resistencia en la planta, frente al patógeno, lo que fue estudiado en tomate, lechuga, porotos y tabaco. En estos ensayos se lograron reducciones de incidencia de pudrición gris que iban de un 25% en los peores tratamientos, hasta un 100% de inhibición en los mejores. En el caso de tabaco se observó que las aplicaciones de *Trichoderma harzianum* T39 al follaje, tuvieron los mismos resultados, en la disminución de la incidencia de *Botrytis*, que aplicaciones al suelo.

En ensayos realizados sobre heridas de desbrote en tomate, se aplicaron formulados de *Trichoderma harzianum* y *Verticillium lecanii*, previa inoculación con *Botrytis cinerea*, bajo condiciones de alta presión de la enfermedad. Se observó una fuerte reducción del ataque del patógeno, logrando también disminuir el ataque de mosquita blanca. Los efectos no fueron aditivos, lo que pudo deberse a interferencia de los organismos o bien porque los dos estaban perdiendo el mismo grupo de infección remanente que se investigaba (Brownold, *et al.*, 1998).

Con aplicaciones de *Trichoderma virens* sobre lechuga solo o en combinación con otros fungicidas para el control de *Botrytis cinerea*, se logró un mayor número de plantas sanas que

con fungicidas aplicados solos. Resultados similares se obtuvieron en ensayos realizados en tomate y brócoli.

Cepas de *Trichoderma parceanamosum* en combinación con *Trichoderma virens*, y *Trichoderma harzianum* fueron evaluadas en frutilla, *in vivo* en el control de moho gris. Los resultados obtenidos en los frutos no presentaron diferencias estadísticas significativas con el testigo (Ponce, 2002).

Se han realizado investigaciones con las cepas *Trichoderma virens* y *Trichoderma harzianum*, para medir el efecto que tienen sobre el crecimiento de plantas y su acción sobre *Phytophthora capsici* en pimiento. Se observó que las cepas de *Trichoderma* mejoran la germinación de las plantas, ejercen control sobre *Phytophthora capsici in vitro* y el crecimiento de plantas de pimiento es mayor si se compara con el tratamiento testigo (Cruz *et al.*, 1998).

3.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del experimento

El experimento se realizó en el invernadero de Floricultura, ubicado en el sector sur-oriental del Campus Lircay de la Universidad de Talca. El periodo de pruebas y evaluaciones se desarrolló entre diciembre de 2003 y febrero de 2004.

3.2 Material vegetal

Se utilizaron plantas del híbrido *Leucadendron* 'Safari Sunset'; cuyas estacas fueron recolectadas en el mes de marzo de 2003, en la localidad de Putú, ubicada a 25 Km de Constitución, Provincia de Talca. El enraizamiento de las estacas en camas calientes se realizó a una temperatura promedio de 23°C, iniciándose el 19 de marzo de 2003, efectuándose el trasplante el 26 de mayo del mismo año. Las plantas se llevaron a bolsas de polietileno de 395 cm³ de capacidad. Las estacas a la fecha del trasplante presentaban en promedio dos brotes y una altura de 9 cm aproximadamente.

3.3 Obtención e identificación de *Botrytis cinerea*

Las muestras afectadas por *Botrytis cinerea*, se obtuvieron desde hojas de plantas de *Protea* cv. 'Cardinal', que presentaban síntomas característicos del ataque de este patógeno. La recolección se efectuó el 30 de abril de 2003, en Putú, VII Región. A partir de estas muestras se aisló el hongo en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA).

Con el fin de comprobar la identidad del patógeno se realizaron observaciones al microscopio, de la morfología del micelio y de las esporas desarrolladas (conidias) en las

colonias obtenidas. Para lo anterior, se colocó sobre un portaobjeto parte del micelio, el que fue suspendido en agua destilada, situando un cubreobjeto sobre la muestra preparada, para posteriormente ser observada al microscopio óptico. Al comprobar que la morfología observada correspondía a *Botrytis cinerea*, se procedió a la obtención de cultivos puros. El patógeno fue repicado y multiplicado en placas Petri, en medio de cultivo PDA.

3.4 Pruebas de patogenicidad

Para comprobar tanto que el hongo aislado en cultivo puro se encontraba en estado patogénico como la susceptibilidad del huésped al patógeno, se realizaron pruebas de patogenicidad, inoculando 10 plantas de *Leucadendron* 'Safari Sunset'.

El inóculo del patógeno se obtuvo desde una placa Petri, sacando con un asa trozos de micelio e incorporándolos a un matraz con agua destilada estéril. Este se agitó por un periodo de tiempo, que permitió lograr el desprendimiento de las esporas del hongo. Se agregó Tween 20 (0,1%) al matraz para separar las conidias y poder efectuar el recuento de éstas. La concentración de esporas de la suspensión se estimó usando una cámara de Neubauer, para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Partículas}/\mu\text{l} = \frac{\text{Partículas contadas}}{\text{Profundidad cámara de dilución} * \text{dilución} * \text{superficie contada}}$$

Donde:

Profundidad de cámara = 0,100 mm

Dilución = 1

Superficie contada = 0,0025 mm²

Partículas / μl = conidias por microlitros (c / μl)

Posteriormente se aplicó, con un asperjador manual, 10 ml por planta del inóculo, ajustado a una concentración de 10^6 conidias ml^{-1} , sobre las hojas a evaluar. Las plantas se cubrieron individualmente con bolsas de polietileno transparente, a las que se les realizaron agujeros para facilitar el intercambio gaseoso y mantener niveles de humedad elevados. Las plantas inoculadas se mantuvieron en el invernadero a temperatura ambiente y el desarrollo de síntomas se observó una vez a la semana.

3.5 Evaluación en preinfección del biocontrolador *Trichoderma* spp. y del producto Tebuconazole en el control de *Botrytis cinerea*

Las cepas nativas *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens* y *Trichoderma parceanamosum*, fueron facilitadas por el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Talca.

La aplicación de los tratamientos con los biocontroladores se efectuó 15 días antes de la inoculación con *Botrytis cinerea*, para permitir un establecimiento adecuado de este hongo en el follaje de las plantas de este hongo. Se asperjaron 50 ml en cada planta con una concentración de conidias en todos los tratamientos de 10^9 conidias ml^{-1} . La aplicación se hizo sobre el follaje de las plantas.

