



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Forestales
Programa de Magister en Ciencias Forestales.

Eficacia de diferentes formulaciones de *Clonostachys rosea* en el control del moho gris (*Botrytis cinerea*) en condiciones operacionales de plantas de *Eucalyptus* spp.

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Forestales.

DIEGO NICOLÁS MUSIET SOTO
CONCEPCIÓN - CHILE
2015

Profesor Guía: Eugenio Sanfuentes Von Stowasser.
Dpto. de Silvicultura, Facultad de Ciencias forestales.
Universidad de Concepción.

Eficacia de diferentes formulaciones de *Clonostachys rosea* en el control del moho gris (*Botrytis cinerea*) en condiciones operacionales de plantas de *Eucalyptus* spp.

Comisión evaluadora.

Eugenio Sanfuentes VS.

Ingeniero Forestal, Dr.

Katherine Sossa F.

Bióloga, Dra.

Wagner Bettiol.

Agrónomo, Dr.



Director de Postgrado.

Regis Texeira M.

Ingeniero Químico, Dr.

Decano Facultad de Ciencias Forestales.

Manuel Sanchez-Olate

Ingeniero Forestal, Dr.



Agradecimientos.

Primero, agradecer a mi mamá y al tío Max, por su apoyo en toda mi carrera académica.

Al profesor Eugenio Sanfuentes, por permitirme realizar mis estudios con él durante estos cinco años que han pasado, por su tiempo, su paciencia, sus consejos, por permitirme crecer en el mundo de la ciencia y comenzar un tema totalmente nuevo, tanto para mí como para él, lo cual fue un desafío complejo.

Agradecer al profesor Wagner Bettiol, por sus consejos y tiempo en apoyarme.

A don Carlos Villagra de forestal Mininco, por permitirme realizar ensayos en las dependencias de la empresa, su buena disposición y gentileza en todo momento. También agradecer al personal que me apoyaron en los montajes de ensayo, como la señora Ana y Jaqueline.

A mis amigos, Sebastián, Felipe Balocchi, Felipe Segura, Mariela y Gabriela, por su constante apoyo y permitirme vivir buenos y malos momentos en conjunto, las risas, salidas extra programáticas, situaciones estresantes, alegrías, todo. Sin ellos y otras personas, los años que pasé en la universidad no hubiesen sido lo mismo.

A todos los integrantes del club de aikido Taiga Aikidojo Concepción, por entregarme crecimiento espiritual. Mención especial para Oscar, Sergio y Joaquín, mis grandes amigos, que sin ellos, tal vez las clases no serían lo mismo. Mención especial para este último, por su apoyo en idioma inglés. También agradecer a Sensei Javier y Sensei Piotr por las oportunidades que me han dado.

Agradecer a mi Sensei Rigoberto, por su apoyo en los malos momentos de mi vida, por aconsejarme y ayudarme a ponerme de pie en momentos que lo necesité.

Al personal del laboratorio de Patología Forestal, Erwin, Karina y Don Fernando, sin los cuales el ambiente del laboratorio no sería lo mismo. Mención también para todas las personas que han pasado por el laboratorio realizando unidad de investigación, tesis u otros.

A todas las personas nombradas y a aquellos que me faltaron, pero saben que sin su apoyo esto no hubiese sido posible, ¡Gracias totales!

