



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA

EVALUACIÓN DE MÉTODOS BIOLÓGICOS Y QUÍMICOS PARA EL  
CONTROL DE BOTRYTIS CINEREA EN VIVEROS DE EUCALYPTUS  
GLOBULUS

por

FACULTAD DE AGRONOMÍA



DEPARTAMENTO DE  
DOCUMENTACIÓN Y  
BIBLIOTECA

Rossana Giselle REYNA AVILA

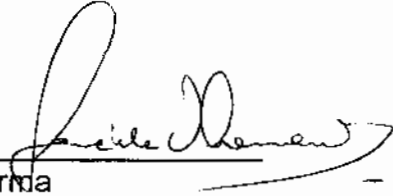
TESIS presentada como uno de  
los requisitos para obtener el  
título de Ingeniero Agrónomo.  
(Orientación Forestal)

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2000

Tesis aprobada por:

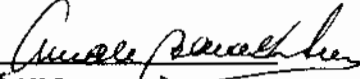
Director:

GRACIELA ROMERO



Nombre completo y firma

AMALIA BARAIBAN LUCAS



Nombre completo y firma

RAFAEL ESCUDECO



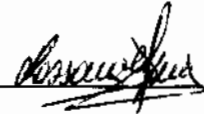
Nombre completo y firma

Fecha:

23/3/00

Autor:

ROSSANA GUELE REYNAMILA



Nombre completo y firma

## AGRADECIMIENTOS

Ing. Agr. Amalia Baraibar  
Ing. Agr. Carlos Nervi  
Ing. Agr. Claudine Folch  
Ing. Agr. Estela Priore (Cátedra de Estadística de Facultad de  
Agronomía)  
Ing. Agr. Graciela Romero  
Laboratorio Lage y Cía S.A.  
Mauricio Beltrán  
Vivero OLANCOR  
Vivero Sociedad Forestal Uruguay

## TABLA DE CONTENIDOS

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VII
<b>1. <u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	1
<b>2. <u>OBJETIVOS</u></b> .....	2
<b>3. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u></b> .....	4
3.1. AGENTE CAUSAL.....	4
3.2. DESCRIPCIÓN DEL AGENTE CAUSAL.....	4
3.3. SINTOMATOLOGÍA Y SIGNO.....	5
3.4. DAÑOS.....	5
3.5. CONDICIONES PREDISONENTES PARA EL ATAQUE ...	6
3.5.1. <u>Humedad</u> .....	6
3.5.2. <u>Temperatura</u> .....	6
3.5.3. <u>Densidad de plantas</u> .....	7
3.5.4. <u>Fertilización nitrogenada</u> .....	7
3.6. CICLO BIOLÓGICO.....	7
3.6.1. <u>Supervivencia</u> .....	7
3.6.2. <u>Diseminación del hongo</u> .....	8
3.6.3. <u>Germinación</u> .....	8
3.6.4. <u>Penetración</u> .....	9
3.6.5. <u>Esporulación</u> .....	10
3.7. CONTROL.....	10
3.7.1. <u>Control químico</u> .....	10
3.7.1.1. Iprodione.....	12
3.7.1.2. Mancozeb.....	12
3.7.2. <u>Control biológico</u> .....	12
3.7.2.1. Trichoderma harzianum.....	13
3.7.2.1.1. Competencia.....	13
3.7.2.1.2. Hiperparasitismo.....	14
3.7.2.1.3. Eficacia de Trichoderma.....	15
3.7.2.2. Bacillus subtilis.....	16
3.7.3. <u>Control Integrado</u> .....	17



5.1.2. Incidencia de <i>B. cinerea</i> en el vivero Sociedad Forestal Uruguay .....	38
5.1.2.1. Primera evaluación.....	38
5.1.2.2. Segunda evaluación.....	38
5.1.2.3. Tercera evaluación.....	38
5.1.3. <u>Porcentaje de plantas muertas para el vivero Olancor</u> .....	39
5.1.4. <u>Porcentaje de plantas muertas para el vivero Sociedad Forestal Uruguay</u> .....	40
5.2. <b>EVALUACIÓN IN VITRO</b> .....	41
5.2.1. <u>Antagonismo de cepas de <i>Trichoderma</i> en el crecimiento de cepas de <i>Botrytis cinerea</i></u> .....	41
5.2.2. <u>Estudio de tolerancia de diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> frente a los fungicidas Rovral y Mancozeb</u> .....	43
5.2.3. <u>Estudio de comportamiento de <i>Botrytis cinerea</i> frente a <i>Trichoderma</i> y Rovral</u> .....	45
<b>6. <u>DISCUSIÓN</u></b> .....	49
<b>7. <u>CONCLUSIONES</u></b> .....	55
<b>8. <u>RESUMEN</u></b> .....	56
<b>9. <u>SUMMARY</u></b> .....	57
<b>10. <u>BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	58
<b>11. <u>ANEXOS</u></b> .....	62

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro N°	Página
1. Incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> en el vivero Olancor con riego habitual.....	37
2. Incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> en el vivero Sociedad Forestal Uruguay con riego habitual.....	39
3. Porcentaje de plantas muertas por <i>Botrytis cinerea</i> para el vivero Olancor con riego habitual.....	40
4. Porcentaje de plantas muertas por <i>Botrytis cinerea</i> para el vivero Sociedad Forestal Uruguay con riego habitual.....	41
5. Diámetro de colonia de <i>Botrytis cinerea</i> frente a diferentes colonias de <i>Trichoderma</i> .....	42
6. Diámetro de colonia de <i>Trichoderma</i> frente a diferentes concentraciones de fungicidas.....	45
7. Diámetro de colonias de <i>Botrytis cinerea</i> frente a <i>Trichoderma</i> y Rovral.....	47
8. Datos climáticos registrados por la Estación Meteorológica Melilla Agosto- Setiembre 1998.....	63
9. Temperaturas máximas y mínimas registradas por la Estación Meteorológica Melilla (periodo Agosto- Setiembre 1998).....	64
 Figura N°	
1. Esquema de la distribución de los discos de <i>Botrytis</i> y <i>Trichoderma</i> en las placas de petri en el ensayo in vitro 1.....	65
2. Esquema de la distribución de los discos de <i>Trichoderma</i> en las	

placas de petri en el ensayo in vitro 2.....	65
3. Esquema de la distribución de los discos de <i>Botrytis</i> en las placas de petri en el ensayo in vitro 3.....	66
Fotografía N°	
1. Vista general de las canchas del vivero Olancor en donde se realizó el ensayo de campo con condiciones habituales del vivero .....	67
2. Vista general de las canchas del vivero Sociedad Forestal Uruguay en donde se realizó el ensayo de campo con condiciones habituales del vivero.....	67
3. Colonias de <i>Botrytis</i> del ensayo in vitro 3 de los tratamientos con dosis completa de Rovral, con media dosis de Rovral y el Testigo..	68
4. Colonias de <i>Botrytis</i> del ensayo in vitro 3 del tratamiento con Trichosoil sólo y del Testigo.....	68
5. Colonias de <i>Botrytis</i> del ensayo in vitro 3 de los tratamientos con media dosis de Rovral, con media dosis de Rovral junto con Trichosoil y el Testigo.....	69
6. Colonias de <i>Botrytis</i> del ensayo in vitro 3 de los tratamientos con dosis completa de Rovral, con dosis completa de Rovral junto con Trichosoil y el Testigo.....	69
7. Colonias de <i>Botrytis</i> del ensayo in vitro 3 de los tratamientos con Trichosoil sólo, Trichosoil con dosis completa de Rovral y Trichosoil con media dosis de Rovral .....	70



## 1. INTRODUCCIÓN

A partir del año 1988, la forestación en el Uruguay a tenido un gran desarrollo, fomentado por la ley forestal del mismo año, la cual brinda una serie de subsidios a las forestaciones que se lleven a cabo en suelos de prioridad forestal, y que se realicen con determinadas especies que están contempladas en dicha ley.

Dentro de las especies de prioridad forestal se encuentran especies del género *Eucalyptus*.

Además del incentivo generado por la ley se ha visto en el mercado de la pulpa para papel un buen lugar donde colocar la madera de *Eucalyptus* principalmente de madera proveniente de *Eucalyptus globulus*, lo que ha llevado a la implantación de grandes masas boscosas de esta especie principalmente en la zona sur del país.

La instalación de los rodales se realiza a través de la implantación de plantines provenientes de viveros dedicados a su producción.

La producción de plantines en vivero se realiza en forma intensiva con la utilización de bandejas con sustrato en las cuales se colocan las semillas. Los plantines son cuidados hasta que alcanzan un tamaño determinado para ser llevados a plantación.

Generalmente, los cortos plazos de los cuales se dispone para la producción de los plantines, junto con la intensidad de agroquímicos y agua de riego que se le agregan lleva a que se desarrollen condiciones favorables para el desarrollo de varias enfermedades entre las cuales se encuentra la enfermedad causada por el hongo *Botrytis cinerea* Pers ex Pers. denominada "moho gris de los *Eucalyptus*".

En Uruguay dicha enfermedad causa graves daños a nivel de plantas de vivero produciendo la muerte de estas, lo que trae aparejado enormes pérdidas en la producción.

Dichos daños se producen principalmente en los meses de otoño y en inviernos sin temperaturas extremadamente bajas y con alta humedad relativa.

El control hasta el momento se realiza a través de productos químicos los cuales han presentado una serie de dificultades debidas a la baja efectividad de los productos cuando el hongo encuentra condiciones óptimas para su desarrollo, y por otro lado, debido a la alta adaptabilidad que muestra el hongo a los diversos productos, desarrollando resistencia a estos ingredientes activos.

Esto ha llevado a la investigación de métodos alternativos de lucha contra la enfermedad ya sea a través de controles culturales como a través del control biológico.

## **2. OBJETIVOS**

El primer objetivo de este trabajo es encontrar un medio de control eficiente para la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* "moho gris de los Eucalyptus".

Para ello se recurrió en primera instancia a la evaluación de métodos de control químicos, utilizando los productos comerciales Mancozeb (ingrediente activo Maneb) y Rovral (ingrediente activo Iprodione).

Como métodos alternativos de control se probaron métodos de control biológico para el cual se utilizaron por un lado Trichosoil (formulación comercial de *Trichoderma harzianum*) y MBI 600 (formulación comercial de *Bacillus subtilis*); así como también métodos de control integrado combinando un producto químico con un biológico.

La evaluación se realizó ya sea in situ en viveros de *Eucalyptus globulus*, como así también in vitro enfrentando cultivos de moho gris a los diferentes métodos de control.

### **3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. AGENTE CAUSAL**

La enfermedad moho gris de los Eucalyptus es causada por el hongo imperfecto *Botrytis cinerea* Pers ex Pers. (15)

La forma perfecta de este hongo es *Botryotinia fuckeliana* (= *Sclerotinia fuckeliana*) perteneciente a la clase Ascomycetes, Hymenoscypales, familia Sclerotiniaceae. (15)

La forma imperfecta pertenece a la subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, orden Hyphales (Moniliales). (1)

La forma imperfecta del hongo (*Botrytis cinerea*) es sumamente polífaga causando diversas enfermedades como pudrición de frutos o pudrición del tallo, ahogamiento de plantulas, manchas foliares etc. Encontrándose tanto en plantas hortícolas, frutales, ornamentales así como también plantas forestales. (1)

#### **3.2. DESCRIPCIÓN DEL AGENTE CAUSAL**

Según (2, pág. 105) " Este patógeno crece bien en PDA, a 20-30 °C sus colonias producen micelios aéreos de coloración cenicienta. Con más de una semana de edad se forman esclerocios negros en la superficie del medio de cultivo y en la periferia de la placa de petri, generalmente solitarios, con variación en el tamaño desde pocos milímetros hasta más de 1 centímetro. Los conidioforos son septados, delgados o también filiformes, con compresión variable, de hasta más de 2 milímetros, con los dos tercios basales de color marrón claro a marrón oscuro y el tercio apical bien claro o

hialino, donde son encontradas ramificaciones dicotómicas portando dilataciones con denticulos sustentadores de los conidios (esterigmatas). Los conidios son marrón claro a hialinos, unicelulares, ovoides a elipsoidales o esféricos de 6-18 por 4-11  $\mu\text{m}$ "

### 3.3. SINTOMATOLOGÍA Y SIGNO

Las lesiones del patógeno en la enfermedad de ahogamiento de plantas de Eucalyptus son fácilmente reconocibles en hojas de la parte apical de la planta.

Los síntomas iniciales son un enrollamiento de las hojas seguido del secado de las mismas, encontrándose comúnmente recubiertas por una capa de moho gris o plateado resultante de la esporulación del hongo con abundante producción de conidioforos con conidios. También pueden encontrarse esporulación de *Botrytis cinerea* en hojas caídas en la bandeja o en hojas senescentes que aún están unidas a la planta por el pecíolo lo que sugiere que la infección comienza en las hojas muertas en la bandeja y que luego continua por la hoja unida al tallo tomando por ultimo al tallo, en este caso los tejidos atacados pierden rigidez y la planta se tuerce y posteriormente cae al suelo. (2,3,13)

En plantaciones se han podido observar ataques en los veranillos de invierno o en años de inviernos poco rigurosos en lo que se refiere a temperaturas bajas. (24)

### 3.4. DAÑOS

El principal daño que causa dicha enfermedad es el ahogamiento de plántulas ya que ataca principalmente los tejidos de las partes aéreas de las plantas causando la muerte del ápice o de toda la planta especialmente si

éstas son jóvenes, produciendo una disminución importante en la producción de los viveros. (13)

La limpieza de plantas con ataque constituye una de las medidas a realizar para no contagiar plantas sanas, ya que muchas veces el no retirarlas compromete el número de plantas disponible para la venta.

