



UNIVERSIDAD DE TALCA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA DE AGRONOMÍA

EFECTO DE APLICACIONES DE LOS BIOCONTROLADORES *Trichoderma*  
*spp.* y *Bacillus spp.* SOBRE LA INFECCIÓN DE *Cucumber Mosaic Virus* –  
CMV INOCULADO MECÁNICAMENTE EN MELÓN (*Cucumis melo*)

MEMORIA DE TÍTULO

ALEJANDRA VICTORIA LILLO REBOLLEDO

TALCA, 2006



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

**EFFECTO DE APLICACIONES DE LOS BIOCONTROLADORES *Trichoderma*  
spp. y *Bacillus* spp. SOBRE LA INFECCIÓN DE *Cucumber Mosaic Virus* –  
CMV INOCULADO MECÁNICAMENTE EN MELÓN (*Cucumis melo*)**

**Por**

**ALEJANDRA VICTORIA LILLO REBOLLEDO**

**MEMORIA DE TÍTULO**

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

**INGENIERO AGRÓNOMO**

**TALCA, 2006**

APROBACIÓN:

---

Profesor guía: Ing. Agr., Ph. D. Claudio Sandoval B.  
Profesor Escuela de Agronomía.  
Facultad de Ciencias Agrarias.  
Universidad de Talca.

---

Profesor informante: Ing. Agr., Ph. D. Mauricio Lolas C.  
Profesor Escuela de Agronomía.  
Facultad de Ciencias Agrarias.  
Universidad de Talca.

Fecha Defensa Memoria de Título: 20 de Octubre de 2006.

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

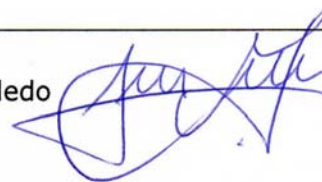
Yo, **Alejandra Victoria Lillo Rebolledo**, cédula de Identidad N° **14.018.291-5** autor de la memoria o tesis que se señala a continuación, autorizo a la Universidad de Talca para publicar en forma total o parcial, tanto en formato papel y/o electrónico, copias de mi trabajo.

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>Efecto de aplicaciones de los biocontroladores</b> <i>Trichoderma spp. y Bacillus spp. sobre la infección de</i> <i>Cucumber mosaic virus – CMV inoculado</i> <i>mecánicamente en melón (Cucumis melo)</i>
<b>Unidad Académica:</b>	<b>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</b> <b>Ingeniero Agrónomo</b>
<b>Nota de calificación</b>	<b>5.9</b>

**Firma de Alumno**  
Alejandra Lillo Rebolledo

**Rut:** 14.018.291-5



*Dedicada a Mima y Pipa...*

*Algunos son más lentos y otros más rápidos en el andar. Lo importante es perseverar en los ideales, ser paciente y esperar, pues no todo llega de inmediato. Esperar con paciencia, permite que los frutos maduren y así apreciar debidamente su dulzura.*

*Todo lo que esté en nuestro destino vendrá a nuestras manos en el momento oportuno...*

*Gracias Dios por darme la oportunidad de terminar felizmente esta etapa de mi vida, sólo a ti debo todo lo que hoy tengo y he logrado.*

*No existe apoyo más incondicional que el de una madre...*

*Gracias Mima por todo tu cariño, apoyo y fuerza durante estos años. Como olvidar cada vez que pensé que ya no podría avanzar, y sólo deseaba detenerme en este duro camino, pero tú me ayudaste y diste una mano para continuar. Tus cariños, besos y abrazos en esos momentos son el mayor privilegio que Dios nos puede dar a través de nuestras madres. Este título no es sólo mío,*

*ES DE LAS DOS... **Te quiero mucho.***

*Pipa, no alcanzaste a ver como tu hija cumplía uno de sus sueños. Pero hoy te agradezco por el tiempo que estuvimos juntos... Tus sabios consejos, hoy me sirven como herramienta para seguir en esta nueva etapa. Sé que donde estás me apoyas y envías fuerzas para seguir adelante sin ti, te agradezco todo lo que hiciste, y sigues haciendo por mí... Esto también te pertenece. **Te***

***quiero mucho.***

*Mayi, Sindy, Mimy, Chichi y Maca, gracias por iluminar mi vida con su alegría y cariño, cada una se ha robado un pedacito de mi corazón. A mis hermanas Ana y Myriam por su afecto y apoyo en los momentos difíciles.*

*Cómo olvidar a quienes permitieron que esta etapa fuera inolvidable, esas personitas llamadas amigas: Ely, Xime, Karen, Juany, Dany. Gracias por tu estar siempre ahí, en los momentos de alegría y tristeza. Como olvidar esos momentos que vivimos... ¡cómo borrar de la memoria cuando nos perdimos en...!, bueno, ustedes saben. Gracias por soportarme tantos años, eso es un gran mérito. A Marcia, pese a que el tiempo que llevamos de amistad es pequeño, gracias por tu preocupación y ánimo.*

*Profesor Claudio Sandoval, gracias por su paciencia y palabras de aliento en los momentos de incertidumbre, y por la confianza depositada para desarrollar esta memoria. Además agradecer al Profesor Mauricio Lolas por su disposición y tiempo.*

## RESUMEN

Durante la temporada 2005/2006 se realizó un ensayo destinado a determinar el efecto de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* sp. sobre la infección de *Cucumber mosaic virus*-CMV inoculado de manera mecánica en melón. El ensayo se realizó en un invernadero ubicado en el Campus Lircay de la Universidad de Talca, VII Región.

Este estudio estuvo compuesto por 3 tratamientos: aplicación de *Trichoderma* spp., y aplicación de *Bacillus* sp., ambos en pre-inoculación del virus, inoculación del virus sin biocontrolador, y testigo sin inoculación del virus ni biocontrolador.

La aplicación de las cepas de los biocontroladores se realizó tres veces: 19, 14 y 7 días antes de la inoculación del virus. A los 45 días posterior a ésta, se realizaron mediciones de altura y peso fresco de las plantas, y la presencia del virus se determinó a través de sintomatología visual y posteriormente a través de la prueba serológica DAS-ELISA.

Respecto a los resultados obtenidos, los tratamientos con antagonistas, presentaron porcentajes similares de incidencia, y menores en relación al testigo inoculado con virus sin biocontrolador. Parámetros de altura y peso de plantas, no presentaron diferencias estadísticas significativas. Los resultados de pruebas serológicas arrojaron diferencias estadísticas significativas, mostrando la sanidad de las semilla, y una eficiente inoculación del virus del mosaico del pepino. *Trichoderma* spp. y *Bacillus* sp. no redujeron la concentración de virus en las plantas de melón.

## ABSTRACT

During the season 2005/2006, an experiment was performed to determine the effect of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* sp on the infection of *Cucumber mosaic virus*-CMV inoculated mechanically in melon. This was located in a greenhouse at Campus Lircay, Universidad de Talca.

In the experiment, three treatments were tested: application of *Trichoderma* spp., and *Bacillus* sp., both before the inoculation of the virus, plants inoculated with the virus, but not treated with the biocontroller, and plants without inoculation both the biocontroller and the virus.

The applications of the antagonist microorganism were made at three times: 19, 14 and 7 days before inoculation of the virus. 45 days after the inoculation of the pathogen height and fresh weight of the plants were measured, and the virus presence was determined by visual symptoms and the serological test of DAS-ELISA.

Height and weight of plants, did not present significant statistical differences among treatments. The serological test, demonstrated that the inoculation was efficient and the absence of pathogen in the seed used in the experiment *Trichoderma* spp. and *Bacillus* sp. did not reduce the concentration of the virus in the melon plants.