El tratamiento con el fungicida Tebuconazole se realizó 8 días previos a la inoculación con *Botrytis cinerea*. Se asperjaron 50 ml por planta al igual que en la aplicación con los biocontroladores del género *Trichoderma* spp. Se utilizó una suspensión del producto de 2cc L^{-1} . Los tratamientos a evaluar en el ensayo se presentan en cuadro 3.1

Cuadro 3.1 Tratamientos a evaluar en el control preventivo de *Botrytis cinerea* en *Leucadendron* ‘Safari Sunset’

Tratamientos	Dosis	Momento de aplicación (días previos a inoculación con <i>Botrytis cinerea</i>)
<i>Trichoderma parceanamosum</i>	10 ⁹ conidias ml ⁻¹	15
<i>Trichoderma virens</i>	10 ⁹ conidias ml ⁻¹	15
<i>Trichoderma harzianum</i>	10 ⁹ conidias ml ⁻¹	15
Mezcla de tres cepas de <i>Trichoderma</i>	10 ⁹ conidias ml ⁻¹	15
Tebuconazole (Horizon 25% WP)	2cc L ⁻¹	8
Testigo	-	-

3.6 Inoculación de plantas con *Botrytis cinerea*

La inoculación se realizó el 29 de diciembre de 2003. El inóculo fue preparado poniendo micelio de los aislados que resultaron patogénicos según lo descrito en el punto 3.4, sembrando éstos en trozos de durazno en conserva. Una vez esporulado el hongo, las conidias fueron recolectadas usando un asa, incorporándolas a un matraz con agua destilada estéril. La concentración de esporas de la suspensión fue estimada del modo ya descrito. Cada planta de *Leucadendron* ‘Safari Sunset’ del ensayo, fue inoculada con 10 ml de esta suspensión, a una concentración de 10⁶ conidias ml⁻¹. Se utilizó un aspersor manual para inocular el follaje de la planta. Para asegurar la infección de las plantas se realizó una segunda inoculación el día 5 de enero de 2004.

3.7 Medición de la incidencia y severidad de la enfermedad

Posterior a la inoculación se realizaron evaluaciones cada siete días, durante un mes, en las que se midió la incidencia y severidad de *Botrytis cinerea* en las plantas inoculadas.

Para calcular la incidencia se utilizó la fórmula empleada por Ogawa (1986), expresándola en porcentaje.

$$\text{Incidencia (I)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de Individuos afectados por repetición}}{\text{Total de individuos afectados y no afectados}} * 100$$

Por otra parte, para medir la severidad de la enfermedad se empleó una escala numérica:

- 0 = No se observa tejido enfermo
- 1 = 1% a 25% de las hojas enfermas
- 2 = 26% a 50% de las hojas enfermas
- 3 = 51% a 75% de las hojas enfermas
- 4 = 76% a 100% de las hojas enfermas

3.8 Diseño experimental

El ensayo realizado evaluó la capacidad controladora de las distintas cepas de *Trichoderma* y Tebuconazole sobre *Botrytis cinerea*. Los seis tratamientos estudiados se ordenaron en un diseño experimental completamente al azar (DCA), con cuatro repeticiones. La unidad experimental estuvo constituida por diez plantas de *Leucadendron* 'Safari Sunset'.

Los datos obtenidos para incidencia, fueron sometidos a un Análisis de Varianza, previa transformación de los datos en porcentaje a valores angulares, de modo de homogenizar las varianzas. Cuando existieron diferencias significativas se utilizó el Test de separación de

medias Duncan, con un nivel de significancia de un 95%. Para este efecto se utilizó el Software Statgraphics Plus 4.01.

En el caso de severidad, cada grado fue sometido a un análisis de varianza por separado comparando los porcentajes de plantas con los distintos niveles. Para aquellos casos en que se observó significancia, se utilizó el test Duncan ($p \leq 0.05$), para realizar la separación de medias.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Efecto de aplicaciones de *Trichoderma* spp. y un fungicida tradicional en el control preventivo de la enfermedad *Botrytis cinerea* en *Leucadendron* 'Safari Sunset'

4.1.1 Análisis de la incidencia de *Botrytis cinerea* en *Leucadendron* 'Safari Sunset'

La incidencia de *Botrytis cinerea* en *Leucadendron* 'Safari Sunset' fue medida en cuatro fechas distintas, la primera el 11 de enero (Figura 4.1), la segunda el 18 de enero (Figura 4.2), la tercera el 25 enero (Figura 4.3) y la última, el 1 de febrero (Figura 4.4).

Durante la primera evaluación (Figura 4.1), el tratamiento testigo presentó un 20% de incidencia de *Botrytis cinerea*. Por otra parte, las plantas con aplicación de *Trichoderma parceanamosum* y una mezcla de las tres cepas de *Trichoderma* presentaron un 7,5% y un 5% de incidencia del hongo.

En los demás tratamientos no se detectaron plantas con síntomas de *Botrytis cinerea*. Sin embargo, a pesar de estas diferencias para esta fecha de evaluación las distintas alternativas de control evaluados no difirieron estadísticamente entre ellos, ni con el testigo.

En la evaluación realizada el 18 de enero de 2004 (Figura 4.2), el tratamiento testigo alcanzó un 25% de incidencia de la enfermedad, no siendo este valor distinto estadísticamente nuevamente de las observaciones en las plantas sometidas a los distintos tratamientos de control preventivo.

En la tercera medición realizada el 25 de enero de 2004 (Figura 4.3), el tratamiento testigo y el correspondiente a aplicaciones de *Trichoderma harzianum* alcanzaron un 82,5% de

incidencia de la enfermedad. Ambos fueron estadísticamente similares a todos los demás tratamientos a excepción del correspondiente a aplicaciones de *Trichoderma parceanamosum*.

La última evaluación efectuada el 1 de febrero de 2004 (Figura 4.4), muestra un 100% de incidencia de la enfermedad para el tratamiento testigo, y los correspondientes a aplicaciones de *Trichoderma harzianum*, mezcla de las cepas de *Trichoderma* y el fungicida. Estos valores no difieren estadísticamente de los valores de incidencia observados en las plantas tratadas con *Trichoderma virens*, pero sí lo hicieron aquellas plantas tratadas con *Trichoderma parceanamosum*.

