



UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

**EFFECTIVIDAD DE *Bacillus subtilis* Y DE UNA CEPA NATIVA
DE *Trichoderma harzianum* SOBRE LA INCIDENCIA Y
SEVERIDAD DE PUDRICIÓN GRIS (*Botrytis cinerea*) EN *Vid*
*vinífera***

MEMORIA DE TÍTULO

MARIO AMÉRICO LISBOA MINGUZZI

**TALCA – CHILE
2003**

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

**EFFECTIVIDAD DE *Bacillus subtilis* Y DE UNA CEPA NATIVA
DE *Trichoderma harzianum* SOBRE LA INCIDENCIA Y
SEVERIDAD DE PUDRICIÓN GRIS (*Botrytis cinerea*) EN *Vid vinífera***

POR

MARIO AMÉRICO LISBOA MINGUZZI

MEMORIA DE TÍTULO

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

**TALCA – CHILE
2003**

APROBACIÓN:

Profesor Guía : **Ing. Agr. M.S. Ph.D. Mauricio Lolas Caneo**
Profesor Escuela de Agronomía
Universidad de Talca

Profesor Informante : **Ing. Agr. M.S. Ph.D. Yerko Moreno Simunovic**
Profesor Escuela de Agronomía
Universidad de Talca

Fecha de Presentación de la Defensa de Memoria: 29 de septiembre de 2003.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

DIOS te doy las gracias por toda la fuerza, el apoyo y la tranquilidad que me has entregado desde siempre, ayudándome con ello a salir adelante en los momentos difíciles de mi carrera.

"Gracias Señor por estar conmigo en cada instante de mi vida"

A MI FAMILIA:

Mamita, gracias por todo el cariño y el amor que me entregas, por todo tu apoyo y comprensión, por todo lo que me has enseñado y por hacer de mi una persona de bien.

"Gracias Mamita por ser como eres"

Papá, gracias por todo tu apoyo desde siempre, por confiar en mi, por tus palabras de aliento, por todo lo que me has entregado en mi vida y por ayudarme a cumplir esta meta.

"Papá, siempre estaré orgulloso de ti"

Yayo, hermano de mi alma, gracias por todo tu apoyo incondicional, por todos tus consejos y enseñanzas, por ayudarme cada vez que estuve mal y por preocuparte siempre de mi.

"Hermano, estés donde estés, siempre estaré contigo"

A MIS PROFESORES

Agradezco a mi profesor guía Mauricio Lolas, por sus enseñanzas, por todo el apoyo que me brindo, por su disposición y comprensión y por haber confiado en mi en la realización de esta memoria.

Le agradezco también al profesor Claudio Sandoval por ayudarme en el inicio de mi memoria y por estar dispuesto siempre a darme uno que otro día más de plazo para la entrega de un adelanto de ésta. Gracias profesor por ser un amigo.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS

Gracias a mis compañeros y amigos de la generación del "97" con los cuales compartí penas y alegrías. En especial a Miguel Moraga "Moraguis", amigo con el cual hicimos las noches días cada vez que teníamos que estudiar para alguna prueba, preparación de algún trabajo o por algún mítico carrete.

Gracias a todos aquellos que de alguna u otra forma me apoyaron en esta importante e inolvidable etapa de mi vida.

Por último quiero hacer una mención especial al gran equipo de mis amores, "AGROSOCCKER", equipo con el cual participe en innumerables batallas campales.

ÍNDICE

CAPITULO I. INTRUDUCCIÓN.....	1
CAPITULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1.- Importancia de la vid.....	4
2.2.- Pudrición gris de la vid causada por <i>Botrytis cinerea</i>	4
2.2.1.- Generalidades.....	4
2.2.2.- El agente causal.....	5
2.2.3.- Rango de hospederos.....	5
2.2.4.- Epidemiología.....	5
2.2.5.- Factores predisponentes.....	11
2.2.6.- Susceptibilidad varietal.....	12
2.3.- Métodos de control.....	13
2.3.1.- Control químico.....	13
2.3.2.- Control cultural.....	15
2.3.3.- Control biológico.....	15
2.4.- Biocontroladores utilizados en el control de enfermedades tales como pudrición gris.....	18
2.4.1.- <i>Trichoderma</i> spp.....	18
2.4.2.- <i>Bacillus subtilis</i>	20
CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1.- Material vegetal.....	22
3.2.- Efectividad de biocontroladores aplicados en distintos estados fenológicos de la vid.....	22
3.2.1.- Definición del ensayo.....	22

3.2.2.- Diseño experimental.....	23
3.2.3.- Determinación de la incidencia y severidad de <i>B. cinerea</i> en los racimos.....	24
3.2.4.- Determinación del número de capas de hojas en el parronal en estudio.....	24
3.3.- Análisis de resultados.....	25
CAPITULO IV. RESULTADOS.....	26
4.1.- Determinación del número de capas de hojas en el parronal en estudio.....	26
4.2.- Efectividad de los biocontroladores <i>Trichoderma harzianum</i> cepa Queule y <i>Bacillus subtilis</i> cepa QST713 (Serenade ® WP) aplicados en distintos estados fenológicos de la vid.....	27
4.2.1.- Efecto sobre la incidencia de la enfermedad.....	27
4.2.2.- Efecto sobre la severidad de la enfermedad.....	28
CAPITULO V. DISCUSIÓN.....	31
CAPITULO VI. CONCLUSIONES.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO III

Cuadro 3.1. Tratamientos biocontroladores aplicados en distintas épocas de susceptibilidad a <i>B. cinerea</i> en vid vinífera, cv. Sauvignon Blanc, conducido en parronal. Sector Las Rastras, Talca, temporada 2002-2003.....	23
--	----

CAPÍTULO IV

Cuadro 4.1. Número de capas de hojas presentes en un parronal de uva cv. Sauvignon Blanc. La evaluación fue realizada el 31 Marzo 2003.....	26
--	----

Cuadro 4.2. Incidencia de Pudrición Gris causada por <i>Botrytis cinerea</i> en uva vinífera, cv. Sauvignon Blanc, en racimos tratados con los biocontroladores <i>Trichoderma harzianum</i> cepa Queule y <i>Bacillus subtilis</i> cepa QST713 (Serenade® WP) aplicados en distintos estados fenológicos de la vid. Temporada 2002-2003. Evaluación 17/02/03.....	27
---	----

Cuadro 4.3. Incidencia de Pudrición Gris causada por <i>Botrytis cinerea</i> en uva vinífera, cv. Sauvignon Blanc, en racimos tratados con los biocontroladores <i>Trichoderma harzianum</i> cepa Queule y <i>Bacillus subtilis</i> cepa QST713 (Serenade® WP) aplicados en distintos estados fenológicos de la vid. Temporada 2002-2003. Evaluación 04/03/03.....	28
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS.

CAPÍTULO IV.

- Figura 4.1.** Severidad de Pudrición Gris causada por *Botrytis cinerea* en uva vinífera, cv. Sauvignon Blanc, en racimos tratados con los biocontroladores *Trichoderma harzianum* cepa Queule y *Bacillus subtilis* cepa QST713 (Serenade® WP) aplicados en distintos estados fenológicos de la vid. Temporada 2002-2003. Evaluación 17/02/03..... 29
- Figura 4.2.** Severidad de Pudrición Gris causada por *Botrytis cinerea* en uva vinífera, cv. Sauvignon Blanc, en racimos tratados con los biocontroladores *Trichoderma harzianum* cepa Queule y *Bacillus subtilis* cepa QST713 (Serenade® WP) aplicados en distintos estados fenológicos de la vid. Temporada 2002-2003. Evaluación 04/03/03..... 30

RESUMEN

Para evaluar la capacidad biocontroladora de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* (Queule) y del producto comercial Serenade, cuyo ingrediente activo es *Bacillus subtilis*, sobre Pudrición gris causada por el hongo *Botrytis cinerea*, se llevó a cabo un ensayo con plantas de vid cv. Sauvignon Blanc, conducidas en parrón español ubicado en el sector Las Rastras, a 12 km., de la ciudad de Talca. El ensayo se realizó con un diseño experimental completamente al azar, utilizándose siete tratamientos con ocho repeticiones cada uno. Cada unidad experimental constó de 6 plantas, las cuales fueron asperjadas en los estados susceptibles de floración, apriete y/o pinta con: *Trichoderma harzianum* cepa nativa Queule (Proyecto FIA-UTALCA) y Serenade® WP (Moviagro S.A.), a una dosis de 1L/ha (a una concentración de 10^6 conidias por ml) y 5 kg/ha, respectivamente. Las evaluaciones realizadas correspondieron a incidencia y grados de severidad de *B. cinerea* en 15 racimos seleccionados al azar en cada unidad experimental. Además, se registró el número de capas de hojas para cada una de las repeticiones, de manera de correlacionar este factor con la incidencia de pudrición gris. Los resultados obtenidos mostraron que la incidencia alcanzada por los racimos de las plantas testigo fue de un 35%, con grados de severidad que fluctuaron entre 1 y 4, correspondiendo a racimo sano sin síntomas de pudrición gris y con hasta un 75% de bayas del racimo infectadas con el hongo. Los tratamientos con la cepa nativa Queule de *Trichoderma harzianum* y el biofungicida Serenade presentaron una incidencia de la enfermedad significativamente menor ($P=0,0002$), a la presentada por los racimos testigo. Estos valores fluctuaron entre 11,7 y 23,3% tanto para una, dos o tres aplicaciones en los estados susceptibles, no presentando diferencias significativas entre sí. Por otra parte, no existieron diferencias significativas entre el número de capas de hojas entre los distintos tratamientos, lo que indicó que el sector fue homogéneo y que este factor no contribuyó a aumentar o disminuir la incidencia de *B. cinerea* en los racimos evaluados. Lo anterior sugeriría que es posible utilizar estos biocontroladores para reducir la incidencia de *B. cinerea* en Sauvignon Blanc, y que sería necesario realizar estudios tendientes a evaluar su efectividad en reducir o eliminar infecciones latentes en floración, o complementar las aplicaciones con otras de precosecha.