### 3.5. CONDICIONES PREDISPONENTES PARA EL ATAQUE

#### 3.5.1. Humedad

Debido a que las plantas son muy susceptibles a la desecación exigen frecuentes riegos, lo que acarrea el mantenimiento de una elevada humedad en las bandejas así como agua libre sobre los órganos vegetales, lo cual es una de las variables predisponentes más importantes para el desarrollo de la enfermedad. La elevada humedad es también causa de una deficiente ventilación o de un sombreado excesivo de las bandejas debido a la protección adicional que se les da a los plantines con materiales de cobertura.

#### 3.5.2. Temperatura

La temperatura también influye en el ataque del patógeno siendo óptimas para la infección en un rango de entre 10 y 20 °C, pudiendo ocurrir infecciones incluso entre 2 y 25 °C. (20)

### 3.5.3. Densidad de plantas

Otro de los factores que lleva a la ocurrencia de esta enfermedad es la elevada densidad de los plantines, llevando a que las copas de las mudas se toquen entre sí creando un microambiente favorable para la dispersión de inóculo planta a planta debido a la elevada humedad e insuficiente aireación que hay bajo las copas.

### 3.5.4. Fertilización nitrogenada

La fertilización nitrogenada es también un factor predisponente importante, ya que provoca un crecimiento foliar suculento, cutículas más delgadas y tejido poco lignificado que hace que las hojas sean más susceptibles al ataque. (2)

Por último, cabe señalar que *Botrytis cinerea* requiere, para la germinación de sus conidios y para el posterior desarrollo de sus tubos germinativos, de nutrientes que se encuentran en la superficie del hospedero, por lo tanto, este sería otro de los factores predisponentes, ya que si hubiera una restricción nutritiva esto traería como consecuencia una baja tasa de infección. (20)

## 3.6. CICLO BIOLÓGICO

### 3.6.1. Supervivencia

*Botrytis cinerea* es un parásito facultativo con amplia gama de hospederos a demás de Eucalyptus.

Saprofíticamente el hongo vive en hojas u otros órganos vegetales muertos en el suelo, principalmente de sus hospederos.

Sobre los tejidos de esos materiales, el hongo produce hifas y esclerocios. Los esclerocios pueden garantizar la supervivencia en condiciones de ambientes desfavorables para las hifas normales.

### 3.6.2. Diseminación del hongo

En condiciones de temperatura y humedad favorables, los esclerocios germinan, produciendo hifas con poder colonizante de tejidos orgánicos vegetales vivos o muertos y productoras de conidioforos con conidios.

Los conidios de *Botrytis* son diminutos secos fácilmente diseminados por el viento o por el agua. En condiciones de ambientes favorables, los conidios diseminados que caen sobre material vegetal vivo o muerto de un hospedero susceptible pueden germinar o colonizar el sustrato a partir de sus tubos germinativos en la superficie del hospedero.

En Eucalyptus esta afección se ve prácticamente solo en estado de plántula en vivero, pudiendo ser infectados a partir de otras fuentes de inóculo ajenas al vivero con el auxilio del viento siendo los conidios diseminados y llegando a las copas de las plantas en ese estadio.

El inóculo puede llegar, también, a través de la irrigación que cae sobre las hojas muertas en la superficie de las bandejas o sobre las copas entrelazadas de los plantines donde se verifica la colonización saprofítica del hongo seguida de una intensa producción de estructuras reproductivas en la superficie del sustrato. (2)

### 3.6.3. Germinación

Las condiciones necesarias para la germinación, formación del tubo germinativo y para la infección del hospedero son humedad relativa



ambiente mayor a 98% o agua libre en la superficie de las plantas. Siendo las temperaturas óptimas entre 9 y 21 °C.

Previamente a la penetración del tejido vegetal los conidios desarrollan un tubo germinativo, este tubo germinativo se fija firmemente a la cutícula por una estructura que lleva en su extremo denominada apresorio, el cual a través de la segregación de sustancias mucilaginosas permite que el conidio se adhiera al sustrato. Primeramente, esto es un proceso pasivo, que depende en parte de interacciones hidrófobas entre la espora del hongo y la cutícula del huésped, seguido por un segundo estado en el cual se segregan las sustancias mucilaginosas asociadas al tubo germinativo. (11,17,18,27)

Este apresorio se forma cuando en la superficie del huésped se encuentran disponibles nutrientes exógenos, lo cual es un prerequisite para su formación y para la penetración de los tejidos.

#### 3.6.4. Penetración

La penetración de la cutícula y epidermis del huésped es un proceso mecánico y enzimático, con la presión por parte del patógeno en una pequeña área del tejido huésped, excretando una cantidad limitada de

- cutinasa que ayuda a la degradación de la pared celular.
- La presencia de esterases en el extremo del tubo germinativo ayudaría en darle plasticidad a la pared del patógeno donde se forma el poro de infección y también en la disolución de la cutícula del huésped. (17)

Luego de la penetración del micelio en el tejidos huésped la temperatura y la humedad son menos restrictivos. (22,23 y 26)

### 3.6.5. Esporulación

El primer indicio de ataque del hongo en Eucalyptus es la presencia de esporulación del hongo visto sobre hojas muertas en la superficie de las bandejas, como moho gris ceniciento o plateado.

La intensidad de esporulación depende de la presión de inóculo, siendo el rango de temperatura favorable para la producción de conidios más estrecho que el rango de temperaturas en el cual se promueve la infección. La esporulación es favorecida por alta humedad relativa y temperaturas relativamente bajas y moderadas. (20)  
En esas condiciones las plantas se ven rápidamente esporuladas.

De allí los conidios son salpicados hacia las hojas senescentes, donde germinan y sus tubos penetran directamente, colonizando los limbos. Las primeras infecciones de tallos de los plantines por el patógeno ocurren cuando éstos son tocadas por los limbos senescentes, colonizados y esporulados del hongo o por la continuidad de colonización limbo senescente-(pecíolo)- tallo.

El impacto de la gota de riego o de lluvia en una esporulación del hongo, que normalmente es abundante y seca hace que los conidios sean diseminados fácilmente hacia el tallo o hacia otras hojas. Por esta razón, una de las características del ataque del hongo es la presencia de lesiones ya sea en el tallo como en las hojas.

## 3.7. CONTROL

### 3.7.1. Control químico

Actualmente, en los viveros de Eucalyptus se están utilizando una amplia gama de productos químicos para combatir esta enfermedad con una

alta frecuencia de aplicación de los mismos. No encontrándose en el mercado productos que frente a un ataque severo de la enfermedad logren un control realmente efectivo de la misma.

Dentro de la amplia gama de productos químicos, son muy pocos los que actúan específicamente contra *Botrytis cinerea*. Es por ello, y por la alta frecuencia de la enfermedad, que se ha creado una presión de selección tal que permitió el desarrollo de resistencia hacia los fungicidas. (14)

La resistencia a los Benzimidazoles y a las Dicarboximidias (Iprodione comercialmente Rovral y Vinclozolin comercialmente denominado Ronilan) ha sido descrita para una variada gama de cultivos, tanto en invernáculos como a campo, siendo reportada por primera vez en 1979 en invernáculos de Pennsylvania. (14)

En un experimento llevado a cabo por J.A. La Mondia y S.M. Douglas; (1997) se observó resistencia hacia los dos grupos de fungicidas siendo más común la resistencia hacia Benomyl (Benzimidazol), que hacia las Dicarboximidias, a su vez, el nivel de resistencia hacia las Dicarboximidias fue menor comparado al nivel de resistencia hacia los Benzimidazoles.

También se observó en este trabajo que podía existir resistencia cruzada dentro de los grupos de fungicidas. Se evidenció resistencia ya sea a Vinclozolin como a Iprodione, pudiendo el nivel de resistencia no ser el mismo a los diferentes fungicidas del grupo, siendo la principal forma de resistencia la adquirida. Lo que puede deberse, principalmente, a la utilización por parte de los productores del mismo producto a lo largo del ciclo del cultivo, favoreciendo condiciones para el desarrollo de resistencia a los productos.

Una estrategia de control para disminuir la posibilidad de desarrollo de resistencia sería a través de limitar el número de aplicaciones con Dicarboximidias, combinándolas con otros fungicidas de acción múltiple. De

este modo, no se permitiría crear una presión de selección tal que llevara a la aparición de cepas de *Botrytis* resistentes a este grupo de fungicidas. (28)

En el presente estudio los productos utilizados fueron: un producto específico contra la enfermedad como es el caso de Iprodione (nombre comercial Rovral) y un producto de amplio espectro que es un Carbamato, denominado Mancozeb.

#### 3.7.1.1. Iprodione

Es un fungicida de contacto que se aplica en el follaje de las plantas, inhibiendo la germinación de esporas y el crecimiento del micelio del hongo. Dentro de los patógenos que controla se encuentran *Botrytis*, *Alternaria*, *Sclerotinia* y *Rhizoctonia*.

Posee una actividad principalmente preventiva y tan solo apenas curativa.(1)

#### 3.7.1.2. Mancozeb

Es un compuesto orgánico del azúfre derivado del ácido carbámico con el agregado del ion zinc el cual disminuye la fitotoxicidad del producto. Se trata de un producto de amplio espectro que inhibe la respiración celular. Actúa sobre sistemas enzimáticos provocando la acumulación de ácido pirúvico, produciendo la inhibición de la germinación de las esporas.

#### 3.7.2. Control biológico

La integración del control biológico en un plan de control de enfermedades sería una buena opción para realizar en todo cultivo dadas las ventajas que puede mostrar frente al control químico. Pero a pesar de todos los estudios que se han realizado son difíciles de implementar estrategias de

control biológico consistentes y raramente se han desarrollado e implementado tales medidas.

Quizás esto se deba a la gran complejidad que estos sistemas implican. Aún así, dada las crecientes presiones sociales y económicas del mundo se han desarrollado estrategias de uso para el control biológico.

En este estudio en particular se utilizaron dos antagonistas que son *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis*.

#### 3.7.2.1. *Trichoderma harzianum* Rifai

El género *Trichoderma* encierra a una serie de hongos saprofitos que se encuentran tanto en el suelo como en madera muerta pudiendo ser reconocidos por la coloración verde de sus esporas. (12)

*Trichoderma* actuaría sobre *Botrytis cinerea* principalmente a dos niveles, ya sea a través de la competencia por el sustrato, así como también a través del hiperparasitismo.

##### 3.7.2.1.1. Competencia

Una de las características de *Botrytis cinerea* es la colonización de los restos vegetales desarrollándose vigorosamente sobre estos y a partir de este desarrollo es que obtiene una base nutritiva con la que coloniza los tejidos vivos.

La acción de *Trichoderma* es colonizar primero los restos vegetales impidiendo la colonización de estos por parte de *Botrytis cinerea*, retardando así el desarrollo de la enfermedad. (12)

Dubos et al; (1983) demostraron en sus avances que los fenómenos de competencia como los de hiperparasitismo, tanto in vitro como in vivo, dependen estrictamente de la temperatura. (12)

El rango de temperatura en donde se ve potencializada la actividad del antagonista es muy estricto (18 a 25 °C), con una humedad relativa de 80 a 97 %, mientras que el espectro de actividad de *Botrytis cinerea* es de 5 a 28 °C, demostrándose un efecto positivo en el control con temperatura por encima de los 20 °C. (Elad, Y et al; 1993) (6)

#### 3.7.2.1.2. Hiperparasitismo

El hiperparasitismo se realizaría a través de la acción de enzimas degradadoras de las paredes celulares del hongo patógeno, tales como una proteínasa,  $\beta$  1-3 glucanasas y quitinasas, las cuales son producidas por *Trichoderma harzianum* Rifai.

Las hifas de *Trichoderma* pueden penetrar tanto estructuras durmientes (esclerocios) como hifas en crecimiento. En el caso de que parasite hifas, *Trichoderma* crece junto con las hifas del hongo patógeno luego las envuelve con ganchos o estructuras parecidas a un apresorio, penetrando por último sus paredes, invadiendo las células. (5,9)

En un estudio, Mauch, F et al; (1988), demostraron que ciertas enzimas quitinolíticas y gluconolíticas provocarían la inhibición de la germinación de las esporas y de la elongación de las hifas de *Botrytis cinerea*.