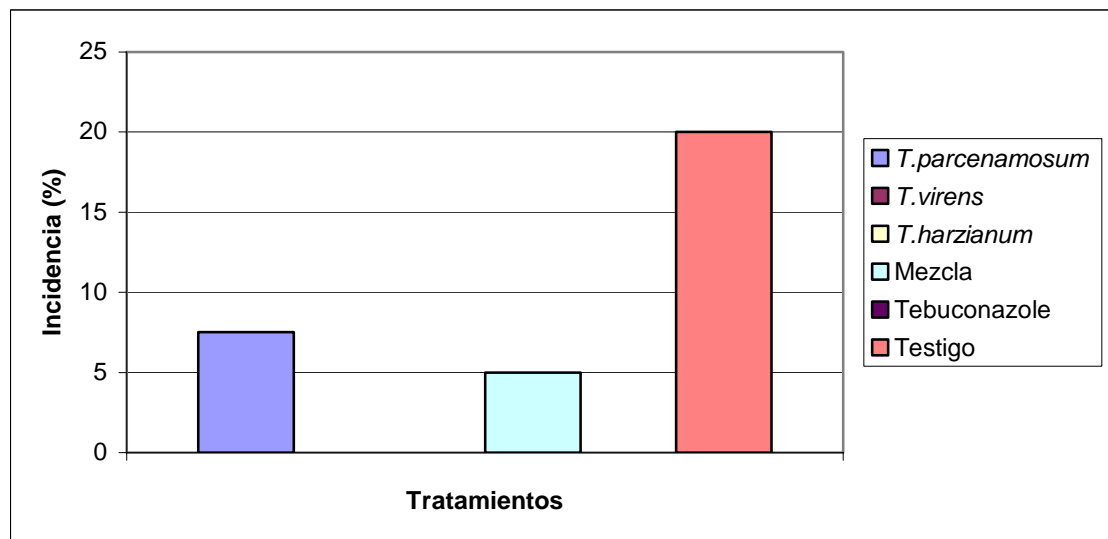


Figura 4.1 Incidencia de *Botrytis cinerea* en plantas de *Leucadendron* 'Safari Sunset' tratadas preventivamente con *Trichoderma* y un fungicida tradicional. Primera fecha de evaluación correspondiente a siete días post inoculación con el patógeno.

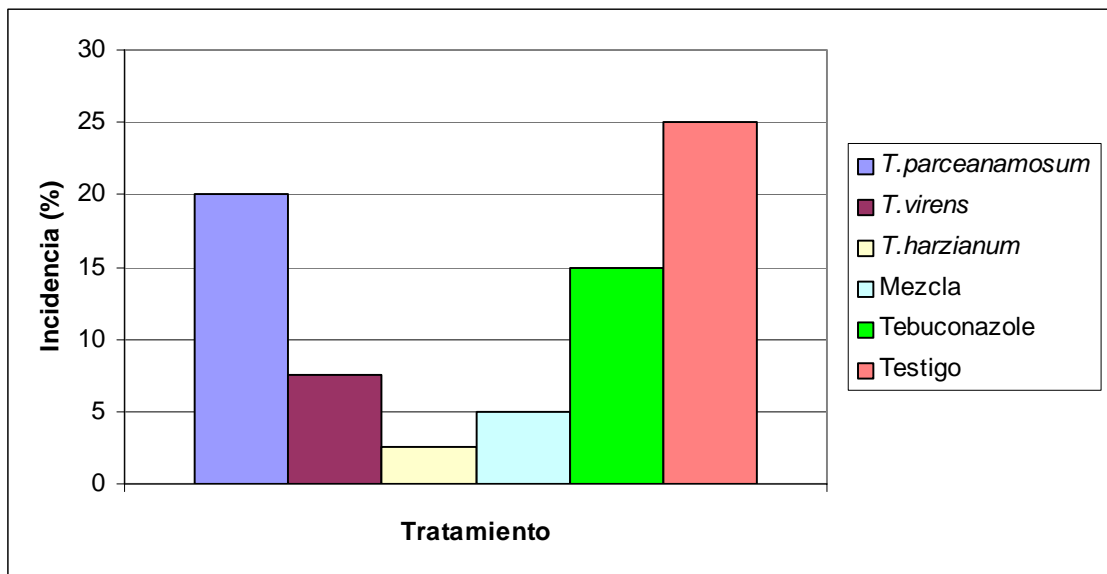


Figura 4.2 Incidencia de *Botrytis cinerea* en plantas de *Leucadendron* 'Safari Sunset' tratadas preventivamente con *Trichoderma* y un fungicida tradicional. Segunda fecha de evaluación correspondiente a 14 días post inoculación con el patógeno.

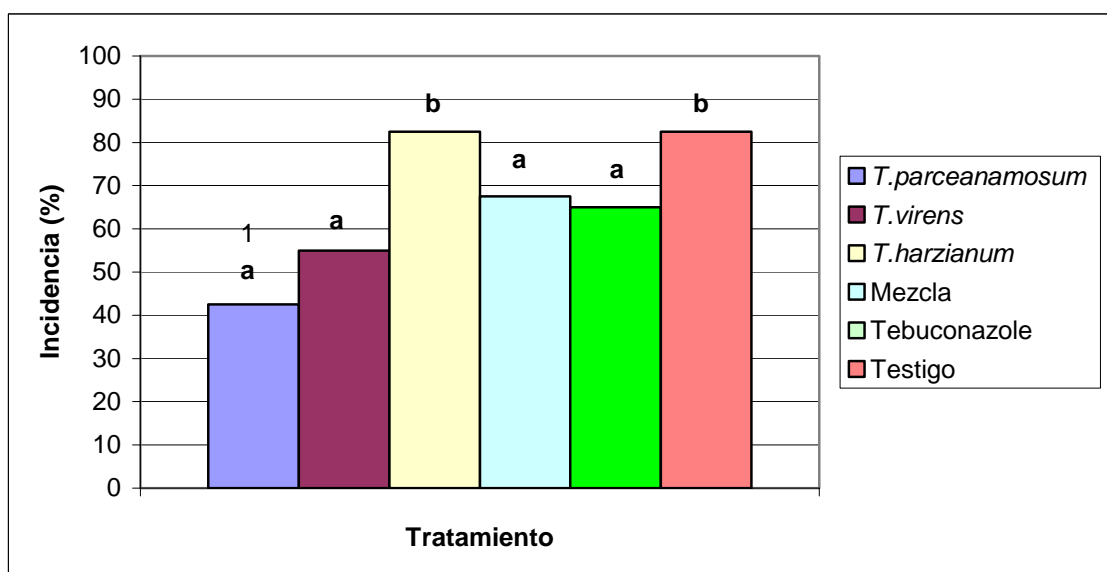


Figura 4.3 Incidencia de *Botrytis cinerea* en plantas de *Leucadendron* 'Safari Sunset' tratadas preventivamente con *Trichoderma* y un fungicida tradicional. Tercera fecha de evaluación correspondiente a 21 días post inoculación con el patógeno