ABSTRACT

To evaluate a native isolate of *Trichoderma harzianum* (Queule) and a commercial fungicide (Serenade) as control alternatives for gray mold caused by the fungi *Botrytis cinerea*, a field assay was performed in Sauvignon Blanc vineyard located in Las Rastras, Talca. The seven treatments evaluated, were arranged in a Complete Randomized Experimental Design, with eight replications. Each experimental unit (six plants) was sprayed at three different susceptible phenological stages (bloom, tight cluster and véraison) with: *Trichoderma harzianum*, isolate Queule (FIA-UTALCA project) and Serenade WP (Moviagro S.A.), using 1 L/ha (10x6 spores/ml) and 5 kg/ha respectively. Gray mold incidence and severity was evaluated in 15 clusters randomly selected from each experimental unit. Also, it was recorded the number of leaf layers for each replication to correlate this factor with the disease incidence. The results obtained showed for the treatment without application, a disease incidence of 35% and severity levels between 1 (cluster without symptoms) and 4 (cluster with 75% of infection). The treatments sprayed with *Trichoderma* and Serenade showed a disease incidence statistically lower. These values were between 11,7% and 23.3%, for one, two or three applications at the different susceptible phenological stages. There were no statistically significant differences for the number of leaf layers among the different treatments. This indicates that this factor did not affect the incidence of *Botrytis cinerea*. We can conclude from these results that it is possible to use *Trichoderma* and Serenade as biofungicides, to reduce the incidence of gray mold in Sauvignon Blanc vineyard. It seems necessary to develop further research in order to study the efficiency of these two products in reducing or eliminating latent infections which take place at bloom or complement pre-harvest treatments.

I.- INTRODUCCIÓN

El cultivo de la vid se extiende desde la Región de Atacama por el norte, a la VIII Región por el sur, con un total de 164.770 ha. Del total de éstas, 103.876 ha son para uva vinífera; 50.818 ha para uva de mesa y 10.076 ha para uva pisquera (ODEPA, 2002).

La producción agrícola ve constantemente limitados sus rendimientos y calidad final, debido al ataque de una gran diversidad de organismos fitopatógenos, fundamentalmente hongos y bacterias; los primeros, constituyen el grupo principal de agentes causales de enfermedades de las plantas (Agrios, 1997).

La pudrición gris o “botritis”, causada por el hongo *Botrytis cinerea*, es una de las enfermedades de la vid de mayor importancia en nuestro país. Desde el inicio de la viticultura nacional, la frecuencia e intensidad de los ataques, han hecho de esta enfermedad una de las más temidas. De esta forma, se ha transformado en uno de los problemas sanitarios que causa mayores pérdidas por deterioro de la uva de mesa en pre y post cosecha, así como también, en las variedades viníferas. En estas últimas, la pudrición por este hongo es causante de desnaturalización de color y la aparición de un sabor desagradable en el vino, reduciendo así su calidad (Auger, 1981).

El desarrollo de “botritis” con carácter epifítico depende de complejas interacciones entre factores ambientales y bióticos. Entre estos últimos tienen especial importancia el desarrollo estacional de la vid; la potencialidad, liberación y dispersión del inoculo de *B. cinerea*, así como también los fenómenos de penetración del hongo e infección. Sólo el buen conocimiento de estas interacciones garantizará el éxito en el control de esta enfermedad (Latorre, 1986).

La enfermedad se ha controlado por años con fungicidas aplicados varias veces en primavera y verano. Los productos utilizados pertenecen a los grupos químicos de los benzimidazoles (por ejemplo, benomilo), introducido en el mercado mundial en la década de los 60,

y a las dicarboximidazoles (tales como iprodione y vinclozolin), usadas desde fines de los años 70 principalmente en uvas viníferas, pisquera y de mesa (Morales, 1995). También se han utilizado otros fungicidas como dicloran y captan. Sin embargo, con el paso del tiempo, el control de este hongo ha resultado cada vez más problemático como consecuencia de una variada gama de factores que interactúan entre sí, dificultando el manejo de la enfermedad. Entre estos factores, destaca el desarrollo progresivo de resistencia por parte del hongo a los fungicidas tradicionales (Latorre, 1986).

En nuestro país los botriticidas más eficientes y por consiguiente más usados han sido los benzimidazoles, las dicarboximidazoles, el dicloran y el captan (Álvarez, 1989, Carreño y Álvarez, 1990). En Chile se han determinado varios casos de resistencia, principalmente a benomilo. Así por ejemplo, en 1979 se comprobó la existencia de razas del hongo resistentes a este producto en varios parronales desde la IV a la VII región. En cuanto a dicarboximidazoles, también se han encontrado razas resistentes de *B. cinerea* en distintos viñedos de la Zona Central. Además, se ha establecido que generalmente las razas resistentes a este producto también lo son a benzimidazoles (Auger y Esterio, 1997).

En los últimos años, han aparecido nuevas moléculas con actividad contra este hongo, los cuales están siendo evaluados y utilizados por la industria. Sin embargo, el uso de estos productos está limitado por las normas de tolerancia o límite máximo de residuos permitidos por los países importadores, lo que reduce las posibilidades de uso (Agrios, 1997).

A consecuencia de lo anteriormente señalado, resulta de gran interés evaluar nuevas alternativas de control, como es el uso de biocontroladores, de gran interés hoy en día. Aunque ya en 1951, se había demostrado que podría limitarse el desarrollo de *B. cinerea* mediante controladores biológicos, no fue sino hasta la década de los 70 en que se logró desarrollar el control biológico para este hongo (Abbott, 1997). Desde los primeros estudios a la fecha, se ha establecido el efecto de distintas especies de *Trichoderma* (*Trichoderma harzianum*, *T. viride*);

Gliocladium spp.; *Cladosporium* spp.; algunas bacterias, como *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* spp. y *Pseudomonas* spp., y levaduras como *Exophiala jeanselmei* y *Trichosporon pullulans* sobre *B. cinerea*. Todos ellos, tendrían una acción antagonista contra cepas del hongo en distintos cultivos (Abbott, 1997).

Por lo tanto, como objetivo general de esta investigación, se plantea determinar la efectividad de un aislado nativo de *Trichoderma harzianum* (Proyecto FIA-UTALCA) y del bíocontrolador Serenade ® WP *Bacillus subtilis* en el bíocontrol de *B. cinerea* en vides. Como objetivos específicos se señalan:

- ◆ Evaluar la incidencia y severidad de *B. cinerea* en racimos de vid cv. Sauvignon Blanc, sometido a un programa preventivo con los agentes biocontroladores en las épocas de mayor susceptibilidad.
- ◆ Determinar el número de capas de hojas del sector en estudio y relacionarlo con la mayor o menor incidencia de la pudrición.

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1.- Importancia de la vid

La vid es el cultivo frutal mas extensamente plantado en el mundo. Se desarrolla tanto en regiones templadas como tropicales, pero la mayoría de los viñedos están establecidos en zonas de climas templados (Pearson y Goheen, 1996). Chile cuenta con un total de 164.770 ha, de éstas 103.876 ha son para uva vinífera; 50.818 ha para uva de mesa y 10.076 ha para uva pisquera (ODEPA, 2002).

La vid es un cultivo que puede utilizarse con varios fines. Sus frutos fermentados se transforman en vinos y brandy. Por otra parte se consume en fresco como uva de mesa y mediante la utilización de almacenamiento en frío y gracias a la producción en ambos hemisferios se puede consumir durante todo el año. También y por secado, el fruto se convierte en pasas para consumo. Jugos no fermentados, jugo concentrado helado y conservas son otros usos comunes del fruto en diferentes mercados (Pearson y Goheen, 1996).

2.2.- Pudrición gris de la vid causada por *Botrytis cinerea*

2.2.1.- Generalidades

Las enfermedades causadas por *B. cinerea* quizá sean las más comunes y más ampliamente distribuidas de hortalizas, plantas de ornato, frutales y aún de cultivos mayores en todo el mundo. Aparecen principalmente en forma de tizones de inflorescencias y pudriciones del fruto, pero también como canchros o pudriciones del tallo, ahogamiento de plántulas, manchas foliares y como pudriciones de tubérculos, cormos, bulbos y raíces (Agrios, 1997).

2.2.2.- El agente causal

B. cinerea se incluye dentro del grupo Deuteromycota, Orden Moniliales, el cual corresponde al estado anamórfico del hongo Ascomycota *Botryotinia fuckeliana*, de rara presencia en la naturaleza. Las esporas asexuales se forman sobre las hifas del hongo que se encuentran expuestas libremente a la atmósfera (o en su interior) (Agrios, 1997). Pertenece a la Familia Moniliaceas, Genero *Botrytis*, presentando conidióforos erectos y conidias originadas en los ápices redondeados de las ramificaciones (Walker, 1965). Este fitopatógeno produce abundante micelio gris y varios conidióforos largos y ramificados que presentan células apicales redondas que portan racimos de conidias ovoides, unicelulares, incoloros o de color gris. Los conidióforos y los racimos de conidias se asemejan a un racimo de uvas. El hongo a menudo produce esclerocios irregulares, planos, duros y de color negro, que le sirven como estructura de resistencia (Agrios, 1997).

2.2.3.- Rango de hospederos

Se reconocen más de 235 hospederos de *B. cinerea*, pertenecientes a una amplia variedad de plantas cultivadas y malezas (Latorre y Vásquez, 1996), siendo la vid una de ellas.

2.2.4.- Epidemiología

Esta enfermedad reduce seriamente la cantidad y calidad de cosecha. Esta disminución de la producción puede estar asociada con la caída prematura de racimos de los pámpanos podridos o con la pérdida de jugo y la desecación de las bayas. En la producción de uva de mesa, la pérdida de calidad del fruto en el propio viñedo, el almacenamiento o durante el transporte puede ser considerable. En la producción de uva para vinificación, el daño más importante es cualitativo debido a las modificaciones de la composición química de las uvas infectadas. El hongo convierte los azúcares simples (glucosa y fructosa) en glicerol y ácido glucónico y produce enzimas que catalizan la oxidación de los compuestos fenólicos. También secreta polisacáridos como β -glucan,

que dificultan la clarificación del vino. Los vinos producidos con uvas infectadas tienen mal sabor y son frágiles y sensibles tanto a la oxidación como a la contaminación bacteriana, lo que los hace inadecuados para el envejecimiento (Bulit y Dubos, 1996)

El hongo puede atacar casi todos los órganos de la planta, y en sus diferentes estados de desarrollo, causando daños en hojas, zarcillos y sarmientos. Sin embargo, el mayor daño se produce cuando ataca el racimo antes, durante y después de la floración (Auger, 1981; Pérez, 1992; Hidalgo, 1993). Según la época en que se produzca la infección por el hongo, aparecerán diferentes síntomas en la vid (Santa María, 1982).

A principios de la primavera las yemas y los brotes jóvenes infectados se vuelven marrones, se necrosan y se secan. Al final de la primavera, y antes de la floración, aparecen en algunas hojas unas manchas necróticas grandes de contorno irregular, pardo – rojizas y que a menudo se localizan en el margen del limbo (Bulit y Dubos, 1996).