Por otra parte, Lorito, M et al; (1994), demostraron que además de existir una inhibición sobre el hongo *Botrytis cinerea* existía un efecto sinérgico cuando en el control se utilizaba una combinación de diferentes

enzimas que produce *Trichoderma harzianum* en el control de *Botrytis cinerea*. (16)

En cuanto al fenómeno de antibiosis es fácil de evidenciar in vitro pero es muy difícil de detectar en la naturaleza. (12)

No pudiéndose evidenciar que las sustancias antibióticas sean producidas en el suelo en cantidades suficientes como para realizar un control biológico tangible. (21)

#### 3.7.2.1.3. Eficacia de *Trichoderma*

*Trichoderma harzianum* ha demostrado ser un verdadero agente de biocontrol. (Elad, Y Et al, 1993) Demostrando una disminución en la severidad de la enfermedad, ya sea cuando es utilizado solo o cuando es utilizado en combinación con Dicarboximidias (Vinclozolin e Iprodione), pudiendo ser utilizado, tanto en mezcla como alternado con el producto químico lo que posibilita un menor uso de estos, obteniéndose resultados tan buenos como con los fungicidas tradicionales. Con esto se logra que el patógeno esté menos expuesto al fungicida y por lo tanto menos presionado a desarrollar resistencia hacia el mismo. (5,8)

Por otro lado, Mc Kenzie et al; (1991) concluyeron acerca de la pobre actividad de *Trichoderma* en presencia de una alta presión de la enfermedad, lo cual puede ser parcialmente explicado por una baja sobrevivencia de *Trichoderma* en las hojas en condiciones de cultivo.

También, Eden, M.A. et al; (1996) en el cultivo de tomate observaron que la efectividad de *Trichoderma* se veía reducida al aumentar la concentración de inóculo de *Botrytis cinerea* indicando un tipo de interacción competitiva entre estos. (7)

Cabe señalar que si comparamos sus requerimientos ecológicos con los de *Botrytis cinerea*, *Trichoderma harzianum* sería más efectivo cuando las condiciones son sub-óptimas para *Botrytis cinerea*. (26)

La elección de la cepa antagonista se debe hacer en función del objetivo a atender y de su ambiente, debiendo, una cepa de *Trichoderma*, cubrir al menos una parte de las exigencias térmicas de *Botrytis* para ser realmente eficaz. (12)

Para la producción de una buena formulación de este antagonista, ésta debería tener la capacidad de competir y persistir en el ambiente en el cual será utilizado, ser capaz de colonizar y proliferar en órganos ya existentes y en aquellos que se encuentran en formación de la planta tratada aún después de cierto tiempo luego de la colocación del producto.

Para lograr una aplicación efectiva en la parte aérea de las plantas sería recomendable, cuando es pulverizado, controlar el tamaño de gota y la velocidad de pulverización. (5)

Pudiendo ser utilizado como una herramienta de control conjuntamente con la mejora de las prácticas culturales. (10)

### 3.7.2.2. *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* es una bacteria formadora de esporas resistente a temperaturas extremas, pH y a la desecación; lo cual hace posible su supervivencia incluso en condiciones desfavorables. Siendo la formación de esporas muy ventajosa en la preparación de inoculantes ya que son fáciles de preparar además de poseer una larga vida útil y persistencia en el suelo adecuada. (19)

Las características de la bacteria son: "Gram positiva, presencia de endosporas, catalasas positiva, oxidasas negativa, crecimiento en agar



anaerobio negativo, hidroliza el almidón, colonias de aspecto áspero, rugoso y de brillo mate en YDC agar. (25)

Es capaz de segregar un metabolito termoestable con propiedades antifúngicas. Dicho metabolito, conjuntamente con la competencia por los nutrientes y con la exclusión de nichos son los responsables del amplio espectro de acción que presenta el *Bacillus subtilis*.

Para ser exitoso el inoculante debe multiplicarse en la rizosfera e inhibir a los patógenos. Para producir antibiosis deben poseer nutrientes adecuados, especialmente Carbono, el cual puede ser suministrado por exudados radiculares, pudiendo la calidad del sustrato afectar la producción de antibióticos.(4)

### 3.7.3. Control integrado

Hoy en día se está recurriendo al control integrado como una de las medidas más eficaces para el control de las enfermedades.

Según Dickinson y Lucas, (6) " el manejo de las plagas o enfermedades comprende la creación de sistemas que utilicen todos los métodos disponibles en una forma lo mejor compatible posible, a fin de mantener la población de patógeno a un nivel inferior al que causaría pérdidas económicas."

En el caso de *Botrytis cinerea* se sugiere una combinación de modificaciones en el ambiente que reduzcan el nivel de inóculo, la humedad relativa y la humedad sobre los órganos vegetales, todo esto combinado con el uso ya sea de productos químicos como productos para el control biológico.

Para ello, se debe considerar al cultivo y todo lo que lo rodea como un ecosistema, considerando que la enfermedad forma parte del mismo sin

tratar de erradicarla pero si de mantenerla dentro de niveles que no sean económicamente perjudiciales.

Esto se puede lograr por medio de la promoción de condiciones que dificulten el desarrollo de la enfermedad.

Una de las medidas posibles es el manejo del agua para el cultivo, disminuyendo las condiciones que faciliten la germinación y penetración del hongo en el tejido vegetal no permitiendo que se forme una película de agua libre sobre este.

Una mejor aireación del lugar evitaría que se produzcan diferencias de temperatura entre el aire y las hojas lo cual también resultaría en la formación de una película de agua sobre los órganos de las plantas imprescindible para el desarrollo inicial del hongo. (26)

A través de la eliminación de plantas enfermas o de hojas infectadas caídas ya que éstas son una importante fuente de inóculo y también realizando fertilizaciones sin exceso de Nitrógeno con lo cual lograría que las hojas de las plantas, por ser menos succulentas, fueran más resistentes al ataque del hongo siendo más difícil su penetración.(13)

Por medio de la utilización de agentes antagonistas que dificulten o inhiban la presencia del hongo patógeno ya sea total o parcialmente.

Por ultimo, en caso de que sea necesario, cuando las condiciones del medio son ampliamente favorables (alta humedad relativa ambiente y temperaturas moderadas), con la utilización de productos químicos para así disminuir la probabilidad de aumento en la tasa de infección.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. ENSAYOS IN VIVO**

Los ensayos in vivo se realizaron en dos viveros en los meses de agosto y setiembre de 1998 con una duración de 30 días.

Dentro de cada vivero se realizaron dos ensayos en uno de los cuales se mantuvieron las mismas condiciones del vivero en lo que se refiere a condiciones de riego y fertilizaciones exceptuando las aplicaciones de fungicidas.

El otro ensayo se realizó sin el riego habitual del vivero, procediendo a la aplicación de riego manual por debajo del canopy de las plantas, sin la aplicación de fertilizantes ni fungicidas.

Las aplicaciones de los tratamientos también fueron diferenciales para ambos ensayos.

Por un lado, en las bandejas en las cuales se mantuvieron las condiciones del vivero se efectuaron 6 aplicaciones distanciadas cada una cinco días.

En condiciones sin riego habitual se realizaron 3 aplicaciones distanciadas 10 días entre sí.

#### **4.1.1. Viveros**

##### **4.1.1.1. Vivero Olancor**

Se encuentra ubicado en camino Rigel en la ciudad de Montevideo.

Se utilizaron plantines de *Eucalyptus globulus* spp. *globulus*, dentro de las canchas del propio vivero y con bandejas de 84 plantas cada una.

Se utilizó para las bandejas sustrato G8 y G10 de Gromor, realizándose la siembra en el mes de junio.

Los fungicidas que se utilizaron previo a la instalación de los ensayos fueron Oxidloruro de Cobre e Iprodione (Rovral).

Para el manejo de la enfermedad también se procedía a levantar las mallas de protección para mejorar así la aireación de las plantas. (Fotografía 1, anexo)

#### 4.1.1.2. Vivero Sociedad Forestal Uruguaya

El mismo se encuentra sobre camino Repetto en la ciudad de Montevideo.

Se utilizaron plantines de *Eucalyptus globulus* spp. *globulus* dentro de las canchas del propio vivero. Se utilizaron bandejas de 104 plantas.

El sustrato utilizado fue Premier promix-PGX (a base de turba de musgo), siendo sembrado en junio.

Los fungicidas utilizados previamente a la instalación del ensayo fueron Oxidloruro de Cobre e Iprodione (Rovral).

Para el manejo de la enfermedad se realizaba manejo del agua reduciendo el tiempo de riego. (Fotografía 2, anexo)

#### 4.1.2. Diseño experimental para ensayos in vivo

Correspondió a un diseño de parcelas al azar con cuatro repeticiones. Cada parcela correspondía a una bandeja que contenía para el caso del vivero Olancor y Sociedad Forestal Uruguaya, 84 y 104 plantines, respectivamente.

La elección de las bandejas también se realizó al azar pudiendo contener algunas plantas enfermas.

#### 4.1.3. Tratamientos efectuados

- 1) Tratamiento testigo: testigo sin aplicación de fungicidas

Tratamientos químicos

- 2) Tratamiento con Iprodione a dosis comercial 1,5 grs./ m<sup>2</sup> de cantero (1,5 kg./há).
- 3) Tratamiento con Mancozeb a dosis comercial 2,5 grs./ m<sup>2</sup> de cantero (2,5 kg./há).
- 4) Tratamiento con Iprodione a mitad de la dosis comercial 0.75 grs./ m<sup>2</sup> de cantero (0,75 kg./há).

Tratamientos biológicos

- 5) tratamiento con MBI 600 (producto a base de *Bacillus subtilis*) con una dosis de 0.4 grs./ m<sup>2</sup> de cantero.
- 6) tratamiento con Trichosoil (producto a base de *Trichoderma harzianum*) con una dosis de 0,5 grs./m<sup>2</sup> de cantero.

## Tratamientos integrados

- 7) tratamiento con MBI 600 con una dosis de 0,4 grs./ m<sup>2</sup> de cantero conjuntamente con media dosis comercial de Iprodione 0,75 grs./ m<sup>2</sup> de cantero.
- 8) Tratamiento con Trichosoil con una dosis de 0,5 grs./ m<sup>2</sup> de cantero, conjuntamente con media dosis comercial de Iprodione 0,75 grs./ m<sup>2</sup> de cantero.
- 9) Tratamiento con MBI 600 con una dosis de 0,4 grs./ m<sup>2</sup> de cantero, conjuntamente con la dosis comercial de Iprodione de 1,5 grs./ m<sup>2</sup> de cantero.

Para el ensayo con condiciones normales de vivero, los tratamientos se aplicaron los siguientes días:

25 de agosto de 1998

30 de agosto de 1998

4 de setiembre de 1998

9 de setiembre de 1998

14 de setiembre de 1998

19 de setiembre de 1998

Para el ensayo con condiciones en las cuales el riego se realizó manualmente los tratamientos se aplicaron los días siguientes:

25 de agosto de 1998

4 de setiembre de 1998

14 de setiembre de 1998

Para el último ensayo los riegos se realizaron cada 2 días por debajo del canopy.

Las aplicaciones se realizaron por medio de aspersión sobre la parte superior de las plantas y tratando de mojar lo más posible las plantas.

Al iniciarse el ensayo se hizo un recuento del número de plantas totales por bandejas y del número de plantas enfermas por bandeja.

Al finalizar el mismo se contabilizó el número de plantas totales, el número de plantas enfermas y el número de plantas muertas por bandeja.

## 4.2. ENSAYOS IN VITRO

Los ensayos in vitro se realizaron en el laboratorio Lage y Cía. S.A. Se llevaron a cabo tres ensayos en los cuales se trato de determinar el comportamiento de diferentes cepas de *Trichoderma* frente al hongo patógeno *Botrytis cinerea* para su uso en el combate de la enfermedad moho gris de los Eucalyptus.

### 4.2.1. Ensayo in vitro 1

Antagonismo de cepas de *Trichoderma* en el crecimiento de una cepa de *Botrytis*.

Para la realización de este ensayo se partió de una cepa de *Botrytis* proveniente del vivero Olancor y de 5 cepas de *Trichoderma* proporcionadas por el Laboratorio Lage y Cía.

#### 4.2.1.1. Actividades previas a la instalación del ensayo

Previo a la instalación del ensayo se procedió a la preparación de placas de petri con medio de cultivo melaza agar diluido a un cuarto de la concentración normal esterilizadas. Para ello anteriormente se preparó el medio de cultivo diluyendo 3,75 grs. de melaza y 10 grs de agar en un litro

de agua destilada, se puso a calentar hasta romper el hervor y luego se distribuyó en frascos llevándose a autoclave para esterilizar.

Otra actividad realizada fue la siembra en placas con las diferentes cepas de *Trichoderma* y de la cepa de *Botrytis* proveniente del vivero Olancor a partir de las cuales se sacarían los discos utilizados para el ensayo.

#### 4.2.1.2. Instalación del ensayo.

Para la instalación del ensayo se partieron de discos provenientes de las placas que se habían sembrado anteriormente (3 días de crecimiento) de *Trichoderma* y de *Botrytis*.

Los discos fueron extraídos con sacabocados de 5 mm de diámetro del borde de crecimiento de las colonias de *Botrytis* y *Trichoderma*. En placas de petri con el medio de cultivo se colocaron un disco de *Botrytis* y un disco *Trichoderma* en extremos opuestos de la misma. (Figura 1, anexo)

La siembra se realizó en cámara de flujo laminar para evitar posibles contaminaciones del exterior.

#### 4.2.1.3. Diseño experimental del ensayo in vitro 1

Se trata de un diseño de parcelas al azar con 5 repeticiones. Se realizaron 6 tratamientos incluyendo el testigo.