Palabras clave: Control biológico, *Cucumber mosaic virus*

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	4
2.1. Antecedentes del cultivo del melón	4
2.2. Enfermedades que afectan el melón	5
2.3. Enfermedades causadas por virus	6
2.3.1. Virus del mosaico del pepino-CMV	8
a. Agente causal	8
b. Ciclo de la enfermedad	8
c. Especies hospederas	9
d. Epidemiología y transmisión	9
e. Sintomatología	10
f. Detección e identificación	10
g. Control	11
2.4. Biocontroladores <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus</i> spp.	12
2.4.1. <i>Trichoderma</i> spp.	12
2.4.2. <i>Bacillus</i> spp.	13
2.4.3. <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus</i> spp. como inductores de resistencia	14
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	16
3.1. Ubicación del ensayo	16
3.2. Material vegetal y producción de plantas	16
3.3. Aplicación de los biocontroladores	16
3.4. Fuente de inóculo de <i>Cucumber mosaic virus</i> -CMV	17
3.5. Preparación del inóculo del virus e inoculación	17

3.6. Diseño experimental	18
3.7. Evaluación	19
3.7.1. Determinación de incidencia y severidad del virus CMV sobre las plantas de melón	19
3.7.2. Determinación de la presencia del virus	20
3.7.3. Medición de altura de la planta y peso fresco	21
3.8. Análisis de resultados	21
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>22</b>
4.1. Presencia del virus del mosaico del pepino en las plantas	22
4.2. Evaluación de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus</i> spp. en el control preventivo del virus del mosaico del pepino, CMV	23
4.2.1. Severidad de la enfermedad	23
4.2.2. Incidencia de la enfermedad	24
4.3. Efectos del virus del mosaico del pepino (CMV) sobre el crecimiento vegetativo en las plantas de melón	25
4.3.1. Altura final de las plantas	25
4.3.2. Peso fresco de las plantas	27
4.4. Determinación de la presencia del virus CMV en los tratamientos a través de DAS-ELISA	28
4.5. Discusión	30
<b>V. CONCLUSIÓN</b>	<b>31</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>32</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 2.1.</b> Enfermedades del cultivo del melón ( <i>Cucumis melo</i> )	6
<b>Cuadro 3.1.</b> Tratamientos a evaluar en un ensayo de determinación del efecto de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus</i> spp. sobre la resistencia a CMV en melón.	18
<b>Cuadro 4.1.</b> Evaluación de la severidad del virus del mosaico del pepino, CMV, en plantas de melón tratadas con <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus</i> spp.	23
<b>Cuadro 4.2.</b> Efectos de Virus del mosaico del pepino (CMV) sobre la altura final en plantas de melón inoculadas con el virus.	26
<b>Cuadro 4.3.</b> Efecto del virus del mosaico del pepino (CMV) sobre la producción de materia fresca en plantas de melón inoculadas con el virus, y pre-inoculación de <i>Trichoderma</i> spp., y <i>Bacillus</i> spp.	27

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 4.1.** Evaluación de la incidencia del virus del mosaico del pepino, CMV, en plantas de melón tratadas con *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. 25
- Figura 4.2.** Valores de absorbancia obtenidos en la prueba serológica DAS-ELISA en hojas de plantas de melón inoculadas con Virus del mosaico del pepino, CMV, tratadas previamente con *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. 29

## I. INTRODUCCIÓN

En Chile, la producción de hortalizas tiene una amplia distribución geográfica, que totaliza unas 124.000 hectáreas, de las cuales un 53,9% se concentra entre las Regiones V y VI. Los cultivos hortícolas existentes incluyen un conjunto de variadas especies, entre ellos el melón, que constituye uno de los principales cultivos de temporada, con un total de 3.500 a 4.000 hectáreas aproximadamente, de las cuales cerca de un 90% se concentra entre la RM y VII Región (FIA, 2001).

Los cultivos están expuestos a una multitud de factores que pueden alterar su productividad. Patógenos como hongos, bacterias y virus constituyen el grupo principal de agentes causales de enfermedad en las plantas (Agrios, 1996).

De las enfermedades que afectan al cultivo del melón en Chile, las causadas por virus, pueden llegar a ser muy destructivas debido a la dificultad que presenta su control, pues una vez que la planta es afectada, no existe medio de lucha curativo para este tipo de patología.

El virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus-CMV*) se desarrolla en diversas especies vegetales. Este virus se propaga a través de áfidos vectores, los cuales transmiten la enfermedad desde una planta enferma a una sana mediante breves picaduras, siendo un medio muy eficiente de diseminación (Blancard *et al.*, 1996).

Como ya se ha descrito, no existe forma curativa para esta patología, y por ello se han utilizado medidas preventivas como eliminación de plantas enfermas y aplicación de químicos para el control de vectores. Sin embargo, en muchas ocasiones estas medidas no son suficientes para evitar el desarrollo de la enfermedad (Blancard *et al.*, 1996). Durante años, el uso de variedades resistentes a este virus ha sido la alternativa más eficiente para evitar esta patología.

Además de las medidas mencionadas, constantes investigaciones buscan un efecto

preventivo y curativo de la enfermedad. Es así como el control biológico surge como una alternativa emergente para la prevención de infección viral, el cual involucra el uso de organismos llamados antagonistas, que actúan disminuyendo la capacidad infectiva del patógeno, y a su vez activan mecanismos de defensa de la planta, con lo que se limitaría la replicación del virus y su movimiento de manera sistémica en el huésped (Parry, 1990).

En el siguiente trabajo se evaluó dos tipos de controladores biológicos para observar la efectividad de la aplicación de éstos en el control preventivo del virus del mosaico del pepino.

### **1.1. Hipótesis**

Hongos del género *Trichoderma* spp. y bacterias del género *Bacillus* spp. han sido masivamente utilizados como controladores biológicos, además, de acuerdo a estudios realizados, ambos han demostrado tener un efecto indirecto confiriendo resistencia a infección viral, reduciendo en las plantas los síntomas característicos del virus. De acuerdo a ello, plantas de melón inoculadas con estos biocontroladores serían menos susceptibles al ataque del virus del mosaico del pepino.

De acuerdo a lo anterior, el objetivo general de esta investigación fue evaluar el efecto de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. sobre la concentración del virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus-CMV*) en plantas de melón, y la expresión de sus síntomas característicos.

**Objetivos específicos:**

- Evaluar el efecto de los biocontroladores *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. sobre la expresión de síntomas de una infección artificial del virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus* - CMV) en plantas de melón.
- Comparar concentración de viriones del *Cucumber mosaic virus*-CMV en plantas de melón tratadas con los biocontroladores *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. a través de los valores de absorbancia obtenidos en la prueba serológica DAS-ELISA.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Antecedentes del cultivo del melón

El melón cuyo nombre científico es *Cucumis melo* L., pertenece a la familia de las cucurbitáceas, y se cultiva en diferentes zonas de la geografía mundial, especialmente entre los 50° de Latitud Norte y los 30° de Latitud Sur, fundamentalmente en climas cálidos y no demasiado fríos con temperaturas que oscilan entre 25 y 30° C (Gamayo, 1991).

La planta posee un sistema radicular muy abundante y ramificado, de crecimiento rápido, pudiendo algunas de sus raíces alcanzar una profundidad de 1.20 m. Sus tallos herbáceos están recubiertos de formaciones pilosas al igual que las hojas, y su desarrollo puede ser rastrero o trepador, debido a la presencia de zarcillos (Maroto, 1995).

Las flores son solitarias, de color amarillo; según su sexo pueden ser femeninas, masculinas o hermafroditas. La polinización es de tipo entomófila. Su fruto corresponde a un pepónide, de forma variable, pudiendo ser esférico o deprimido. La textura de la corteza del fruto puede ser lisa, reticulada, o estriada, y al igual que su pulpa, puede ser de color verde, amarillo, anaranjado o blanco (Maroto, 1995).