Antes de la caída de la caliptra (floración), el hongo puede invadir las inflorescencias, que se pudren o se secan y se caen. Al final de la floración, *Botrytis* se desarrolla frecuentemente en las caliptras marchitas, en los estambres y en las bayas abortadas que han quedado prendidas o retenidas en los racimos. A partir de esos puntos el hongo ataca al pedicelo o al raquis formando pequeñas manchas que al principio son marrones y luego se ponen negras. Al final del verano, esas lesiones rodean completamente el pedicelo o el raquis y las porciones del racimo que están por debajo del área necrosada se marchitan y se caen (Bulit y Dubos, 1996).

A partir de la pinta, las uvas se infectan directamente a través de la epidermis o de heridas. La podredumbre se desarrolla rápidamente en los racimos compactados en los que las uvas en maduración están muy juntas. Las uvas blancas infectadas se ponen café y las uvas negras se vuelven rojizas. Con tiempo seco, las bayas infectadas se desecan; en tiempo húmedo, tienden a agrietarse y se forma en su superficie un moho marrón grisáceo (Bulit y Dubos, 1996).

En precosecha, las pudriciones se originan a partir del inóculo (conidias) presentes en el viñedo, pero también pueden deberse a infecciones latentes que eventualmente ocurren durante floración. Comúnmente, las infecciones en las flores son asintomáticas, lo cual significa que el hongo penetra y permanece como micelio internamente en alguna parte de la flor y luego en la baya. Conjuntamente con la maduración se reactiva el micelio e inicia la pudrición del grano. Se utiliza la expresión “botritis endógena” para referirse a esta condición de micelio latente, ubicado en el interior de bayas aparentemente sanas. Teóricamente, una baya con “botritis endógena” sería fuente de inóculo suficiente para el desarrollo de “nidos” en racimos próximos a la cosecha. La presencia de “botritis endógena” se ha demostrado también en otras especies, por ejemplo en frambuesas y frutillas (Latorre, 1986).

Tardíamente en verano – otoño, ocurren ataques en los extremos de los sarmientos aún no lignificados. Estos ataques se favorecen con la presencia de heladas y de lluvias en marzo o abril y se caracterizan por el necrosamiento parcial de los extremos del sarmiento y por el desarrollo de lesiones necróticas blanquecinas en las cuales *B. cinerea* forma esclerocios de color negro que le permiten la sobrevivencia invernal (Latorre, 1986).

Los principales síntomas producidos por *B. cinerea* en vid son:

- “El tizón del racimo” que se manifiesta temprano en la temporada, en prefloración o durante la flor, y se caracteriza por un desecamiento del escobajo, especialmente en extremo terminal y en los hombros del racimo.
- Pudrición temprana, que se desarrolla en el viñedo durante el verano, sin que se hayan registrado lluvias. Las bayas infectadas de los racimos, se tornan de color café, pierden humedad, (se “apanan”) y presentan esporulación o fructificaciones del hongo en su superficie.
- “Piel suelta”, que se desarrolla inmediatamente después de las lluvias durante la cosecha. Se manifiesta con manchas de color violáceo, que luego se tornan de color pardo, en las variedades blancas y son difíciles de distinguir en las variedades tintas.

- Pudrición peduncular, que corresponde a la pudrición húmeda de color pardo grisáceo que ocurre en los brotes aún no lignificados, como consecuencia de un fuerte ataque al racimo durante y posterior a la cosecha. En estos brotes con pudrición se formaran posteriormente, durante el otoño, los cuerpos de resistencia o “esclerocios” del hongo.
- Durante la brotación, se puede manifestar un tipo de ataque poco usual de *Botrytis*, causando la pudrición basal y muerte de brotes jóvenes y de racimo, con características muy parecidas a la pudrición peduncular de post cosecha.
- “Moho gris”, que se desarrolla en las cajas de uva en almacenaje refrigerado, transporte o en mercado. El hongo invade las bayas sanas en contacto con las enfermas, produciéndose verdaderos “nidos” constituidos por el micelio del hongo que se desarrolla a baja temperatura (Auger, 1981; Álvarez, 1987; Morales, 1990).

Las condiciones ambientales, los factores predisponentes en la planta y la cantidad de inóculo del hongo presente, determinan la mayor o menor severidad de los síntomas descritos anteriormente, pudiendo presentarse todos o sólo alguno de ellos en una temporada y en un determinado viñedo o parronal (Auger, 1981).

El hongo logra sobrevivir en invierno gracias a la formación de estructuras de resistencia llamadas “esclerocios”, elementos que son de consistencia dura, color negro en su exterior y blanco en su interior. Estos esclerocios se encuentran generalmente en el suelo adheridos a material vegetal como sarmientos, pecíolos, hojas y restos de racimos. Temperaturas que fluctúan entre 11 – 15°C, días cortos y alta humedad relativa favorecen la formación de esclerocios sobre órganos no lignificados de la vid, condiciones que generalmente suceden en los meses de otoño – invierno (Santa María, 1982; Cruz, 1992; 1993).

En cualquier época del año, alrededor del 90% de los esclerocios son viables y también se puede encontrar material esporulando. De esta manera, los estados invernantes constituyen una fuente de inóculo primario extremadamente importante (Cruz, 1992; 1993). En primavera con

temperaturas entre los 18 – 23°C y con presencia de humedad relativa alta, tal como lloviznas o rocío, se produce la germinación de estos esclerocios y producción de esporas. Éstas serán diseminadas por el viento y posteriormente llegaran a tejidos susceptibles de la vid como flores y bayas en los racimos. Esto ocurre también con temperaturas entre los 13 y 15°C, siendo necesario que se presente acompañado de una humedad relativa cercana al 90% (Santa María, 1982).

B. cinerea puede penetrar directa o indirectamente la piel de una baya. La penetración directa ocurre al perforar mecánica y/o enzimáticamente la cutícula. Indirectamente penetra por heridas (daños por heladas, insectos labores culturales, etc.) o por aberturas naturales (principalmente estomas y estigmas). En ambos casos, las conidias o las hifas de *B. cinerea* deben establecer un contacto directo con algún órgano susceptible de la vid y al mismo tiempo las condiciones de humedad y de temperatura del medio deben ser favorables (Latorre, 1986).

No obstante, las bayas si no presentan heridas durante la cuaja y pinta, son menos susceptibles a la penetración de las conidias debido a que existen en su piel, sustancias que inhiben su germinación; sin embargo, durante el periodo de maduración los racimos presentan su máxima sensibilidad debido a la concentración de azúcares en los granos, base nutritiva favorecedora del desarrollo del hongo (Pérez, 1992). Las conidias deben germinar y desarrollar un tubo germinativo más un apresorio en su extremo distal, antes de iniciar la penetración propiamente tal. El apresorio corresponde a una pequeña dilatación del extremo del tubo germinativo, el cual adhiere la conidia al substrato, gracias a la secreción de sustancias mucilaginosas (posiblemente polisacáridos) (Latorre, 1986). Una vez que las conidias han germinado, se produce en el interior del órgano atacado un micelio que, después de haber destruido el tejido parasitado, sale al exterior produciendo conidióforos con conidias que al principio son de color blanco, pero al cabo de unos pocos días adquieren el color típico grisáceo que caracteriza a la enfermedad. Estas conidias producen nuevas contaminaciones a lo largo del periodo vegetativo de la vid y al llegar el otoño el hongo comienza a formar sus órganos de resistencia (esclerocios) (Pérez, 1992).

El potencial de infección dependerá de la cantidad de inóculo que exista en el viñedo, desde inicio de la brotación en primavera hasta cosecha. Según las condiciones ambientales, se producirá gran cantidad de conidias, capaces de infectar los distintos tejidos tiernos de la planta, pudiendo causar inicialmente con ello pudrición en brotes y flores y posteriormente afectar al racimo (Auger y Esterio, 1997).

En el desarrollo de *Botrytis* en uvas, se deben distinguir dos mecanismos de infección: La infección común, que corresponde a la penetración directa, a través de la cutícula de las bayas maduras por el micelio del hongo o por heridas ocasionadas por diversos agentes. Ésta ocurre durante la cosecha y post cosecha. Es frecuente observar este tipo de infección en racimos que han sido dañados por pájaros o insectos, racimos demasiado compactos y sobremaduros y, en el caso de la uva de mesa, por contaminación de envases cosecheros y/o líneas de embalaje (Auger, 1981). La infección ocurre preferentemente en determinados estadios de desarrollo estacional de la vid. De acuerdo con la experiencia recogida en los últimos años en la zona central del país, estos periodos son brotación, floración, arreglo de los racimos, pinta a cosecha, cosecha y en uva embalada. Además suelen ocurrir infecciones en sarmientos no lignificados en otoño – invierno (Latorre, 1986). La infección se produce con temperaturas óptimas de 15 – 20°C y en presencia de agua libre o con humedad relativa mayor al 90%, después de unas 15 horas (Bulit y Dubos, 1996; Álvarez, 1987).

Las conidias de *B. cinerea* son transportadas en gran número (en algunos cultivos se han registrado más de 10000 conidias/m³ de aire) por el viento a cortas o medianas distancias. De esta manera, el hongo se redistribuye eficientemente en un viñedo hasta alcanzar los tejidos susceptibles. La liberación de las conidias aparentemente se debe a un mecanismo higroscópico, el cual ocurre cada vez que existen rápidos cambios de humedad relativa en el ambiente. Sin embargo, la lluvia por un fenómeno de salpicado, parece tener también importancia tanto en la liberación como la diseminación de las conidias a cortas distancias (Latorre, 1986). Una diseminación secundaria se produce por el simple contacto de bayas enfermas y sanas. En este

caso el micelio entra en directo contacto con nuevos tejidos. La diseminación secundaria tiene gran importancia en racimos excesivamente compactados y el desarrollo de nidos de “botritis” se explicaría por este mecanismo (Latorre, 1986).

2.2.5.- Factores predisponentes

B. cinerea se adapta a las más variadas condiciones, pero necesita un mínimo de humedad, evolucionando con mayor o menor velocidad, dependiendo de las temperaturas (Álvarez, 1987; Hidalgo, 1993). La formación de esclerocios se favorece con temperaturas de 10 – 15°C, días cortos y humedad alta; condiciones que se producen en los meses de otoño e invierno. Su germinación se produce entre los 18°C y los 23°C en presencia de alta humedad (Álvarez, 1987). En cuanto a la formación de esporas, ella se produce con temperaturas entre 15 y 20° C. Sobre 22°C, la producción se detiene. Las esporas de *B. cinerea* pueden germinar dentro de un amplio rango de temperatura, entre 1 y 33°C, pero siendo el óptimo alrededor de 20 – 25°C. (Alvarez, 1987).