#### 4.2.1.4. Tratamientos

Los tratamientos fueron los siguientes:



- 1) Tratamiento testigo: Se colocaron en cada placa dos discos de *Botrytis*.
- 2) Tratamiento con la utilización de la cepa de *Trichoderma* denominada Ajo1. Se colocó un disco de *Botrytis* y un disco de *Trichoderma* en posición opuesta.
- 3) Tratamiento con la cepa de *Trichoderma* denominada T4. Se colocó un disco de *Botrytis* y uno de *Trichoderma* por placa de petri.
- 4) Tratamiento con la cepa de *Trichoderma* de la cual proviene el producto comercial Trichosoil. Se colocó un disco de *Botrytis* y uno de *Trichoderma* en cada placa de petri.
- 5) Tratamiento con la cepa de *Trichoderma* denominada T473. Se colocó un disco de *Botrytis* y uno de *Trichoderma* por placa de petri.
- 6) Tratamiento con la cepa de *Trichoderma* denominada 668. Se colocó un disco de *Botrytis* y uno de *Trichoderma* por placa de petri.

#### 4.2.1.5. Evaluación

Se midió el diámetro de las colonias de *Botrytis* y de *Trichoderma* realizándose además observaciones subjetivas sobre el crecimiento y comportamiento de las colonias con el paso del tiempo.

#### 4.2.2. Ensayo in vitro 2

Estudio de tolerancia de *Trichoderma* contra los fungicidas Iprodione y Mancozeb.

El objetivo de este estudio es ver la tolerancia de *Trichoderma* a dos de los productos utilizados contra el hongo *Botrytis cinerea*.

Con esto se busca inferir la posibilidad de utilización de *Trichoderma* conjuntamente o alternado con los productos químicos para el control del hongo patógeno.

Se utilizaron las cepas de *Trichoderma* que en primera instancia demostraron un mejor comportamiento contra *Botrytis* en el ensayo anterior. Dichas cepas fueron:

- AJO1
- T4
- TRICHOSOIL

##### 4.2.2.1. Actividades previas a la instalación del ensayo

Una de las actividades fue la preparación de medio de cultivo. Para ello se requirió de la elaboración de medio de cultivo melaza agar completo el cual se preparó con 15 grs. de melaza y 10 grs. de agar diluidos en un litro de agua destilada dicha preparación se llevó a autoclave para su esterilización.

Posteriormente se mezcló con el medio de cultivo diferentes concentraciones de los fungicidas a evaluar.

Iprodione

Para Iprodione las concentraciones utilizadas fueron:

- Media dosis de etiqueta lo cual equivale a una concentración de 750 ppm

- Dosis comercial del producto lo cual equivale a una concentración de 1500 ppm
- Doble de la dosis comercial lo cual equivale a una concentración de 3000 ppm

Para la preparación de las placas se realizó una solución stock a partir de la cual se obtuvieron las diferentes concentraciones.

Dicha solución stock se preparó a partir de 1,5 grs. de Iprodione en 50 ml de agua destilada estéril, (Solución con una concentración de 30.000 ppm).

Para la preparación de placas de petri con medio de cultivo con una concentración de Iprodione de 3000 ppm se colocaron 10 ml de solución stock en un frasco con 90 ml de medio de cultivo. Así se obtuvieron 100 ml de medio de cultivo con la concentración de fungicida requerida.

De la solución stock se extrajo una pipeta con 25 ml que se llevaron a un frasco con 25ml. de agua destilada estéril. De esta forma se obtuvieron 50 ml de solución con una concentración de 15000 ppm.

Para la preparación del medio de cultivo con una concentración de 1500 ppm se colocaron 10 ml de la solución de 15000 ppm en un frasco con 90 ml de medio de cultivo melaza agar completo, obteniendo 100 ml de medio con una concentración de fungicida de 1500 ppm.

Por ultimo, se procedió a la preparación de la solución con menor concentración.

Para ello, se utilizaron 25 ml de solución de 15000 ppm en 25 ml de agua destilada estéril obteniéndose 50 ml de solución con una concentración de 7500 ppm.

A partir de esta última se obtuvo el medio con una concentración de fungicida de 750 ppm, colocando 10 ml de la solución de 7500 ppm en un frasco

conteniendo 90 ml de medio melaza agar, de esta manera se obtuvieron 100 ml de medio de cultivo con la concentración de fungicida requerida.

Con los diferentes medios se llenaron placas de petri, en los cuales posteriormente serían colocados 4 discos de *Trichoderma*.

#### Mancozeb

El procedimiento utilizado es el mismo que para Iprodione variando las dosis utilizadas.

Dichas dosis fueron:

- Media dosis de etiqueta la cual equivale a una concentración de 1250 ppm.
- Dosis comercial del producto que equivale a 2500 ppm
- Doble de la dosis comercial lo que equivale a 5000 ppm del producto.

Además, de la preparación del medio de cultivo, se realizaron cultivos en placas de petri con las cepas de *Trichoderma* elegidas, de los cuales se obtuvieron los discos que se utilizarían en el experimento.

#### 4.2.2.2. Instalación del ensayo

Luego de la preparación de las placas de petri con las diferentes concentraciones de los fungicidas se procedió a la colocación de 4 discos de *Trichoderma* de 5 mm de diámetro por placa de petri, a una distancia igual entre sí. (Figura 2, anexo)

Los discos se obtuvieron del borde de crecimiento de colonias de *Trichoderma* previamente cultivadas con 2 días de crecimiento.

Todas las tareas se realizaron en cámara de flujo laminar al igual que en el ensayo anterior.

#### 4.2.2.3. Diseño experimental del ensayo in vitro 2

Consiste en un diseño de parcelas al azar con 3 repeticiones.

#### 4.2.2.4. Tratamientos

Los tratamientos realizados fueron los siguientes:

- 1) Testigo con cepa de *Trichoderma* Trichosoil sin fungicida
- 2) Testigo con cepa de *Trichoderma* T4 sin fungicida
- 3) Testigo con cepa de *Trichoderma* AJO1 sin fungicida
- 4) Cepa de *Trichoderma* Trichosoil con una concentración de Iprodione de 3000 ppm (3 grs./m<sup>2</sup> de cantero)
- 5) Cepa de *Trichoderma* Trichosoil con una concentración de Iprodione de 1500 ppm (1,5 grs./m<sup>2</sup> de cantero)
- 6) Cepa de *Trichoderma* Trichosoil con una concentración de Iprodione de 750 ppm (0,75 grs./m<sup>2</sup> de cantero)
- 7) Cepa de *Trichoderma* Trichosoil con una concentración de Mancozeb de 5000 ppm (5 grs./m<sup>2</sup> de cantero)
- 8) Cepa de *Trichoderma* Trichosoil con una concentración de Mancozeb de 2500 ppm (2,5 grs./m<sup>2</sup> de cantero)
- 9) Cepa de *Trichoderma* Trichosoil con una concentración de Mancozeb de 1250 ppm (1,25 grs./m<sup>2</sup> de cantero)

- 10) Cepa de *Trichoderma* T4 con una concentración de Iprodione de 3000 ppm (3 grs./m<sup>2</sup> de cantero)
- 11) Cepa de *Trichoderma* T4 con una concentración de Iprodione de 1500 ppm (1,5 grs./m<sup>2</sup> de cantero)
- 12) Cepa de *Trichoderma* T4 una concentración de Iprodione de 750 ppm (0,75 grs./m<sup>2</sup> de cantero)
- 13) Cepa de *Trichoderma* T4 con una concentración de Mancozeb de 5000 ppm (5 grs./m<sup>2</sup> de cantero)
- 14) Cepa de *Trichoderma* T4 con una concentración de Mancozeb de 2500 ppm (2,5 grs./m<sup>2</sup> de cantero)
- 15) Cepa de *Trichoderma* T4 con una concentración de Mancozeb de 1250 ppm (1,25 grs./m<sup>2</sup> de cantero)
- 16) Cepa de *Trichoderma* AJO1 con una concentración de Iprodione de 3000 ppm (3 grs./m<sup>2</sup> de cantero)
- 17) Cepa de *Trichoderma* AJO1 con una concentración de Iprodione de 1500 ppm (1,5 grs./m<sup>2</sup> de cantero)
- 18) Cepa de *Trichoderma* AJO1 con una concentración de Iprodione de 750 ppm (0,75 grs./m<sup>2</sup> de cantero)
- 19) Cepa de *Trichoderma* AJO1 con una concentración de Mancozeb de 5000 ppm (5 grs./m<sup>2</sup> de cantero)
- 20) Cepa de *Trichoderma* AJO1 con una concentración de Mancozeb de 2500 ppm (2,5 grs./m<sup>2</sup> de cantero)

21) Cepa de *Trichoderma* AJO1 con una concentración de Mancozeb de 1250 ppm (1,25 grs./m<sup>2</sup> de cantero)

#### 4.2.2.5. Evaluación

Se realizaron mediciones de los diámetros de las colonias de *Trichoderma* y observaciones subjetivas de las mismas.

#### 4.2.3. Ensayo in vitro 3

Evaluación de *Botrytis* frente al fungicida Iprodione y frente a *Trichoderma*.

El objetivo de este ensayo es ver el comportamiento de *Botrytis* frente a un producto químico como es el caso de Iprodione, frente a un producto biológico como es el caso de la utilización de *Trichoderma* y frente a un control mixto con la utilización conjunta de Iprodione y *Trichoderma*.

Luego de realizado el ensayo anterior se eligió la cepa de *Trichoderma* Trichosoil ya que demostró un buen comportamiento frente a Iprodione.

#### 4.2.3.1. Actividades previas a la instalación del ensayo

##### 4.2.3.1.1. Preparación del medio de cultivo

Para esta evaluación se procedió a la preparación de los medios de cultivo a utilizar, en este caso se trataba de medio melaza agar a un cuarto de concentración.

#### 4.2.3.1.2. Preparación de las soluciones para el ensayo

Para la evaluación de *Botrytis* frente a *Trichoderma* se utilizaron dos preparaciones.

Por un lado se utilizó el producto formulado Trichosoil a la misma dosis que se utilizó a campo, y en segundo termino se utilizó una solución de conidios de *Trichoderma* de la misma cepa que Trichosoil.

Dosis utilizadas y procedimiento para llegar a ellas.

##### Preparación con Conidios

Se procedió a la preparación de una solución a partir de conidios de *Trichoderma* provenientes de colonias de la cepa de Trichosoil.

Los conidios fueron colocados en un tubo de ensayo estéril con agua destilada estéril agitándose bien para facilitar la dilución de los conidios para proceder luego al conteo de los mismos en Cámara de Neubauer.

En el contéo el número de células promedio fue de  $4,5 \times 10^7$ .

##### Trichosoil

La dosis utilizada a campo fue de 0,5 grs./litro de agua. En placas de petri para mantener dicha concentración se diluyeron 0,25 grs./50 ml de agua destilada estéril. Luego esta solución fue diluida en 9 ml de agua destilada estéril ya fuera pura o de agua con una determinada concentración de Iprodione, obteniendo así iguales concentraciones a las utilizadas en los ensayos a campo.

##### Iprodione

Se prepara una solución stock a partir de 0,75 grs. de Iprodione/ 50 ml. de agua destilada estéril.



#### 4.2.3.1.3. Cultivo de *Botrytis*

También, se procedió al cultivo de *Botrytis cinerea* proveniente del vivero Olancor de donde se extraerían posteriormente los discos necesarios para el ensayo.

#### 4.2.3.2. Instalación del ensayo

Para la evaluación se procedió a la colocación en placas de petri de un disco de *Botrytis* de 5 mm de diámetro extraído del borde de crecimiento de colonias (discos de hifas jóvenes).

Luego de la colocación de los discos en el centro de las placas de petri se colocó a los lados del disco dos gotas con la preparación correspondiente, dependiendo del tratamiento a evaluar. (Figura 3, anexo)

Las placas preparadas en cámara de flujo laminar fueron colocadas en estufa a 27 °C.

#### 4.2.3.3. Diseño experimental del ensayo in vitro 3

Consistió en un diseño de parcelas al azar con 4 repeticiones.

#### 4.2.3.4. Tratamientos

Los tratamientos se mencionan a continuación:

- 1) Tratamiento testigo: Se procedió a la colocación en placa de petri de un disco de *Botrytis* y de 2 gotas, en este caso de agua destilada estéril sin ningún producto.

- 2) Tratamiento con Conidios: se colocaron gotas con la concentración de conidios antes mencionada.
- 3) Tratamiento con conidios e Iprodione a mitad de dosis comercial: las gotas contenían la concentración de conidios mencionada y 750 ppm de Iprodione
- 4) Tratamiento con conidios e Iprodione a dosis comercial: las gotas contenían igual concentración de conidios que los anteriores tratamientos y 1500 ppm de Iprodione
- 5) Tratamiento con el producto Trichosoil: Las gotas contenían la dosis de Trichosoil utilizada a campo.
- 6) Tratamiento con el producto Trichosoil e Iprodione a la mitad de la dosis comercial: Las gotas contenían la dosis de Trichosoil del tratamiento anterior y una concentración de Iprodione de 750 ppm.
- 7) Tratamiento con el producto Trichosoil e Iprodione a dosis comercial: Las gotas contenían la dosis de Trichosoil utilizada a campo y una concentración de Iprodione de 1500 ppm.
- 8) Tratamiento con Iprodione a mitad de la dosis comercial: Las gotas contenían una concentración de 750 ppm de Iprodione.
- 9) Tratamiento con Iprodione a dosis comercial: Las gotas contenían una concentración de Iprodione de 750 ppm.