Las semillas ocupan la cavidad central del fruto, insertas sobre el tejido placentario, son fusiformes y de color blanco, pudiendo encontrar dentro de un fruto 200 a 600 semillas (Maroto, 1995).

En cuanto a su producción en Chile, la incorporación de tecnología en riego, técnicas de forzado y asistencia técnica, ha llevado a un importante aumento de la superficie cultivada de melón en zonas de secano.

En relación a la oferta de producto, a nivel de mercado interno, esta se concentra entre los meses de Noviembre a Abril, logrando las mayores producciones a partir de mediados de Diciembre a Enero, coincidiendo con una importante reducción de los precios. Esta característica de mercado se explica fundamentalmente por el escaso desarrollo técnico del cultivo, debido a que en la zona Central se conserva el manejo tradicional de esta especie en cuanto a fechas de siembra, técnicas de establecimiento, densidad de plantación y variedades con una importante presencia de material estándar (Urbina,2001).

Las exportaciones de este producto se han caracterizado por ser altamente erráticas en cuanto a volúmenes despachados, siendo Estados Unidos y Europa los principales mercados a los cuales se exporta (Urbina,2001).

## **2.2 Enfermedades que afectan el melón (*Cucumis melo*)**

Enfermedad es un fenómeno exclusivo y propio de los sistemas vivientes, que involucra todos los niveles de organización biológica, y corresponde a una alteración fisiológica o anomalía estructural de la planta (García-Arenal y Fraile, 1996).

Para el desarrollo de la infección no sólo se requiere la presencia del patógeno, sino además se deben presentar las condiciones ambientales necesarias para su desarrollo y un hospedero susceptible, lo que se conoce como triángulo de la enfermedad.

En las cucúrbitas existen más de 200 enfermedades de diversa etiología. En el cultivo del melón las patologías son provocadas por diferentes tipos de microorganismos, como son bacterias, hongos y virus, como se resumen en el Cuadro 2.1.

**Cuadro 2.1. Enfermedades del cultivo del melón (*Cucumis melo*)**

ENFERMEDAD	AGENTE CAUSAL	ORIGEN
Fusariosis	<i>Fusarium oxysporum</i> fsp. <i>melonis</i>	Fúngico
Verticilosis	<i>Verticillium alboatrum</i>	Fúngico
Podredumbre del cuello de la raíz	<i>Pythium</i> sp.	Fúngico
Oidio	<i>Erysiphe polyphaga</i> , <i>E. polygoni</i> , <i>E. cichoracearum</i>	Fúngico
Mildiú de las cucurbitáceas	<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	Fúngico
Pudrición gris	<i>Botrytis cinerea</i>	Fúngico
Alternariosis	<i>Alternaria cucumerina</i>	Fúngico
Mancha angular de las cucurbitáceas	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	Bacterial
Marchitamiento bacteriano	<i>Erwinia tracheiphilla</i>	Bacterial
Virus del mosaico del pepino	<i>Cucumber mosaic virus</i> -CMV	Viral
Virus del mosaico de la sandía	<i>Watermelon mosaic virus</i> -WMV	Viral
Virus de la mancha amarilla del tabaco	<i>Tobacco ringspot virus</i> -TRSV	Viral
Virus del mosaico amarillo del calabacín)	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i> -ZYMV	Viral
Virus del mosaico del calabacín	<i>Squash mosaic virus</i> -SMV	Viral

Fuente: Zitter *et al.*, 1996

### **2.3 Enfermedades causadas por virus**

Las virosis son enfermedades frecuentes dentro de los cultivos, y son provocadas por numerosos virus. Estos corresponden a nucleoproteínas que poseen la capacidad de producir enfermedad dentro de las células vivas de diferentes formas vivientes. Los virus no poseen la capacidad de dividirse dentro de las células o producir alguna estructura reproductora especializada como lo son las esporas en los hongos. Su sistema de infección consiste en inducir a las células hospedantes a formar más partículas virales, ocupando los espacios libres en éstas y alterando los componentes y procesos celulares, que a su vez modifican el metabolismo y llevan a la producción de sustancias anormales generando condiciones que influyen negativamente sobre las funciones de la célula o del organismo (Agrios, 1996).

A diferencia de otros virus, los que infectan plantas presentan gran especificidad por la planta que parasitan y en la cual se multiplican, diferenciándose entre sí no sólo en tamaño y forma, sino también en su constitución química y estructura física, método de infección, propagación, diseminación, translocación dentro del hospedero, y los síntomas que producen sobre él (Agrios, 1996).

La capacidad infectiva de estos patógenos radica en la información genética que posee su ácido nucleico, que en la mayoría de los virus que infectan vegetales es RNA. Su ingreso ocurre a través de heridas producidas mecánicamente o por ciertos vectores, o bien cuando un grano de polen infectado se deposita en un óvulo.

Una vez que el virus ingresa al tejido vegetal, el ácido nucleico (RNA) en primer término pierde su cubierta proteica. Luego induce a la célula a sintetizar enzimas denominadas RNA polimerasas, las que en presencia del RNA viral sintetizan nuevas moléculas del genoma.

Para que ocurra una infección viral dentro de la planta, el virus debe pasar de una célula a otra y propagarse sistémicamente. En su traslado de una célula a otra los virus se desplazan a través de los plasmodesmos que unen las células adyacentes, generando una invasión constante y directa (Agrios, 1996).

Entre las enfermedades que afectan cucúrbitas, aquellas causados por virus son difíciles de controlar y pueden ser muy destructivas. Su incidencia y severidad puede variar, dependiendo de las relaciones complejas entre patógeno, hospedero, vectores y medio ambiente. Es importante identificar a los agentes causales de enfermedades de virus y si es posible, adoptar estrategias para reducir al mínimo su impacto sobre la producción y la calidad de cosecha (Zitter *et al.*, 1996).

Durante años, el control químico de vectores y eliminación de fuentes de inóculo han sido los medios principales de prevenir enfermedades virales. La utilización de aceites minerales, insecticidas piretroides, destrucción de cultivos infectados luego de cosecha y saneamiento estricto en cosechas de invernadero, mostraban una alta eficacia, pero debían ser repetidas cada año (Zitter *et al.*, 1996).

### **2.3.1 Virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus-CMV*)**

A nivel mundial, el virus del mosaico del pepino es sin duda el virus encontrado con mayor frecuencia en los cultivos de cucurbitáceas al aire libre y en cultivos de invernadero. Descrito en Estados Unidos a principios del siglo XX, y posteriormente señalado en todos los continentes, aún es considerado como un importante agente viral destructivo que afecta especialmente a este grupo de especies. Junto con otros virus, ha sido responsable de epidemias extendidas en muchas partes del mundo provocando grandes pérdidas.

#### **a) Agente causal**

De acuerdo a su taxonomía viral, el virus del mosaico del pepino, CMV, pertenece a la familia Bromoviridae, cuyo género es *Cucumovirus*. Es un virus poliédrico, con un diámetro aproximado de 30 nm. Su peso molecular está dentro de los límites de 5.8 a 6.7 millones Daltons, de los cuales el 18 % es RNA y el 82 % restante, proteína. El punto de inactivación térmica de este virus es de casi 70 °C (Agrios, 1996).

#### **b) Ciclo de la enfermedad**

CMV inverna en muchas malezas perennes y en plantas de cultivo; las malezas albergan al virus en sus raíces durante el invierno y lo llevan hasta su follaje en la primavera, desde donde los áfidos lo transmiten a las plantas de cultivo susceptible. Una vez que éstas han sido infectadas, los insectos vectores y el hombre cuando cultiva y manipula las plantas, diseminan el virus a individuos sanos.