Para germinar, las conidias necesitan la presencia de agua libre, ya sea por rocío, lluvia o condensación, lo que permite que los tubos germinativos penetren en las plantas a través de heridas. Por lo tanto, *Botrytis* requiere de alta humedad para reproducirse e infectar, por lo que crece en forma abundante en días nublados y con llovizna, pudiendo desarrollarse tanto en presencia de luz como en oscuridad. Sin embargo, produce conidias sólo en presencia de luz (Sherf y Macnab, 1986).

En el caso de ataque a racimos, contribuye favorablemente la presencia de jugo de las bayas ocasionada por la ruptura de piel provocada por el propio hongo u otros agentes. El micelio presenta una actividad óptima alrededor de los 20°C, pero puede continuar su desarrollo hasta los 25°C para detenerse cuando las temperaturas son superiores (Álvarez, 1987).

Uno de los factores que predisponen en mayor grado el ataque de *Botrytis*, es el vigor de la planta causada principalmente por una excesiva fertilización nitrogenada, que induce a un crecimiento vegetativo exagerado. Los tejidos son más suculentos con un aumento del follaje de las parras. El exceso de humedad en el suelo, ya sea por mal manejo de los riegos o en suelos de textura pesada con alta retención de agua, influyen en el grosor de la cutícula de las bayas, las cuales presentan una piel delgada y muy susceptible al ataque del hongo (Auger, 1981).

Los daños causados por insectos, aves, labores culturales o producidos como consecuencia de lluvias o rocíos (partiduras, medias lunas) favorecen el rápido desarrollo de "botritis" tanto por facilitar la penetración como por estimular la germinación de las conidias (Latorre, 1986). Se ha comprobado también que el jugo estigmático favorece la germinación de las esporas, con lo que se tendrían mayores posibilidades que estos órganos fueran atacados. Restos de flores infectadas pueden quedar adheridas a los granos e infectarlos posteriormente (Santa María, 1982).

Regar es indispensable, pero el manejo inadecuado del agua de riego puede indirectamente favorecer el desarrollo de "botritis". En este sentido se sugiere evitar el uso de grandes caudales y los riegos muy frecuentes, especialmente durante la cosecha (Latorre, 1986).

2.2.6.- Susceptibilidad varietal

La forma y naturaleza del racimo puede aumentar o disminuir la sensibilidad de la variedad, pues algunas se caracterizan por tener racimos compactos, mientras que en otras, éste es más suelto. La piel de las bayas también puede ser resistente o frágil, según la variedad. Finalmente, otro factor importante, es la época de cosecha, estando generalmente más expuesta a pudriciones las variedades más tardías (Auger, 1981).

Entre las variedades destinadas a vinificación, cultivadas o conocidas en Chile, se pueden señalar como: muy sensibles, a Riesling, Chenin, Chardonnay, Gewurztraminer y Moscatel de Austria entre las blancas y Carignan, Petite Sirah y Zinfandel entre las tintas; entre las sensibles, se puede nombrar a Sauvignon Blanc entre las blancas y Grenache y Barbera entre las tintas; como poco sensibles, se cita a French Colombard, Semillón, Pedro Ximenez y Sylvaner entre las blancas y Pinot Noir, Merlot y Cabernet Franc entre las tintas; entre las variedades menos afectadas, se puede señalar a Moscatel de Alejandría y Torontel entre las blancas y Cabernet Sauvignon entre las tintas (Pszczolkowski, 1987).

Auger (1981), establece también que las variedades Cot y País son resistentes y solo en condiciones muy favorables para el ataque del hongo, sufren deterioros de consideración. Coombe y Dry (1992), mencionan a las variedades Ondec y Mueller – Thurgau como susceptibles.

Entre las variedades de uva de mesa más susceptibles, sobresalen Perlette y Sultanina. La variedad Ribier es atacada generalmente cuando se parten sus bayas, ya sea por ataques de oidio o por problemas de turgencia (Auger, 1981).

2.3.- Métodos de control

Actualmente, los tratamientos para el control de *B. cinerea* se realizan preventivamente, concentrándolos en los periodos de mayor riesgo, como lo son la floración (desde ruptura hasta caída de la caliptra) y el periodo comprendido entre la pinta y la cosecha (McClellan y Hewitt, 1973; Pastor, 1980; Latorre, 1986; Verhoeff, 1974; citado por Flores y Latorre, 1990).

2.3.1.- Control Químico

Frente a la planificación del control químico, se debe tener presente el problema de resistencia, tolerancia o acostumbramiento de *B. cinerea* a los fungicidas, por lo que se hace

necesario, utilizar productos con diferentes modos de acción y distintos principios activos (Santa María, 1982). Del mismo modo, los límites máximos de residuos exigidos por los países importadores de uva de mesa o por la industria vitivinícola, en conjunto con la autorización de uso del producto químico a utilizar, son factores fundamentales al momento de controlar químicamente *B. cinerea*.

Entre los posibles fungicidas a utilizar para el control de *B. cinerea*, Morales (1997) menciona a iprodione, captan, dicloran, y folpet, como fungicidas de contacto; y carbendazima y benomilo como fungicidas sistémicos. En los últimos años nuevas moléculas están siendo comercializadas en nuestro país, con un efecto botriticida importante, tales como la anilopirimidina pyrimethanil; la mezcla cyprodinil-fludioxonil, entre otras. Por otra parte, alternativas no químicas también están siendo utilizadas, donde destacan formulaciones del hongo *Trichoderma* spp. y de la bacteria *Bacillus subtilis*, en conjunto con derivados de ácidos grasos obtenidos de cítricos.

Como consecuencia de una variada gama de factores que interactúan entre sí, año tras año el control de *B. cinerea* resulta ser más problemático. Entre estos factores cabe destacar al desarrollo progresivo de resistencia a los fungicidas tradicionalmente ocupados con este fin, debido al uso intensivo de éstos y por el escaso número de fungicidas botricidas alternativos con registro en los principales mercados de exportación de las uvas chilenas (Esterio y Auger, 1997). Otro factor importante y actual lo constituyen las exigencias de mercado en donde año a año está adquiriendo mayor importancia la etiqueta de “fruta sana” o “producto orgánico”, obteniendo un mejor precio la fruta producida sin o con menor cantidad de tratamientos de agroquímicos. Esta condición de mercado se ha mantenido en aumento paralelamente al incremento de las limitaciones impuestas por los mercados (Esterio y Auger, 1997). Debido a lo anteriormente expuesto, resulta extremadamente relevante evaluar nuevas prácticas de manejo que sean un complemento del control químico de “botritis”, como también determinar la eficacia de botricidas de distinto modo de acción a los fungicidas tradicionales, y de productos orgánicos naturales, no sintéticos o de controladores biológicos (Esterio y Auger, 1997).

2.3.2.- Control cultural

Las medidas de control cultural más aconsejables de poner en práctica para evitar o disminuir el ataque de *B. cinerea* en vides son:

- No plantar variedades de racimo compacto en localidades húmedas.
- Establecer plantaciones con sistema de poda y conducción que permitan mejorar la aireación de los racimos.
- Restringir los riegos en cantidad y duración.
- Mantener un programa eficiente de control de malezas.
- Limitar el uso de fertilizantes nitrogenados.
- Evitar atrasos en las labores de arreglo de racimo.
- Recoger y destruir los racimos que presenten daños por pudrición.
- Recoger y quemar todos los restos vegetales y de poda (Auger, 1981).

La implementación de estas medidas, en conjunto con un control químico equilibrado, son la base de un control integrado eficiente de esta enfermedad.

2.3.3.- Control biológico

Una alternativa de control de los problemas fitosanitarios agrícolas que surge en los últimos años, es la factibilidad de seleccionar, utilizar y manejar a los enemigos naturales de patógenos vegetales e insectos causantes de enfermedades y plagas agrícolas. En patología vegetal el control biológico se entiende como la destrucción o inhibición total o parcial de poblaciones del patógeno por otros microorganismos (Ciampi y Silva, 1991).

La utilización de microorganismos saprófitos, especialmente seleccionados, pertenecientes a la flora de los suelos agrícolas para controlar patógenos vegetales representa una importante

herramienta de control biológico. En los últimos años, la utilización de estos microorganismos antagonistas, ha demostrado ser una alternativa factible frente al control tradicional de patógenos con productos químicos (Ciampi y Silva, 1991). El uso de estos antagonistas se basa en su promoción (ocurriendo naturalmente) y en la introducción artificial de ellos, siendo este último el más utilizado en el control biológico (Wainwright, 1992). Para *B. cinerea*, ya en 1951 se demostró que podría limitarse el desarrollo de éste mediante controladores biológicos; pero no fue sino hasta la década del 70 en que se logró desarrollar el control biológico mediante el uso de especies del hongo *Trichoderma* (Esterio y Auger, 1997).

Actualmente, el número de controladores biológicos es bastante amplio, incluyéndose entre estos a hongos, bacterias, levaduras y nemátodos, y, aunque no todos ellos han mostrado un control satisfactorio de patógenos, los resultados generados durante este tiempo han permitido dilucidar interrogantes tan importantes como la forma o modo en que los productos biológicos actúan para controlar a los microorganismos patógenos, y el efecto de su comportamiento sobre el medio ambiente (Esterio y Auger, 1997).

Para que un antagonista susceptible se convierta en un eficaz agente de control biológico, debe ser capaz de producir inóculo abundante en cualquier condición climática. Además, debe ser genéticamente estable y poseer una alta especificidad sobre el hospedero al que se quiere controlar. También debe infectar y destruir eficazmente al patógeno en un amplio rango de condiciones ambientales y ser inocuo para el medio ambiente y animales. Como condición final debe tolerar la acción de otros antagonistas (Morales, 1997).

La acción micoparásita ha sido reportada a través de muchos trabajos. Ella ha sido visualizada como crecimiento de micelio en forma de hifas alrededor del hongo hospedero, donde el micelio penetra con una acción lítica, resultando de la destrucción, desintegración, disolución o descomposición de materiales biológicos. El micoparasitismo sería un mecanismo de acción

verdadero, por sus evidencias morfológicas a través del microscopio electrónico y por sus evidencias enzimáticas en análisis en laboratorios (Morales, 1997).

Agrios (1997), señala que los mecanismos usados por los microorganismos antagonicos que afectan a las poblaciones de patógenos no siempre son claros, pero en general se pueden mencionar:

- Parasitismo directo y muerte del patógeno.
- Competencia con el patógeno por el alimento.
- Efectos tóxicos directos sobre el patógeno por medio de sustancias antibióticas liberadas por el antagonista.
- Efectos tóxicos indirectos sobre el patógeno por sustancias volátiles, como el etileno, liberadas por la actividad metabólica del organismo antagonista.

