



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

**EVALUACIÓN DE APLICACIONES PREINFECCIÓN DEL FUNGICIDA  
BENOMILO Y DEL BIOCONTROLADOR *Trichoderma harzianum* EN EL  
CONTROL DE *Fusarium* sp. EN PROTEÁCEAS**

**MEMORIA DE TÍTULO**

**MABEL XIMENA OBREQUE DOTE**

**TALCA - CHILE**

**2004**

UNIVERSIDAD DE TALCA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA DE AGRONOMÍA

**EVALUACIÓN DE APLICACIONES PREINFECCIÓN DEL FUNGICIDA  
BENOMILO Y DEL BIOCONTROLADOR *Trichoderma harzianum* EN EL  
CONTROL DE *Fusarium* sp. EN PROTEÁCEAS**

Por:

**MABEL XIMENA OBREQUE DOTE**

**MEMORIA DE TÍTULO**

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

**INGENIERO AGRÓNOMO**

TALCA, 2004

## APROBACIÓN

---

Profesor Guía:                      Ing. Agr., M. Sc., Ph. D. Claudio Sandoval Briones  
    Profesor Facultad de Ciencias Agrarias  
    Universidad de Talca

---

Profesora Informante:              Ing. Agr., M. Sc. Flavia Shiappacasse Canepa  
    Profesor Facultad de Ciencias Agrarias  
    Universidad de Talca

Fecha Presentación de Defensa de Memoria: 30 de abril 2004.

## ÍNDICE

---

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	3
2.1. Generalidades de las Proteáceas	3
2.1.1. <i>Leucadendron</i> 'Safari Sunset'	4
2.2. Importancia de las enfermedades en Proteáceas	4
2.2.1. Antecedentes de <i>Fusarium</i> spp. en Proteáceas	6
2.3. Descripción de <i>Fusarium</i> sp.	7
2.3.1. Sintomatología	8
2.3.2. Ciclo biológico	9
2.3.3. Alternativas de control	10
2.4. Características de los fungicidas benzimidazoles	11
2.4.1. Benomilo	12
2.5. Antecedentes de <i>Trichoderma</i> spp.	13
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	15
3.1. Ubicación del ensayo	15
3.2. Material Vegetal	15
3.3. Obtención e identificación de <i>Fusarium</i> sp.	15
3.4. Pruebas de patogenicidad	16
3.5. Descripción del ensayo	17
3.6. Inoculación con <i>Fusarium</i> sp.	18
3.7. Evaluaciones	19
3.8. Diseño experimental	19

<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	20
4.1. Identificación del hongo <i>Fusarium</i> sp.	20
4.2. Pruebas de patogenicidad	20
4.3. Evaluación de Benomilo y <i>Trichoderma harzianum</i> cepa nativa Queule en el control preventivo de <i>Fusarium</i> sp. en L. 'Safari Sunset'	22
4.3.1. Incidencia de la enfermedad	22
4.3.2. Severidad de la enfermedad	24
<b>5. CONCLUSIONES</b>	28
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	29

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

---

	Página
<b>Capítulo 2</b>	
<b>Figura 2.1.</b> Estructura química de Benomilo.	12
<b>Capítulo 3</b>	
<b>Cuadro 3.1.</b> Descripción de los tratamientos utilizados para evaluar el efecto preventivo de dosis comerciales de Benex 50 WP y <i>Trichoderma harzianum</i> en el control de <i>Fusarium</i> sp. en plantas de <i>L. 'Safari Sunset'</i> .	18
<b>Capítulo 4</b>	
<b>Cuadro 4.1.</b> Resultados de las pruebas de patogenicidad efectuadas sobre cinco plantas de <i>L. 'Safari Sunset'</i> , inoculadas con el hongo <i>Fusarium</i> sp., bajo condiciones de invernadero.	20
<b>Figura 4.1.</b> Efecto de Benomilo y de tres concentraciones de <i>T. harzianum</i> , sobre el control preventivo de <i>Fusarium</i> sp. en plantas de <i>L. 'Safari Sunset'</i> .	23
<b>Cuadro 4.2.</b> Efecto de Benomilo y tres concentraciones de <i>T. harzianum</i> cepa nativa Queule en el control preventivo de <i>Fusarium</i> sp. en plantas de <i>L. 'Safari Sunset'</i> con distintos grados de severidad a los 30 días después de inoculación (DDI).	25
<b>Cuadro 4.3.</b> Efecto de Benomilo y tres concentraciones de <i>T. harzianum</i> cepa nativa Queule en el control preventivo de <i>Fusarium</i> sp. en plantas de <i>L. 'Safari Sunset'</i> con distintos grados de severidad a los 45 días después de inoculación (DDI).	26
<b>Cuadro 4.4.</b> Efecto de Benomilo y tres concentraciones de <i>T. harzianum</i> cepa nativa Queule en el control preventivo de <i>Fusarium</i> sp. en plantas de <i>L. 'Safari Sunset'</i> con distintos grados de severidad a los 60 días después de inoculación (DDI).	27

## RESUMEN

Con el objeto de evaluar la efectividad del fungicida de uso tradicional Benomilo (Benex 50 WP) y del biocontrolador *Trichoderma harzianum* cepa nativa Queule, en el control preventivo de *Fusarium* sp. en plantas de *Leucadendron* 'Safari Sunset', cultivar perteneciente a la familia Proteaceae, se realizó un ensayo bajo condiciones de invernadero. Plantas de cinco meses de edad fueron inoculadas a través de una herida realizada en la base del tallo, con una suspensión del patógeno de  $10^6$  conidias  $\text{ml}^{-1}$  y con un volumen de 10 ml por planta. Se evaluó la dosis comercial del fungicida Benomilo (Benex 50 WP)  $1\text{g L}^{-1}$  y tres concentraciones del biocontrolador *T. harzianum* ( $10^7$ ,  $10^8$  y  $10^9$  conidias  $\text{ml}^{-1}$ ), en aplicaciones preinfección. Además, se incluyó un tratamiento testigo en el que las plantas sólo fueron inoculadas con el patógeno. Se realizaron mediciones de incidencia y severidad de la enfermedad causada por *Fusarium* sp., a los 30, 45 y 60 días después de inocular (DDI) las plantas. Los resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad preliminares indican al aislado de *Fusarium* sp., utilizado en los ensayos como patogénico, asociándose a su presencia síntomas como marchitez en las puntas de las hojas jóvenes, necrosis de los brotes, pardeamiento de haces vasculares y muerte de plantas. Por otra parte, se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de control evaluados. Se determinó que el fungicida tradicional Benomilo y *T. harzianum* en las concentraciones  $10^8$  y  $10^9$  conidias  $\text{ml}^{-1}$  fueron los más efectivos en el control preventivo de *Fusarium* sp., observándose una incidencia de la enfermedad menor a 20% e índices de severidad con valor 1 o inferior, equivalentes a marchitez leve o sin marchitez.

## ABSTRACT

In order to evaluate the effectiveness of the fungicida traditional use Benomyl (Benex 50 WP) and biocontrol *Trichoderma harzianum* native strain Queule, in the preventive control of *Fusarium* sp. in plants of *Leucadendron* 'Safari Sunset', variety pertaining to the Proteaceae family, was made test under conditions greenhouse. Plants of five months of age were inoculated with a concentration pathogen  $10^6$  conidia  $\text{ml}^{-1}$  and with 10 ml by plant. The commercial dose of the fungicida Benomyl was evaluated (Benex 50 WP)  $1\text{g L}^{-1}$  and three concentrations of the biocontrol *T. harzianum*  $10^7$ ,  $10^8$  and  $10^9$  conidia  $\text{ml}^{-1}$ , in preinfection applications, besides to evaluate a control treatment, the plants were only inoculated with the pathogen. Were made measurements of incidence and severity of the disease caused by *Fusarium* sp., in three evaluations to the 30, 45 and 60 days after inoculating (DDI) the plants of *L. 'Safari Sunset'* with the pathogen. In the test were significant statistical differences between the evaluated treatments. Was determined that isolated of *Fusarium* sp., turned out to be pathogenic and the symptoms associated to the presence of this fungus were, wilt in the ends of the young leaves, necrotic buds, dark lesion of vascular tissue and death of plants. Additionally was determined that the traditional fungicida Benomyl and concentrations *T. harzianum* in  $10^9$  and  $10^8$  conidia  $\text{ml}^{-1}$ , was effective in the preventive control pathology caused by *Fusarium* sp., an incidence of the inferior disease to 20% and ratios of severity with inferior value 1, equivalent to weigh or without wilt.



## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años en Chile ha ocurrido una amplia diversificación de las especies cultivadas, las que específicamente se han expandido a la producción de flores de corte, debido a que proporcionan mejores retornos por hectárea, en comparación a otros productos agrícolas (Indap, 2001).

Debido a lo anterior, se han introducido muchas especies exóticas a nuestro país, las cuales tienen una demanda sostenida, además de obtener con ellos excelentes rentabilidades (Indap, 2001). Dentro de éstas, se encuentran las pertenecientes a la familia Proteaceae, donde adquieren relevancia los géneros *Protea*, *Leucadendron*, y *Leucospermum*, los cuales tienen bajos requerimientos de agua en relación a otros cultivos y permiten utilizar suelos degradados (Indap, 2001).

El género *Fusarium* es causante de marchitamientos vasculares en un gran número de especies vegetales, específicamente en flores y hortalizas. Es un hongo habitante del suelo que infecta a las plantas a través de las raíces, penetrando en forma directa o por heridas. Este patógeno, produce tres tipos de esporas asexuales: microconidias, macroconidias y clamidosporas, las cuales ascienden a través de los vasos xilemáticos por la corriente transpiratoria (Agrios, 1996).

Recientemente se ha identificado este hongo afectando a las proteas en nuestro país, por lo que se hace necesario establecer medidas de control apropiadas para mantener los cultivos libres de este patógeno. Éste puede llegar a tener implicancias económicas sobre la producción del cultivo, debido a que el marchitamiento alcanza a la planta en su totalidad, observándose además una disminución en la cantidad de flores producidas por planta (Swart *et al.*, 1999).

Para el control de *Fusarium* sp. se ha utilizado el fungicida Benomilo en diferentes especies de importancia agrícola (Besoain, 1989), con el inconveniente de que su repetido uso puede generar razas resistentes a este patógeno (Besoain, 1989; Alvarez, 1989).

Adicionalmente se ha determinado la efectividad del hongo *Trichoderma harzianum* en el control de *Fusarium* sp., el cual disminuyó la incidencia del patógeno bajo condiciones de campo en dos periodos consecutivos de producción de tomate (Sivan *et al.*, 1987).

Debido a lo expuesto se podría esperar un adecuado efecto tanto de Benomilo como de *Trichoderma harzianum* en el control de *Fusarium* sp. en proteas.

De acuerdo a lo anterior, el objetivo general de esta investigación fue evaluar el efecto del fungicida de uso comercial Benomilo (Benex 50 WP) y de *Trichoderma harzianum* cepa nativa Queule, en el control preventivo de *Fusarium* sp. en plantas de *Leucadendron* 'Safari Sunset', bajo condiciones de invernadero.

**Como objetivos específicos se plantean:**

- Determinar la incidencia y severidad de *Fusarium* sp. en plantas de proteas tratadas con el fungicida Benomilo y el biocontrolador *Trichoderma harzianum* en aplicaciones de preinfección.
- Evaluar la efectividad de la dosis comercial del fungicida Benomilo (Benex 50 WP) y de tres concentraciones del biocontrolador *Trichoderma harzianum*, para el control de *Fusarium* sp. en aplicaciones de preinfección.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Generalidades de las Proteáceas

Las Proteáceas constituyen una de las más importantes familias de plantas que producen flor en el hemisferio sur. Ésta se divide en dos subfamilias: Proteoideae, la cual está presente principalmente en Sudáfrica, pero también en Australia y Nueva Zelandia; y Grevilleoideae, la que habita predominantemente en Australia. Sin embargo, alrededor de 90 especies son encontradas en Sudamérica, 80 especies habitan el oeste de las islas de Nueva Guinea, 45 especies Nueva Caledonia y unas pocas especies se encuentran en Madagascar, Sudeste de Asia y Nueva Zelandia (Rabelo, 1995).

La familia Proteaceae está dividida en 14 géneros, de los cuales siete son de importancia comercial. Éstos son: *Protea*, *Leucospermum*, *Leucadendron*, *Serruria*, *Aulax*, *Mimetes* y *Paranomus* (Indap, 2001).

Los países productores más importantes de proteas son Sudáfrica y Australia; sin embargo, se ha incrementado el cultivo comercial en otros países tales como Nueva Zelandia, Estados Unidos (en la costa sur de California y en parte de Hawaii), Israel, Isla Norfolk, Islas Canarias y Zimbabwe (Matthews, 2002).

Algunos de los principales mercados para flores de protea son Japón, Norteamérica y Europa. Todos ellos, sin excepción, demandan perfecta calidad de las flores, es decir, tallos derechos de máxima longitud, flores o brácteas sin defecto, que se encuentren en la etapa correcta del desarrollo para su comercialización y calidad duradera (Matthews, 2002).

Las proteas se han adaptado bien a los ambientes con condiciones severas, es decir, muy áridos y pobres en nutrientes. Se desarrollan bien en suelos pedregosos, con gravas y arenosos así como también en suelos con limo y arcilla. La mayoría de estas plantas prefiere suelos con pH ácido entre 3,5 - 6,5 (Matthews, 2002).

Por el hecho de habitar zonas áridas las hojas de las proteas son esclerófilas, lo que les permite prevenir la pérdida de agua. Además su tejido densamente lignificado detiene el colapso cuando este elemento es escaso (Rabelo, 1995).

#### 2.1.1. *Leucadendron* 'Safari Sunset'

Corresponde al *Leucadendron* de flor de corte más exitoso, siendo ampliamente cultivado en varios países con fines de exportación. Es considerada una de las variedades de mayor colorido, habiendo sido desarrollada a inicios de la década de los 60 en Nueva Zelanda (Matthews, 2002).

Proviene de un cruzamiento entre *Leucadendron salignum*, como forma roja femenina y *Leucadendron laureolum* (Salinger, 1991; Matthews, 2002). Es una planta hembra, muy vigorosa, de rápido desarrollo y hábito de crecimiento de tipo arbustivo. Una característica destacada es el largo de las ramas, las cuales sobrepasan los 60 cm (Tjia, 1987). Puede llegar a medir de dos a tres metros de altura (Matthews, 2002).

Las brácteas se expanden desde finales de invierno a inicios de primavera y permiten ver una flor interior (Matthews, 2002). El color rojo intenso de las brácteas, la longitud de sus tallos y su prolongada vida postcosecha, hacen que este híbrido sea el favorito de los productores de flores de corte (Matthews, 2002).

Las series de suelo bien drenadas son aptas para el cultivo de esta variedad, pero el cultivo a pleno sol es esencial para obtener el máximo colorido de las brácteas. Es moderadamente resistente a las heladas, tolerando alrededor de -6°C (Matthews, 2002).

#### 2.2. Importancia de las enfermedades en Proteáceas

Existe una alta demanda en el mercado internacional por las flores nativas de Sudáfrica. Sin embargo, la presencia de hongos patógenos en las flores de corte provoca el rechazo de los lotes exportados, además de causar pérdida de plantas y reducción en el rendimiento. Así el

control de enfermedades es uno de los factores más importantes en la producción por lo que este aspecto debe recibir especial atención (Lubbe, 2001).

Los problemas patológicos en proteas son difíciles de manejar en Sudáfrica, debido a que los microorganismos están bien adaptados al ambiente donde se realizan las plantaciones. Por lo anterior, las enfermedades constituyen una amenaza mayor con respecto a otras zonas de cultivo (Lubbe, 2001).

Las enfermedades normalmente se manifiestan bajo condiciones de alta humedad, durante el periodo de crecimiento activo y formación de la flor. Este es el periodo crítico durante el cual las plantas están particularmente susceptibles a microorganismos (Lubbe, 2001).

Es importante conocer cuáles enfermedades pueden infectar un cultivar, además de tener claro las condiciones climáticas que favorecen el desarrollo de cada patología en particular (Lubbe, 2001).

Según Lubbe (2001), las enfermedades más importantes de las proteas en Sudáfrica pueden ser agrupadas en:

- Enfermedades de las raíces
- Enfermedades del tallo
- Enfermedades foliares
- Enfermedades de postcosecha

Existen principalmente tres hongos del suelo que afectan a las Proteáceas. Estos son *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. Los dos últimos operan en el nivel superficial del suelo y son ocasionalmente un problema para plantas establecidas (Harré, 1995).