Si el virus es transmitido por la savia o por insectos, produce una infección sistémica de la cucurbitácea y de la mayoría de las demás plantas hospederas. Tejidos y órganos senescentes que se desarrollan antes que se produzca la infección no son afectados por el virus, pero las células y tejidos jóvenes activos que se desarrollan después de la infección, pueden ser afectados

con severidad variable. La concentración del virus en las plantas infectadas continúa aumentando varios días después que se produjo la inoculación y más tarde disminuye por bajo el nivel inicial o hasta que la planta muere (Agrios, 1996).

### **c) Especies hospederas**

CMV es de distribución mundial y puede infectar aproximadamente 800 especie de plantas, incluyendo monocotiledóneas y dicotiledóneas. La gama de hospederos incluye cultivos vegetales, como zanahoria (*Daucus carota*), apio (*Apium graveolens*), cucúrbitas en general, lechuga (*Lactuca* sp.), cebolla (*Allium cepa*), espinaca (*Spinacia oleracea*), tomate (*Lycopersicum esculentum*); ornamentales como la anémona (*Anemone* sp.), áster (*Aster* sp), geranio (*Pelargonium* sp), petunia (*Petunia* sp); plantas leñosas y semi leñosas (Zitter *et al.*, 1996).

### **d) Epidemiología y transmisión**

El método más común de transmisión de virus y económicamente más importante es a través de insectos vectores. Dentro de estos los de mayor importancia son áfidos y mosquita blanca.

El CMV es transmitido por pulgones, de manera no persistente. Los áfidos adquieren con sus partes bucales el virus desde plantas enfermas durante unos pocos segundos (30 o menos), lo transportan dentro de sus estiletes, y una vez que se alimentan de plantas sanas, transmiten el virus mientras se alimentan de ellas.

El periodo en que los áfidos son virulíferos después de haber adquirido un virus portado en el estilete, varía desde unos cuantos minutos hasta varias horas, después de lo cual ya no pueden transmitirlo (Agrios, 1996).

La transmisión del virus la realizan más de 60 especies de áfidos, entre los cuales se encuentra *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Aulacorthum solana* y *Aphis gossypii*.

La alta eficiencia de este modo de transmisión hace que la enfermedad pueda propagarse en un cultivo sin que se observe la presencia de importantes poblaciones de pulgones (Blancard *et al.*, 1996).

#### **e) Sintomatología**

La sintomatología desarrollada en general se caracteriza por una disminución en la tasa de crecimiento, desarrollo de una severa atrofia en la planta, mosaico foliar amarillo prominente, malformación y reducción drástica del tamaño de la hoja y de los entrenudos del tallo, disminución en el rendimiento total, y por ende una disminución del periodo efectivo de vida del cultivo.

En las etapas tempranas de crecimiento, los síntomas sistémicos consisten en enrollamiento de la hoja, mosaico, y reducción en el tamaño de la lámina. En plantas con alta severidad de infección, las flores afectadas pueden presentar anomalías prominentes y pétalos verdosos. Los frutos infectados se deforman y a menudo decoloran y por lo general permanecen pequeños. En frutas afectadas con un alto nivel de severidad, las producciones de semilla son prácticamente nulas (Zitter *et al.*, 1996).

De acuerdo a la especie, cultivar, condiciones ambientales y edad de las plantas, varía la intensidad de los síntomas foliares.

#### **f) Detección e identificación**

Según Agrios (1996), las partículas virales individuales no pueden observarse con el microscopio óptico, aunque las inclusiones o cristales producidos por éstos en células infectadas, se pueden observar a través de este medio.

Los métodos que se utilizan actualmente para detectar los virus de las plantas incluyen entre otros, la transmisión del virus de una planta enferma a una sana ya sea por injerto o inoculación con savia. Algunos otros métodos de transmisión utilizan insectos vectores para demostrar la presencia de un virus, sin embargo, la mayoría de estos métodos no pueden determinar si el patógeno es un virus, un micoplasma o una bacteria; hoy en día sólo la transmisión

a través de la savia de individuo enfermo se considera como una prueba de la naturaleza viral del patógeno.

La prueba más definitiva de la presencia de un virus en una planta se logra mediante pruebas serológicas. Estas técnicas basadas en la interacción anticuerpo-antígeno, son sencillas y específicas permitiendo analizar muestras de una forma rápida. Ejemplo de estas es la técnica inmunoenzimática ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Esta presenta una variante, conocida como doble "sandwich" de anticuerpos, denominada DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immunosorbent Assay), técnica usual para detección de virus en material vegetal (Cambra *et al.*, 1996).

#### **g) Control**

Durante el cultivo, ningún método de control es curativo, y una planta enferma lo estará toda su vida. En el momento inicial del ataque puede ser útil la eliminación de individuos infectados, sobre todo en cultivo bajo invernadero; además los síntomas sólo se expresan tras un periodo de incubación de una a dos semanas durante el cual la planta puede actuar como fuente de virus para pulgones (Zitter *et al.*, 1996).

Las aplicaciones de insecticidas son útiles para limitar la población de pulgones, vectores del virus. Sin embargo, no son eficaces para impedir el desarrollo de la epidemia vírica, ya que los vectores con frecuencia provienen del exterior del cultivo y transmiten el virus durante picaduras muy breves, sin que el insecticida tenga tiempo de actuar (Blancard *et al.*, 1996).

La eliminación de hospederos alternativos, como malezas, es a menudo una tarea imposible, debido a la extensa gama de especies que puede infectar este virus. Un método eficiente para evitar la presencia de esta virosis, es la utilización de cultivares resistentes. La resistencia a la infección viral es estable y duradera. En 1928, Porter encontró resistencia a este patógeno en un pepino chino, y actualmente la misma resistencia ha sido introducida a la mayor parte de las variedades de pepinos desarrollados en los Estados Unidos y en el mundo. Dentro del mismo esquema, otra solución frente a enfermedades virales se basa en el empleo de la ingeniería

genética. Un número de genes de resistencia de virus han sido estudiados y se encuentran disponibles para ser utilizados en la obtención de cultivares resistentes (Zitter *et al.*, 1996).

## **2.4 Biocontroladores *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp.**

### **2.4.1 *Trichoderma* spp.**

El género *Trichoderma* agrupa especies de hongos que se encuentran presentes en forma natural, en una gran cantidad de suelos y hábitat, desarrollándose frecuentemente sobre madera y tejidos vegetales en descomposición. Debido a su naturaleza agresiva y su capacidad metabólica para competir con la abundante microflora circundante, es un organismo dominante en los suelos. Se caracteriza por ser un hongo de crecimiento rápido, cuyas temperaturas óptimas de desarrollo fluctúan entre 25-30 °C (Samuels, 2001).

Taxonómicamente, *Trichoderma* es un Deutoromycete perteneciente al grupo de los Hifomycetes. Posee conidióforos erectos y altamente bifurcados que terminan en uno o varios fiálides. La disposición de las ramas primarias genera un aspecto piramidal (Samuels, 2001).

Debido a su fácil manipulación y versatilidad, los hongos del género *Trichoderma* son utilizados como controladores biológicos de diferentes hongos. El parasitismo directo es una de las formas de control, a través de la liberación de enzimas (celulasas, glucanasas, lipasas, proteasas y quitinasas) que ayudan a disolver la pared celular de las hifas del huésped, facilitando la absorción de nutrientes e inserción de estructuras especializadas en el interior del hongo parasitado. Además, produce antibióticos que le permiten inhibir el desarrollo de otros hongos o bacterias, que compiten por nutrientes y espacio (Roco *et al.*, 2001)

La capacidad biocontroladora de *Trichoderma* spp. se conoce desde los años 30. El efecto biocontrolador de este hongo no sólo se reduce a la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos de las plantas, sino que también puede inducir la resistencia sistémica y localizada para una gama de patógenos, y competencia por nutrientes. Además, ciertas cepas tienen influencia sustancial sobre el crecimiento de la planta y el desarrollo de ésta (Roco *et al.*, 2001).