Tabla de contenidos

I. INTRODUCCIÓN.....	1
Importancia del sector forestal en Chile.	1
Control biológico como alternativa.	3
Importancia de la formulación.	5
Ejemplos de formulación.	10
Control Biológico en Chile con <i>Clonostachys rosea</i>	11
II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	12
Hipotesis.	12
Objetivo general.	12
Objetivos específicos.	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1. Efecto de distintas formulaciones en la germinación de conidias de <i>C. rosea</i> A10 y A11.	13
3.1.1. Prueba de productos individuales.	13
3.1.2. Prueba de productos combinados.	14
3.1.3. Evaluación y análisis estadístico.	15
3.2. Eficacia de formulaciones de <i>C. rosea</i> A10 y A11 en el control de <i>B. cinerea</i> en mini estacas del clon híbridos <i>E. globulus</i> x <i>E. nitens</i> X-65 y plantas de <i>E. globulus</i> en condiciones de producción operacional.	16
3.2.1. Antecedentes generales.	Error! Bookmark not defined.
3.2.2. Material vegetal y condiciones de ensayos.	16
3.2.3. Producción de inóculo de <i>C. rosea</i>	17
3.2.4. Tratamientos.	17
3.2.5. Evaluaciones.	20
3.2.6. Diseño experimental y análisis estadístico.	20
3.3. Bioensayos de antagonismo de <i>B. cinerea</i> en discos de hoja a diversas temperaturas.	22
3.3.1. Material vegetal.	22
3.3.2. Inoculación de discos, tratamientos y temperaturas de incubación.	22

3.3.3	Diseño experimental y análisis de datos.	23
3.4.	Bioensayo de antagonismo con diferentes formulaciones para el control de <i>B. cinerea</i>	24
3.4.1.	Material vegetal.	24
3.4.2.	Inoculación de discos, tratamientos y temperaturas de incubación.	24
3.4.3.	Diseño experimental y análisis estadístico.	25
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1.	Efecto de distintas formulaciones en la germinación de conidias de <i>C. rosea</i> A10 y A11. 26	
4.1.1.	Prueba de productos para formulación.	26
4.1.2.	Prueba de productos combinados.	28
4.2.	Efecto de formulaciones de <i>C. rosea</i> A10 y A11 en el control de <i>B. cinerea</i> en mini estacas del clon híbrido <i>E. globulus</i> x <i>E. nitens</i> X-65 y plantas de <i>E. globulus</i> en condiciones de producción operacional.	32
4.2.1.	Ensayo de verano.	32
4.2.2.	Ensayo de otoño.	37
4.3.	Bioensayos de antagonismo de <i>B. cinerea</i> en discos de hoja a diversas temperaturas. 43	
4.4.	Bioensayo de antagonismo con diferentes formulaciones para el control de <i>Botrytis cinerea</i>	46
V.	CONCLUSIONES	49
VI.	BIBLIOGRAFÍA.....	50
VII.	ANEXOS.	61

INDICE DE TABLAS.

TABLA N°	PÁGINA
En el texto.	
TABLA 1. Productos adyuvantes probados para formulación de <i>Clonostachys rosea</i> A10 y A11 con sus respectivas concentraciones (g/L).....	14
TABLA 2. Combinación de adyuvantes utilizados en los ensayos de germinación de <i>Clonostachys rosea</i> A10 y A11, con sus respectivas concentraciones.....	15
TABLA 3. Tratamientos utilizados en ensayo de verano, correspondientes a mini estacas del clon híbrido <i>Eucalyptus globulus x Eucalyptus nitens</i> X65.	18
TABLA 4. Tratamientos probados en ensayo de otoño, correspondiente a plantas de semillas de <i>Eucalyptus globulus</i>	19
TABLA 5. Descripción de los grados utilizados para la evaluación de bioensayos a distintas temperaturas con discos de hoja de <i>Eucalyptus globulus</i>	22
TABLA 6. Grado de esporulación (GE) en los bioensayos de control de <i>B. cinerea</i> con aplicación de <i>C. rosea</i> A10 y A11 a distintas temperaturas.	44
TABLA 7. Resultados del bioensayo con distintas formulaciones para ambas cepas de <i>C. rosea</i> A10 y A11 en el control de <i>B. cinerea</i> a distintas temperaturas.....	48
En ANEXO.	
TABLA 8. Productos biológicos comercializados en Chile. Fuente: SAG, 2012.	61

INDICE DE FIGURAS.