Según Moura *et al.* (2001), las enfermedades fungosas que atacan la raíz y la zona del cuello, en la Isla de Madeira, son mucho más serias, considerando sus efectos sobre el crecimiento de las proteas. Así cuando los hongos presentes en el suelo son *Rosellinia necatrix*, *Armillaria* sp. o *Phytophthora* sp. la muerte de la planta es segura. Como no existe un tratamiento fungicida efectivo, pueden ser implementadas sólo medidas de prevención y erradicación. También el uso reciente de camellones y el mejoramiento del drenaje del suelo

han permitido condiciones del suelo menos favorables para el desarrollo de estos microorganismos fitopatógenos.

#### 2.2.1. Antecedentes de *Fusarium* spp. en Proteáceas

Constituye un patógeno de reciente determinación en el género *Protea* en Sudáfrica y Zimbabwe. Diversos cultivares, tales como 'Sylvia', 'Sneyd', 'Cardinal', 'Susara', 'Venus', 'Pink Ice' y especies de *Protea* tales como: *Protea aristata*, *Protea compacta*, *Protea cynaroides*, *Protea eximia*, *Protea magnifica*, *Protea repens* y *Protea susannae* son susceptibles. El patógeno fue aislado desde las raíces, cuello y tejido vascular e identificado como *Fusarium oxysporum* Schelecht (Swart *et al.*, 1999).

De acuerdo a Ben - Jaacob (1986), en Israel fueron aislados desde *Proteas* y *Banksia* *Fusarium* sp., *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani*.

Moura *et al.* (2001), identificaron en la Isla de Madeira *Fusarium* sp. en las siguientes especies de proteas: *Protea cynaroides*, *Protea* 'Red Baron', *Protea* 'Fiery Duchess', *Leucadendron* spp., *Leucadendron* 'Safari Sunset', *Leucospermum* spp., *Leucospermum* 'Succession II', *Leucospermum cordifolium*. Además se identificó *Fusarium solani* en *Leucospermum* spp., *Protea cynaroides*, *Leucadendron* 'Safari Sunset', *Leucadendron* 'Inca Gold', encontrándose también *Fusarium equiseti* en *Leucospermum* spp. Los aislamientos fueron hechos desde tejidos de la raíz y el cuello de las plantas enfermas.

En Australia Dunne *et al.* (2003), concluyeron que *Phytophthora cinnamomi* es el principal agente causal de la enfermedad comúnmente llamada 'Muerte Súbita', que afecta a las proteas en el Oeste de Australia, sin embargo se descubrió que otros hongos e insectos también son la causa de esta patología. Entre los hongos identificados, se encontró una especie de *Fusarium*, el cual fue aislado desde tallos de plantas de *Leucadendron* enfermas y se mostró particularmente agresivo. Posteriormente éste se utilizó para realizar pruebas de patogenicidad, las que resultaron positivas.

### 2.3. Descripción de *Fusarium* sp.

El género *Fusarium* es causante de marchitamientos vasculares en un gran número de especies vegetales, específicamente en flores y hortalizas anuales (Agrios, 1996). Constituye un problema serio, el cual afecta el rendimiento de las plantas provocando la obstrucción del flujo normal de agua y nutrientes, a través de los haces vasculares, los que se necrosan por acción del hongo. Pertenecen a este género aproximadamente 40 especies y de éstas, más de la mitad es patogénica. El éxito de este hongo se puede atribuir a su amplio espectro de acción (Price, 1982). Booth (1971), citado por Price en 1982, enumeró 43 especies de *Fusarium*, las cuales pueden dividirse en cuatro grupos principales:

- Patógenos de las plantas (incluyendo micoparásitos)
- Patógenos de insectos
- Saprófitos
- Habitantes del suelo

Existen especies que están en más de un grupo, atacando plantas e insectos, o viviendo activamente lejos de su hospedero; de estos 43, unos 27 son patogénicos para las plantas e incluso algunos están entre los patógenos más serios de la agricultura mundial, debido a que su efecto en los rendimientos potenciales de las cosechas es enorme (Price, 1982).

Este patógeno produce tres tipos de esporas asexuales: microconidias, macroconidias y clamidosporas. Las primeras están compuestas por una o dos células, siendo éstas las que el hongo produce con mayor frecuencia y abundancia en todas las condiciones. Además, son las únicas que produce el patógeno al interior de los vasos xilemáticos de plantas hospederas que ha infectado y que actuarían como inóculo secundario. Las macroconidias son las esporas típicas de *Fusarium* sp. y están constituidas por tres a cinco células, las que se elongan gradualmente curvándose hacia ambos extremos. Con frecuencia aparecen sobre la superficie

de plantas que han sido destruidas por el patógeno. El tercer tipo de esporas que desarrolla este patógeno son las clamidosporas, que corresponden a estructuras de resistencia constituidas por una a dos células. Los tres tipos de esporas pueden ser encontrados, tanto en el suelo, como en cultivo *in vitro* del hongo (Agrios, 1996).

*Fusarium* sp. es un hongo habitante del suelo que infecta a las plantas a través de las raíces, penetrando en forma directa o por heridas. El micelio y las esporas ascienden a través de los vasos xilemáticos por la corriente transpiratoria (Agrios, 1996). Es un organismo saprófito que puede permanecer en el suelo por tiempo indefinido; se propaga principalmente como micelio, esporas o clamidosporas a través del agua de riego, el equipo agrícola, estructuras vegetativas y semillas de algunas plantas (Agrios, 1996).

La mayoría de las enfermedades causadas por *Fusarium* sp. son difíciles de controlar, ya que sólo una infección provocada por una espora es suficiente para introducir al patógeno en la planta, donde se desarrolla y propaga (Agrios, 1996).

### 2.3.1. Sintomatología

Los primeros síntomas de la enfermedad en proteas, se hacen visibles como necrosis en las hojas y marchitamiento de los brotes jóvenes. Al hacer un corte longitudinal en el tallo se puede ver que el tejido vascular está decolorado y obstruido, causando la muerte del brote y luego de la planta (Lubbe, 2001).

Adicionalmente, se desarrolla un oscurecimiento en secciones irregulares sobre las hojas, las cuales se unen provocando la muerte de éstas. Las hojas no se vuelven cloróticas y flácidas, sino que se observan rígidas y secas después de la necrosis, permaneciendo sujetas al tallo mucho tiempo después de la muerte de la planta. Posterior a la necrosis, se observa una lesión oscura a un lado del tallo, que se extiende desde la raíz hacia la parte aérea de la planta. El área decolorada en la superficie del tallo, se relaciona con una decoloración vascular dentro del mismo. La lesión se extiende desde la corteza al floema y tejido xilemático (Swart *et al.*, 1999).



La marchitez causada por *Fusarium* sp. en proteas tiene implicancias económicas en la producción del cultivo, debido a que la planta y los brotes resultan muertos luego de ser infectados, observándose además una reducción en el número de flores producidas por planta (Swart *et al.*, 1999).

### 2.3.2. Ciclo biológico

El hongo sobrevive en el suelo como micelio de una estación a otra en restos vegetales o en todas sus formas conidiales, especialmente clamidosporas (Agrios, 1996; Latorre, 1992). Se propaga a cortas distancias a través del agua o maquinaria agrícola contaminada y su propagación a grandes distancias ocurre principalmente en transplantes o material vegetativo infectado (Agrios, 1996).

Al establecer plantas sanas en suelo contaminado, los tubos germinales de las esporas o el micelio penetran directamente en las puntas de las raíces o ingresan a través de heridas. El micelio del patógeno se propaga intercelularmente a través de la corteza de la raíz y cuando llega a los vasos xilemáticos, entra a través de las punteaduras. Se mantiene sólo en los haces vasculares y viaja a través de ellos, principalmente en sentido ascendente, hacia el tallo y corona de la planta. Cuando llega a los vasos, el micelio se ramifica y produce microconidias que se desprenden y son llevadas hacia la parte superior de la planta. Éstas germinan donde finaliza su movimiento ascendente. Posteriormente, penetra la pared superior del vaso y el patógeno produce más microconidias en el vaso siguiente (Agrios, 1996).

El patógeno causa marchitez y bloquea el tejido vascular de la planta, impidiendo el paso del agua y nutrientes hacia la parte aérea. La infección de las raíces es favorecida por temperaturas cálidas del suelo (28°C y más) y por condiciones de humedad. Las condiciones climáticas encontradas en la región de verano lluvioso en Sudáfrica, son favorables para la infección y desarrollo del hongo. Sin embargo la enfermedad también se manifiesta en la región de invierno lluvioso (Lubbe, 2001).

### 2.3.3. Alternativas de control

No existe un control efectivo para detener la muerte de la planta después que la infección ha tenido lugar. Así, el control se basa en la prevención (Lubbe, 2001).