Existen algunos factores que limitan el uso de controladores biológicos como la menor competitividad con respecto al control químico; el nivel sociocultural del agricultor; la dificultad de obtener resultados positivos que se repitan año tras año y en distintas localidades; el tener un efecto relativo en el control de enfermedades policíclicas y además por la variable estabilidad en cuanto a los resultados del control por efecto de las condiciones ambientales y edáficas sobre la adaptación del microorganismo controlador (Campbell, 1989).

Los hongos poseen características que los hacen potencialmente ideales como agentes biocontroladores. Muchos de ellos, como saprofitos antagonizan a patógenos de plantas, malezas e insectos, además son fácilmente cultivables, pudiendo ser producidos económicamente en grandes cantidades, para luego liberarlos principalmente como inóculo en forma de esporas o fragmentos miceliares al medio ambiente. Los inóculos del agente germinan o crecen para producir micelio activo, los cuales pueden parasitar o inhibir el patógeno objetivo sin dañar los otros organismos. Sobreviven relativamente por largos períodos de tiempo como cuerpos inactivos, para luego germinar, crecer y controlar la población objetivo (Wainwright, 1992).

2.4.- Biocontroladores utilizados en el control de enfermedades tales como pudrición gris

2.4.1.- *Trichoderma* spp.

Este genero pertenece a la subdivisión Deuteromycotina, siendo un hongo imperfecto que carece de estructuras de reproducción sexual; se ubica en la clase Hyphomycetes, orden Hyphales y sus esporas asexuales, las cuales se forman sobre las hifas o en su interior, se encuentran expuestas libremente al ambiente (Agrios, 1997).

El genero *Trichoderma* spp. posee conidióforos erectos o arrastrados, altamente ramificados, mas o menos cónicos; al final del conidióforo las conidias se agrupan en forma de pelota. Las conidias son de distinto tamaño y forma, pueden ser subglobosas y ovoides. Comúnmente forma clamidosporas intercaladas o raramente terminales, las cuales pueden ser azules a verde (Cook y Baker, 1989).

El genero *Trichoderma* está compuesto por hongos que se encuentran presentes en forma natural en casi todos los suelos y otros hábitats del planeta. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales, son colonizadas rápidamente por estos microorganismos. Algunas cepas son componentes importantes de la rizosfera. Aparte de su facilidad para colonizar las raíces de las plantas, *Trichoderma* spp. ha desarrollado mecanismos para atacar y parasitar a otros hongos y así, aprovechar una fuente nutricional adicional. Han sido demostrados varios mecanismos con los cuales actúa este hongo como biocontrolador y como colonizador de las raíces (Harman, 2000).

Se ha demostrado que *Trichoderma* spp. es eficaz contra una amplia gama de hongos patógenos de las plantas incluyendo *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea*, *Phytophthora* spp., *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia homoeocarpa* y *Alternaria alternata*. La capacidad antagonista de *Trichoderma* spp. es conocida desde el año 1930, y se han realizado

numerosos esfuerzos para utilizarlos en el control de enfermedades de las plantas desde entonces. Sin embargo, ahora esta comenzando a ser utilizado comercialmente (Harman, 1996).

Se ha determinado que el método en que el hongo *Trichoderma* spp. controla hongos fitopatógenos es principalmente a través de competencia y predación. Los micelios se enrollan alrededor de las hifas del hongo presa, produciendo un estrangulamiento. Además se ha observado que las hifas susceptibles son penetradas, colapsando y finalmente desintegradas. Posterior a esto, el micoparásito se alimenta de este sustrato (Cook and Baker, 1989). Harman (1996), señala que *Trichoderma harzianum* protege eficazmente a: semillas con o sin tratamientos de fungicidas. Es muy importante utilizar el organismo correctamente, como también tener en cuenta que cualquier organismo de biocontrol no podrá proteger las semillas de la misma forma que los fungicidas químicos. Pero, por otro lado, el biocontrolador coloniza raíces, aumentando su masa y vigor, proporcionando con ello aumentos en la producción, lo que un fungicida químico aplicado en dosis comercial no puede hacer. Aplicaciones al césped darán lugar al establecimiento del biocontrolador en las raíces controlando con ello a *S. homoeocarpa*, *Pythium* spp., y *R. solani*. *Trichoderma harzianum* es también altamente eficaz cuando es aplicado a flores o frutos para el control de *Botrytis cinerea*.

Trichoderma spp. posee resistencia innata a la mayoría de los agroquímicos, incluyendo a los fungicidas. Sin embargo, el nivel de resistencia difiere entre cepas. Algunas líneas han sido seleccionadas o modificadas para ser resistentes a agroquímicos específicos. La mayoría de productores de cepas de *Trichoderma* spp. destinadas al control biológico poseen información relacionada con la susceptibilidad o resistencia a un amplio rango de agroquímicos (Harman, 2000).

2.4.2.- *Bacillus subtilis*

Algunas bacterias, como *Bacillus subtilis*; *Streptomyces* spp. y *Pseudomonas* spp., también son utilizadas como organismos antagonistas (Abbott, 1997).

González y Fragoso (2002), señalan que la bacteria *Bacillus subtilis* no es potencialmente patógena, no produce endotoxinas y secreta proteínas al medio, algunas de ellas con propiedades antifúngicas, como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las iturinas. Se utiliza industrialmente como insecticida y funguicida. La subtilina liberada por *Bacillus subtilis* actúa sobre la pared celular de hongos. Otras características son:

- Corresponde a una bacteria Gram positiva.
- Producen endosporas, las que son termoresistentes y también resisten a factores físicos perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos.
- Muchos bacilos producen enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuentes de carbono y donadores de electrones.
- Muchos bacilos producen antibióticos y son ejemplos de estos la bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina y circulina.
- Son fermentativas, usualmente fermentan caseína y almidón.
- Los bacilos en general crecen bien en medios sintéticos que contienen azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, etc., como las únicas fuentes de carbono y el amonio como única fuente de nitrógeno.
- Viven dentro los límites de temperatura de 55 a 70°C.
- El límite inferior de pH para el género *Bacillus* es de 2 a 3.

B. subtilis es conocido por ser antagonista de muchos hongos patógenos vegetales. Este antagonismo es logrado a través de diversos mecanismos que incluyen la competencia por nutrientes; exclusión de sitio; colonización de la bacteria en el patógeno y/o la liberación de

componentes celulares durante el crecimiento, en orden de eliminar o reducir los competidores en su medio ambiente inmediato (Butt *et al.*, 1999).

El proceso de liberación del contenido celular se cree que ha evolucionado, así el organismo protege su nicho, inhibiendo el crecimiento de los competidores y utilizando la misma fuente nutricional, e incluso posiblemente consumiendo a los competidores. Sumado al antagonismo / competencia y la liberación del contenido celular, *B. subtilis* también ha demostrado inducir la resistencia sistémica natural de la planta contra patógenos bacterianos y fungos, propiedad llamada Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) (Butt *et al.*, 1999).

El tratamiento de semillas como los cereales, maíz dulce y zanahorias con suspensiones acuosas, pastas o polvos que contienen a las bacterias *B. subtilis* cepa A13, han protegido a las plantas contra los patógenos de la raíz y ha dado como resultado un mejor crecimiento y producción de esos cultivos (Agrios, 1997). Cuando varias clases de frutos de hueso, es decir, duraznos, nectarinas, albaricoques y ciruelos; fueron tratados, después de haber sido cosechados, con suspensiones de la bacteria antagonica *B. subtilis*, permanecieron libres de la pudrición café causada por el hongo *Monilinia fructicola*, cuando menos durante nueve días (Agrios, 1997).

Finalmente, en nuestro país se comercializa una formulación de la cepa QST713 de *Bacillus subtilis* bajo el nombre de Serenade ® WP (Moviagro S.A.), la cual ha sido recomendada para el control de *B. cinerea* en vides.

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Material vegetal

La investigación se llevó a cabo durante la temporada 2002/2003, en donde se usó como material vegetal, vides de la variedad Sauvignon Blanc, pertenecientes al fundo San Vicente ubicado en el sector Las Rastras, a 12 km de la ciudad de Talca. Las plantas estaban formadas en parronal, con una distancia de plantación de 4 m entre hilera y 4 m sobre ésta. El sector en estudio, ha presentado durante los últimos años un historial importante de infecciones por *B. cinerea* en los racimos (Leonardo Caris, Administrador, Comunicación Personal, 2002), motivo por el cual fue seleccionado para realizar el ensayo.

3.2.- Efectividad de biocontroladores aplicados en distintos estados fenológicos de la vid

3.2.1.- Definición del ensayo

Para evaluar el efecto de los biocontroladores *Trichoderma harzianum* cepa nativa Queule (Proyecto FIA-UTALCA) y de la cepa QST713 de *Bacillus subtilis* (Serenade® WP, Moviagro S.A.), se llevaron a cabo pulverizaciones en tres estados fenológicos definidos como críticos en la infección de *B. cinerea* en vid vinífera: 1) 80% flor (03-12-2002); 2) apriete de racimo (03-01-2003) y 3) pinta (29-01-2003). Las aplicaciones se realizaron con un pulverizador (marca Lévera), con capacidad de 2000L, donde se utilizaron diferentes volúmenes de agua de acuerdo a los estados fenológicos señalados anteriormente: 1) 1000 L/ha en 80% flor; 2) 1200 L/ha en apriete de racimo; y 3) 1200 L/ha en pinta. Las dosis utilizadas fueron de 1 L/ha para *T. harzianum* cepa nativa Queule (a una concentración de 10^6 conidias por ml) y de 5 Kg/ha de Serenade® WP (Moviagro S.A.).

3.2.2.- Diseño experimental

El ensayo se realizó con un diseño experimental completamente al azar, donde cada tratamiento tuvo ocho repeticiones. Cada una de éstas estuvo formada por 6 plantas, marcándose 15 racimos al azar para realizar las evaluaciones.

Los tratamientos evaluados se presentan en el Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1 Tratamientos biocontroladores aplicados en distintas épocas de susceptibilidad a *B. cinerea* en vid vinífera, cv. Sauvignon Blanc, conducido en parronal. Sector Las Rastras, Talca, temporada 2002-2003.