Con el resto de las soluciones y luego de 24 horas se procedió a repetir el ensayo para observar si había alguna influencia del reposo de las soluciones, (principalmente aquellas en las cuales se colocaron conjuntamente Iprodione con Trichosoil) en el comportamiento de *Trichoderma* frente a *Botrytis*.

#### 4.2.3.5. Evaluación

Se realizaron mediciones de diámetro de colonia, ya sea en el sentido hacia las gotas de productos así como en el sentido contrario.

Debido a la contaminación de diversas placas del último procedimiento no se pudo evaluar estadísticamente pudiéndose si realizar observaciones subjetivas con respecto al mismo.

Al haberse, también contaminado placas del tratamiento con Iprodione a dosis comercial, este último fue nuevamente ejecutado siendo comparado con un nuevo testigo.

### 4.3. ANALISIS ESTADÍSTICO

Para cada ensayo los resultados obtenidos fueron sometidos al análisis de varianza y cuando se encontraron diferencias significativas se realizaron pruebas de comparación de medias para detectar diferencias entre los tratamientos.

Para ello se utilizó el programa SAS (SAS Institute, Cary, NC 27511)

En los ensayos in vivo la probabilidad de error utilizada fue de 10 %, mientras que para los ensayos in vitro la probabilidad de error fue del 5%.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *B.cinerea* EN VIVERO**

En los viveros se realizaron 3 evaluaciones de incidencia de *B. cinerea*

#### **5.1.1. Incidencia de *B. cinerea* en el vivero Olancor**

##### **5.1.1.1. Primera evaluación**

En dicha evaluación los valores de incidencia fueron muy bajos alcanzando un valor máximo de 3,94 % en el testigo.

Fueron encontradas diferencias significativas entre tratamientos.

Se diferenciaron del testigo los tratamientos que incluían media dosis de Rovral, ya fuera sólo, con *Trichoderma* o MBI y el tratamiento con Mancozeb; los cuales obtuvieron los valores más bajos de incidencia.

No se diferenciaron del testigo el resto de los tratamientos con valores medios de incidencia. (Cuadro 1)

##### **5.1.1.2. Segunda evaluación**

En esta evaluación los valores de incidencia aumentaron con respecto a la evaluación anterior, siendo los mayores valores, los alcanzados por el tratamiento Trichosoil con un 6,17 %, MBI con 6,15 % y el testigo con 5,76 %.

Se diferenciaron del testigo los tratamientos con valores de incidencia más bajos, el tratamiento con media dosis de Rovral más Trichosoil con 1,5 % y Mancozeb con 1,2 %.

El resto de los tratamientos con valores medios de incidencia no se diferenciaron del testigo. (Cuadro 1)

### 5.1.1.3. Tercera evaluación

La incidencia de la enfermedad se redujo con respecto a las anteriores.

Los valores máximos fueron los del Trichosoil con 6,18 %, el testigo con 4,85 %, media dosis de Rovral con 3,98 % y MBI con 3,88 %.

Se diferenció significativamente del testigo el tratamiento con Mancozeb con el valor más bajos de incidencia. (Cuadro 1)

**CUADRO 1:** Incidencia de *Botrytis cinerea* en el vivero Olancor con riego habitual

	25 de Agosto	20 de Set.	25 de Set.
TRATAMIENTO	Incidencia inicial	Incidencia	Incidencia
<b>TESTIGO</b>	3,94 a	5,76 a	4,85 a
<b>1/2 ROVRAL</b>	0,6 b	3,67 abc	3,98 a
<b>1/2 ROVRAL + MBI</b>	1,2 b	4,01 abc	3,70 ab
<b>1/2 ROVRAL + TRICHOSOIL</b>	0,3 b	1,5 bc	2,12 ab
<b>MANCOZEB</b>	0,9 b	1,2 bc	0,6 b
<b>MBI</b>	2,9 a	6,15 a	3,88 a
<b>ROVRAL</b>	1,83 a	2,75 abc	1,22 ab
<b>ROVRAL + MBI</b>	1,62 ab	2,27 abc	2,59 ab
<b>TRICHOSOIL</b>	1,54 ab	6,17 a	6,18 a

INCIDENCIA: PLANTAS ENFERMAS / PLANTAS TOTALES EN PORCENTAJE (%)

## 5.1.2. Incidencia de *B. cinerea* en el vivero Sociedad Forestal Uruguaya

### 5.1.2.1. Primera evaluación

Se diferenció del resto el tratamiento con media dosis de Rovral con MBI sin incidencia. Para el resto de los tratamientos no se encontraron diferencias significativas entre estos, siendo los valores de incidencia muy bajos incluso comparados con los del vivero Olancor. (Cuadro 2)

### 5.1.2.2. Segunda evaluación

Los valores de incidencia aumentaron considerablemente con respecto a la evaluación anterior. El valor máximo alcanzado por el tratamiento MBI con 5,0 % no diferenciándose significativamente del testigo el cual alcanza un valor de 2,36 %.

Se diferenciaron del testigo los tratamientos con media dosis de Rovral 0,5 %, media dosis de Rovral más MBI 0,49 % y media dosis de Rovral más Trichosoil sin valor de incidencia.

El resto de los tratamientos no se diferenciaron del testigo. (Cuadro 2)

### 5.1.2.3. Tercera evaluación

Los valores de incidencia fueron mayores que en las evaluaciones anteriores.

El mayor valor corresponde al testigo con 5,6 %, no se diferencian del mismo los tratamientos MBI 5,26 %, Trichosoil 4,04 %, media dosis de Rovral más MBI 2,99 % y dosis completa de Rovral 2,66%.

Al igual que en las anteriores evaluaciones el tratamiento con media dosis de Rovral más Trichosoil se encuentra dentro de los tratamientos con menor incidencia de *Botrytis cinerea* con un valor en este caso de 0,28 %. (Cuadro 2)

**CUADRO 2:** Incidencia de *Botrytis cinerea* en el vivero Sociedad Forestal Uruguaya con riego habitual

	25 de Agosto	20 de Set.	25 de Set.
TRATAMIENTO	Incidencia inicial	Incidencia	Incidencia
<b>TESTIGO</b>	1.47 a	2.36 ab	5.6 ac
<b>1/2 ROVRAL</b>	1.04 a	0.5 cd	2.1 d
<b>1/2 ROVRAL + MBI</b>	0 b	0.49 cd	2.99 acd
<b>1/2 ROVRAL + TRICHOSOIL</b>	0.58 ab	0 cd	0.28 b
<b>MANCOZEB</b>	1.4 a	1.4 ac	1.4 bd
<b>MBI</b>	0.8 a	5.0 ab	5.26 ac
<b>ROVRAL</b>	1.0 a	0.66 acd	2.66 ad
<b>ROVRAL + MBI</b>	0.75 a	0.75 acd	2.00 d
<b>TRICHOSOIL</b>	0.7 ab	2.57 ab	4.04 acd

INCIDENCIA: PLANTAS ENFERMAS / PLANTAS TOTALES EN PORCENTAJE (%)

### 5.1.3. Porcentaje de plantas muertas para el vivero Olancor

Este contéo se realizó conjuntamente con la última evaluación de incidencia de *Botrytis cinerea*.

No se registró un número muy alto de plantas muertas siendo el valor máximo alcanzado por el testigo con 3,6 % de plantas muertas.

Los valores más bajos de plantas muertas corresponden a los tratamientos media dosis de Rovral más Trichosoil 0,3%, Media dosis de Rovral 0,6 %, Mancozeb 0,9% y Rovral a dosis completa más MBI 0,97 %.

El resto de los tratamientos no se diferenciaron del testigo. (Cuadro 3)

CUADRO 3: Porcentaje de plantas muertas por *Botrytis cinerea* para el vivero Olancor con riego habitual

	25 de Setiembre	
TRATAMIENTO	% DE PLANTAS MUERTAS	
<b>TESTIGO</b>	3.6	a
<b>1/2 ROVRAL</b>	0.6	b
<b>1/2 ROVRAL + MBI</b>	1.2	ab
<b>1/2 ROVRAL + TRICHOSOIL</b>	0.3	b
<b>MANCOZEB</b>	0.9	b
<b>MBI</b>	1.29	ab
<b>ROVRAL</b>	2.75	a
<b>ROVRAL + MBI</b>	0.97	b
<b>TRICHOSOIL</b>	2.47	a

#### 5.1.4. Porcentaje de plantas muertas para el vivero Sociedad Forestal Uruguay

Al igual que para el vivero Olancor este conteo se realizó conjuntamente con la última evaluación de incidencia de *Botrytis cinerea*, con un valor máximo en el tratamiento media dosis de Rovral más MBI con 1,90 %, no encontrándose diferencias significativas con el resto de los tratamientos. (Cuadro 4)



**CUADRO 4:** Porcentaje de plantas muertas por *Botrytis cinerea* para el vivero Sociedad Forestal Uruguaya con riego habitual

	25 de Setiembre	
TRATAMIENTO	% DE PLANTAS MUERTAS	
<b>TESTIGO</b>	1.48	a
<b>1/2 ROVRAL</b>	1.27	a
<b>1/2 ROVRAL + MBI</b>	1.90	a
<b>1/2 ROVRAL + TRICHOSOIL</b>	0.66	a
<b>MANCOZEB</b>	1.27	a
<b>MBI</b>	1.30	a
<b>ROVRAL</b>	1.29	a
<b>ROVRAL + MBI</b>	0.65	a
<b>TRICHOSOIL</b>	1.24	a

En lo que respecta a los ensayos que se realizaron sin riego habitual no se encontraron plantas enfermas ni muertas, por lo que en el análisis estadístico no hubo resultados.

## 5.2. EVALUACIONES IN VITRO

### 5.2.1. Antagonismo de cepas de *Trichoderma* en el crecimiento de cepas de *Botrytis cinerea*

En este ensayo se realizaron mediciones del diámetro de las colonias de *Botrytis cinerea* cuando este era enfrentado con una colonia de *Trichoderma* en la misma placa.

El crecimiento diametral de *Botrytis* se registró en los primeros tres días luego de instalado el ensayo sin obtenerse diferencias significativas frente al testigo ni entre tratamientos. Por lo cual, en los primeros tres días de crecimiento de las colonias no se evidencia ningún tipo de efecto de *Trichoderma* frente a *Botrytis cinerea*. (Cuadro 5)

**CUADRO 5: DIÁMETRO DE COLONIA DE BOTRYTIS CINEREA FRENTE A DIFERENTES COLONIAS DE TRICHODERMA**

TRATAMIENTO	DÍA 1 Diámetro (mm)		DÍA 2 Diámetro (mm)		DÍA 3 Diámetro (mm)	
<b>Testigo</b>	21	a	30.40	a	38.20	a
<b>Ajo 1</b>	24	a	34.00	a	41.00	a
<b>T 4</b>	23.20	a	35.80	a	48.50	a
<b>Trichosoil</b>	24.4	a	35.40	a	46.25	a
<b>T 473</b>	24.8	a	36.60	a	44.33	a
<b>668</b>	22.95	a	35.10	a	44.60	a

A partir del cuarto día, se realizaron una serie de observaciones para poder discernir acerca del comportamiento de *Botrytis* y *Trichoderma* en el momento en que ambas colonias entran en contacto.

Primeramente, se observó una detención del crecimiento de las colonias de *Botrytis* frente a las cepas de *Trichoderma* de los tratamientos Ajo1 y T4; en los demás tratamientos T473, Trichosoil y 668 se observó un crecimiento diferencial de las colonias de *Botrytis* hacia los costados opuestos a *Trichoderma*.

En observaciones posteriores se determinó el avance de *Trichoderma* sobre las colonias de *Botrytis* ya fuera cubriendo completamente la placa,

como en el tratamiento Trichosoil evidenciándose en estos casos la lisis total de las hifas de *Botrytis cinerea*.

En los tratamientos T4 y Ajo1, el área de la colonia de *Botrytis* se vio reducida a un disco de 5 mm de diámetro en donde se podía observar esporulación de *Botrytis*.

Por otro lado, para los tratamientos 668 y T473 el avance de *Trichoderma* fue más lento que para los otros tratamientos, quedando una mayor área de *Botrytis* con abundante esporulación y sin ser contaminado por *Trichoderma*.

El testigo, por su parte, llegó a cubrir completamente las placas con abundante esporulación.

Por las observaciones antes mencionadas se puede concluir que las cepas de *Trichoderma* que mejor se comportaron como antagonistas de *Botrytis* fueron Trichosoil, T4 y Ajo1, cepas que fueron utilizadas en la siguiente evaluación.

#### 5.2.2. Estudio de tolerancia de diferentes cepas de *Trichoderma* frente a los fungicidas Rovral y Mancozeb.

Los testigos de este ensayo fueron los que crecieron más rápidamente cubriendo la placa al segundo día de instalado el ensayo, por lo que no pudieron ser utilizados en el análisis estadístico con los restantes tratamientos.