¹ Letras distintas en la columna, indican que existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, según el test de Duncan ($p < 0.05$)

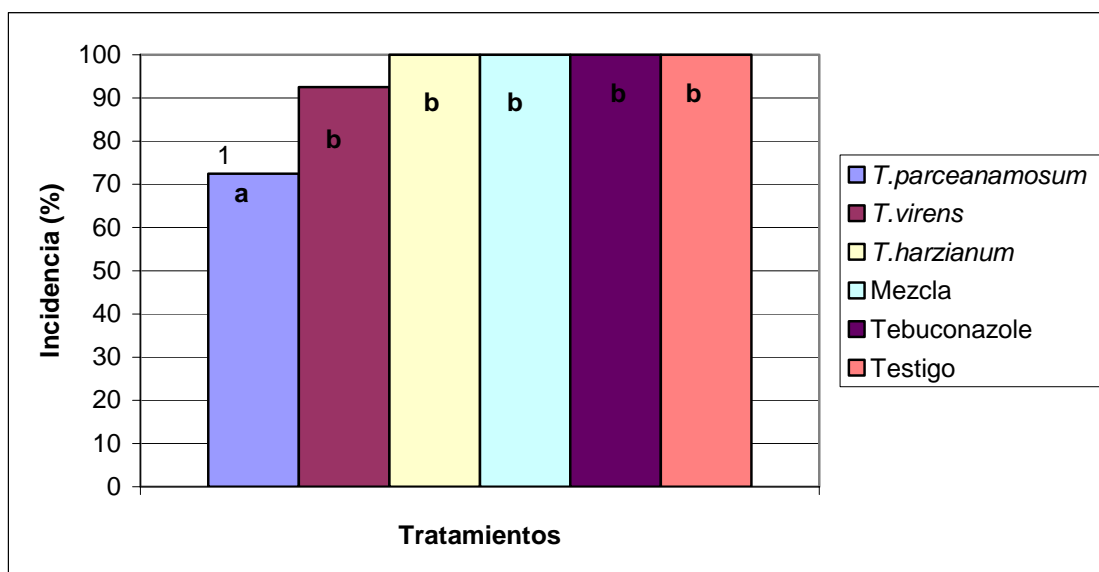


Figura 4.4 Incidencia de *Botrytis cinerea* en plantas de *Leucadendron* 'Safari Sunset' tratadas preventivamente con *Trichoderma* y un fungicida tradicional. Cuarta fecha de evaluación correspondiente a 28 días post inoculación con el patógeno

¹ Letras distintas en la columna, indican que existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, según el test de Duncan ($p < 0.05$)

Si se comparan las distintas fechas de evaluación se observa claramente que en las dos primeras no se observaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos para el porcentaje de incidencia de *Botrytis cinerea*, a pesar de que los valores para este parámetro siempre fueron mayores en el testigo, sin aplicación. Es probable que el número de repeticiones no hayan sido suficientes como para poder detectar diferencias entre tratamientos.

Por otra parte en la tercera evaluación, sí hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, y la incidencia de *Botrytis cinerea* aumentó considerablemente (figura 4.3). En esta evaluación, la menor incidencia la presentaron plantas tratadas con *Trichoderma parceanamosum* (42.5%), valor que fue estadísticamente distinto al resto. De acuerdo a esto podría pensarse que en las mediciones previas no se lograron diferencias entre los

tratamientos, producto de que los síntomas de la enfermedad aún no se habían hecho evidentes.

Como ya se señaló, los demás tratamientos no difirieron estadísticamente entre ellos ni con el testigo. Los altos valores de incidencia observados, incluso en el mejor tratamiento dejan en evidencia la gran presión de inóculo de *Botrytis cinerea*, lo que habría limitado la acción antagónica de *Trichoderma*.

En la cuarta evaluación (Figura 4.4) casi la totalidad de las plantas en los distintos tratamientos mostraron síntomas de la enfermedad. Sin embargo nuevamente, se encontraron diferencias significativas para incidencia entre los tratamientos, donde las aplicaciones de *Trichoderma parceanamosum* resultaron más efectivas en el control preventivo de la incidencia de *Botrytis cinerea*. Nuevamente, al igual que en la evaluación anterior la alta presión de inóculo del patógeno limitó la acción de control preventivo de los distintos tratamientos.

Es probable que bajo condiciones menos predisponentes al desarrollo de la enfermedad y con concentraciones de inóculo más bajas algunos otros tratamientos también habrían resultado efectivos. Se debe tener en cuenta que normalmente bajo condiciones de campo la presión de infección que debe ejercer el hongo es menor.

4.1.2 Análisis de la severidad de *Botrytis cinerea* en *Leucadendron* 'Safari Sunset'

Al igual que para el parámetro anterior, la severidad de *Botrytis cinerea* en los distintos tratamientos fue evaluada en cuatro fechas distintas. En términos generales, en un comienzo los síntomas de la enfermedad se presentaron sólo en el ápice de la hoja, mientras que en las evaluaciones finales el hongo se encontró invadiendo todo el tejido aéreo de la planta, observándose un alto número de individuos muertos.

Durante la primera evaluación (Figura 4.5), la mayoría de las plantas de los distintos tratamientos presentaron un grado de severidad equivalente a 0. Sin embargo un 20% de las plantas del tratamiento testigo presentaron grado 1. A pesar de estas diferencias, los tratamientos evaluados, incluyendo las plantas sin ningún tipo de aplicación, no difirieron estadísticamente para éste parámetro.

En la segunda evaluación se observa nuevamente lo mismo, no difiriendo para ningún grado de severidad las distintas alternativas de control evaluadas respecto al testigo.

En la tercera evaluación (Figura 4.7) se observa un aumento en los porcentajes de plantas con grados de severidad de la enfermedad mayores. Para esta fecha se observan diferencias estadísticas entre tratamientos, para el grado 0 (plantas sanas) donde aplicaciones de *Trichoderma parceanamosum* permitieron aumentar significativamente el porcentaje de individuos sin síntoma de la enfermedad. Este tratamiento difirió estadísticamente del testigo sin aplicación y de *Trichoderma harzianum*.