FIGURA N°	PÁGINA
En el texto.	
FIGURA 1. Planta de <i>Eucalyptus globulus</i> atacada por <i>Botrytis cinerea</i> . Abundante esporulación en tallo de la planta(A). Conidióforos y conidias del patógeno (B).....	3
FIGURA 2. Germinación de conidias de <i>Clonostachys rosea</i> A10 para los productos ensayados en tres concentraciones (g/L). Barras indican la desviación estándar de los tratamientos y letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según test Tukey (P=0.05).	27
FIGURA 3. Germinación de conidias de <i>Clonostachys rosea</i> A11 para los productos ensayados en tres concentraciones (g/L). Barras indican la desviación estándar de los tratamientos y letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según test Tukey (P=0.05).	28
FIGURA 4. Germinación de conidias de <i>Clonostachys rosea</i> A10 para las combinaciones de productos. Control: suspensión de conidias en agua; Mezcla 1: alginato de sodio, carbonato de potasio, dióxido de titanio (15:1:4 g/L); Mezcla 2: alginato de sodio, carbonato de potasio, carboximetilcelulosa, dióxido de titanio (15:1:0.5: 4 g/L); Mezcla 3: alginato de sodio, carbonato de calcio, dióxido de titanio (15:1:4 g/L); Mezcla 4: alginato de sodio, carbonato de calcio, carboximetilcelulosa, dióxido de titanio (15:1:0.5:4 g/L); Mezcla 5: almidón de maíz, carbonato de potasio, dióxido de titanio (15:1:4 g/L); Mezcla 6: almidón de maíz, carbonato de potasio, carboximetilcelulosa, dióxido de titanio (15:1:0.5:4 g/L); 7: Mezcla almidón de maíz (15 g/L), carbonato de calcio (1 gr/L), dióxido de titanio (4 g/L); Mezcla 8: almidón de maíz, carbonato de calcio, carboximetilcelulosa, dióxido de titanio (15:1:0.5:4 g/L). Barras indican la desviación estándar de los tratamientos.	29
FIGURA 5. Germinación de conidias de <i>Clonostachys rosea</i> A11 para las combinaciones de productos. Control: suspensión de conidias en agua; Mezcla 1: alginato de sodio, carbonato de potasio, dióxido de titanio (15:1:4 g/L); Mezcla 2: alginato de sodio, carbonato de potasio, carboximetilcelulosa, dióxido de titanio (15:1:0.5: 4 g/L); Mezcla 3: alginato de sodio, carbonato de calcio, dióxido de titanio (15:1:4 g/L); Mezcla 4: alginato de sodio, carbonato de calcio, carboximetilcelulosa, dióxido de titanio (15:1:0.5:4 g/L); Mezcla 5: almidón de maíz, carbonato de potasio, dióxido de titanio (15:1:4 g/L); Mezcla 6: almidón de maíz, carbonato de potasio, carboximetilcelulosa, dióxido de titanio (15:1:0.5:4 g/L); 7: Mezcla almidón de maíz (15 g/L), carbonato de calcio (1 gr/L), dióxido de titanio (4 g/L); Mezcla 8: almidón de maíz, carbonato de calcio, carboximetilcelulosa, dióxido de titanio (15:1:0.5:4 g/L). Barras indican la desviación estándar de los tratamientos.	30

FIGURA 6 .Porcentaje de enraizamiento correspondiente a mini estacas del clon híbrido *E. globulus* x *E. nitens* X-65 (A), formación de callos (B), plantas no enraizadas (C) y plantas muertas (D) correspondientes al ensayo de verano. Barras indican desviación estándar de los tratamientos. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre los tratamientos según test LSD P=0.05. Tratamientos 1 y 5: Dióxido de titanio (4 g/L), carbonato de potasio (1 g/L), alginato de sodio (10 g/L); carboximetilcelulosa (0.5 g/L).; Tratamiento 2 y 6: Dióxido de titanio (4 g/L), carbonato de calcio (1g/L), alginato de sodio (10 g/L), carboximetilcelulosa (0.5 g/L).; Tratamiento 3 y 7: Dióxido de titanio (4 g/L), carbonato de potasio (1g/L), almidon de maíz (10 g/L), carboximetilcelulosa (0.5 g/L); Tratamiento 4 y 8: Dióxido de titanio (4 g/L), carbonato de calcio (1g/L), almidón de maíz 10 (g/L), carboximetilcelulosa (0.5 g/L). Tratamientos 1 al 4 corresponden a mezclas con cepa *C. rosea* A10; tratamientos del 5 al 8 corresponden a mezclas cepa *C. rosea* A11. Tratamiento 9: aplicación de agua.; Tratamiento 10: Serenade.; Tratamiento 11: suspensión de conidias en agua de *C. rosea* A10.; Tratamiento 12: suspensión de conidias en agua *C. rosea* A11.; Tratamiento 13: Iprodione. 34