La desinfección de los suelos con fumigantes o aspersión con desinfectantes antes de la plantación y posteriormente un control regular, suprimirán los hongos en el suelo y protegerán a las plantas contra una infección (Lubbe, 2001). El mejor método de prevención puede ser el uso de material vegetal tolerante o resistente (Beckman, 1987; Agrios, 1996; Lubbe, 2001).

El material infectado debe ser retirado rápidamente, cuando es detectado. Las plantas infectadas y sus raíces pueden ser sacadas cuidadosamente del lugar en bolsas plásticas y luego deben quemarse, para impedir la diseminación de las esporas presentes en el suelo y raíces infectadas (Lubbe, 2001).

Tradicionalmente se ha fumigado el suelo previo a la plantación con Bromuro de Metilo, medida que esta siendo abandonada, debido a la toxicidad del producto y el daño ambiental que éste causa, por lo tanto será retirado del mercado en los próximos años (Larkin y Fravel, 1998).

Un producto químico que es habitualmente utilizado para controlar *Fusarium* sp., es benomilo el cual ha sido efectivo, debido a que es un fungicida sistémico (Besoain, 1989; Carrillo, 1992).

Otra medida para reducir la cantidad de inóculo en el suelo es mediante la pasteurización del mismo con vapor de agua, pero se produce una rápida recolonización con microorganismos (Beckman, 1987). Actualmente en ciertas regiones climáticas específicas se utiliza el método de solarización (Beckman, 1987).

El uso de biocontroladores es una alternativa interesante que ha sido investigada. Numerosos microorganismos han demostrado ser efectivos en el control de varios hongos del suelo incluyendo a *Fusarium* spp. (Larkin y Fravel, 1998). Entre los controladores biológicos estudiados, cabe mencionar a *Trichoderma harzianum*, el cual disminuyó la incidencia de

*Fusarium* sp. bajo condiciones de campo en dos periodos consecutivos de producción en tomate (Sivan *et al.*, 1987).

#### 2.4. Características de los fungicidas benzimidazoles

Los fungicidas pertenecientes a este grupo son sistémicos, por lo anterior se ve aumentada la posibilidad de control químico de numerosas enfermedades causadas por hongos Ascomycetes. A partir de estudios bioquímicos se estableció el modo de acción de estos fungicidas, los cuales inhiben el ensamble de los microtúbulos y con ello impiden el proceso de división celular (Davidsed, 1982, citado por Besoain 1989).

Este grupo de fungicidas tienen poco efecto inhibitorio en la germinación de esporas de hongos sensibles, pero dependiendo de la concentración y del medio de cultivo, alteran el desarrollo del tubo germinativo, la multiplicación celular e inhiben fuertemente el crecimiento de las hifas y de los haustorios de los hongos sensibles (Erwin, 1973; Hammerschlag y Sisler, 1973, citado por Besoain, 1989).

Los fungicidas sistémicos deben poseer diversas propiedades, siendo una de ellas el tener toxicidad selectiva, es decir no ser tóxicos a las células de la planta, pero si al hongo patógeno (Carrillo, 1992).

El movimiento de los fungicidas sistémicos en la planta es principalmente acropétalo, a través de la transpiración. Sin embargo, algunos pueden moverse con los compuestos formados por la planta y esto ocurre cuando existe flujo de compuestos hacia la base de ésta (Carrillo, 1992).

Las concentraciones comercialmente activas son bajas, sin embargo son suficientes para suprimir el rápido crecimiento de muchos hongos fitopatógenos. Esto es una ventaja debido a que contribuye a la disminución de la polución ambiental (Erwin, 1982, citado por Besoain, 1989).

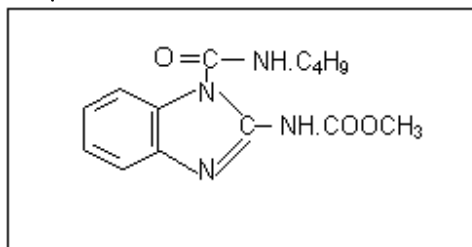
En cuanto a la absorción de estos compuestos, se ha visto que aumenta mediante el uso de humectantes. En ensayos realizados con benomilo hubo una mayor absorción translaminar usando humectantes no iónicos (Edgigton, 1981, citado por Besoain, 1989).

Las aplicaciones al suelo han sido efectivas para el control de algunas enfermedades producidas por especies de *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Macrophonima*, *Verticillium*, o *Thielaviopsis*, en cultivos anuales tales como frutillas, claveles, tomates, tabacos y otras especies (Muller *et al.*, 1972, citado por Besoain, 1989).

Una desventaja en el uso de estos productos se ha manifestado en el rápido desarrollo de poblaciones fungosas resistentes, las cuales presentan resistencia cruzada a los fungicidas del mismo grupo (Alvarez, 1989; Carreño y Pinto de Torres, 1979; Davidse, 1982, citados por Besoain).

#### 2.4.1. Benomilo

Este producto fue uno de los primeros fungicidas sistémicos conocidos. Químicamente corresponde a carbamato de metil - 1 - (butilcarbamoil) - 2 - benzimidazol (Figura 2.1.). En nuestro país se conoce con los nombres comerciales de: Benlate 50 PM, Benex 50 PM, Forlate 50 PM, Polyben 50 PM o Benotrax 50 PM. Se utiliza en Chile desde 1970 aproximadamente y ha sido de gran utilidad en el manejo de *Venturia inaequalis* en manzano y *Venturia pyrina* en peral, *Monilinia laxa* en frutales de carozo, *Botrytis cinerea*, en uva de mesa (Latorre y Bruzone, 1971, citados por Besoain, 1989).



**Figura 2.1.** Estructura química de Benomilo. Fuente: Carrillo, 1992.

Benomilo se degrada a carbendazima bajo condiciones naturales y es este último compuesto el que ejerce realmente la acción antimicótica (Erwin, 1973, citado por Besoain), ya que posee afinidad por la tubulina del hongo patógeno (Carrillo, 1992).

Debido al uso reiterado de estos fungicidas se ha propiciado el desarrollo de resistencia en los patógenos. Como una forma de retardar o prevenir la aparición de ésta, se recomienda no aplicar cantidades de fungicida mayores a las necesarias, restringir las aplicaciones sólo a los periodos críticos y alternar fungicidas con diferente mecanismo de acción (Alvarez, 1989). En los benzimidazoles la resistencia se debe a un cambio en la estructura de la cepa resistente, con lo cual el producto pierde la posibilidad de formar el enlace benzimidazol - tubulina e interferir en el proceso mitótico (Georpopoulos, 1983; Davidse, 1986, citados por Alvarez, 1989).

#### 2.5. Antecedentes de *Trichoderma* spp.

Es un hongo imperfecto que carece de estructuras de reproducción sexual. Perteneciente a los Hyphomycetes, orden Hiphales, sus esporas asexuales se forman sobre las hifas y en su interior y se encuentran expuestas libremente a la atmósfera (Agrios, 1996). Posee conidias suaves, verdes, subglobosas a cortas ovoides, con medidas de 2,4 a 3,2 x 2,2 a 2,8 µm. Sus colonias son de rápido crecimiento, con micelio compacto de blanco a verde. Comúnmente forma clamidosporas intercaladas, raramente terminales las que son globosas a elipsoidales, hialinas y de pared suave (Rifai, 1969, citado por Cook *et al.*, 1989).

Es un habitante común del suelo, es saprófito y se distribuye en todo el mundo, controlando una gran gama de fitopatógenos tales como *Armillaria mellea*, *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani*, *Chondrostereum purpureum*, *Sclerotium rolfsii*, y *Heterobasidion annosum* (Cook, 1989). El modo de acción de *Trichoderma* spp, es principalmente a través de competencia y predación. Los micelios se enrollan alrededor de las hifas del hongo presa, produciendo un estrangulamiento. Se ha observado que hifas susceptibles son penetradas siendo vacuoladas, colapsando y siendo finalmente desintegradas.

Luego el mycoparásito se alimenta de este sustrato. Además, existen ciertas razas de *Trichoderma* que son capaces de producir antibióticos, especialmente a pH bajos (Cook *et al.*, 1989).

De acuerdo a Eastburn, *et al.* (1991), los requerimientos del *Trichoderma* spp. para su establecimiento, son humedad adecuada. Específicamente, *Trichoderma harzianum* es más activo en suelos con humedad de -0.5 a -1.0 bar, un pH más bien ácido (pH 5.0) y una fuente de alimentación (materia orgánica con actividad microbiológica alta) (Dennis y Webster, 1971, citados por Cook *et al.*, 1989).