En la última evaluación (Figura 4.8), se observa claramente un aumento en todos los tratamientos del número de plantas afectadas por *Botrytis cinerea* con grado de severidad 1. Sólo en plantas con aplicación de *Trichoderma parceanamosum* o *Trichoderma virens* fue posible observar individuos sanos (grado de severidad 0), si bien sólo el primero difirió estadísticamente de los demás para este nivel de severidad. Plantas con grado de severidad 3 se presentaron en los tratamientos con *Trichoderma virens*, *Trichoderma parceanamosum* y el testigo sin aplicación. Finalmente algunas de las plantas tratadas con *Trichoderma virens*, mezcla de tres cepas del biocontrolador y el testigo alcanzaron el mayor nivel de severidad (grado 4).

Si se analiza en particular cada fecha de evaluación para el grado 0, hubo diferencias estadísticas significativas en la tercera y cuarta medición (Figura 4.7 y 4.8). A su vez, en la cuarta evaluación (Figura 4.8), las distintas alternativas de control preventivo evaluadas

difirieron estadísticamente para el grado de severidad 1. En las fechas anteriores de evaluación, si bien los porcentajes de plantas con diferentes grados de severidad resultaron distintos para los distintos tratamientos, éstos no difirieron estadísticamente.

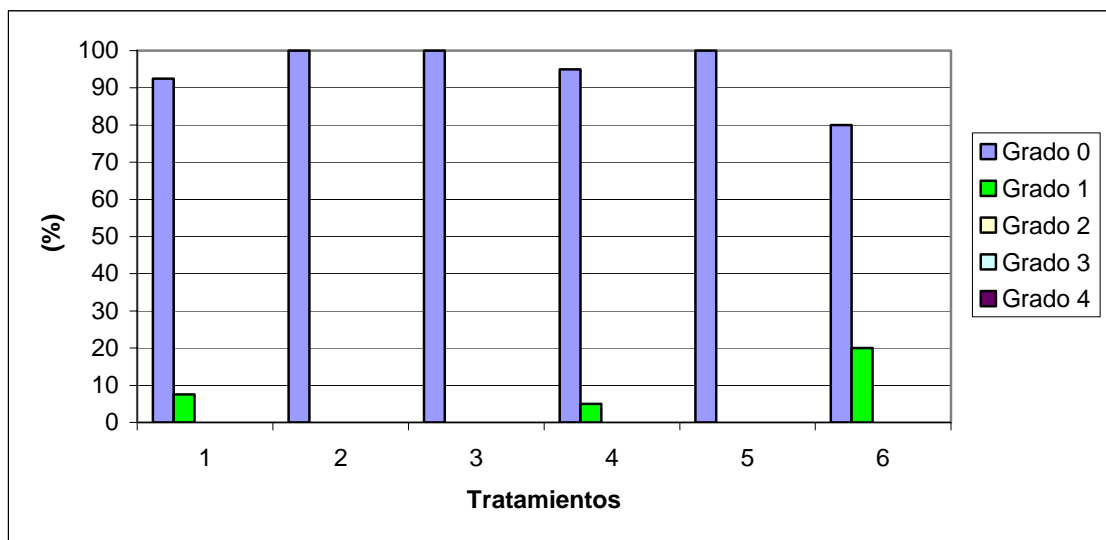


Figura 4.5 Porcentajes de plantas de *Leucadendron* 'Safari Sunset', con distintos grados de severidad tratadas preventivamente con *Trichoderma* y un fungicida tradicional. Primera fecha de evaluación correspondiente a siete días post inoculación con el patógeno. Tratamientos: 1= *T. parceanamosum*, 2= *T. virens*, 3= *T. harzianum*, 4= mezcla *Trichoderma*, 5= Tebuconazole y 6= Testigo

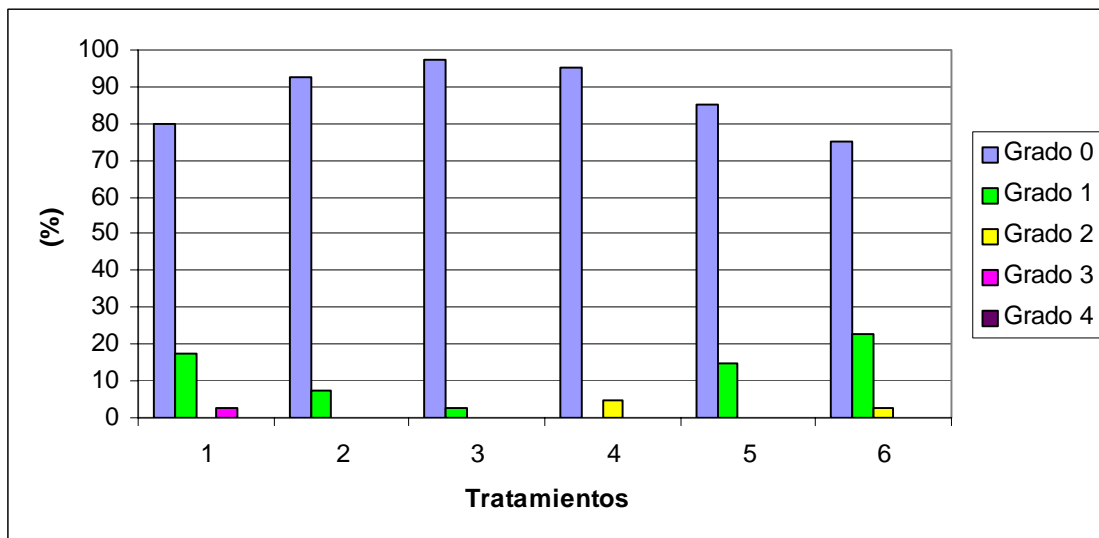


Figura 4.6 Porcentajes de plantas de *Leucadendron* 'Safari Sunset', con distintos grados de severidad tratadas preventivamente con *Trichoderma* y un fungicida tradicional. Segunda fecha de evaluación correspondiente a 14 días post inoculación con el patógeno. Tratamientos: 1= *T. parceanamosum*, 2= *T. virens*, 3= *T. harzianum*, 4= mezcla *Trichoderma*, 5= Tebuconazole y 6= Testigo