#### **2.4.2 *Bacillus* spp.**

En 1872 Roberto Koch, reconoció la bacteria *Bacillus subtilis*. Al género *Bacillus* corresponden bacterias Gram positivo perteneciente al orden Bacillales, y a la familia Bacillaceae. Se encuentra comúnmente en el suelo y agua.

Como muchas de las bacterias, tiene la capacidad de formar endosporas resistentes, que le permite tolerar condiciones ambientales extremas, como altas temperaturas. Se desarrolla en ambientes aeróbicos (Todar, 2005).

Existen muchos microorganismos que han sido considerados como antagonistas de algunos patógenos, constituyendo una alternativa a los productos químicos, estos se denominan controladores biológicos. Entre ellos se encuentran las bacterias del género *Bacillus*, que ha mostrado ser un eficiente controlador de hongos como *Fusarium* y *Rhizoctonia solani*, en solanáceas (Sandoval, 2004).

De forma natural esta bacteria tiene una buena acción biocontroladora como fungicida. Su modo de acción se caracteriza por la liberación de compuestos antifúngicos como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas, caracterizándose estas últimas por ser compuestos que actúan sobre la pared celular de los hongos (Kloepper *et al.*, 2004).

Dada estas características biocontroladoras, se han creado productos comerciales que contienen este microorganismos en su formulación, tales como Serenade WP®, formulado en base a *Bacillus subtilis*.

#### **2.4.3 *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. como inductores de resistencia**

La inducción de resistencia por parte de *Trichoderma* sp. en plantas ha sido constantemente estudiada. Así, la primera manifestación clara de resistencia inducida por este hongo fue publicada en 1997 por Bigirimana *et al*, quienes mostraron que al tratar el suelo con *Trichoderma harzianum*, para control de enfermedades causadas por los hongos *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum lindemuthianum*, en fréjol, las hojas de la planta mostraban resistencia a estas

enfermedades. Ello permitió determinar que aún cuando la cepa del hongo se encontraba presente sólo sobre las raíces y no sobre el follaje, igualmente ejercía cierta resistencia a ambas patologías (Harman *et al.*, 2004).

La invasión a las células de las raíces por parte de *Trichoderma* sp., puede causar la resistencia sistémica inducida. Varios estudios han mostrado que la colonización de raíz por cepas de *Trichoderma* sp. aumenta los niveles de enzimas relacionadas con la defensa de las plantas, incluyendo peroxidasas (Harman *et al.*, 2004).

Según Harman *et al.* (2004), a través de estudios se ha evidenciado que cepas de *Trichoderma* sp. generarían resistencia inducida en diferentes plantas y sobre diversas patologías, causadas por hongos y virus. Así, la especie *T. harzianum* cepa T-1 y T22, y la especie *T. virens* cepa T3, generan protección sobre las hojas del pepino (*Cucumis sativus*) ante el Virus de mosaico de la mancha verde del pepino (*Green-mottle mosaic virus-CGMMV*), cuando las cepas de *Trichoderma* se presentaban sólo sobre las raíces. Producto de la aplicación, se produjo una reducción de la enfermedad.

Kloepper y Schroth (1978) reportaron que ciertas bacterias colonizadoras de las raíces podían promover el crecimiento en rábanos picante en ensayos de campo e invernadero, y a estas bacterias las denominaron rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (RPCP o PGPR). Desde entonces, se han realizados estudios bajo invernadero para reducir la severidad o incidencia de las enfermedades virales a través de la aplicación de diferentes cepas de *Bacillus* sp.

Zehnder *et al.* (2000), citado por Kloepper, (2004) realizaron investigaciones sobre la protección sistémica contra CMV en tomate y tabaco. Basado en síntomas y según los análisis a través de ELISA, en comparación con los controles, los tratamientos bacterianos redujeron perceptiblemente la severidad de la enfermedad (Kloepper *et al.*, 2004).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Ubicación del ensayo

El ensayo se llevó a cabo en el invernadero ubicado en el Campus Lircay, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Talca, durante la temporada 2005/2006.

#### 3.2. Material vegetal y producción de plantas

Para la realización de los ensayos se utilizó la variedad de melón VME 603 de Sakata Seed Chile S.A. Éste es susceptible al virus del mosaico del pepino, CMV.

Para la siembra se utilizaron bolsas plásticas de 1 litro de capacidad, en las cuales se sembraron dos semillas por bolsa, utilizando como sustrato tierra de hojas. Aproximadamente un mes después, las plantas fueron raleadas, es decir, se dejó sólo una planta por bolsa.

#### 3.3. Aplicación de los biocontroladores

En el ensayo se evaluó el efecto de los biocontroladores *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. sobre la infección de CMV. Para el primero se utilizó una mezcla que incluye las cepas Sherwood, Trailles y Queule, que corresponden a aislados obtenidos por el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias a través de un proyecto financiado por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA). En el caso de *Bacillus* sp. se utilizó la cepa nativa Antumávida, obtenida también a través de un proyecto financiado por la misma institución y desarrollado por el mismo laboratorio.

Para la evaluación de los biocontroladores se realizaron tres aplicaciones de éstos pre-inoculación del virus *Cucumber mosaic virus*-CMV, sobre las plantas de melón. La primera aplicación de los biocontroladores se ejecutó 40 días después de siembra (4 pares de hojas). Cinco y diez días posteriores a ésta, se realizaron la segunda y tercera aplicación respectivamente.

La aplicación de ambos biocontroladores se efectuó utilizando un aspersor manual de 5 L, a una concentración del antagonista de  $10^8$  UFC/ml, es decir, 50 ml en 1 litro de agua, para la mezcla de *Trichoderma* spp., y 10 g por litro de agua para la cepa de *Bacillus* sp. El mojado de cada planta fue hasta punto de escurrimiento.

#### **3.4. Fuente de inóculo de *Cucumber mosaic virus* – CMV**

En cuanto al inóculo del virus, éste fue obtenido de plantas de tomate infectadas con CMV, las que fueron analizadas a través de la técnica serológica de DAS-ELISA con el fin de comprobar la identidad del patógeno. El material enfermo recolectado correspondió a hojas, las que se almacenaron en recipientes que contienen  $\text{CaCO}_3$  con el fin de secarlos y mantener el patógeno infectivo.

#### **3.5. Preparación del inóculo del virus e inoculación**

Una vez que los biocontroladores fueron aplicados, 7 días posterior a ello, se procedió a inocular las plantas con el virus.

A partir del material infectado con CMV se preparó el inóculo. Para tal fin se pesó 1 g de tejido seco, el que se maceró en 5 ml de tampón fosfato de extracción, pH 7.4, utilizando morteros estériles.

Utilizando un sacabocado estéril, el extracto se aplicó a 2 hojas jóvenes de cada planta. Esto se realizó un par de veces en un lapso de 7 días con el fin de asegurar la infección con el virus.

### **3.6. Diseño experimental**

El ensayo se ordenó en un diseño experimental completamente al azar con 3 repeticiones, donde cada unidad experimental se componía de 13 plantas. Los tratamientos evaluados se presentan en el Cuadro 3.1.

Además, se incluyó un testigo absoluto, sin inoculación (Tratamiento T0) compuesto por 14 plantas, el que se mantuvo alejado del ensayo en un lugar aislado. El objeto de ello fue verificar que el material de propagación empleado no se encontraba contaminado por microorganismos. Estas plantas también fueron evaluadas, pero los resultados no se incluyeron en el análisis estadístico.