Tratamientos	Producto	i. a.	Dosis (L, Kg/ha)	Época de aplicación
1	a) <i>Trichoderma</i> b) ----- c) -----	<i>Trichoderma harzianum</i>	a) 1 L b) ---- c) ----	a) 80% flor b) c)
2	a) <i>Trichoderma</i> b) <i>Trichoderma</i> c)	<i>Trichoderma harzianum</i>	a) 1 L b) 1 L c) ----	a) 80% flor b) apriete c)
3	a) <i>Trichoderma</i> b) <i>Trichoderma</i> c) <i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	a) 1 L b) 1 L c) 1 L	a) 80% flor b) apriete c) pinta
4	a) Serenade® WP b) ----- c) -----	<i>Bacillus subtilis</i>	a) 5 Kg b) ---- c) ----	a) 80% flor b) c)
5	a) Serenade® WP b) Serenade® WP c) -----	<i>Bacillus subtilis</i>	a) 5 Kg b) 5 Kg c) ----	a) 80% flor b) apriete c)
6	a) Serenade® WP b) Serenade® WP c) Serenade® WP	<i>Bacillus subtilis</i>	a) 5 Kg b) 5 Kg c) 5 Kg	a) 80% flor b) apriete c) pinta
7	Testigo	----	a) ---- b) ---- c) ----	a) b) c)

3.2.3.- Determinación de la incidencia y severidad de *B. cinerea* en los racimos

Las evaluaciones se realizaron a partir de los primeros síntomas observados en el tratamiento testigo. Posteriormente se fue evaluando a medida que los estados fenológicos fueron avanzando, siendo la cosecha el último estado registrado. La incidencia de racimos enfermos se determinó sobre la base del número de racimos con síntomas de pudrición gris con relación al total de racimos evaluados de cada repetición (15), siguiendo la ecuación siguiente:

$$\text{Incidencia} = \frac{\text{Número de racimos enfermos por repetición}}{\text{Número de racimos totales por repetición}} \times 100$$

La severidad se determinó sobre la base de distintos grados de infección en los racimos enfermos, de acuerdo a la siguiente escala:

- 1.- Racimo sano, sin síntomas de pudrición gris
- 2.- 1-25% de las bayas del racimo con síntomas de pudrición gris
- 3.- 26-50% de las bayas del racimo con síntomas de pudrición gris
- 4.- 51-75% de las bayas del racimo con síntomas de pudrición gris
- 5.- 76-100% de las bayas del racimo con síntomas de pudrición gris

3.2.4- Determinación del número de capas de hojas en el parronal en estudio

Se midió el número de capas de hojas de la zona de los racimos para cada una de las repeticiones del ensayo. Este se realizó a través del método del cuadrante propuesto por Smart y Robinson (1991), el cual a través de una varilla metálica se simula la trayectoria de un haz de luz, registrándose el número de capas de hojas presentes a su paso. Los datos obtenidos fueron usados para determinar el grado de homogeneidad de la cubierta vegetal en las distintas repeticiones y, en caso de existir diferencias, relacionar la incidencia y severidad de la pudrición de racimos por *B. cinerea* con la expresión vegetativa del parronal.

3.3.- Análisis de resultados

Para la incidencia de racimos podridos por *B. cinerea*, los datos en porcentaje fueron transformados a valores angulares, utilizando la fórmula $(\arcsen(\%)^{1/2})$, para asegurar homogeneidad en las varianzas. Luego, éstos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) y en caso de existir diferencias significativas se realizó una separación de medias, mediante el test HSD ($P \leq 0,05$). Del mismo modo, los grados de severidad de la pudrición asignados para cada racimo, fueron sometidos al test estadístico no-paramétrico Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$). Los valores del número de capas de hojas fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) y en caso de existir diferencias significativas se realizó una separación de medias, mediante el Test HSD ($P \leq 0,05$).

IV. Resultados

4.1.- Determinación del número de capas de hojas en el parronal en estudio

Los resultados del número de capas de hojas, determinadas por el método de Smart y Robinson (1991), de cada repetición de los tratamientos en el parronal, muestran que no existen diferencias significativas entre ellos. Los valores oscilaron entre 1 y 1,3 capas de hoja, tal como se presenta en el Cuadro 4.1.

Cuadro 4.1. Número de capas de hojas presentes en un parronal de uva cv. Sauvignon Blanc. La evaluación fue realizada el 31 Marzo 2003.

Tratamientos	N° de capas de hojas ¹
T1 Trichoderma 80% flor	1,3
T2 Trichoderma 80% flor y apriete	1,2
T3 Trichoderma 80% flor, apriete y pinta	1,2
T4 Serenade 80% flor	1
T5 Serenade 80% flor y apriete	1,1
T6 Serenade 80% flor, apriete y pinta	1,3
T7 Testigo	1,2
Significancia	n.s.

¹ Promedio de capas de hoja por tratamiento.
n.s = no significativo.

4.2.- Efectividad de los biocontroladores *Trichoderma harzianum* cepa Queule y *Bacillus subtilis* cepa QST713 (Serenade® WP) aplicados en distintos estados fenológicos de la vid

4.2.1.- Efecto sobre la incidencia de la enfermedad

Los Cuadros 4.2 y 4.3 presentan los resultados en incidencia de racimos con pudrición gris en plantas de vid cv. Sauvignon Blanc en dos fechas de evaluación, respectivamente. En la primera evaluación del viñedo en estudio que correspondió a tres semanas antes de cosecha (17/02/03), se registró un 17,5% de racimos con pudrición gris en el tratamiento testigo (T7). El ANDEVA realizado indicó que existieron diferencias altamente significativas ($P < 0, 01$) entre los tratamientos, presentando los biocontroladores aplicados en floración, apriete y/o pinta una incidencia significativamente menor a la del testigo. Es así como la incidencia presentada por éstos, fluctuó entre un 1,7 y 4,2% de racimos con pudrición gris. No existieron diferencias significativas entre los biocontroladores usados y el número de aplicaciones efectuadas (Cuadro 4.2)

Cuadro 4.2. Incidencia de Pudrición Gris causada por *Botrytis cinerea* en uva vinífera, cv. Sauvignon Blanc, en racimos tratados con los biocontroladores *Trichoderma harzianum* cepa Queule y *Bacillus subtilis* cepa QST713 (Serenade® WP) aplicados en distintos estados fenológicos de la vid. Temporada 2002-2003. Evaluación 17/02/03

Tratamientos	Incidencia %
T1 <i>Trichoderma</i> 80% flor	4,2 a ¹
T2 <i>Trichoderma</i> 80% flor y apriete	3,4 a
T3 <i>Trichoderma</i> 80% flor, apriete y pinta	1,7 a
T4 Serenade 80% flor	1,7 a
T5 Serenade 80% flor y apriete	1,7 a
T6 Serenade 80% flor, apriete y pinta	4,2 a
T7 Testigo	17,5 b
Significancia	**2

¹ Tratamientos seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas, según Test HSD

² ** Altamente significativo ($P < 0, 01$)

En la segunda evaluación se registró un 35% de incidencia de pudrición gris en los racimos del tratamiento testigo días antes de cosecha. Dos (T2) o tres aplicaciones de *Trichoderma* (T3), al igual que una (T4), dos (T5) o tres (T6) aplicaciones de Serenade en 80% flor, apriete y pinta fueron efectivos en reducir significativamente ($P = 0,0002$) la incidencia de racimos con pudrición, cuyos valores fluctuaron entre 11 y 18% (Cuadro 4.3). Sin embargo, la incidencia de racimos con pudrición alcanzada por el tratamiento testigo fue estadísticamente similar a aquella obtenida por el tratamiento que incluyó solo una aplicación de *Trichoderma* en floración (T1).

Cuadro 4.3. Incidencia de Pudrición Gris causada por *Botrytis cinerea* en uva vinífera, cv. Sauvignon Blanc, en racimos tratados con los biocontroladores *Trichoderma harzianum* cepa Queule y *Bacillus subtilis* cepa QST713 (Serenade ® WP) aplicados en distintos estados fenológicos de la vid. Temporada 2002-2003. Evaluación 04/03/03

Tratamientos	Incidencia %
T1 <i>Trichoderma</i> 80% flor	23,3 ab ¹
T2 <i>Trichoderma</i> 80% flor y apriete	15 a
T3 <i>Trichoderma</i> 80% flor, apriete y pinta	18,3 a
T4 Serenade 80% flor	12,5 a
T5 Serenade 80% flor y apriete	15 a
T6 Serenade 80% flor, apriete y pinta	11,7 a
T7 Testigo	35 b
Significancia	**2

¹Tratamientos seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas, según Test HSD
² ** Altamente significativo ($P = 0,0002$)

4.2.2. Efecto sobre la severidad de la enfermedad

Las Figuras 4.1 y 4.2 presentan los resultados de severidad o avance de la pudrición en el racimo de vid cv. Sauvignon Blanc. Para la primera evaluación, solamente en el tratamiento testigo se encontraron valores máximos de severidad de 3, lo que corresponde a un rango de 26 – 50% de las bayas del racimo con síntomas de pudrición gris. Según el test estadístico no paramétrico Kruskal – Wallis, los tratamientos biocontroladores aplicados en floración, apriete o pinta y el

testigo no presentaron diferencias significativas entre ellos (Figura 4.1). Del mismo modo, los tratamientos que utilizaron biocontroladores, los resultados de severidad fluctuaron entre racimos sanos (grado 1) a solo racimos con hasta un 25% de la superficie del racimo con pudrición gris (grado 2).

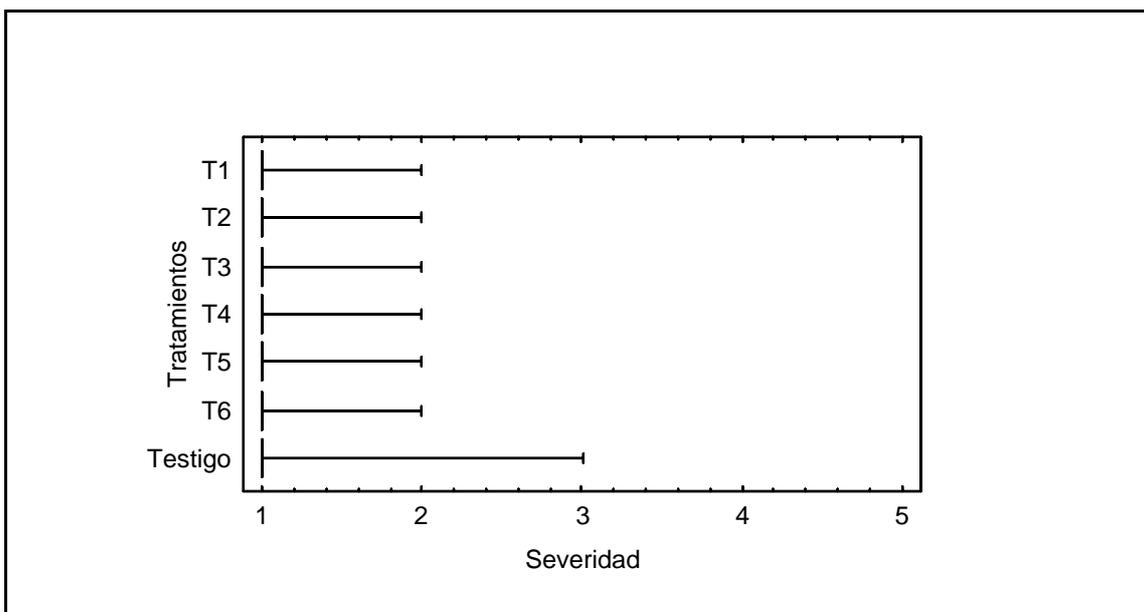


Figura 4.1. Severidad de Pudrición Gris causada por *Botrytis cinerea* en uva vinífera, cv. Sauvignon Blanc, en racimos tratados con los biocontroladores *Trichoderma harzianum* cepa Queule y *Bacillus subtilis* cepa QST713 (Serenade® WP) aplicados en distintos estados fenológicos de la vid. Temporada 2002-2003. Evaluación 17/02/03.