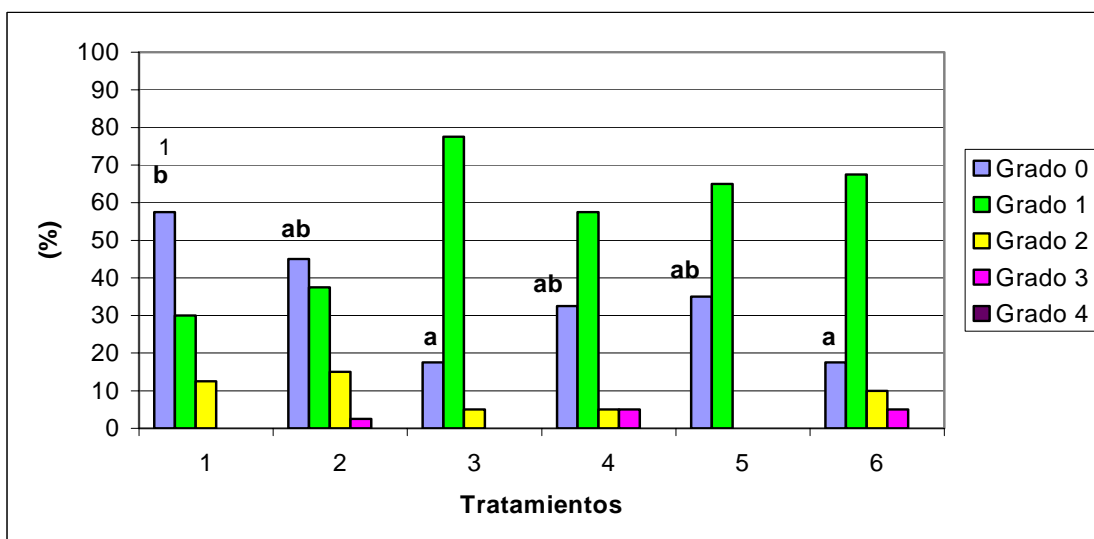


Figura 4.7 Porcentajes de plantas de *Leucadendron* 'Safari Sunset', con distintos grados de severidad tratadas preventivamente con *Trichoderma* y un fungicida tradicional. Tercera fecha de evaluación correspondiente a 21 días post inoculación con el patógeno. Tratamientos: 1= *T. parceanamosum*, 2= *T. virens*, 3= *T. harzianum*, 4= mezcla *Trichoderma*, 5= Tebuconazole y 6= Testigo

¹ Letras distintas en la columna, indican que existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, según el test de Duncan ($p < 0.05$).

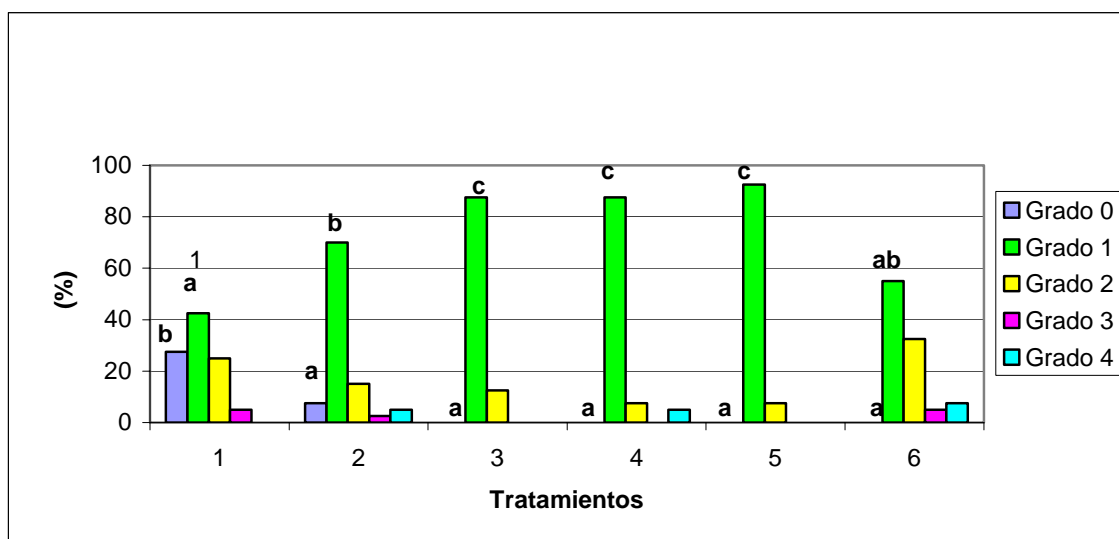


Figura 4.8 Porcentajes de plantas de *Leucadendron* 'Safari Sunset', con distintos grados de severidad tratadas preventivamente con *Trichoderma* y un fungicida tradicional. Cuarta fecha de evaluación correspondiente a 28 días post inoculación con el patógeno. Tratamientos: 1= *T. parceanamosum*, 2= *T. virens*, 3= *T. harzianum*, 4= mezcla *Trichoderma*, 5= Tebuconazole y 6= Testigo

¹ Letras distintas en la columna, indican que existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, según el test de Duncan ($p < 0.05$)

Lo anterior podría explicarse por un escaso desarrollo de síntomas de *Botrytis*, al momento de ambas mediciones. En la primera y segunda evaluación (Figuras 4.5 y 4.6) todos los tratamientos, incluido el testigo sin aplicación, presentaron un alto porcentaje de plantas sanas (grado 0 de severidad). Sólo el tratamiento testigo y los con aplicaciones de *Trichoderma parceanamosum* y mezcla de *Trichoderma* presentaron individuos con grado de severidad 1 en la evaluación inicial.

Durante la tercera evaluación (Figura 4.7) como ya se ha señalado, se observaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos para el grado 0 de severidad de la enfermedad. Así, se observó un 57,5% de plantas sanas en el tratamiento de *Trichoderma parceanamosum*, diferenciándose del testigo. De acuerdo a lo anterior esta última cepa presentaría una mayor eficiencia en la competencia con *Botrytis cinerea*. Los tratamientos con aplicación de *Trichoderma virens*, mezcla de tres cepas del biocontrolador *Trichoderma* y el

fungicida Tebuconazole no difirieron estadísticamente entre ellos, ni con el testigo, ni con *Trichoderma parceanamosum* para este grado de severidad. Durante esta evaluación la mayoría de las plantas en todos los tratamientos presentaron grado de severidad 0 y 1, lo que indica que *Botrytis cinerea* se encuentra invadiendo a cada planta afectada en un porcentaje inferior al 25%.