Para los tratamientos con el fungicida Mancozeb a diferentes dosis no se registraron crecimientos de las colonias de *Trichoderma*.

Los tratamientos de la cepa de *Trichoderma* T4 con Rovral a diferentes dosis, no pudieron ser comparados estadísticamente ya que su crecimiento comenzó posteriormente al de las otras cepas.

Se realizó el análisis estadístico para las cepas de *Trichoderma* Ajo1 y Trichosoil con diferentes dosis de Rovral. (Cuadro 6)

En la primera medición el mayor diámetro de colonia fue el del tratamiento Trichosoil-Rovral 750 ppm con 19 mm. Este no se diferenció estadísticamente de Ajo1-Rovral 3000 ppm, Trichosoil-Rovral 3000 ppm y Trichosoil-Rovral 1500 ppm.

El diámetro de colonia menor fue el del tratamiento Ajo1-Rovral 750 ppm con 4,54 mm seguido del tratamiento Ajo1-Rovral 1500 ppm.

En la segunda medición nuevamente el mayor diámetro corresponde al tratamiento Trichosoil-Rovral 750 ppm con 28,24 mm.

Los tratamientos Ajo1-Rovral 1500 ppm, Ajo1-Rovral 750 ppm y Trichosoil-Rovral 3000 ppm registraron los menores diámetros los que se diferenciaron estadísticamente de Trichosoil-Rovral 750 ppm.

El resto de los tratamientos registraron diámetros medios de colonia.

En la tercera medición el diámetro del tratamiento Trichosoil-Rovral 750 ppm fue de 36,83 mm no diferenciándose estadísticamente de los tratamientos Ajo1-Rovral 3000 ppm con 31,00 mm, Trichosoil-Rovral 1500 ppm con 31,63 mm y Ajo1-Rovral 1500 ppm con 27,81 mm de diámetro.

Los menores diámetros correspondieron a los tratamientos Ajo1-Rovral 750 ppm y Trichosoil-Rovral 3000 ppm.

Si bien el crecimiento de T4 se vio retardado en el tiempo al igual que en el resto de los tratamientos se pudo observar la esporulación de *Trichoderma*.

**CUADRO 6:** DIÁMETRO DE COLONIA DE *TRICHODERMA* FRENTE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FUNGICIDA

TRATAMIENTO	1 <sup>er</sup> Diámetro (mm)	2 <sup>do</sup> Diámetro (mm)	3 <sup>er</sup> Diámetro (mm)	4 <sup>to</sup> Diámetro (mm)
<b>Ajo 1 Rovral 3000 ppm</b>	10.63 ab	23.00 ab	31.00 ab	31.63 a
<b>Ajo 1 Rovral 1500 ppm</b>	8.88 b	18.81 b	27.81 ab	28.44 a
<b>Ajo 1 Rovral 750 ppm</b>	4.54 b	11.92 b	22.75 b	25.54 a
<b>Trichosoil Rovral 3000 ppm</b>	11.79 ab	15.79 b	21.83 b	26.29 a
<b>Trichosoil Rovral 1500 ppm</b>	12.81 ab	20.38 ab	31.63 ab	36.81 a
<b>Trichosoil Rovral 750 ppm</b>	19.00 a	28.24 a	36.83 a	37.13 a

5.2.3. Estudio de comportamiento *Botrytis cinerea* frente a *Trichoderma* y Rovral.

En lo que se refiere a los testigos no hubo diferencias significativas entre los mismos.

Para el resto de los tratamientos se registraron diámetros durante cinco días, pudiendo éstos ser comparados estadísticamente. (Cuadro 7)

En la primera medición realizada no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos y entre estos y los testigos.

En la medición realizada el segundo día el mayor diámetro fue el del testigo 1 con 25 mm seguido por los tratamientos que incluían Conidios en mezcla con Rovral a diferentes dosis.

Los tratamientos que lograron el menor diámetro fueron T-750R, T-1500R y Trichosoil con 18mm, 15,50mm y 14,33 mm respectivamente. El resto de tratamientos obtuvieron valores medios de diámetro.

Al tercer día todos los tratamientos se diferenciaron del testigo 1 con 36,83 mm de diámetro, a excepción del testigo 2 que logró un diámetro de 37,00 mm.

Los tratamientos Rovral 1500 y Trichosoil obtuvieron diámetros de 29,50 mm y 29,00 mm respectivamente los cuales se diferenciaron de los tratamientos C-1500R y C-750R con 26 mm de diámetro y el tratamiento Rovral 750 con 24,33 mm de diámetro.

Los tratamientos que obtuvieron menor diámetro fueron T-750R con 21,33 mm, Conidios con 21 mm y T-1500R con 16,50 mm, estos se diferenciaron estadísticamente de los demás tratamientos.

En los resultados de la cuarta medición, todos los tratamientos excepto el testigo 2, se diferenciaron del testigo con valores de diámetro menores.

Los tratamientos con menores diámetros de colonia fueron C-1500R con 25,25 mm, Conidios con 20,67 mm, T-1500R con 20 mm y T-750R con 19,33mm. el resto de los tratamientos obtuvieron valores medios de diámetro.

Al quinto día, al igual que la medición anterior todos los tratamientos se diferenciaron del testigo, el cual logró un diámetro de 61,33 mm, a excepción del testigo 2.

Los tratamientos con menores diámetros fueron C-1500R, Conidios, T-1500R y T-750R con valores de 25,25 mm, 21 mm, 20 mm y 19,33 mm respectivamente, los que luego detuvieron su crecimiento con respecto a la medición anterior.

También los tratamientos C-750R y Trichosoil detuvieron su crecimiento con valores de diámetro de 32,75 mm y 32 mm respectivamente.

Los días 6 y 7 se lograron medir y comparar los testigos con los tratamientos que contenían sólo Rovral a diferentes dosis, ya que los

tratamientos que contenían *Trichoderma* detuvieron su crecimiento el día anterior. Para ambas dosis de Rovral los diámetros de colonia fueron menores que los testigos diferenciándose estadísticamente de ellos.

**CUADRO 7: DIÁMETRO DE COLONIAS DE BOTRYTIS CINEREA FRENTE A TRICHODERMA Y ROVRAL**

TRATA- MIENTO	DÍA 1 Diám. (mm)	DÍA 2 Diám. (mm)	DÍA 3 Diám. (mm)	DÍA 4 Diám. (mm)	DÍA 5 Diám. (mm)	DÍA 6 Diám. (mm)	DÍA 7 Diám. (mm)
<b>Testigo 1</b>	15.80 a	25.00 a	36.83 a	51.33 a	61.33 a	68.83 a	78.83 a
<b>Testigo 2</b>	13.00 a	24.00 abc	37.00 ab	41.00 ac	47.00 abc	54.00 ab	66.00 ab
<b>Rovral 1500</b>	14.25 a	22.00 ac	29.50 b	38.00 c	47.50 c	49.50 b	54.75 b
<b>Rovral 750</b>	15.33 a	21.00 abc	24.33 d	31.67 c	35.00 b	41.67 b	44.67 b
<b>Conidios</b>	20.00 a	21.33 abc	21.00 c	20.67 bd	21.00 d		
<b>C-1500 R</b>	19.75 a	24.50 a	26.00 d	25.25 bd	25.25 d		
<b>C – 750 R</b>	17.75 a	24.50 a	26.00 d	32.75 c	32.75 c		
<b>Trichosoil</b>	12.33 a	14.33 bc	29.00 b	32.00 bcd	32.00 bcd		
<b>T-1500 R</b>	13.50 a	15.50 bc	16.50 c	20.00 bd	20.00 d		
<b>T – 750 R</b>	16.67 a	18.00 bc	21.33 c	19.33 bd	19.33 d		

Luego del quinto día, a partir del cual el crecimiento en diámetro de las colonias de *Botrytis* no pudo ser medido para los tratamientos que contenían *Trichoderma*, ya fuera como solución de conidios o como la formulación Trichosoil, se realizaron una serie de observaciones para poder evaluar como era el comportamiento tanto de *Botrytis* como de *Trichoderma*.

El día 6, para todos los casos, ya sea para *Trichoderma* solo como aplicado junto a Rovral en sus diferentes dosis, las colonias de *Botrytis* se encontraban muy esporuladas pero detuvieron su crecimiento en diámetro.

Al día siguiente, ya las placas del tratamiento Conidios sin ninguna dosis de Rovral habían sido completamente cubiertas por *Trichoderma*, para el resto de los tratamientos, se pudo observar como lentamente *Trichoderma* iba sobrepasando el crecimiento de *Botrytis*, con esporulación de *Trichoderma* en el borde de las colonias de *Botrytis*.

Finalmente, en las placas de los tratamientos con Conidios a diferentes dosis de Rovral, sobre el área que ocupaban las hifas de *Botrytis* con conidios se encontraba esporulación abundante de *Trichoderma* por lo que se consideraron las placas cubiertas por *Trichoderma*.

Para los tratamientos que incluían Trichosoil, ya fuera sólo como con Rovral a diferentes dosis, *Botrytis* se vio reducida a una pequeña área alrededor del disco que se había colocado al instalar el ensayo sin esporulación de *Trichoderma* sobre esta, por lo que también se puede considerar que *Botrytis* había sido controlada por *Trichoderma*.

El procedimiento en el cual las soluciones se dejaron reposar 24 horas, si bien no pudo ser comparada estadísticamente por la contaminación de diversas placas, se pudo observar que en las pocas observaciones que se realizaron no habían diferencias en el crecimiento con respecto a los tratamientos que se habían instalado 24 horas antes.



## 6. DISCUSIÓN

*Botrytis cinerea* agente causal de la enfermedad moho gris de los Eucalyptus, desarrolla sus infecciones no sólo gracias a la interacción entre huésped-patógeno, la cual depende de la susceptibilidad del huésped a ese patógeno en particular y de la afinidad de este último a determinado huésped, sino también gracias a la interacción de otros factores tales como temperatura y humedad del ambiente donde se encuentran las plantas.

En lo que se refiere a los datos de humedad relativa y temperaturas medias, correspondientes a la estación meteorológica Melilla (Cuadro 8, anexo), para el período en el cual se llevaron a cabo las actividades en los viveros, se observó que si bien los valores de humedad relativa se encontraban por debajo de los requerimientos de *Botrytis cinerea* para actividades tales como la germinación de los conidios, dentro de los viveros, estos valores sufrirían modificaciones ya que en ellos las condiciones eran diferentes como consecuencia de la utilización de riego por aspersion, lo cual generaría condiciones favorables para la proliferación del hongo.

Los valores de temperaturas medias para el mismo período se encontraron dentro de los rangos óptimos de temperatura para *Botrytis*, siendo las temperaturas mínimas nunca inferiores a 0 °C lo cual impediría el desarrollo del hongo. (Cuadro 9, anexo)

A pesar de las buenas condiciones dadas para el desarrollo del hongo no se dieron, en los ensayos realizados en viveros, valores altos de incidencia de enfermedad, ni de plantas muertas; lo cual no permitió realizar una adecuada evaluación de los diferentes tratamientos para el control de *Botrytis*. Dentro de los valores de incidencia más bajos, se observó un buen control de la enfermedad por parte de los tratamientos que incluían el

fungicida Mancozeb y media dosis de Rovral con Trichosoil para los dos viveros evaluados y de Rovral a dosis completa para el vivero Olancor.

Los bajos valores de incidencia que se obtuvieron para ambos viveros pueden ser explicados por el manejo alternativo que estos realizaban para el control de la enfermedad como ser la reducción del agua de riego y la ventilación de las canchas en las cuales se encontraban las plantas lo que causa una disminución en las condiciones de humedad.

Los tratamientos que incluían control biológico con *Bacillus subtilis* fueron muy variantes, estando el tratamiento MBI generalmente dentro de los valores más altos de incidencia.

Las causas para la baja eficacia del producto biológico a base de *Bacillus subtilis* pueden ser, por un lado, el corto período de evaluación de dicho producto el cual pudo no haber sido suficiente para la producción de antibióticos capaces de controlar a *Botrytis*; otro elemento causal posible es la baja calidad del sustrato, ya que este fue aplicado foliarmente sin la provisión de carbono necesaria para el desarrollo de *Bacillus*.

Se observó, que en los ensayos realizados en vivero con riego manual por debajo del canopy, no hubo incidencia de la enfermedad lo cual pudo deberse a la baja humedad presente en el canopy, sin agua libre que permitiera la germinación de los conidios y por la falta de protección sobre las plantas lo que trajo como consecuencia una incidencia directa de los rayos solares sobre las plantas y una buena ventilación lo que pudo haber llevado a una rápida evaporación del agua sobre estas.

En cuanto al ensayo realizado in vitro que evaluaba el comportamiento de *Botrytis cinerea* frente a diferentes cepas de *Trichoderma*, se pudo observar que las diferentes cepas de *Trichoderma* lograban un buen control de *Botrytis* destacándose dentro de las cinco cepas utilizadas Trichosoil, Ajo1 y T4 los cuales lograron tanto reducir el área que ocupaba *Botrytis* como es

el caso de las cepas Ajo1 y T4, como también, cubrir completamente esa área lisando las hifas de *Botrytis* en su totalidad como es el caso de Trichosoil. La lisis de las hifas de *Botrytis* pudo deberse a la acción de las enzimas que posee *Trichoderma* capaces de degradar las paredes de *Botrytis*.