Severidad: valores asignados de acuerdo al rango de porcentaje. 1= Racimo sano, sin síntomas de pudrición gris, 2= (1 – 25%) de bayas del racimo con síntomas de pudrición gris, 3= (26 – 50%) de bayas del racimo con síntomas de pudrición gris, 4= (51 – 75%) de bayas del racimo con síntomas de pudrición gris, 5= (76 – 100%) de bayas del racimo con síntomas de pudrición gris.

Tratamientos: T1 Trichoderma 80% flor, T2 Trichoderma 80% flor y apriete, T3 Trichoderma 80% flor, apriete y pinta, T4 Serenade 80% flor, T5 Serenade 80% flor y apriete, T6 Serenade 80% flor, apriete y pinta, T7 Testigo.

En la segunda evaluación realizada, se detectaron racimos con grados de severidad 4, lo que equivale a un rango de 51 – 75% de bayas del racimo con síntomas de pudrición gris. Sin embargo este valor fue registrado en el tratamiento testigo y el que recibió solo una aplicación de *Trichoderma* en floración (Figura 4.2). El análisis estadístico indicó que los tratamientos realizados presentaron diferencias altamente significativas ($P < 0,01$) entre ellos. Es así como los tratamientos que incluyeron *Bacillus subtilis* cepa QST713 (Serenade® WP) presentaron una severidad significativamente menor a la manifestada por el tratamiento testigo. Los demás tratamientos fueron similares a este último.

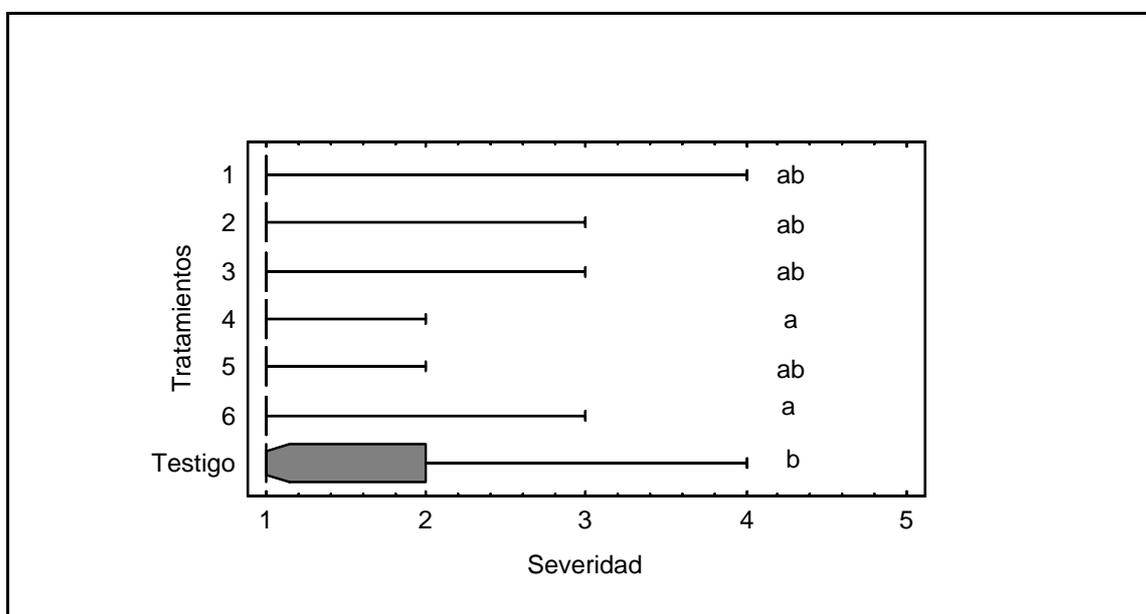


Figura 4.2. Severidad de Pudrición Gris causada por *Botrytis cinerea* en uva vinífera, cv. Sauvignon Blanc, en racimos tratados con los biocontroladores *Trichoderma harzianum* cepa Queule y *Bacillus subtilis* cepa QST713 (Serenade® WP) aplicados en distintos estados fenológicos de la vid. Temporada 2002-2003. Evaluación 04/03/03.

Severidad: valores asignados de acuerdo al rango de porcentaje. 1= Racimo sano, sin síntomas de pudrición gris, 2= (1 – 25%) de bayas del racimo con síntomas de pudrición gris, 3= (26 – 50%) de bayas del racimo con síntomas de pudrición gris, 4= (51 – 75%) de bayas del racimo con síntomas de pudrición gris, 5= (76 – 100%) de bayas del racimo con síntomas de pudrición gris.

Tratamientos: T1 *Trichoderma* 80% flor, T2 *Trichoderma* 80% flor y apriete, T3 *Trichoderma* 80% flor, apriete y pinta, T4 Serenade 80% flor, T5 Serenade 80% flor y apriete, T6 Serenade 80% flor, apriete y pinta, T7 Testigo.

Tratamientos seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas, según test no paramétrico Kruskal-Wallis.

V. DISCUSIÓN

Durante la temporada vitivinícola 2002-2003 fue posible constatar la eficacia de los biocontroladores *Trichoderma* spp. y del producto comercial Serenade ® WP, cuyo ingrediente activo es *Bacillus subtilis* cepa QST713, para el control de pudrición gris en un parronal de vid cv. Sauvignon Blanc. Éste presentó en forma natural una alta incidencia de pudrición gris en sus racimos, lo que se vio reflejado en niveles de hasta un 35% de incidencia en el tratamiento testigo. La conducción de la vid en parrón español, indiscutiblemente permite satisfacer más fácilmente las condiciones de humedad y temperatura que *Botrytis cinerea* requiere para la infección. Además, reduce su ventilación e iluminación. Tales factores, si bien pueden presentar ciertas ventajas de calidad de ciertos cultivares de uva de mesa y vinífera, son sanitariamente muy desfavorables (Broome *et al.*, 1997).

Diversos estudios realizados en Chile muestran que es posible el biocontrol de *Botrytis cinerea* mediante uso de antagonistas, los cuales son aplicados en forma directa a las plantas. Esterio y Auger (1997), realizaron estudios donde lograron el control de *Botrytis cinerea* en plantas de vid usando antagonistas pertenecientes al género *Trichoderma* spp. Un aspecto importante y fundamental que se debe considerar al incluir un producto biológico en un programa de control de esta enfermedad, como de cualquier otra, es el modo en que actúan estos agentes antagonistas para limitar el desarrollo de los microorganismos patogénicos. Hasta este momento, la información obtenida señala que la principal forma de acción sería por competencia. Una vez aplicado el biocontrolador *Trichoderma* spp., sus propágulos se desarrollan abundantemente, colonizando superficialmente los tejidos de la planta hospedera, compitiendo con *B. cinerea* por el sustrato (Esterio y Auger, 1997). Además de este modo de acción, se ha detectado también un efecto de micoparasitismo, en que estarían involucradas ciertas enzimas como *B* 1,3 gluconasas, lipasas y proteolasas, que *Trichoderma* liberaría al medio, provocando la destrucción de componentes estructurales de ciertos fitopatógenos (Elad *et al.*, 1982). En nuestro estudio, los resultados mostraron que las aplicaciones de *T. harzianum* cepa Queule en las épocas descritas como de

mayor susceptibilidad fueron efectivas en reducir la incidencia de *B. cinerea* en racimos de Sauvignon Blanc. Para este biocontrolador, las aplicaciones deberían ser practicadas en todos estos momentos, ya que una aplicación solo en floración demostró ser insuficiente para reducir la incidencia y severidad de la pudrición causada por el hongo. Las poblaciones latentes de *B. cinerea* son una importante fuente de inóculo primario potencial para eventuales infecciones en pre cosecha (Latorre y Vasquez, 1996). De esta forma, la eficacia de los tratamientos contra *B. cinerea* puede variar en función de la carga de inóculo en racimos. Por lo tanto, *Trichoderma* spp. debería siempre ser utilizado como un botriticida preventivo, debiendo aplicarse antes de una condición de infección y durante la temporada de crecimiento y maduración de los racimos. Al respecto es importante señalar que en estudios realizados tanto en Chile como en el extranjero (Malathrakis *et al.*, 1992; Esterio *et al.*, 1997; citado por Esterio y Auger, 1997), se ha podido establecer que mientras más tempranamente se aplique este producto con respecto al estadio fenológico que se desee proteger, mejor es el resultado de control otorgado. Aplicaciones de *Trichoderma* spp. realizadas con 72 horas de antelación a la condición de infección artificial, obtuvieron el mejor efecto de control sobre *B. cinerea*, disminuyéndose este efecto a medida que se acercaba la aplicación a la condición de infección. Lo anterior fue particularmente notorio en los tratamientos que consideraron aplicación de *Trichoderma* spp. en la época de plena flor. En el caso de la época de pinta, los resultados fueron más erráticos (Esterio y Auger, 1997). Por lo tanto, pareciera que el éxito de aplicaciones con *Trichoderma* dependería en cierto grado de la oportunidad de su aplicación, lo que para nuestro estudio podría mejorarse con aplicaciones previas y durante la floración. De esta forma, lograríamos un establecimiento real y eficiente para evitar la colonización de *B. cinerea* de bayas en formación y de restos florales.