**Cuadro 3.1. Tratamientos a evaluar en un ensayo de determinación del efecto de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. sobre la resistencia a CMV en melón.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>
T1	Testigo, inoculación virus, sin inóculo del biocontrolador
T2	Aplicación de <i>Trichoderma</i> spp pre-inoculación de CMV
T3	Aplicación de <i>Bacillus</i> spp. pre-inoculación de CMV

### **3.7. Evaluación**

Transcurridos 45 días posterior a la inoculación con el virus, se realizaron las siguientes evaluaciones en cada uno de los tratamientos:

- Incidencia y severidad para cada unidad experimental en base a sintomatología visual asociada al virus. Para el caso de evaluación de severidad, además se realizó una evaluación inicial 15 días posterior a la inoculación con el virus.

- Medición de altura y peso de las plantas, cuantificando peso fresco de la parte aérea y raíces para cada unidad experimental.
- Finalmente, se tomó muestras de hojas para determinar por medio de DAS-ELISA la presencia del virus CMV.

### 3.7.1 Determinación de incidencia y severidad del virus CMV sobre las plantas de melón

La incidencia se determinó a través de la fórmula empleada por Ogawa (1986), la que se expresa en porcentaje de acuerdo a la ecuación siguiente:

$$\text{Incidencia (I): } \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de individuos con síntomas de infección viral}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de individuos}} * 100$$

La severidad se determinó de acuerdo a la siguiente escala:

**Nivel 0:** No se observan síntomas.

**Nivel 1:** Moteado leve.

**Nivel 2:** Moteado o mosaico moderado.

**Nivel 3:** Mosaico severo, deformación de hojas.

En cada uno de los tratamientos se midió incidencia y severidad para cada unidad experimental. A partir de ello se obtuvo como dato representativo de cada tratamiento, la moda, es decir, número que más se repite, logrando así una comparación objetiva entre tratamientos.

### 3.7.2 Determinación de la presencia del virus

Para determinar la presencia del virus, se realizó la prueba serológica DAS-ELISA. Para ello, al final del ensayo se recolectaron dos folíolos en pleno desarrollo de cada unidad

experimental. Se pesó 0,2 g de cada folíolo y se diluyó en 1:20 (p/v) en tampón de extracción general, es decir, 0.2 g se diluyeron en 4 ml de tampón, macerando en morteros estériles. Una vez obtenido el extracto, se llevó por 24 horas a 4°C. Transcurrido dicho periodo, este extracto se depositó sobre las celdillas de una placa de poliestireno previamente sensibilizada con un anticuerpo monoclonal del virus. Para ello el anticuerpo fue diluido en tampón carbonato (0,02 M, pH 9,6) y depositado en las placas, incubándose a 37°C por 4 horas.

Una vez adicionadas las muestras de hojas de las plantas, se incubaron a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se agregaron 100 µl del anticuerpo conjugado 1:1000 (1mg/ml p/v) incubándose 4 horas a 37°C. Posteriormente, luego de lavar repetidas veces, se agregó el sustrato (p-nitrofenil fosfato) diluido en tampón sustrato (1mg/ml p/v) midiendo absorbancia a 405 nm, a 15 y 45 minutos.

Tras el término de cada paso se efectuaron tres lavados utilizando PBS-Tween (1mg/ml p/v).

En cada placa utilizada se incluyó un control positivo, es decir, un testigo absoluto sano y uno negativo, o testigo enfermo, con el fin de verificar el correcto funcionamiento de la técnica.

### **3.7.3 Medición de altura de la planta y peso fresco**

De cada tratamiento se obtuvo una altura promedio de plantas en similar estado fenológico, para realizar una correcta comparación entre tratamientos. De esta forma se midió altura desde la base hasta la última hoja extendida, y peso de la parte aérea y raíces.

### **3.8 Análisis de resultados**

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA), utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus para Windows, previa transformación de los datos en porcentaje a valores angulares ( $\text{Arcosen } (\%/100)^{1/2}$ ), de manera de homogenizar las varianzas. En aquellos casos en que el ANDEVA resultó significativo, se realizó separación de medias mediante el test Tuckey (HSD) ( $p \leq 0.05$ ).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Presencia del virus del mosaico del pepino en las plantas

Posterior a la inoculación del virus, en todos los tratamientos se observaron síntomas que correspondían a los causados por el Virus del mosaico del pepino, CMV, como moteados y mosaicos. Estos eran más evidentes en hojas de mayor desarrollo, lo que concuerda con lo establecido por Latorre (2004), que cita este tipo de síntomas en plantas de melón infectadas con el virus. Los síntomas se presentaron en las hojas de algunas plantas, pero no en todas. Aquellos más severos, como necrosis en el follaje o muerte de plantas, no se observaron en ninguno de los tratamientos durante el desarrollo del ensayo.

Por otra parte, el testigo absoluto (sin aplicación de biocontrolador ni inoculación de virus), no presentó síntomas, lo que confirma la sanidad de la semilla.

Respecto a la presencia de síntomas en cada tratamiento, el tratamiento 3 (preinoculación con *Bacillus* spp.) es el que presentó el mayor porcentaje de plantas asintomáticas. Considerando la literatura, de acuerdo a lo establecido por Zendher, citado por Kloepper (2004), *Bacillus* reduce la cantidad de plantas sintomáticas, en relación a un testigo inoculado con el virus, sin la aplicación de *Bacillus* sp.

A partir de la inoculación del virus, en los días posteriores los síntomas de las plantas inoculadas fueron poco evidentes, en donde no se observaron diferencias de desarrollo foliar entre los distintos tratamientos. Los primeros síntomas observados se lograron detectar aproximadamente a los 30 días. Estos tiempos se aproximan a lo establecido en la literatura, que muestra la presencia de síntomas aproximadamente dos a tres semanas después de inoculación del virus.

## **4.2 Evaluación de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* sp. en el control preventivo del virus del mosaico del pepino, CMV.**

### **4.2.1 Severidad de la enfermedad**

Los niveles de severidad se determinaron a los 15 y 45 días posterior a la inoculación del virus. Inicialmente, las plantas no presentaron síntomas visibles, y no se observó diferencias entre los tratamientos. En la evaluación final de severidad, 45 días post inoculación, se observó un leve incremento en la severidad del tratamiento sin biocontrolador y con inoculación de virus. Los resultados de incidencia se presentan en el Cuadro 4.1

En el análisis de varianza no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos.

**Cuadro 4.1. Evaluación de la severidad del virus del mosaico del pepino, CMV, en plantas de melón tratadas con *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp.**

TRATAMIENTOS	DÍAS POST INOCULACIÓN	
	15	45
Testigo inoculado con virus y sin biocontrolador T1	1	2
Aplicación de <i>Trichoderma</i> spp. T2	0	1
Aplicación de <i>Bacillus</i> spp. T3	0	1
Testigo absoluto T0	0	0

De acuerdo a la escala de severidad:

**Nivel 0:** No se observan síntomas.

**Nivel 1:** Moteado leve.

**Nivel 2:** Moteado o mosaico moderado.

**Nivel 3:** Mosaico severo, deformación de hojas.

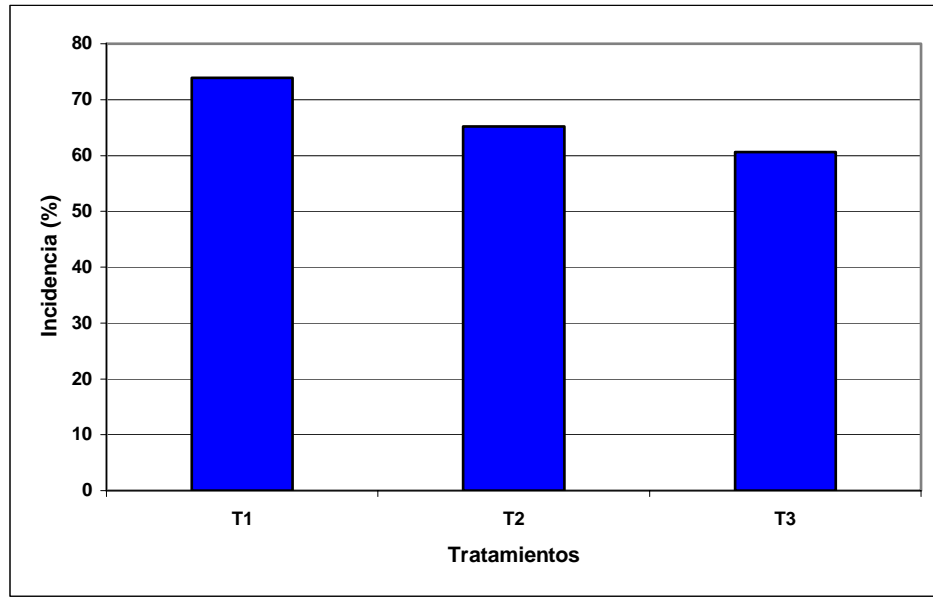
#### 4.2.2 Incidencia de la enfermedad

Finalizado el ensayo, se consideró conjuntamente a la severidad, la incidencia del virus del mosaico del pepino en los tratamientos en estudio. Para ello se utilizó la fórmula empleada por Ogawa (1986), la que se expresa en porcentaje de acuerdo a la ecuación siguiente:

$$\text{Incidencia (I): } \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de individuos con síntomas de infección viral}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de individuos}} * 100$$

Los tratamientos en los que se aplicó biocontrolador pre inoculación de virus, es decir, T2 y T3, presentaron un porcentaje similar de incidencia, mientras que el tratamiento con inoculación de virus, sin biocontrolador presentó un alto porcentaje de incidencia en comparación con todos los tratamientos.

Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 4.1, e indicarían que la aplicación de biocontroladores podría haber incrementado la defensa sistémica de las plantas. Sin embargo, en el análisis de varianza no se observaron diferencias significativas entre tratamientos.



**Figura 4.1. Evaluación de la incidencia del virus del mosaico del pepino, CMV, en plantas de melón tratadas con *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp.**

Donde se define que:

T1: Testigo, inoculación virus, sin inóculo del biocontrolador

T2: Aplicación de *Trichoderma* spp pre-inoculación de CMV

T3: Aplicación de *Bacillus* spp. pre-inoculación de CMV

#### **4.3. Efectos del Virus del mosaico del pepino (CMV) sobre el crecimiento vegetativo en las plantas de melón**

##### **4.3.1. Altura final de plantas**

Esta evaluación se realizó en el periodo final del estudio, 45 días después de la inoculación del virus. El análisis de varianza mostró que no existen diferencias significativas entre los tratamientos.

La altura final promedio de las plantas de cada tratamiento se detalla en el Cuadro 4.2. En todos ellos, las plantas crecieron de manera regular. Así el tratamiento 2 (*Trichoderma* spp) y el tratamiento 3 (*Bacillus* spp.) mostraron alturas cercanas, mientras que el tratamiento 1 se alejó levemente de estos promedios, presentando una altura menor de plantas, sin embargo fue estadísticamente similar. De acuerdo a esto se puede concluir que los tratamientos con biocontroladores no mostraron un crecimiento significativo mayor en comparación con las plantas no tratadas con estos, de lo que se determina que no tuvieron un efecto sobre la altura de las plantas.

**Cuadro 4.2. Efectos de virus del mosaico del pepino (CMV) sobre la altura final en plantas de melón inoculadas con el virus.**

TRATAMIENTO	ALTURA FINAL (cm) <sup>1</sup>
T1	97.3
T2	106.7
T3	105
<b>Significancia</b> <sup>2</sup>	<b>n.s</b>

1: Altura promedio de las plantas por tratamiento

2: Significancia, n.s: no significativo, \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$

Donde se define que:

T1: Testigo, inoculación virus, sin inóculo del biocontrolador

T2: Aplicación de *Trichoderma* spp pre-inoculación de CMV

T3: Aplicación de *Bacillus* spp. pre-inoculación de CMV

#### 4.3.2. Peso fresco de las plantas

Junto con la altura final de las plantas, se consideró la evaluación del peso total de éstas, considerando tanto peso de raíces como parte aérea.

Los resultados obtenidos en cuanto a producción de materia fresca de la planta de melón de cada tratamiento se presentan en el Cuadro 4.3. Nuevamente se aprecia que no existieron diferencias significativas entre tratamientos.

**Cuadro 4.3. Efecto del virus del mosaico del pepino (CMV) sobre la producción de materia fresca en plantas de melón inoculadas con el virus, y pre-inoculación de *Trichoderma* spp., y *Bacillus* spp.**

TRATAMIENTO	PESO FINAL (gr) <sup>1</sup>
T1	31,7
T2	51,8
T3	40,6
<b>Significancia</b> <sup>2</sup>	<b>n.s</b>

1: Peso promedio de las plantas por tratamiento

2: Significancia, n.s: no significativo, \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$

Donde se define que:

T1: Testigo, inoculación virus, sin inóculo del biocontrolador

T2: Aplicación de *Trichoderma* spp pre-inoculación de CMV

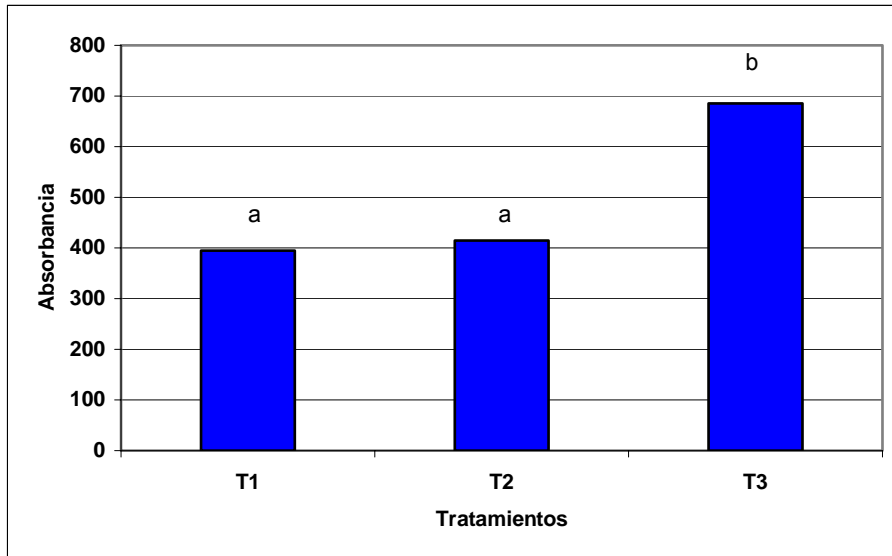
T3: Aplicación de *Bacillus* spp. pre-inoculación de CMV

#### **4.4. Determinación de la presencia del virus CMV en los tratamientos a través de DAS-ELISA**

Una vez que se realizaron las mediciones de altura y peso de las plantas de melón, de cada unidad experimental constituida de 13 plantas, se tomó una muestra de hojas, las que fueron sometidas a la prueba DAS-ELISA.