En la evaluación final (Figura 4.8) se observaron diferencias estadísticas significativas tanto para el grado 0 y 1 de severidad. El tratamiento con *Trichoderma parceanamosum* presentó un 27,5% de plantas sin síntomas de la enfermedad, valores estadísticamente distintos al del resto de los tratamientos.

5. CONCLUSIONES

El tratamiento con *Trichoderma parceanamosum* presentó estadísticamente una menor incidencia de *Botrytis cinerea* respecto al tratamiento testigo durante la tercera y cuarta evaluación.

Las evaluaciones realizadas indican que durante la tercera y cuarta evaluación se presentaron las mayores diferencias entre los tratamientos en cuanto a grado de severidad de la enfermedad. En la tercera evaluación el tratamiento de *Trichoderma parceanamosum* mostró un mayor porcentaje de individuos sin síntomas de la enfermedad, respecto al testigo. Durante la cuarta evaluación plantas tratadas tanto con *Trichoderma virens* como con *Trichoderma parceanamosum* presentaron plantas sin síntomas de la enfermedad.

Trichoderma parceanamosum resultó mas eficaz en el control preventivo de *Botrytis cinerea*, presentando en las últimas evaluaciones el mayor porcentaje de plantas sin evidenciar la presencia de la enfermedad.

5. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- **Agrios, G. 1988.** Plant pathology. University of Florida, Gainesville. USA. 735p.
- **Agrios, G. 1996.** Fitopatología. 3° edición, 838 p.
- **Aguilera, M. 2001.** Diversificación florícola en la oferta nacional, disponible en: http://www.sitec.cl/boletines/flores/panorama_floricola_n6.doc. Consultado 23 agosto 2003.
- **Arapeq, C. 1996.** Propiedades y características de tebuconazole. Disponible en <http://www.aragro.com//.htm>. Consultado 21 noviembre 2003.
- **Araya, G. 2000.** Estrategias de control de pudriciones de postcosecha en carozo y pomáceas (Tebuconazol, Pangermex, Spore Tech]. Tesis de grado Universidad de las Américas. Fac. de Ciencias Agropecuarias, Santiago, Chile, 2000, 101 p.
- **Auger, J. 1988.** Sobrevivencia invernal de *Botrytis cinerea* y su importancia para las estrategias de control. Boletín Agrícola Shell (Set-Dic 1981) v. 41(3) p. 1-2.
- **Bailey, D.J, Lumsden, R.D.** 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. In: Harman, G.E y Kubicek, C.P, (eds.). *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial applications. London: Taylor & F
- **Baker, R. 1991.a** Diversity in biological control. Crop Protection 10: 85–94. rancis, 185–204.
- **Baker, R. 1991.b** Diversity in biological control. Rancis 11: 185–204.
- **Bethencourt, L.M. 2001.** Preliminary study of fungi on aerial parts of *Protea* grown in Tenerife (Canary Island) Acta Horticulturae 545:275-279.
- **Blakeman, JP y Fokkema, N.J. 1982.** Potential for biological control of plant diseases on phylloplane. Ann. Rev. Phytopathol. 20:167-92.
- **Blata, R. 2001.** *Botryotinia fuckeliana*. Disponible en <http://www.terralia.com//htm>. Consultado 21 noviembre 2003.
- **Cook, R. y Baker, K. 1983.** The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS Press St Paul. Minnesota. 539p.
- **Cruz, M. y Cisternas, V. 1998.** Control integrado de *Phytophthora capsici* en pimiento. Efecto de hongos antagonistas sobre el crecimiento de las plantas. Agricultura Técnica (Abr-Jun 1998) v. 58(2) p. 81-92.

- **Duff, K, Jackson, L y Ódonnell, W. 1994.** Residuos y aspectos analíticos del Tebuconazole. Disponible en [http:// www.parijatagrochemicals.com/Tebuconazole.htm](http://www.parijatagrochemicals.com/Tebuconazole.htm) . Consultado 18 abril 2004.
- **Figueroa, D. 1996.** Evaluación y respuesta de dos especies de *Proteas* (*Leucadendron* “Safari Sunset” y *Leucadendron thymifolium*) a las condiciones de campo, en tres mezclas de sustratos y bajo parámetros de fertilización. Taller de licenciatura. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 64 p.
- **Harre, J. 1988.** *Proteas: The propagation and production of Proteaceae.* Edition Fisher Printing & Stationery. P 100-101.
- **Jalil, G. 1997.** Evaluación de *Trichoderma harzianum* y Pirimetanil en el control de *Botrytis cinerea* en tomate (*Lycopersicon esculentum*) Tesis de grado. Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.
- **Latorre, B. 1985.** Moho negro del corazón de la manzana. *Revista Frutícola* (4)1:23-24
- **Latorre, B. 1989.** Fungicidas inhibidores de la síntesis de esteroides. En: *Fungicidas y Nematicidas. Avances y aplicabilidad.* Facultad de Agronomía. Pontificia Universidad Católica, Santiago, Chile. P:42-48.
- **Latorre, B. 1995.** *Enfermedades de las plantas cultivadas.* Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. P:230,487,562.
- **Lo, C; Nelson, E y Harman, G. 1997.** Improved biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* 1295-22 for foliar phases of turf diseases by use of spray applications. *Plant Dis.* 81:1132-1138.
- **Lolas, M. 2001.** Hongos fitopatógenos, Dikariomycota: Acomycotina (Eumycota) y Anamorfos, laboratorio n° 6. Fitopatología general. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca.
- **Lubbe, K. 2001.** Plant protection for Fynbos crops: diseases management. En :ARC-Fynbos, Unit. Fynbos Cultivation Course. LNR ARC, Elsenburg, South Africa (8)1-34
- **Malan, D. 1992.** Propagation of *Proteaceae.* *Acta Horticulturae* 316. P 27-34.
- **McLennan, R. 1993.** *Growing Proteas.* Eds. Kangaroo Press Pty Ltda. Australia. 68 p.