Por su parte *Bacillus subtilis* actúa evitando la germinación de esporas de patógenos; interrumpe el crecimiento del tubo germinativo y del micelio, e inhibe la adherencia del patógeno a las hojas del hospedero, ya que produciría una zona de inhibición que restringe el desarrollo de los patógenos causantes de las enfermedades. *B. subtilis* ha demostrado inducir una resistencia sistémica adquirida (SAR) natural de la planta contra patógenos bacterianos y fungos (Butt *et al.*,

1999). En este estudio, las aplicaciones del producto Serenade ® WP, en su dosis comercial recomendada, logró una eficiente reducción de la incidencia (valores cercanos a un 23% de disminución con respecto al testigo) y severidad de la pudrición causada por *B. cinerea* en racimos de Sauvignon Blanc. Este buen efecto fue logrado tanto con una sola aplicación de Serenade ® WP en floración como con una aplicación del producto en cada época definida como crítica de infección. Sería interesante realizar nuevos estudios para evaluar aplicaciones dirigidas durante todo el período de floración, desde previo a ésta hasta una vez concluida, de manera de determinar su efecto sobre las infecciones latentes que se producen en esa época. De esta forma, podríamos evaluar su efectividad de reducir aún más la incidencia de pudrición gris.

En la vid, la intersección de la radiación solar depende de la interacción entre la forma y tamaño del dosel, debido a que a través de la hoja se transmite solo un pequeño porcentaje de la radiación; de acuerdo a lo anterior, la densidad del follaje es indicador de posibles cambios del microclima al cual están expuestos los racimos. Es por esto que el número de capas de hojas es considerado como un índice de área foliar y los espacios al interior del follaje han sido utilizados por Smart y Robinson (1991), para evaluar la iluminación en la zona frutal y caracterizar la condición de follaje. Los resultados obtenidos demostraron que el sitio de estudio presentó una homogeneidad en cuanto al número de capas de hojas en todos sus sectores. Lo anterior cobra relevancia, ya que podemos descartar la influencia que pudo ejercer el follaje en los resultados obtenidos con el uso de los biocontroladores. Finalmente, es importante mencionar que los valores obtenidos concuerdan con los mencionados por Smart y Robinson (1991), en donde señalan que el número de capas de hojas debería fluctuar entre 1 y 1,5 para un estado de follaje óptimo.

VI. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones del estudio se señalan a continuación:

- a) La cepa nativa Queule de *Trichoderma harzianum* fue efectiva en reducir significativamente la incidencia de la pudrición causada por *B. cinerea* en racimos de uva cv. Sauvignon Blanc, cuando fue aplicada en floración y apriete o en estos estados más una tercera aplicación en pinta.

- b) La cepa QST713 de *Bacillus subtilis* (Serenade ® WP) fue efectiva en reducir significativamente la incidencia y severidad de la pudrición causada por *B. cinerea* en racimos de uva cv. Sauvignon Blanc, cuando fue aplicada solamente en floración o en ésta y los demás estados críticos para la infección como apriete y pinta.

BIBLIOGRAFÍA

- **AGRIOS, G. 1997.** Plant Pathology. 4th Ed. Academic Press, San Diego. 635 p.
- **ABBOTT LABORATORIES DE CHILE LTDA, 1997.** Trichodex 25% WP: La alternativa Biológica. Área de desarrollo. En: Botrytis: nuevas estrategias de control cultural, biológico y químico en uva de mesa. Facultad de Cs. Agrarias Universidad de Chile. Santiago, Chile. Pp.: 82-88.
- **ÁLVAREZ. M. 1987.** Biología-Epidemiología de *Botrytis Cinerea* en uva de Mesa. En: Latorre, B. 1987. Manejo de Botritis y Otras Plagas en Uva de Mesa. Curso breve. Pontificia Universidad Católica de Chile. Departamento de Fruticultura y Enología. Facultad de Agronomía, Santiago, Chile. Pp.: 111-114.
- **ÁLVAREZ. M. 1989.** Resistencia a los fungicidas, fundamentos y aspectos practicos. En: Latorre B. (ed.). Fungicidas y Nematicidas avances y aplicabilidad. Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. Pp.: 125-138.
- **AUGER, J. 1981.** La Pudrición Gris de la Vid. Revista Frutícola. Vol. 7. (2): 7-9.
- **AUGER, J. 1987.** Importancia del control químico de Botrytis en precosecha. En: Latorre, B. 1987. Manejo de Botrytis y otras plagas de uva de mesa. Curso breve. Pontificia Universidad Católica de Chile. Depto. De Fruticultura y Enología. Facultad de Agronomía. Santiago, Chile. Pp.: 115-121.
- **AUGER, J., y ESTERIO, M. 1997.** Botrytis en vides en Chile: Epidemiología y Resistencia a fungicidas. En: Botrytis: nuevas estrategias de control cultural, biológico y químico en uva de mesa. Facultad de Cs. Agrarias Universidad de Chile. Santiago, Chile. Pp.: 3-9.
- **BULIT, J., y DUBOS, B. 1996.** Podredumbre gris. Botrytis Bunch Rot and Blight. En: Person, R. y Goheen, A. 1996. Plagas y Enfermedades de la vid. The American Phytopathological Society. Ediciones Mundi- Prensa. 91p.
- **BUTT. T. M., J. G. HARRIS & K. A. POWELL.1999.** Microbial biopesticides: The European scene. In "Biopesticides. Use and delivery". Eds. F.R. Hill & J. J. Menn. Humana Press, NJ. Pp.: 23-44.
- **BROOME, J., LATORRE, A., MAROIS, J., AVILES, J. 1995.** El pronóstico en el manejo de la pudrición gris (*Botrytis cinerea*) de la vid. Revista Aconex (48): 13-17.
- **CAMPBELL, R.1989.** Biological control of microbial plant pathogenes. Cambridge University, Press Cambridge. Australia. Pp.: 67-94.

- **CARREÑO, I., y ÁLVAREZ, M. 1990.** Determinación de razas resistentes de *Botrytis cinerea* de vides a fungicidas dicarboximidadas. Agricultura Técnica (Chile) 50 (3): 298-303.
- **CIAMPI, L., y SILVA, S. 1991.** Perspectivas para el Control Biológico de *Botrytis cinerea* en Frambueso. Revista Aconex (31): 5-10.
- **COOMBE, B.G., and DRY, P. R. 1992.** Viticulture. Volume 2 practices. Winetitles. Adelaide. Pp.: 243-246.
- **COOK, R. J. and BAKER, K. F. 1989.** The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogenes. The American Phytopathological Society. USA. 539p.
- **CRUZ. M. 1992.** Pudrición Gris de Frutales y Hortalizas. Agroanálisis Centro-Sur. Año 5, (50): 16-18.
- **CRUZ. M. 1993.** ¿ Qué es Exactamente la Botrytis?. Chile Agrícola. Vol. 18 (185): 42-45.
- **ESTERIO, M. y AUGER, J. 1997.** "Control integrado de *Botrytis cinerea* Pers. En vid (*Vitis vinífera* L.)". En: En: Botrytis: nuevas estrategias de control cultural, biológico y químico en uva de mesa. Facultad de Cs. Agrarias Universidad de Chile. Santiago, Chile. Pp.: 14-24.
- **ESTERIO, M. y AUGER, J. 1997.** Control de *Botrytis cinerea* Pers. en Vid (*Vitis vinífera* L.) Utilizando Fungicidas no Convencionales: BC-1000 y Trichodex. Revista Aconex (54):11-15.
- **ELAD, Y., CHET, I. and HENIS, Y. 1982.** Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Canadian Journal of Microbiology 28: Pp.: 719-725.
- **FLORES. V., y LATORRE. B. 1990.** Dinámica de la Degradación de los Residuos de Ronilan en Uva de Mesa. Revista Aconex (29): 11-13.
- **GONZÁLEZ, V., y FRAGOSO, S. 2002.** *Bacillus subtilis*. [En - linea]. Disponible en <http://www2.cbm.uam.es/microali/pdfs/Bsubtilis.pdf>. Consultado 28 de octubre de 2002.
- **HARMAN, G. 1996.** *Trichoderma* for Biocontrol of Plant Pathogens: From Basic Research to Comercialized Products. [On - line]. Disponible en <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/bcconf/talks/harman.html>. Consultado 28 de octubre de 2002.
- **HARMAN, G. 2000.** *Trichoderma* spp., including *T. Harzianum*, *T. Viride*, *T. Koningii*, *T. Hamatum* and other spp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system). [On - line]. Disponible en <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/trichoderma.html>. Consultado 28 de octubre de 2002.

- **HIDALGO, L. 1993.** Tratado de Viticultura General. Madrid. Ediciones Mundi- Prensa. Madrid. Pp.: 875-878.
- **LATORRE, B. 1986.** Manejo de *Botrytis cinerea* en Uva de Mesa. Revista Frutícola. Vol. 7 (3): 75-83.
- **LATORRE, B., y VÁSQUEZ, G. 1996.** Situación de *Botrytis cinerea* Latente en Uva de Mesa de la Zona Central. Revista Aconex (52): 23-28.
- **MORALES, A. 1986.** Resistencia de hongos a los fungicidas. Revista Aconex (13): 25-26.
- **MORALES, A. 1990.** Uva de Mesa: Alternativas Para Mejorar Condiciones en los Mercados Internacionales. Revista Aconex (29): 15-20.
- **MORALES, A. 1997.** Botrytis en vides. Chile Hortofrutícola. (45): 13-16.
- **ODEPA, 2002.** Estadísticas Macrosectoriales. Vides: Superficie y Producción. Estadísticas País. [En - línea]. Disponible en <http://www.odepa.cl/> Consultado 28 de octubre de 2002.
- **PEARSON, R., y GOHEEN, A. 1996.** Plagas y Enfermedades de la Vid. The American Phytopathological Society. Ediciones Mundi- Prensa. 91p.
- **PÉREZ, J. 1992.** Los Parásitos de la Vid. Estrategias de Protección Razonada. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Tercera Edición. Madrid, España. Ediciones Mundi-Prensa. Pp.: 174-179.
- **PSZCZOLKOWSKI, P. 1987.** Rol de *Botrytis cinerea* en vitivinicultura. En: Latorre, B. 1987. Manejo de Botrytis y otras plagas de uva de mesa. Curso breve. Pontificia Universidad Católica de Chile. Departamento De Fruticultura y Enología. Facultad de Agronomía. Santiago. Chile. 216p.
- **SANTA MARÍA, T. 1982.** Botrytis en Uva de Mesa. Revista Aconex. Año 1.(1): 27-29.
- **SHERF, A., MACNAB, A. 1986.** Vegetable Diseases and Their Control. Second Edition. A Wiley –Interscience Publication Jhon Wiley and Sons. Printed in the United States of America. Pp.: 400-403.
- **SMART, R., and ROBINSON, M. 1991.** Sunlight into the wine. A Handbook for winegrape canopy management. Ministry of agriculture and fisheries New Zealland. Winetitles, Adelaide. 88p.
- **WAINWRIGHT, M. 1992.** An Introduction to fungal Biotechnology. England. 202p.

- **WALKER, C.1965.** Patología Vegetal. Ediciones Omega. S.A. Barcelona, España. 818 p.