FIGURA 7.Tratamientos con la cepa de *Clonostachys rosea* A10 (A, C) y A11 (B, D) en ensayo de verano (mini estacas del clon híbrido *E. globulus* x *E. nitens* X-65) presentando entre sus componentes alginato de sodio (A y B) y con almidón de maíz (C y D) respectivamente. 35

FIGURA 8.Mortalidad de plantas (porcentaje) por *B. cinerea* en los diferentes tratamientos al finalizar el ensayo. Las barras muestran desviación estándar de los tratamientos. T1 y T4: Formulación 1 correspondiente a dióxido de titanio 4 g/L, carbonato de potasio 1g/L, almodión de maíz 10 g/L, carboximetilcelulosa 0.5 g/L.; T2 y T5: Formulación 2 correspondiente a suspensión de conidias en agua con modificación de pH a 3.5 añadiendo ácido láctico. T3 y T6: Suspensión de conidias de *C. rosea* en agua. T1 a T3 correspondiente a cepa de *C. rosea* A10; T4 a T6 correspondiente a cepa de *C. rosea* A11; T7: Aplicación de Serenade; T8: Aplicación agua; T9: Rotación de fungicidas. Diferentes letras muestran diferencia significativa entre los tratamientos según test LSD P=0.05. 38

FIGURA 9.Comportamiento de temperaturas promedio en el vivero Carlos Douglas Yumbel entre el 15 de Abril y 4 de Junio de 2014. 39

FIGURA 10. Curva de progreso de la enfermedad en los diferentes tratamientos al 19 de Junio de 2014. T1 y T4: Formulación 1 correspondiente a dióxido de titanio 4 g/L, carbonato de potasio 1g/L, almodión de maíz 10 g/L, carboximetilcelulosa 0.5 g/L.; T2 y T5: Formulación 2 correspondiente a suspensión de conidias en agua con modificación de pH a 3.5 añadiendo ácido láctico. T3 y T6: Suspensión de conidias de *C. rosea* en agua. T1 a T3 correspondiente a cepa de *C. rosea* A10; T4 a T6 correspondiente a cepa de *C. rosea* A11; T7: Aplicación de Serenade; T8: Aplicación agua; T9: Rotación de fungicidas. Diferentes letras muestran diferencia significativa entre los tratamientos según test LSD P=0.05. 40

FIGURA 11. Ensayo de semillas montado en Vivero Carlos Douglas Yumbel. En la imagen es posible observar remanente en las plantas de *E. globulus* en tratamiento de *C. rosea* formulado con dióxido de titanio 42

FIGURA 12. Bioensayo realizado a diferentes temperaturas (30, 25, 20, 15 y 10°C) para el control de *B. cinerea* utilizando los antagonistas *C. rosea* A10 y A11. CA: control agua (aplicación solo agua); CP: Control patógeno (solo aplicación de suspensión de conidias de *B. cinerea*), 10: Aplicación del antagonista *C. rosea* A10 24 h antes de la aplicación del patógeno; 11: Aplicación del antagonista *C. rosea* A11 24 h antes de la aplicación del patógeno. 45



RESUMEN.