*Trichoderma* spp. se ha utilizado como controlador de enfermedades en tomate, melón y algodón (Sivan *et al.*, 1987), sin embargo el primero en demostrar el control exitoso de la pudrición de la raíz y la corona en tomates con este biocontrolador fue Marois *et al.* (1981). Se ha observado que *T. harzianum* controla en un 80 - 83% *Fusarium* en cultivos creciendo sobre suelo infectado en forma natural.

Sivan y Chet en el año 1986, citados por Sivan *et al.* (1987), demostraron la efectividad de aislamientos de cepas de *Trichoderma* en el control de *Fusarium* en algodón, melones y trigo, en condiciones naturales de suelo.

Cifuentes (2001) en Chile, determinó que *T. harzianum* cepa nativa Queule presentó una alta eficiencia protectora sobre *Fusarium solani*, con un 70% de sobrevivencia de plantas de tomate. Ésta fue siempre superior a la entregada por la formulación comercial de *T. harzianum* Trichodex, la cual alcanzó un 40% de sobrevivencia.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Ubicación del ensayo

El ensayo se llevó a cabo en el invernadero de Floricultura, ubicado en el sector sur - oriente del Campus Lircay de la Universidad de Talca. El periodo de pruebas y evaluaciones se desarrolló desde agosto de 2003 a noviembre de 2003. La temperatura mínima se registró en el mes de agosto y fue de -2°C y la máxima se registró en el mes de noviembre y fue de 35°C.

El invernadero posee techumbre simétrica; cubierto con polietileno, con lucarnas para facilitar la ventilación.

#### 3.2. Material Vegetal

Se utilizaron plantas del híbrido *Leucadendron* 'Safari Sunset', cuyas estacas se recolectaron en el mes de marzo de 2003, en la localidad de Putú, ubicada a 25 km de Constitución, provincia de Talca. Luego se enraizaron en cama caliente a una temperatura promedio de 23°C, bajo nebulización. El enraizamiento se inició el 19 de marzo de 2003 y el trasplante se efectuó el 26 de mayo de 2003. Las plantas fueron transplantadas a bolsas de polietileno de 395 cm<sup>3</sup> de capacidad, que contenían tierra de Putú. Las estacas a la fecha del trasplante presentaban una altura de 9 cm aproximadamente y en promedio dos brotes. Las plantas fueron mantenidas en el invernadero durante todo el ensayo.

#### 3.3. Obtención e identificación de *Fusarium* sp.

Las muestras de cultivo desde los que se aisló *Fusarium* sp. se obtuvieron de tallos de plantas de *Leucospermum* 'Succession II', las cuales presentaban síntomas característicos del ataque de este patógeno. La recolección de las muestras se llevó a cabo el 29 de enero de

2003, en Pichilemu, VI Región. A partir de éstas se aisló el hongo en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA).

De acuerdo a Agrios (1996), con el fin de comprobar la identidad del patógeno, se realizó una observación al microscopio de la morfología del micelio y de las esporas desarrolladas (macro y microconidias) en las colonias obtenidas. Con este propósito se colocó sobre un portaobjeto, parte del micelio, el que fue suspendido en agua destilada, situando un cubreobjeto sobre la muestra preparada, observándose en el microscopio óptico. Una vez comprobado que la morfología observada correspondía a *Fusarium* sp. se procedió a la obtención de cultivos puros. Para tal fin, el patógeno fue repicado y multiplicado en placas Petri en medio de cultivo PDA.

#### 3.4. Pruebas de patogenicidad

Con el propósito de comprobar si el hongo aislado en cultivo puro se encontraba en estado patogénico y si la planta era susceptible a dicho hongo, se realizaron pruebas de patogenicidad, inoculando cinco plantas de *Leucadendron* 'Safari Sunset' con *Fusarium* sp.

El inóculo se obtuvo desde una placa Petri, sacando con una asa trozos de micelio, los que se incorporaron a un matraz con agua destilada estéril, agitándose por un periodo prolongado para lograr el desprendimiento de las esporas del hongo. Además, se agregó Tween 20 (0,1%), al matraz, con el objetivo de separar las conidias y poder efectuar el conteo de éstas. Luego se colocó una gota de suspensión sobre un portaobjeto y se observó en el microscopio óptico la presencia de conidias.

La concentración de conidias a inocular se estimó usando una cámara de Neubauer, para lo cual se empleó 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 mm <sup>2</sup>
Partículas / µl	= conidias por microlitros (c/µl)

Posteriormente se aplicaron, con la ayuda de una jeringa estéril, 10 ml por planta del inóculo, ajustado a una concentración de 10<sup>6</sup> conidias ml<sup>-1</sup>, sobre una herida hecha con bisturí, a 1 cm por encima del cuello de las plantas. Luego éstas se cubrieron con bolsas de polietileno transparente, a las que se les hizo agujeros para facilitar el intercambio gaseoso. Las plantas inoculadas se dejaron en el invernadero a temperatura ambiente, observándose una vez a la semana el desarrollo de síntomas.

Adicionalmente se utilizaron como control cuatro plantas de *L. Safari Sunset*, las cuales no fueron inoculadas con el patógeno, pero si se les efectuó un corte con un bisturí a 1cm por encima del cuello, al igual como se hizo con aquellas plantas utilizadas en la prueba de patogenicidad.

### 3.5. Descripción del ensayo

La aplicación de los tratamientos con el biocontrolador *T. harzianum* cepa nativa Queule, se efectuó 15 días antes de la inoculación con *Fusarium* sp., el 10 de septiembre de 2003, permitiendo así un establecimiento adecuado en la zona del cuello de la planta y en el suelo del biocontrolador. Empleando un aspersor manual, se aplicaron 50 ml por planta con las siguientes concentraciones de conidias en tres tratamientos: 10<sup>7</sup> conidias ml<sup>-1</sup>; 10<sup>8</sup> conidias ml<sup>-1</sup> y 10<sup>9</sup> conidias ml<sup>-1</sup>. La aplicación fue hecha sobre el cuello de la planta, comenzando con el tratamiento de la dosis más baja, dejando escurrir la suspensión hacia el suelo de las macetas.

El tratamiento con el fungicida Benomilo (Benex 50 WP) se aplicó ocho días previos a la inoculación con *Fusarium* sp., el 16 de septiembre de 2003. Se asperjaron 50 ml por planta del

mismo modo que la aplicación de los tratamientos con *T. harzianum*. Fue utilizada una suspensión del producto de 1g L<sup>-1</sup>. Además se utilizó un tratamiento testigo el cual sólo fue inoculado con el patógeno.

Los tratamientos evaluados para determinar la efectividad de Benex 50 WP y *Trichoderma harzianum*, en el control de *Fusarium* sp. en plantas de *L. 'Safari Sunset'* se presentan a continuación en el Cuadro 3.1.

**Cuadro 3.1.** Tratamientos utilizados para evaluar el efecto preventivo de dosis comerciales de Benex 50 WP y *Trichoderma harzianum* en el control de *Fusarium* sp., bajo condiciones de invernadero en plantas de *Leucadendron 'Safari Sunset'*. Temporada 2003/2004, Talca.

Tratamientos	Dosis
Testigo	0
Benomilo (Benex 50 WP)	1g L <sup>-1</sup>
<i>T. harzianum</i>	10 <sup>7</sup> conidias ml <sup>-1</sup>
<i>T. harzianum</i>	10 <sup>8</sup> conidias ml <sup>-1</sup>
<i>T. harzianum</i>	10 <sup>9</sup> conidias ml <sup>-1</sup>

### 3.6. Inoculación con *Fusarium* sp.

La inoculación se realizó el 24 de septiembre de 2003. El patógeno fue reaislado desde las plantas utilizadas en las pruebas de patogenicidad y a partir de éste se preparo el inóculo como fue descrito anteriormente en el punto 3.4. Cada planta de *Leucadendron 'Safari Sunset'* del ensayo, fue inoculada con 10 ml de una suspensión del hongo con una concentración de 10<sup>6</sup> conidias ml<sup>-1</sup>, con la ayuda de una jeringa estéril sobre una herida hecha con bisturí a 1 cm por encima del cuello de la planta, desinfectando con alcohol al 70%, la superficie del tallo y el bisturí utilizado.

### 3.7. Evaluaciones

Se evaluó la incidencia y severidad de la enfermedad sobre plantas de *L. 'Safari Sunset'*. Para esto se realizaron tres evaluaciones, a los 30, 45 y 60 días después de inocular (DDI) el patógeno.

La incidencia de la enfermedad se expresó en porcentaje (%), utilizando la fórmula empleada por Ogawa (1986).