Los resultados obtenidos, fueron los esperados, es decir, los tratamientos inoculados con el patógeno, resultaron positivos, lo que permitió verificar la presencia del virus en las plantas, en conjunto con los síntomas observados durante el desarrollo de la evaluación. De acuerdo a esto, la inoculación mecánica del virus en las plantas de melón fue eficiente. Con respecto al testigo absoluto, este presentó un ELISA negativo, logrando comprobar la ausencia del patógeno en las plantas del tratamiento T0.

En la Figura 4.2 se pueden apreciar los valores de absorbancia obtenidos a los 45 minutos luego de agregado el sustrato. Estos fueron sometidos a análisis estadístico, el cual arrojó diferencias significativas entre tratamientos. Las plantas tratadas con *Bacillus* spp. pre inoculación de virus (T3), presentan el mayor nivel de absorbancia, mientras que el tratamiento de *Trichoderma* spp. pre inoculación de virus (T2), y el tratamiento sin biocontrolador e inoculación de virus (T1), no difieren estadísticamente.



**Figura 4.2. Valores de absorbancia obtenidos en la prueba serológica DAS-ELISA en hojas de plantas de melón inoculadas con virus del mosaico del pepino, CMV, tratadas previamente con *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp.**

Sin embargo, estos resultados no permiten concluir que la aplicación de *Trichoderma* spp. no fue efectiva en inducir mecanismos de defensa de las plantas frente al ataque viral del virus del mosaico del pepino, para lo cual sería necesario considerar además, otros parámetros de estudio.

El testigo absoluto, T0, no se consideró en el análisis estadístico y sólo se utilizó como referencia. El valor de absorbancia que presentó fue el menor de los tratamientos en estudio. Con ello se confirma la inexistencia de virus en las plantas testigo, determinada previamente ante la ausencia de síntomas.

#### **4.5. Discusión**

Los resultados obtenidos indican que ninguno de los biocontroladores tuvo un efecto en cuanto a inducir resistencia en la planta frente a la infección del virus del mosaico del pepino.

Si bien los valores de severidad e incidencia en los tratamientos con aplicación de antagonistas fueron levemente inferiores, no se logró establecer diferencias estadísticas respecto al testigo inoculado sólo con el virus. Esto podría explicarse por distintos factores, entre otros, inoculación inoportuna de los biocontroladores, alta presión del inóculo del virus, el que fue inoculado en dos oportunidades, o un número inadecuado de plantas que no permitió detectar diferencias.

En futuros ensayos sería recomendable aplicar *Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp. con mayor antelación a la inoculación con el virus del mosaico del pepino, y además en un mayor número de oportunidades para asegurar si realmente existe un efecto.

## V. CONCLUSIÓN

Los principales síntomas observados a nivel foliar en plantas inoculadas con CMV fueron mosaicos y moteados. Además se observaron deformaciones en las hojas.

Los distintos tratamientos evaluados no presentan diferencias estadísticas en cuanto a incidencia de la enfermedad provocada por el virus del mosaico del pepino. Lo mismo ocurrió para peso y altura.

En la prueba serológica DAS-ELISA, el tratamiento con preinoculación con *Bacillus* sp. presentó la mayor concentración de virus. Plantas tratadas con *Trichoderma* spp. no difirieron estadísticamente del testigo sólo inoculado con CMV.

En cuanto a los grados de severidad de la enfermedad, en la última evaluación realizada a los 45 días, no se presentaron diferencias considerables, con respecto a la evaluación inicial.

A través de la prueba serológica DAS-ELISA se pudo demostrar la eficiencia de la inoculación mecánica del virus. En el testigo absoluto (T0), el que no fue incluido en el análisis estadístico, la prueba serológica permitió asegurar que el material utilizado para el ensayo estaba libre de patología viral.

Para el parámetro de altura de plantas y peso fresco no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos preinoculados con biocontrolador y el testigo inoculado.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

1. **Agrios, G. 1996.** Fitopatología. Segunda Edición. Editorial Limusa. México. 838 p.
2. **Blancard, D., Lecoq, H. y Pitrat, M. 1996.** Enfermedades de las Cucurbitáceas. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España. 300p.
3. **Cambra, M., Gorris, M. y Terrada M. 1996.** Caracterización, diagnóstico y detección serológica de virus. En: Llácer, G., López, M., Trapero, A. y Bello, A. Patología vegetal. Tomo I. Sociedad española de fitopatología. España. Pp: 207- 242.
4. **Chet, I. 1987.** Innovative approaches to plant disease control. Wiley Interscience. New York, Estados Unidos. 372 p.
5. **Fundación para la Innovación Agraria, FIA. 2001.** Boletín de hortalizas: El mercado mundial de las hortalizas. Providencia, Chile.
6. **García-Arenal, F. y Fraile, A. 1996.** La patología vegetal: Ciencia y Técnica. En: Llácer, G., López, M., Trapero, A. y Bello, A. Patología vegetal. Tomo I. Sociedad española de fitopatología. España. Pp: 25- 31.
7. **Gilardi, P. 2000.** Análisis de los inductores virales de la resistencia frente a *Tobamovirus* en el género *Capsicum* (en línea). Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Disponible en: <http://tesis.sim.ucm.es:2004/19972000/X/3/X3054401.pdf>. Consultado 19 de noviembre 2005.
8. **Harman G., Howell C., Viterbo, A., Chet I. y Lorito M. 2004.** *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature reviews 2: 43-56.
9. **Krarup, C. 2001.** Hortalizas de Estación cálida (en línea). Santiago, Chile. Disponible en: [http://www.uc.cl/sw\\_educ/hortalizas/html/](http://www.uc.cl/sw_educ/hortalizas/html/). Consultado 14 noviembre 2005.
10. **Kloepper, J., Ryu, C. y Zhang, S. 2004.** Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. The American Phytopathology Society 94 (11): 1259-1266.
11. **Kloepper, J., Schroth, M. N. 1978.** Plant growth-promoting rhizobacteria in radish. En: Geoffrey W. Zehnder John F. Murphy David J. Schuster Resistencia Inducida por

Microbios: Una Estrategia Novedosa para Control en Hortalizas de Enfermedades Transmitidas por Insectos.

12. **Latorre, B. 2004.** Enfermedades de las plantas cultivadas. Sexta Edición. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 638p.
13. **Llácer, G., López, M., Trapero, A. y Bello, A. 1996.** Patología vegetal. Tomo I. Sociedad española de fitopatología. España. Pp: 26,54
14. **Maroto, J. 1995.** Horticultura herbácea especial. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España. Pp: 434-435; 440.
15. **Parry, D.1990.** Plant Patology in Agricultura. Cambridge University. Reino Unido. 385p.
16. **Robinson, R., y Decker-Walters, D.1997.** Cucurbits. Cab International, Estados Unidos. Pp: 164-165; 182-183.
17. **Roco, A. y Pérez, L. M. 2001.** *In vitro* biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* on *Alternaria alternata* in the presence of growth regulators. EJB Electronic Journal of Biotechnology 4 (2):1-6.
18. **Samuels, G. 2001.** What is *Trichoderma*? (en línea). Systematic Botany and Mycology Laboratory, Agricultural Research Service, Department of Agriculture. USA. Disponible en: <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex>. Consultado 19 noviembre 2005.
19. **Sandoval, C. 2004.** Manual Técnico Manejo integrado de Enfermedades en cultivos hidropónicos (en línea). Universidad de Talca. Talca, Chile. Disponible en: [www.rlc.fao.org/prior/segalim/aup/pdf/integra1.pdf](http://www.rlc.fao.org/prior/segalim/aup/pdf/integra1.pdf). Consultado 7 diciembre 2005.
20. **Todar, K. 2005.** The genus *Bacillus* (en línea). University of Wisconsin – Madison Department of Bacteriology. Disponible en: <http://www.textbookofbacteriology.net>. Consultado 5 diciembre 2005.