Para el caso de las cepas T473 y 668 si bien estas controlaban el desarrollo de *Botrytis*, estas no crecieron lo suficientemente rápido como para controlar efectivamente el crecimiento del hongo patógeno.

Posteriormente a este ensayo se realizó el estudio de tolerancia de *Trichoderma* a los fungicidas que fueron utilizados en los ensayos de vivero para poder observar cual sería el comportamiento de *Trichoderma* para su posterior aplicación conjunta con los fungicidas.

Se pudo observar que las diferentes cepas de *Trichoderma* utilizadas no lograron desarrollarse en medios que contenían diferentes dosis de Mancozeb, lo que puede deberse a que Mancozeb es un fungicida de amplio espectro, actuando éste incluso sobre *Trichoderma*.

Para el fungicida Rovral, los resultados fueron diferentes dependiendo de la cepa de *Trichoderma* utilizada.

Si bien se observó que para todas las cepas el crecimiento se vio retardado en el tiempo con respecto a los testigos, la cepa T4 mostró un crecimiento mucho menor y más lento que las cepas Ajo1 y Trichosoil, por lo cual no pudo ser comparado estadísticamente. Dentro de las dos cepas de *Trichoderma* que mejor se comportaron se eligió para el siguiente ensayo a Trichosoil ya que de este se poseía una formulación comercial y mostró un buen desempeño en el ensayo frente a *Botrytis*.

Para todas las cepas se pudo observar que el crecimiento de las hifas no fue el mismo que para el testigo ya que estas presentaban un aspecto diferente al de los testigos, siendo las hifas más finas y más cortas.

Con estas observaciones cabe cuestionarse acerca del uso de un producto biológico con *Trichoderma* y su uso conjunto con los productos químicos. Ya que estos de alguna forma afectan el crecimiento de *Trichoderma*, ya sea inhibiéndolo como es el caso de Mancozeb o retardándolo y modificando su estructura como es el caso de Rovral.

Al aplicar el producto biológico con un fungicida que ejerce algún efecto sobre *Trichoderma* estamos trabajando con sobrevivientes de *Trichoderma* capaces de desarrollarse conjuntamente con el fungicida y no con la dosis que realmente aplicamos, por lo cual frente a *Botrytis*, *Trichoderma* estaría en condiciones inferiores no pudiendo lograr un control realmente efectivo.

En el último ensayo se trato de determinar como sería el comportamiento de *Botrytis* frente al control biológico, al control químico con el fungicida Rovral y frente a la integración de ambos.

En cuanto a la repetición del ensayo que se realizó con las mismas soluciones pero con 24 horas de retraso, se pudo observar que no habían diferencias subjetivas en el crecimiento de las colonias de *Trichoderma*, por lo cual, se puede decir que no surgiría ningún efecto negativo en el crecimiento inicial de *Trichoderma* cuando es aplicado conjuntamente con Rovral.

Se pudo observar que los tratamientos de Rovral a diferentes dosis, sin *Trichoderma* fueron los tratamientos que permitieron un mayor crecimiento y desarrollo de *Botrytis*. Esto pudo deberse a la forma en la cual se aplicó el producto colocándose tan sólo una gota a cada lado de *Botrytis*, permitiendo así que *Botrytis* se desarrollara libremente hasta encontrarse en las cercanías de las gotas del producto químico.

Se observó una zona de inhibición de *Botrytis*, ya que las colonias crecían en el sentido opuesto al cual se encontraban las gotas del fungicida adoptando la colonia forma de elipse a diferencia de la forma que adoptaban las colonias del testigo la cual era circular (Fotografía 3, anexo)

Para los tratamientos que incluían *Trichoderma* ya fuera bajo la forma de solución de conidios o como la formulación Trichosoil los resultados fueron diferentes ya que las colonias de *Botrytis* primeramente mostraron diámetros significativamente menores a los testigos y luego al encontrarse con *Trichoderma*, detuvieron su crecimiento para ser sobrepasadas por *Trichoderma*. (Fotografía 4, anexo)

Se pudo observar que las placas de los tratamientos que contenían *Trichoderma* bajo la forma de conidios en solución fueron invadidas de forma completa más rápidamente que las que contenían a Trichosoil.

Esto puede deberse a que los tratamientos con conidios provenían de colonias de *Trichoderma* que fueron llevadas directamente a una solución, por otra parte Trichosoil es una formulación comercial en donde se incluyen no solo conidios sino también hifas de *Trichoderma* las cuales son aplicados como polvo diluido en agua. Para lograr ese aspecto de polvo las hifas y conidios deben ser triturados, esterilizados y mezclados con adyuvantes que faciliten su adhesión al lugar donde vaya a ser aplicado el producto y luego son almacenados para su posterior aplicación.

Esto puede llevar primeramente a una disminución de su vigor y poder colonizante y por otro lado, en el caso de que sea almacenado por mucho tiempo puede provocar la muerte de mucha de las hifas y conidios, disminuyendo así el inóculo inicial de *Trichoderma* disponible para el control de *Botrytis*.

Estas pueden ser las causas por las cuales el comportamiento de Trichosoil comparado con los conidios haya sido más lento y menos vigoroso.

Los resultados obtenidos indican, además, que los tratamientos que incluían *Trichoderma* sólo o conjuntamente con Rovral se comportarían de forma más eficaz que los tratamientos que incluían sólo al producto químico Rovral. (Fotografías 5, 6 y 7, anexo)

Aún frente a los resultados obtenidos no se puede aseverar que la lucha biológica sea más efectiva que la química ya que como se mencionó anteriormente, la forma de incluir el producto químico en el medio de cultivo no fue la adecuada para su evaluación.

Finalmente, cabe mencionar que los fungicidas químicos y los agentes de control biológico como *Trichoderma* tienen sus ventajas y desventajas pudiendo su combinación lograr un control aceptable de la enfermedad.

Por un lado, el uso de productos químicos lleva a un mejor y más rápido control en condiciones de alta infección, a su vez, su uso muy frecuente puede llevar a la aparición de cepas de patógeno resistentes.

Sin embargo, el control biológico aplicado conjuntamente al químico puede llevar a la disminución de las dosis de productos químicos o a su aplicación más distanciada en el tiempo con lo cual se disminuiría la posibilidad de aparición de resistencia.

Por otro lado, el agente de biocontrol en condiciones de infecciones bajas por su capacidad de colonizar nuevas partes de las plantas puede lograr una protección más prolongada en el tiempo que la que se lograría con la utilización de los productos químicos.

## 7. CONCLUSIONES

1) Aunque las condiciones predisponentes para el ataque en los viveros eran adecuadas, la incidencia de la enfermedad fue baja para el período Agosto- Setiembre 1998.

2) Los productos químicos lograron un control aceptable de la enfermedad principalmente el fungicida Mancozeb.

3) Aunque en vivero, *Trichoderma* no mostró buenos resultados, in vitro logró un buen control de la enfermedad incluso cuando era utilizado conjuntamente al producto químico Iprodione (Rovral).

4) La utilización de *Trichoderma* conjuntamente con Mancozeb es inviable, ya que éste producto inhibe el crecimiento de *Trichoderma*.

5) El control biológico con *Bacillus subtilis* no mostró buenos resultados, lo cual pudo deberse a la inadecuada forma de aplicación del producto y al corto tiempo en el cual fue evaluado.

### Sugerencias para futuras investigaciones

1) Continuar la evaluación de sistemas de control integrado

2) Ajustar métodos de aplicación de productos biológicos para tratar de lograr una mejor expresión de los antagonistas (*Trichoderma* y *Bacillus subtilis*) frente a la enfermedad.

3) Buscar la forma más adecuada de utilización del control biológico conjuntamente con el control químico para potenciar así la lucha contra la enfermedad.

## **8. RESUMEN**

El moho gris de los Eucalyptus, cuyo agente causal es el hongo *Botrytis cinerea*, produce un alto número de plantas muertas en vivero, determinando graves pérdidas en la producción.

La utilización de productos químicos , como Mancozeb e Iprodione (Rovral), tanto como la utilización de dos agentes de biocontrol (*Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis*) fueron evaluados en dos viveros forestales con producción de Eucalyptus globulus ssp globulus durante agosto y setiembre de 1998.

En este período, si bien las condiciones para el desarrollo de la enfermedad fueron favorables para los ensayos que se realizaron con las condiciones de vivero habituales, no hubo una incidencia muy alta, quizás producto de los manejos alternativos de control que se estaban realizando en los mencionados viveros.

Además de las evaluaciones en los viveros se realizaron evaluaciones in vitro en donde se estudió más de cerca el comportamiento de *Botrytis cinerea* frente a *Trichoderma* y productos químicos.

*Trichoderma* frente al producto químico Mancozeb no crecía, por lo tanto, su uso conjunto contra *Botrytis* es inviable.

Los tratamientos que incluían solo el producto químico Rovral lograron el más bajo control de la enfermedad, mientras que los tratamientos que incluían *Trichoderma* sólo o en combinación con diferentes dosis del producto químico Rovral lograban un control adecuado del hongo.



## SUMMARY

Grey mould of Eucalyptus, caused by the fungi *Botrytis cinerea*, cause a high number of death plants in greenhouses, producing as a consequence a serious detriment in production.

Utilization of chemical products, such as Mancozeb and Iprodione (Rovral), as well as, the utilization of two biocontrol agents like *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* were evaluated in two greenhouses which produce Eucalyptus globulus ssp. globulus between August - September 1998.

In this period, in the assays with habitual greenhouse conditions; although, the conditions for the development of the disease were favourable, there was not a high incidence of the disease, perhaps, because of the alternative control which was made in these greenhouses.

Morover, there were made in vitro evaluations, which studied the behaviour of *Botrytis cinerea*, against *Trichoderma* and other chemical products.

*Trichoderma* with Mancozeb did not grown, so they could not be used together against *Botrytis*.

Treatments which included just the chemical product Rovral, reach the lowest disease control, while treatments which included *Trichoderma* alone or in combination with different dosis of Rovral reach an adecuated control of the fungi.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- 1) AGRIOS, G.N. 1995. Fitopatología. 2a. edición. Mexico, Limusa. 838 p.
- 2) ALVEZ FERREIRA, FRANCISCO. 1989. Patologia florestal; Principais doenças Florestais no Brasil. Brasil, Viscosa-MG. 570 p.
- 3) BOVEY, R. 1984. La defensa de las plantas cultivadas. Nueva edición revisada. Barcelona, ediciones Omega. 897p.
- 4) BROWN, MARGARET E. 1974. Seed and Root Bacterization. Annual Review of Phytopathology 12:181-197
- 5) CAMPBELL, R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens. Great Britain, Cambridge University Press. 218 p.
- 6) DICKINSON, C.H.; LUCAS, J.A. 1987. Patología vegetal y patógenos de las plantas. Mexico, Limusa. 312p.
- 7) EDEN, M.A.; HILL, R.A.; STEWART, A. 1996. Biological control of Botrytis cinerea stem infection of greenhouse tomatoes. Plant Pathology 45: 276-284
- 8) ELAD, Y.; ZIMAND, G.; ZAQS, Y.; ZURIEL, S.; CHET, I. 1993. Use of Trichoderma harzianum in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (Botrytis cinerea) under commercial greenhouse conditions. Plant Pathology 42: 324-332
- 9) HARAN, S.; SCHICKELER, H. 1996. Differential Expression of

Trichoderma harzianum Chitinases During Mycoparasitism.  
Phytopathology 86: 980-985

- 10) HARMAN, GARY E. 1996. Trichoderma for biocontrol of Plant Pathogens: From Basic Research to Commercialized Product.  
<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/bcconf/talks/harman.html>
- 11) FOURIE, J.F.; HOLZ, G. 1994. Infection of plum and nectarine flowers by Botrytis cinerea. Plant Pathology 43: 309-315
- 12) FRANCIA. INRA. 1986. L' utilisation des Trichoderma comme agent de lutte biologique à l' égard de deux parasites aériens: Chondrosclereum purpureum (Pers. ex Fr) et Botrytis cinerea. L' emploi d' ennemis naturels dans la protection des cultures. Les Colloques d' INRA 34: 35-49
- 13) KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. 1997. Manual de fitopatologia; Doenças das Plantas Cultivadas. 3a. edición. Sao Paulo, Editora Agronomica Ceres Ltda. Vol 2. 774p.
- 14) LAMONDIA, J.A.; DOUGLAS, S.M. 1997. Sensitivity of Botrytis cinerea from Connecticut greenhouses to Benzimidazole and Dicarboximide fungicides. Plant Disease 81: 729-732
- 15) LARNIER, L.; JOLY, P.; BONDOUX, P.; BELLEMÈRE, A. 1978. Mycologie et Pathologie Forestières. Paris, Masson. 487 p. Mycologie forestière. V. I.
- 16) LORITO, M.; HAYES, C.K.; DI PIETRO, A.; WOO, S.L.; HARMAN, G.E. 1994. Purification, Characterization, and Synergistic Activity of a glucan 1,3  $\beta$ -glucosidase and N- acetyl- $\beta$ -glucosaminidase from Trichoderma harzianum. Phytopathology 84: 398-405

- 17) Mc EDEN, W.E. 1973. Mode of penetration of epidermal Cells Walls of *Vicia faba* by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 64: 461-467
- 18) MENDGEN, K.; HAHN, M.; DEISING, H. 1996. Morphogenesis and mechanisms of penetration of plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 34: 367-386
- 19) MICROBIO. 1997. MBI 600 A novel foliar applied biofungicide for use in plant protection. England. 6p.
- 20) O'NEILL, T.M.; SHTINBERG, D.; ELAD, Y. 1997. Effect of some host and microclimate factors on infection of tomato stems by *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 81: 36-40
- 21) PAPAIVIZAS, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocadium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 23: 23-54
- 22) PETERSON, M.J.; SUTHERLAND, J.R.; TULLER, S.E. 1988. Greenhouse environment and epidemiology of grey mould of container-grown Douglas-fir seedlings. *Can. J. For. Res.* 18: 974-980
- 23) PETERSON MICHAEL. 1995. Botscan: A sampling system to forecast disease incidence of grey mould in container-grown conifer seedlings. *Nursery and Seed* 8: 9-10
- 24) RYTTER, J.L.; LUKEZIC, F.L.; CRAIG, R.; MOORMAN G.W. 1989. Biological Control of Geranium Rust by *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 79: 367-370
- 25) ROMERO, GRACIELA. 1995. Enfermedades en *Eucalyptus* en Uruguay. Facultad de Agronomía. 7p.