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

Para determinar la severidad de la enfermedad sobre las plantas, se utilizó la siguiente escala de nivel de marchitez, con sus respectivos porcentajes de hojas o brotes con síntomas por individuo:

0 = Sin marchitez	(0% )
1 = Marchitez leve	(1 - 25%)
2 = Marchitez moderada	(26 – 50%)
3 = Marchitez severa	(> 50%)

### 3.8. Diseño experimental

En este ensayo se utilizó un diseño estadístico completamente al azar (DCA), con cinco tratamientos y cuatro repeticiones por tratamiento. La unidad experimental estuvo constituida por diez plantas de *Leucadendron 'Safari Sunset'*.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un Análisis de Varianza. En el caso en que existieran diferencias significativas se utilizó el test de separación de medias Tukey, con un nivel de significancia de un 95%.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Identificación del hongo *Fusarium* sp.

Para identificar a *Fusarium* sp. se consideraron características tanto de coloración del micelio como morfológicas de los conidios. Así, el color de las colonias en PDA varió a medida que el cultivo envejecía. De esta forma, cultivos jóvenes, presentaron una tonalidad rosada pálida, mientras aquellos más envejecidos mostraron una coloración púrpura. Con relación a la forma de las conidias encontradas en el medio de cultivo PDA, se observaron formas de medialuna constituidas por tres a cinco células y otras redondas formadas por una o dos células, que corresponden a las macroconidias y microconidias del hongo, respectivamente, según lo descrito por Agrios (1996).

### 4.2. Pruebas de patogenicidad

Luego de haber transcurrido tres semanas desde la inoculación de plantas de *Leucadendron* 'Safari Sunset' con el hongo, se observaron los primeros síntomas asociados a *Fusarium* sp. en una de las cinco plantas inoculadas. Las restantes manifestaron los síntomas posteriormente, según se presenta en el Cuadro 4.1.

**Cuadro 4.1.** Resultados de las pruebas de patogenicidad efectuadas sobre cinco plantas de *L.* 'Safari Sunset', inoculadas con el hongo *Fusarium* sp., bajo condiciones de invernadero. Temporada 2003/2004, Talca.

<b>Semanas después de inoculación</b>	<b>N° de plantas enfermas</b>	<b>Incidencia (%)</b>
1	0	0
3	1	20
5	3	60
6	5	100

La sintomatología observada se manifestó inicialmente como marchitez en las puntas de las hojas jóvenes, la cual se hizo más severa a medida que pasaban los días. No se presentó clorosis en las hojas, sino que éstas se necrosaron y se mantuvieron sujetas al tallo. El marchitamiento y necrosis finalmente comprometieron al brote en su totalidad. Adicionalmente se observó un pardeamiento de los haces vasculares sobre el cuello hasta la parte superior de la planta. Posteriormente la necrosis se manifestó también en las hojas más antiguas de las plantas, produciéndose finalmente la muerte de éstas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Swart *et al.* (1999).

De las cinco plantas inoculadas todas presentaron la sintomatología antes descrita al cabo de seis semanas después de la inoculación con *Fusarium* sp., obteniendo una incidencia de la enfermedad del 100%.

Con el objetivo de verificar si los síntomas eran originados por causa del patógeno inoculado, se procedió a aislarlo desde los tallos de las plantas enfermas. De esta forma, se obtuvo nuevamente *Fusarium* sp. en medio de cultivo PDA, cumpliendo así con los postulados de Koch.

Los resultados obtenidos anteriormente indican la patogenicidad de este aislado de *Fusarium* sp. De acuerdo a esto se procedió a utilizarlo en los ensayos de evaluación de distintas alternativas de control para este patógeno.

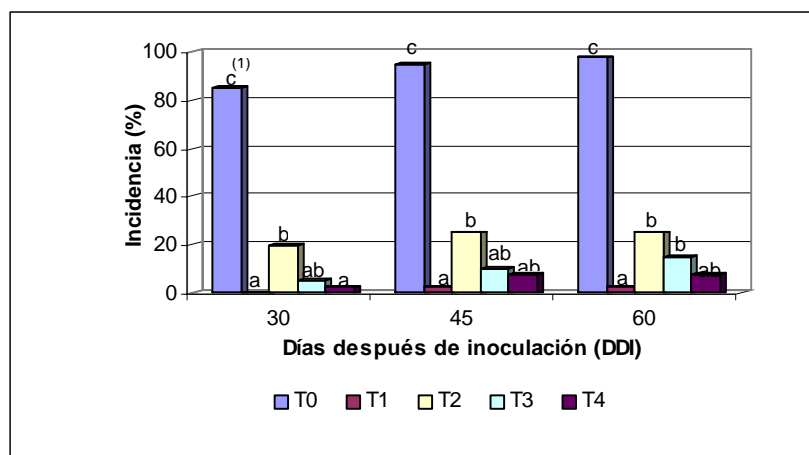
Las cuatro plantas que no se inocularon con el patógeno, no manifestaron ningún tipo de síntoma, es decir permanecieron sanas, lo que significa que el hecho de hacer una herida en la zona del cuello de las plantas, no causó marchitez.

#### 4.3. Evaluación de Benomilo y *Trichoderma harzianum* cepa nativa Queule en el control preventivo de *Fusarium* sp. en L. 'Safari Sunset'

##### 4.3.1. Incidencia de la enfermedad

Se detectaron diferencias altamente significativas ( $p \leq 0,01$ ) entre las medias de los tratamientos en las tres evaluaciones correspondientes a los 30, 45 y 60 días después de la inoculación (DDI) con el patógeno. Para cada una de las evaluaciones, las plantas tratadas con Benomilo (Benex 50 WP) presentaron significativamente ( $p \leq 0,01$ ) una menor incidencia de la enfermedad con respecto al testigo, siendo de un 0% a los 30 DDI y de un 2,5% a los 45 y 60 DDI (Figura 4.1). Por otra parte, las plantas tratadas con las concentraciones de *T. harzianum*  $10^8$  y  $10^9$  conidias  $\text{ml}^{-1}$ , alcanzaron una incidencia de la enfermedad de un 5% y un 2,5% respectivamente a los 30 DDI, no siendo estos valores significativamente distintos del tratamiento con Benomilo para esta fecha de evaluación. A los 45 DDI se observó nuevamente el comportamiento anterior, con valores de incidencia de la enfermedad para los tratamientos con *T. harzianum*  $10^8$  y  $10^9$  conidias  $\text{ml}^{-1}$  de un 10% y un 7,5% respectivamente (Figura 4.1). Al concluir las evaluaciones a los 60 DDI, sólo las plantas tratadas con la concentración mayor de *T. harzianum* ( $10^9$  conidias  $\text{ml}^{-1}$ ) no se diferenciaron significativamente de aquellas tratadas con Benomilo, con niveles de incidencia de la enfermedad de un 7,5% (Figura 4.1).

El tratamiento de menor concentración de *T. harzianum* ( $10^7$  conidias  $\text{ml}^{-1}$ ), mostró durante las tres evaluaciones diferencias estadísticas significativas respecto al tratamiento con Benomilo, observándose una incidencia promedio de la enfermedad de un 20% a los 30 DDI y de un 25% a los 45 y 60 DDI (Figura 4.1). No obstante, los valores para este parámetro en los tratamientos correspondientes a las tres concentraciones de *T. harzianum*, no difirieron estadísticamente entre sí, a los 45 y 60 DDI (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Efecto de Benomilo y de tres concentraciones de *T. harzianum*, sobre el control preventivo de *Fusarium* sp. en plantas de *L. 'Safari Sunset'*. Temporada 2003/2004, Talca.

Donde: T0: Testigo; T1: Benomilo ( $1\text{g L}^{-1}$ ); T2: *T. harzianum*  $10^7$  conidias  $\text{ml}^{-1}$ ; T3: *T. harzianum*  $10^8$  conidias  $\text{ml}^{-1}$ ; T4: *T. harzianum*  $10^9$  conidias  $\text{ml}^{-1}$ .

<sup>(1)</sup> Letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Aquellos promedios señalados con la misma letra no difieren estadísticamente según Test de Tukey (HSD) ( $p \leq 0.05$ ).

De acuerdo a los resultados se puede afirmar que bajo las condiciones de este ensayo Benomilo, y *T. harzianum* en concentración de  $10^8$  y  $10^9$  conidias  $\text{ml}^{-1}$  serían los mejores tratamientos en cuanto a control preventivo, si se consideran los resultados de incidencia de *Fusarium* sp. observados.