Los aislados de *Clonostachys rosea* A10 y A11 han demostrado previamente su capacidad antagonista frente al patógeno *Botrytis cinerea* tanto en condiciones *in vitro* como en condiciones de campo. La formulación podría mejorar la resistencia a variables ambientales adversas a ambas cepas. Por esta razón el objetivo del presente estudio fue determinar la eficacia con distintas formulaciones de ambos antagonistas en el control de *B. cinerea* de en la producción operacional de *Eucalyptus* spp.

En una primera etapa, se realizaron ensayos *in vitro* de germinación con *C. rosea* A10 y A11 probándose diferentes adyuvantes para ser incorporados en una formulación: protector solar (dióxido de titanio), emulsificante (carboximetilcelulosa), humidificantes (carbonato de potasio y de calcio) y estabilizantes (almidón de maíz, alginato de sodio y glicerol) demostrándose que solo el glicerol reducía proceso de germinación de conidias en ambas cepas, mientras el resto de adyuvantes mantuvieron la germinación entre 85 y 98%. Posteriormente se probaron ocho mezclas de adyuvantes en condiciones *in vitro* obteniéndose niveles de germinación superior al 90 % en todos los casos, semejantes al control.

En una segunda etapa, se realizaron dos ensayos en campo. El primero ensayose usaron mini estacas del clon híbrido *Eucalyptus globulus* x *E. nitens* clon X-65, donde se probaron cuatro formulaciones con *C. rosea* A10 y A11, ambas cepas en agua, y como controles el biofungicida comercial Serenade®, el fungicida Iprodione y un control que solo se aplicó agua. Las aplicaciones se realizaron por aspersión cada diez días, mientras que la aplicación de fungicida solo se realizó al montaje del ensayo. En este ensayo no fue posible verificar la capacidad de control de cualquier de los tratamientos debido a que no se registró la ocurrencia de la enfermedad en invernadero, sin embargo, fueron descartadas dos formulaciones que poseían alginato de sodio, compuesto que mostró ser fitotóxico en las hojas de las miniestacas.

El segundo ensayo, establecido en abril se utilizaron plantas de *E. globulus* provenientes de semillas con seis meses de edad. Se probaron tres formulaciones para *C. rosea* A10 y A11, las que fueron a) dióxido de titanio 4g/L, carbonato de potasio 1g/L, carboximetilcelulosa 0.5 g/L y almidón de maíz 10g/L; b) modificación de pH a 3.5 añadiendo ácido láctico; c) suspensión en agua de ambas cepas; además los controles consistentes en el biofungicida comercial Serenade®, rotación de fungicidas (Teldor, Switch, Horizon y Tebuconazole) y el control absoluto (agua). Las aplicaciones se realizaron de manera semanal por aspersión, mientras que la aplicación de los fungicidas quincenalmente. Como resultado se obtuvo que las formulaciones no redujeron la incidencia de *B. cinerea*, alcanzando niveles de mortalidad de plantas entre 4 y 8%, entretanto solo tuvieron efecto de control Serenade (1.83% de mortalidad) y los fungicidas (0.17% de mortalidad). La falla en el control por ambos aislado de *C. rosea* fue asociado a las bajas temperaturas que ocurrieron en la época de ejecución del ensayo.

Para demostrar el efecto de las temperaturas en el control de *B. cinerea* para ambas cepas de *C. rosea* se realizó un bioensayo *in vitro* con discos de hoja de *E. globulus*, donde se probó las cepas por sí solas a diferentes temperaturas (10, 15, 20, 25 y 30°C), demostrando la capacidad antagónica de las cepas a temperaturas de 20, 25 y 30°C, sin embargo, la capacidad de control disminuye a temperaturas menores a 20°C.

Finalmente en bioensayos *in vitro* empleando discos de hoja de *E. globulus* a temperaturas de 15, 20 y 25°C se determinó la eficacia tres formulaciones para ambas cepas de *C. rosea* a) formulación con dióxido de titanio 4g/L, carbonato de potasio 1g/L, carboximetilcelulosa 0.5 g/L y almidón de maíz 10g/L; b) modificación de pH a 3.5 añadiendo ácido láctico; c) suspensión en agua; los controles consistentes en el biofungicida comercial Serenade® y el fungicida Switch, el control absoluto solo agua. Se demostró la capacidad antagónica de ambas cepas en todas sus formulaciones a temperaturas de 20 y 25°C, sin embargo, se constató una disminución en la capacidad antagónica a 15°. En el caso de los productos comerciales, solo el fungicida fue capaz de controlar *B. cinerea* en todas las temperaturas.