- 26) SHTIENBERG, D.; ELAD, Y. 1997. Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 87: 332-340
- 27) SPOTTS, R.A.; HOLTZ, G. 1996. Adhesion and removal of conidia of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* from grape and plum fruit surface. *Plant Disease* 80: 688-691
- 28) STAUB, T. 1991. Fungicide Resistance Practical Experience with Antiresistance Strategies and the Role of Integrated use. *Annual Review of Phytopathology* 29: 421-442

## 11. ANEXOS

**CUADRO 8:** Datos climáticos registrados por la Estación Meteorológica Melilla (periodo Agosto- Setiembre 1998)

Fecha	LLUVIA (mm)	T. Promedio (°C)	H.Relativa (%)
25/08/98		11,9	69
26/08/98		10,7	67,88
27/08/98		11,0	63,67
28/08/98		12,0	59,91
29/08/98		9,4	58,9
30/08/98		9,7	63,5
31/08/98		12,6	63,25
01/09/98	6,0	16,7	62,81
02/09/98	13,0	13,5	97,63
03/09/98		12,4	83,19
04/09/98		11,2	67,5
05/09/98		12,9	60,9
06/09/98		13,2	62,94
07/09/98		14,5	78,79
08/09/98	0,3	11,9	73,8
09/09/98		10,9	49,94
10/09/98		13,2	62,13
11/09/98	6,0	18,4	70,86
12/09/98		13,2	79,69
13/09/98		9,3	61
14/09/98		9,0	61,13
15/09/98		11,5	53,94
16/09/98		13,4	49,33
17/09/98		12,3	77,88
18/09/98	1,5	10,4	68,06
19/09/98	1,3	9,0	68,67
20/09/98	4,1	9,1	84,53
21/09/98		10,0	64,6
22/09/98		15,0	63,56
23/09/98	1,0	15,8	60,81
24/09/98		15,5	64,88
25/09/98		16,4	48,07

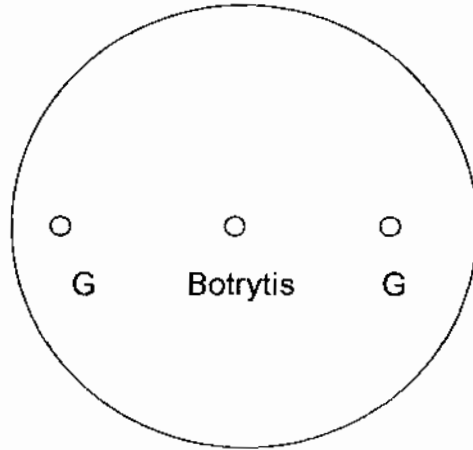
**CUADRO 9:** Temperaturas máximas y mínimas registradas por la Estación Meteorológica Melilla (periodo Agosto- Setiembre 1998)

<b>Fecha</b>	<b>T. Max (°C)</b>	<b>T. Min (°C)</b>
25/08/98	16,0	7,8
26/08/98	13,4	8,0
27/08/98	17,4	4,5
28/08/98	19,4	4,5
29/08/98	14,4	4,4
30/08/98	17,0	2,4
31/08/98	18,8	6,4
01/09/98	23,5	9,9
02/09/98	13,8	13,2
03/09/98	13,5	11,2
04/09/98	17,9	4,4
05/09/98	19,8	6,0
06/09/98	19,8	6,6
07/09/98	20,0	9,0
08/09/98	17,0	6,7
09/09/98	17,1	4,7
10/09/98	19,5	6,9
11/09/98	22,6	14,2
12/09/98	17,8	8,5
13/09/98	13,6	5,0
14/09/98	14,9	3,0
15/09/98	19,2	3,8
16/09/98	20,4	6,3
17/09/98	15,7	8,9
18/09/98	11,9	8,8
19/09/98	13,0	5,0
20/09/98	12,8	5,4
21/09/98	16,1	4,0
22/09/98	19,3	10,8
23/09/98	21,0	10,6
24/09/98	20,9	10,0
25/09/98	24,4	8,4

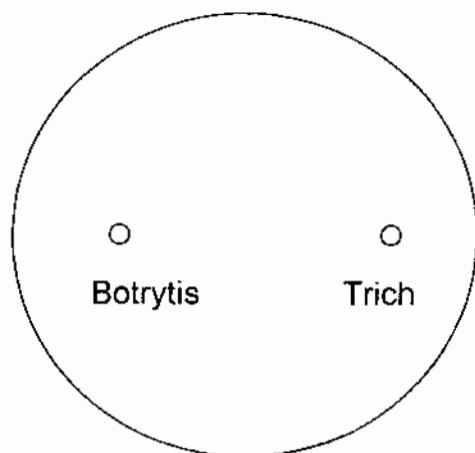


**Figura 3:** Esquema de la distribución de los discos de *Botrytis* en las placas de petri en el ensayo in vitro 3

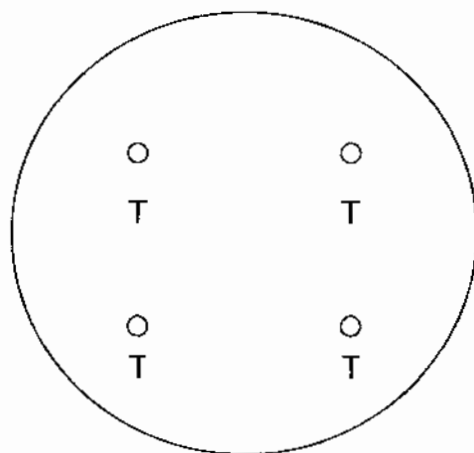
Referencias: G - Gota de las diferentes soluciones



**Figura 1:** Esquema de la distribución de los discos de *Botrytis* y *Trichoderma* en las placas de petri en el ensayo in vitro 1



**Figura 2:** Esquema de la distribución de los discos de *Trichoderma* en las placas de petri en el ensayo in vitro 2



*Fotografía 1:* Vista general de las canchas del vivero Olancor en donde se realizó el ensayo de campo con condiciones habituales del vivero



*Fotografía 2:* Vista general de las canchas del vivero Sociedad Uruguaya Forestal en donde se realizó el ensayo de campo con condiciones habituales del vivero

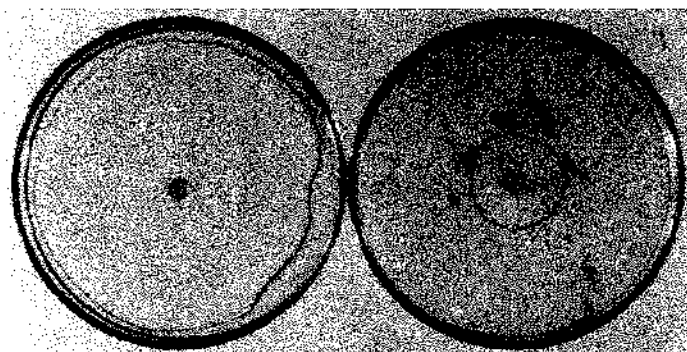


Fotografía 3: Colonias de Botrytis del ensayo in vitro 3 de los tratamientos con dosis completa de Rovral, con media dosis de Rovral y el Testigo



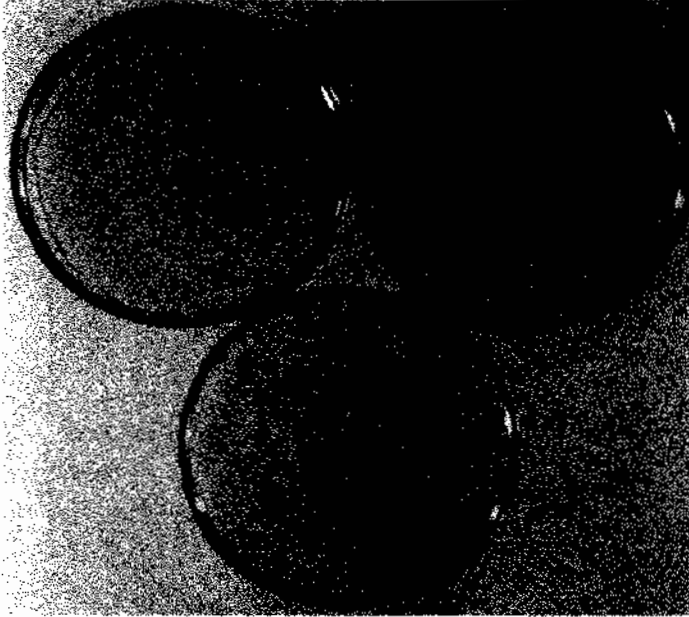
Referencias: Margen superior izquierdo tratamiento con dosis completa de Rovral, margen superior derecho tratamiento Testigo y parte inferior de la fotografía tratamiento con media dosis de Rovral

Fotografía 4: Colonias de Botrytis del ensayo in vitro 3 del tratamiento con Trichosoil sólo y del Testigo



Referencias: A la izquierda el Testigo y a la derecha tratamiento con Trichosoil

**Fotografía 5:** Colonias de Botrytis del ensayo in vitro 3 de los tratamientos con media dosis de Rovral, con media dosis de Rovral junto con Trichosoil y el Testigo



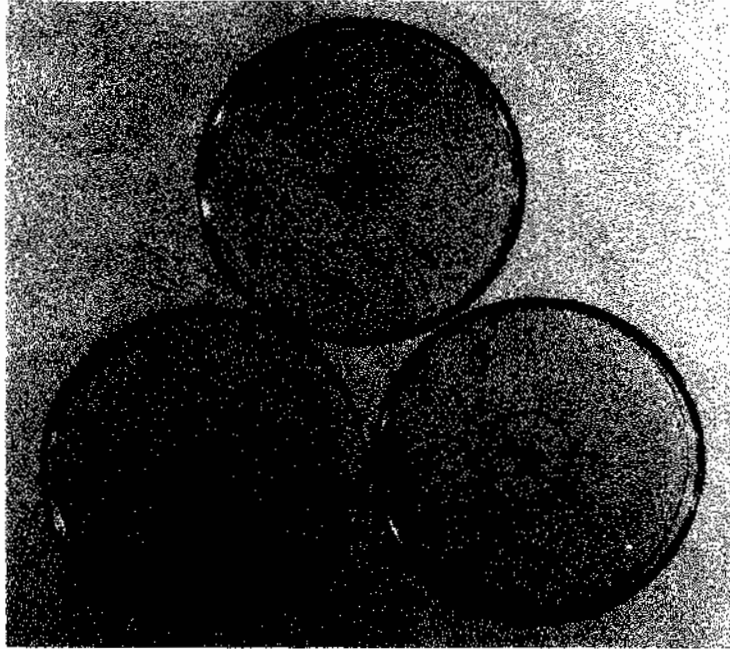
**Referencias:** Margen superior izquierdo tratamiento Testigo, margen superior derecho tratamiento con media dosis de Rovral con Trichosoil y parte inferior de la fotografía tratamiento con media dosis de Rovral

**Fotografía 6:** Colonias de Botrytis del ensayo in vitro 3 de los tratamientos con dosis completa de Rovral, con dosis completa de Rovral junto con Trichosoil y el Testigo



**Referencias:** Parte superior de la fotografía tratamiento con dosis completa de Rovral con Trichosoil, margen inferior izquierdo Testigo y margen inferior derecho tratamiento con dosis completa de Rovral.

**Fotografía 7:** Colonias de Botrytis del ensayo in vitro 3 de los tratamientos con Trichosoil sólo, Trichosoil con dosis completa de Rovral y Trichosoil con media dosis de Rovral



**Referencias:** Parte superior superior de la fotografía tratamiento de Trichosoil con media dosis de Rovral, margen inferior izquierdo tratamiento Trichosoil con dosis completa de Rovral y margen inferior derecho tratamiento Trichosoil sólo.