Estos resultados son comparables a los logrados por Cifuentes (2001), quien evaluó la efectividad de *T. harzianum* ( $10^9$  conidias  $\text{ml}^{-1}$ ) cepa nativa Queule sobre el control de *Fusarium solani* en tomate, en postinfección, obteniendo porcentajes de incidencia de la enfermedad en rangos que variaron entre un 9,2% y un 32,8% en seis mediciones efectuadas. Sin embargo se debe considerar que en aquella investigación se aplicó una dosis menor por planta del biocontrolador (10 ml), respecto a la utilizada en este ensayo (50ml). Además, la aplicación de *Trichoderma* en dicha investigación se efectuó en postinfección.

Hasta el momento en Sudáfrica (Lubbe, 2001) y Australia (Knox - Davies *et al.*, 1986), se ha utilizado Benlate (Benomilo), para controlar *Fusarium* spp. en proteas. No obstante, este fungicida propicia la aparición de resistencia en los patógenos al presentar un modo de acción

sitio - específica (Alvarez, 1989). Por lo tanto, *T. harzianum* surge como una buena alternativa para el control de este patógeno en el cultivo de esta especie en Chile y en el mundo.

Además, durante muchos años ha sido conocida la habilidad de estos hongos para incrementar la tasa de crecimiento y desarrollo de las plantas, en especial de su sistema radical. Todavía no se conocen con certeza estos mecanismos. Recientemente, se encontró que una cepa de *Trichoderma* contribuía al crecimiento en cuanto a profundidad de las raíces en maíz, haciendo a este cultivo más resistente a la sequía (Harman, 2003).

Sería interesante en el futuro efectuar nuevas investigaciones con el fin de evaluar distintas frecuencias de aplicación de *T. harzianum* y ajustar el volumen de la suspensión del biocontrolador aplicada, con el objetivo de hacer que esta alternativa de control sea económicamente sustentable para los productores de proteas. De igual forma, y de acuerdo a los resultados obtenidos por Cifuentes (2001), se hace importante evaluar *Trichoderma* en esta especie, en aplicaciones de postinfección.

#### 4.3.2. Severidad de la enfermedad

En la primera evaluación a los 30 DDI, los tratamientos con concentraciones de *T. harzianum*  $10^7$ ,  $10^8$  y  $10^9$  conidias  $\text{ml}^{-1}$  mostraron sólo plantas afectadas por la enfermedad con un índice de severidad 1, lo que equivale a una marchitez leve (Cuadro 4.2). Sin embargo el tratamiento con la menor concentración de *T. harzianum* ( $10^7$  conidias  $\text{ml}^{-1}$ ), evidenció en esta fecha de evaluación un porcentaje de plantas con este grado de severidad estadísticamente diferente, en comparación a la mayor concentración del biocontrolador y del fungicida utilizado, no obstante, no presentó diferencias estadísticas respecto al testigo. Así en este tratamiento, un 20% de las plantas afectadas por la enfermedad presentaron un índice de severidad 1. Sólo el tratamiento testigo mostró para esta fecha de evaluación plantas con índices de severidad 2.

Por otra parte a los 30 DDI no se observan diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento con Benomilo y los tratamientos con *T. harzianum* en concentraciones  $10^8$  y  $10^9$  conidias  $\text{ml}^{-1}$  para todos los índices de severidad.



**Cuadro 4.2.** Efecto de Benomilo y tres concentraciones de *T. harzianum* cepa nativa Queule en el control preventivo de *Fusarium* sp. en plantas de *L. 'Safari Sunset'*. Porcentajes (%) de plantas con distintos grados de severidad a los 30 días después de inoculación (DDI). Temporada 2003/2004, Talca.

Tratamientos	Dosis	Índice de Severidad (0 - 3)			
		0	1	2	3
Testigo	0	15 c <sup>2</sup>	40 c	45 b	0
Benomilo (Benex 50 WP)	1g L <sup>-1</sup>	100 a	0 a	0 a	0
<i>Trichoderma harzianum</i>	10 <sup>7</sup> conidias ml <sup>-1</sup>	80 b	20 bc	0 a	0
<i>Trichoderma harzianum</i>	10 <sup>8</sup> conidias ml <sup>-1</sup>	95 ab	5 ab	0 a	0
<i>Trichoderma harzianum</i>	10 <sup>9</sup> conidias ml <sup>-1</sup>	97.5 a	2.5 a	0 a	0
Significancia		** <sup>3</sup>	**	**	n.s.

<sup>1</sup> : Valores promedios de cuatro repeticiones por tratamiento. Análisis basado en datos transformados a la función  $\arcsen(\%)^{1/2}$

<sup>2</sup> : Valores seguidos por una misma letra en la columna no difieren estadísticamente según Test de Tukey (HSD) ( $p \leq 0,05$ ).

<sup>3</sup> : \*\*: Altamente significativo ( $p \leq 0,01$ ). n.s.: no existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

En la segunda evaluación realizada a los 45 DDI, todos los tratamientos presentaron plantas enfermas con índice de severidad 1. Los tratamientos con Benomilo y *T. harzianum* 10<sup>8</sup> y 10<sup>9</sup> conidias ml<sup>-1</sup> no se diferenciaron estadísticamente entre ellos, mostrando un 2,5%, 7,5% y 7,5% respectivamente de plantas con dicho grado de severidad (Cuadro 4.3). Por otra parte, el testigo y el tratamiento con *T. harzianum* (10<sup>8</sup> conidias ml<sup>-1</sup>) mostraron plantas enfermas con un índice de severidad 2. Ambos se diferenciaron significativamente en cuanto al porcentaje de plantas con este nivel de severidad (Cuadro 4.3).

Los tratamientos correspondientes a las tres concentraciones de *T. harzianum* presentaron un número de plantas con índice de severidad 1, estadísticamente igual, el que no se diferenció del testigo como se observa en el Cuadro 4.3.

Finalmente sólo en el tratamiento testigo se observaron plantas con un índice de severidad 3, correspondiendo a un 17,5% del total.

**Cuadro 4.3.** Efecto de Benomilo y tres concentraciones de *T. harzianum* cepa nativa Queule en el control preventivo de *Fusarium* sp. en plantas de *L. 'Safari Sunset'*. Porcentajes (%) de plantas con distintos grados de severidad a los 45 días después de inoculación (DDI). Temporada 2003/2004, Talca.

Tratamientos	Dosis	Índice de Severidad (0 - 3)			
		0	1	2	3
Testigo	0	15 c <sup>2</sup>	27.5 b	50 b	17.5 b
Benomilo (Benex 50 WP)	1g L <sup>-1</sup>	97.5 a	2.5 a	0 a	0 a
<i>Trichoderma harzianum</i>	10 <sup>7</sup> conidias ml <sup>-1</sup>	75 b	25 b	0 a	0 a
<i>Trichoderma harzianum</i>	10 <sup>8</sup> conidias ml <sup>-1</sup>	90 ab	7.5 ab	2.5 a	0 a
<i>Trichoderma harzianum</i>	10 <sup>9</sup> conidias ml <sup>-1</sup>	92.5 ab	7.5 ab	0 a	0 a
Significancia		** <sup>3</sup>	**	**	**

<sup>1</sup> : Valores promedios de cuatro repeticiones por tratamiento. Análisis basado en datos transformados a la función  $\arcsen(\%)^{1/2}$

<sup>2</sup> : Valores seguidos por una misma letra en una columna no difieren estadísticamente según Test de Tukey (HSD) ( $p \leq 0,05$ ).

<sup>3</sup> : \*\* : Altamente significativo ( $p \leq 0,01$ ).

En la tercera evaluación a los 60 DDI, todos los tratamientos incluyendo el testigo presentaron plantas con índice de severidad 1, cuyos porcentajes no difirieron estadísticamente entre ellos. Por otra parte, plantas con índice de severidad 2 se observaron en todos los tratamientos, excepto el con aplicación de Benomilo, en el cual los índices de severidad sólo alcanzaron el valor 1 (Cuadro 4.4). Sin embargo los tratamientos con *T. harzianum* en concentración de 10<sup>8</sup> y 10<sup>9</sup> conidias ml<sup>-1</sup>, en los que algunas plantas mostraron un índice de severidad 2, no fueron estadísticamente diferentes del tratamiento en el que se empleo el fungicida tradicional (Cuadro 4.4).

Plantas con índice de severidad 3 fueron sólo observadas en el testigo (32,5% del total) y en el tratamiento con *T. harzianum* en concentración de 10<sup>8</sup> conidias ml<sup>-1</sup> (2,5% del total) (Cuadro 4.4). Sin embargo ambos difirieron estadísticamente.