- Montealegre, J. 1987.** Pudrición de la cavidad calicinal en peras. Revista Frutícola (May-Ago 1987) v. 8(2) p. 57-58.
- Muñoz, G. 2002.** Chile nuestra flora útil. Colección en Agricultura Facultad de Agronomía en Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile, 267p.
- Morales, A. 1985.** *Botrytis cinerea* Pers.: una enfermedad para prevenir. Prevención versus control curativo. Aconex (Ene-Feb 1985) (no. 35) p. 21-25.
- Moura, M.F. 2001.** Fungal diseases on Proteas identified in Madeira Island. Acta horticulturae 545:265-273.
- Pinilla, B. y Alvarez, M. 1994.** *Botrytis cinerea* en frutas. INIA. Estación experimental La Platina, p11-13.
- Ponce, I. 2002.** Evaluación in vitro e in vivo de la capacidad biocontroladora de tres cepas nativas de *Trichoderma* spp. contra *Botrytis cinerea* en frutilla. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca. 39 p.
- Rodríguez, M. 2002.** Exportación y cultivo de follaje o Greens. Disponible en: <http://www.todochileinversiones.cl/araucanía/floricultura.htm>. Consultado 30 agosto 2003.
- Salinger, P. 1991.** Producción comercial de flores. 3ª edición. Zaragoza, Acribia. 316 p.
- Taylor, J.E 2000.** Proteaceae pathogens: Distribution in relation to recent changes in phytosanitary regulation. Acta Horticulturae 545:253-264.
- Von Broembsen, S 1989.** Diseases of cut- flower proteas. Published by the International Protea Association. 43p.

6. ANEXO

Cuadro 6.1 Incidencia de *Botrytis cinerea* en plantas de *Leucadendron* 'Safari Sunset' tratadas preventivamente con *Trichoderma* y un fungicida tradicional. Primera fecha de evaluación correspondiente a siete días post inoculación con el patógeno.

Tratamientos	Incidencia (%)
<i>Trichoderma parceanamosum</i>	7,5
<i>Trichoderma virens</i>	0
<i>Trichoderma harzianum</i>	0
Mezcla de <i>Trichoderma</i>	5
Tebuconazole	0
Testigo	20

Cuadro 6.2 Incidencia de *Botrytis cinerea* en plantas de *Leucadendron* 'Safari Sunset' tratadas preventivamente con *Trichoderma* y un fungicida tradicional. Segunda fecha de evaluación correspondiente a 14 días post inoculación con el patógeno.

Tratamientos	Incidencia (%)
<i>Trichoderma parceanamosum</i>	20
<i>Trichoderma virens</i>	7,5
<i>Trichoderma harzianum</i>	2,5
Mezcla de <i>Trichoderma</i>	5
Tebuconazole	15
Testigo	25

Cuadro 6.3 Incidencia de *Botrytis cinerea* en plantas de *Leucadendron* 'Safari Sunset' tratadas preventivamente con *Trichoderma* y un fungicida tradicional. Tercera fecha de evaluación correspondiente a 21 días post inoculación con el patógeno.

Tratamientos	Incidencia (%)
<i>Trichoderma parceanamosum</i>	42,5
<i>Trichoderma virens</i>	55
<i>Trichoderma harzianum</i>	82.5
Mezcla de <i>Trichoderma</i>	67,5
Tebuconazole	65
Testigo	82,5

Cuadro 6.4 Incidencia de *Botrytis cinerea* en plantas de *Leucadendron* 'Safari Sunset' tratadas preventivamente con *Trichoderma* y un fungicida tradicional. Cuarta fecha de evaluación correspondiente a 28 días post inoculación con el patógeno.

Tratamientos	Incidencia (%)
<i>Trichoderma parceanamosum</i>	72,5
<i>Trichoderma virens</i>	92,5
<i>Trichoderma harzianum</i>	100
Mezcla de <i>Trichoderma</i>	100
Tebuconazole	100
Testigo	100

Cuadro 6.5 Porcentajes de plantas de *Leucadendron* 'Safari Sunset', con distintos grados de severidad tratadas preventivamente con *Trichoderma* y un fungicida tradicional. Primera fecha de evaluación correspondiente a siete días post inoculación con el patógeno.

Tratamientos	Severidad (%)				
	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
<i>Trichoderma parceanamosum</i>	92,5	7,5	0	0	0
<i>Trichoderma virens</i>	100	0	0	0	0
<i>Trichoderma harzianum</i>	100	0	0	0	0
Mezcla de <i>Trichoderma</i>	95	5	0	0	0
Tebuconazole	100	0	0	0	0
Testigo	80	20	0	0	0

Cuadro 6.6 Porcentajes de plantas de *Leucadendron* 'Safari Sunset', con distintos grados de severidad tratadas preventivamente con *Trichoderma* y un fungicida tradicional. Segunda fecha de evaluación correspondiente a 14 días post inoculación con el patógeno.

Tratamientos	Severidad (%)				
	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
<i>Trichoderma parceanamosum</i>	80	17,5	0	2,5	0
<i>Trichoderma virens</i>	92,5	7,5	0	0	0
<i>Trichoderma harzianum</i>	97,5	2,5	0	0	0
Mezcla de <i>Trichoderma</i>	95	0	5	0	0
Tebuconazole	85	15	0	0	0
Testigo	75	22,5	2,5	0	0

Cuadro 6.7 Porcentajes de plantas de *Leucadendron* 'Safari Sunset', con distintos grados de severidad tratadas preventivamente con *Trichoderma* y un fungicida tradicional. Tercera fecha de evaluación correspondiente a 21 días post inoculación con el patógeno.

Tratamientos	Severidad (%)				
	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
<i>Trichoderma parceanamosum</i>	57,5	30	12,5	0	0
<i>Trichoderma virens</i>	45	37,5	15	2,5	0
<i>Trichoderma harzianum</i>	17,5	77,5	5	0	0
Mezcla de <i>Trichoderma</i>	32,5	57,5	5	5	0
Tebuconazole	35	65	0	0	0
Testigo	17,5	67,5	10	5	0

Cuadro 6.8 Porcentajes de plantas de *Leucadendron* 'Safari Sunset', con distintos grados de severidad tratadas preventivamente con *Trichoderma* y un fungicida tradicional. Cuarta fecha de evaluación correspondiente a 28 días post inoculación con el patógeno.

Tratamientos	Severidad (%)				
	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
<i>Trichoderma parceanamosum</i>	27,5	42,5	25	5	0
<i>Trichoderma virens</i>	7,5	70	15	2,5	5
<i>Trichoderma harzianum</i>	0	87,5	12,5	0	0
Mezcla de <i>Trichoderma</i>	0	87,5	7,5	0	5
Tebuconazole	0	92,5	7,5	0	0
Testigo	0	55	32,5	5	7,5