**Cuadro 4.4.** Efecto de Benomilo y tres concentraciones de *T. harzianum* cepa nativa Queule en el control preventivo de *Fusarium* sp. en plantas de *L. 'Safari Sunset'*. Porcentajes (%) de plantas con distintos grados de severidad a los 60 días después de inoculación (DDI). Temporada 2003/2004, Talca.

Tratamientos	Dosis	Índice de Severidad (0 -3)			
		0	1	2	3
Testigo	0	12.5 c <sup>2</sup>	12.5	52.5 c	32.5 b
Benomilo (Benex 50 WP)	1g L <sup>-1</sup>	97.5 a	2.5	0 a	0 a
<i>Trichoderma harzianum</i>	10 <sup>7</sup> conidias ml <sup>-1</sup>	75 b	2.5	22.5 b	0 a
<i>Trichoderma harzianum</i>	10 <sup>8</sup> conidias ml <sup>-1</sup>	85 b	5	7.5 ab	2.5 a
<i>Trichoderma harzianum</i>	10 <sup>9</sup> conidias ml <sup>-1</sup>	92.5 ab	2.5	5 a	0 a
Significancia		** <sup>3</sup>	n.s.	**	**

<sup>1</sup> : Valores promedios de cuatro repeticiones por tratamiento. Análisis basado en datos transformados a la función  $\arcsen(\%)^{1/2}$

<sup>2</sup> : Valores seguidos por una misma letra en una columna no difieren estadísticamente según Test de Tukey (HSD) ( $p \leq 0,05$ ).

<sup>3</sup> : \*\* : Altamente significativo ( $p \leq 0,01$ ). n.s.: no existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

En síntesis, para las evaluaciones de severidad realizadas a los 30 y 45 DDI, Benomilo y *T. harzianum* en concentración 10<sup>8</sup> y 10<sup>9</sup> conidias ml<sup>-1</sup> aparecen como los mejores tratamientos, ofreciendo una alta protección a las plantas con elevados porcentajes de sanidad.

Al evaluar a los 60 DDI, cuando se alcanzó en algunas plantas índices de severidad 2 y 3, las tres concentraciones del biocontrolador, aparecen como tratamientos efectivos. Sin embargo si se considera el porcentaje de plantas sanas en esta fecha de evaluación, sólo *T. harzianum* en la mayor concentración (10<sup>9</sup> conidias ml<sup>-1</sup>) no difiere estadísticamente del fungicida tradicional (Benomilo).

## 5. CONCLUSIONES

- En las pruebas de patogenicidad y en los ensayos de evaluación de alternativas de control los síntomas asociados a la presencia de *Fusarium* sp., fueron marchitez en las puntas de las hojas jóvenes, necrosis de los brotes, pardeamiento de los haces vasculares y muerte de plantas.
- El aislado de *Fusarium* sp. utilizado en este estudio resultó ser patogénico, habiéndose demostrado a través de los postulados de Koch el ser el agente causal de los síntomas observados a nivel de campo.
- De acuerdo a los resultados de incidencia observados en el ensayo, el fungicida Benomilo (Benex 50 WP) y el biocontrolador *Trichoderma harzianum* cepa nativa Queule en las concentraciones de  $10^8$  y  $10^9$  conidias  $\text{ml}^{-1}$ , aplicados en preinfección en plantas de *Leucadendron* 'Safari Sunset', bajo condiciones de invernadero son las mejores alternativas de control de *Fusarium* sp., observándose una incidencia de la enfermedad inferior a un 20%.
- Concluyendo las evaluaciones de severidad, Benomilo y *T. harzianum* en las concentraciones de  $10^8$  y  $10^9$  conidias  $\text{ml}^{-1}$ , aparecen como los mejores tratamientos para el control del patógeno, mostrando niveles de severidad de 1 o inferior, equivalentes a marchitez leve o sin marchitez.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, G. 1996. Fitopatología. 2° Edición. Madrid, Noriega Editores. 530 p.
- ALVAREZ, M. 1989. Resistencia a los fungicidas, fundamentos y aspectos prácticos. En: Latorre B. 1989. Fungicidas y nematocidas, avances y aplicabilidad. Facultad de Agronomía. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. pp 125 - 130.
- BECKMAN, C. 1987. The nature of wilt diseases of plants. Minessota, The American Phytopathological Society. 175 p.
- BEN - JAACOB, J. 1986. Protea production in Israel. Acta Horticulturae, 185: 101 - 110.
- BESOAIN, X. 1989. Benzimidazoles. En: Latorre, B. 1989. Fungicidas y nematocidas, avances y aplicabilidad. Facultad de Agronomía. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. pp 17 - 25.
- CARRILLO, R. 1992. Características de los principales grupos de fungicidas En: Curso de uso y manejo de plaguicidas. Valdivia, Chile, Universidad Austral de Chile. pp 122 - 163.
- CIFUENTES, J. 2001. Evaluación de la capacidad biocontroladora del hongo *Trichoderma harzianum* cepa nativa Queule sobre *Fusarium solani* en tomate. Memoria de título. Talca, Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Agronomía. 30 p.
- COOK, R. J.; BAKER, K. F. 1989. The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society. 2° Edition; USA. 539 p.
- DUNNE, C.; DELL, B.; HARDY, G. 2003. 'Sudden death' in proteas in the southwest of western Australia. Acta Horticulturae 602: 39 - 44.
- EASTBURN, D.; BUTLER, E. 1991. Effects of soil moisture and temperature on the saprophytic ability of *Trichoderma harzianum*. Mycologia. 83(3): 257-263.
- HARMAN, G. 2003. *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* Cornell University, Geneva, NY 14456. Disponible en: <http://www.iicasaninet.net/pub/sanveg/html/biocontrol/patogenos/trichoderma.html>

- HARRÉ, J. 1995. Protea growers handbook. Riverlea Nurseries. Fisher Print, Feilding, New Zealand, 69 p.
- KNOX - DAVIES, P.; VAN WYK, P.; MARASAS, W:F.O.1986. Diseases of proteas and their control in the South Western Cape. Acta Horticulturae, 185: 189 - 200.
- LARKIN, R.; FRAVEL, D. 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. Plant disease.82(9): 1022 - 1028.
- LATORRE, B. 1992. Enfermedades de las plantas cultivadas. 3° Edición. Santiago, Ediciones Pontificia Universidad Católica de Chile. 628 p.
- LUBBE, K. 2001. Plant protection for fynbos crops: disease management. En: ARC - Fynbos Unit. Fynbos Cultivation Course, LNR ARC, Elsenburg, South Africa.(8) 1 - 7.
- MAROIS, J; MITCHEL, D; SONODA, R. 1981. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato under field conditions. Phytopathology 57: 1262 - 1263.
- MATTHEWS, L. 2002. The protea book. A guide to cultivated Proteaceae. New Zealand. Canterbury University Press. 467p.
- INDAP. 2001. Mi Empresa Rural: Agro Informativo de la V región. 2001. Disponible en: [www.Indap.cl.indapquinta.sipre/](http://www.Indap.cl.indapquinta.sipre/)
- MOURA, M; RODRÍGUEZ, P. 2001. Fungal diseases on proteas identified in Madeira Island. Acta Horticulturae, 545: 265 - 268.
- OGAWA, J. 1986. Field test procedures for evaluation of fungicides to control *Monilinia laxa* on stone fruits. In Hickey, Kenneth (Edit). Methods for evaluating pesticides for control of plant pathogens. American Phytopathological Society press. pp. 152 - 154.
- PRICE, D. 1982. *Fusarium* and plant pathology: the reservoir of infection. En: British Mycological Society Symposium. Edited by M.O. Moss and J. E. Smith. London. pp. 71-89.
- RABELO, T. 1995. A field guide to the proteas of Southern Africa. National Botanical Institute. Sudáfrica. 345pp.
- SALINGER, P. 1991. Producción comercial de flores. 3° Edición. Zaragoza, Acribia. 371p.

- SIVAN, A., UKRO, O. AND CHET, I. 1997. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions. *Plant Disease* 71(7): 587- 592.
- SWART, L.; DENMAN, S.; LAMPRECHT, P.; CROUS P. 1999. *Fusarium* wilt: A new disease of cultivated Protea in Southern Africa. *Australasian Plant Pathology* 28(2): 156 - 161.
- TJIA, B. 1987. New crops to consider for New Zealand and Australia to enter the world market. *The International Plant Propagators Society. Combined Proceedings* 37: 166 - 171.