Como conclusión, se demostró en bioensayos *in vitro* la eficacia en el control del patógeno *B. cinerea* de las formulaciones de ambas cepas de *C. rosea* siendo igual a la aplicación del fungicida Switch, sin embargo, a temperaturas menores a 15°C este control disminuye, siendo mejor la aplicación de productos químicos para el control de la enfermedad.

Palabras claves: *Eucalyptusspp.*, *Clonostachys rosea*, *Botrytis cinerea*, control biológico, formulaciones, temperaturas.



ABSTRACT.

Isolated of *Clonostachys rosea* A10 and A11 have shown in previously assays its antagonist capacity against *Botrytis cinerea* *in vitro* as well as field conditions. For this reason, the objective of this present study was to determine the efficacy, with different formulations, of both antagonists in the control of *B. cinerea* in an operational production of *Eucalyptus* spp.

In a first stage, *in vitro* assays of conidia germination with *C. rosea* A10 and A11 were realized, testing different adjuvants to be incorporated at a formulation: sunscreen (titanium dioxide), emulsifier (carboxymethylcellulose), wetting (potassium and calcium carbonate) and stabilizer (cornstarch, sodium alginate and glycerol); showing that glycerol reduced the germination process in both strains, while the rest of adjuvants keep the germination between 85% and 98%. Later eight mixtures of adjuvants *in vitro* were tested, obtaining germination above 90% in all cases, equal at control.

In a second stage, two field assays were performed. In the first one (installed in January) mini cuttings of hybrid *Eucalyptus globulus* x *E. nitens* clone X-65 were used, and four formulations with *C. rosea* A10 and A11 were tested, as control both strains in water, the biofungicide Serenade, the fungicide Iprodione and absolute control (only water). Applications were made by sprinkling every ten days, while the fungicide application was performed only at the beginning of the assay. In this assay was not possible to verify the controllability of any of the treatments because the occurrence of the disease in greenhouse was not registered, however, two formulations possessing sodium alginate were discarded, compound that was shown to be phytotoxic in mini cuttings leaves.

In the second assay, installed in April, plants of *E. globulus* from seeds of six months old were used. Three formulations for *C. rosea* A10 and A11 were tested, they were a) titanium dioxide 4 g/L, potassium carbonate 1g/L, carboxymethylcellulose 0.5g/L and cornstarch 10g/L; b) pH modification to 3.5 with lactic acid; c) conidia in water suspension; the controls were the biofungicide Serenade, fungicides rotation (Teldor, Switch, Horizon and Tebuconazole) and the absolute control (water). The applications were realized weekly for sprinkling, while the

fungicide rotation was performed fortnightly. As results, the formulations of *C. rosea* did not reduce the *B. cinerea* incidence, having levels of mortality between 4% and 8%; meanwhile the biofungicides and fungicide rotation had effect in control of grey mould with mortality 1.83% and 0.17% respectively. The failure in control of both strains was due to the low temperature.

To demonstrate the effect of temperature in control of *B. cinerea* in both strains of *C. rosea*, a bioassay *in vitro* with leaves discs of *E. globulus* was performed. The strains were probed at different temperatures (10, 15, 20, 25 and 30°C), showing the antagonist capacity of the strains at 20, 25 and 30°C, however, it was also probed than the antagonist capacity decrease at temperatures under 20°C.

Finally, in bioassay *in vitro* with leaves discs of *E. globulus* at 15, 20 and 25°C, it was determined the efficacy of three formulations for both strains of *C. rosea*: a) titanium dioxide 4 g/L, potassium carbonate 1g/L, carboxymethylcellulose 0.5g/L and cornstarch 10g/L; b) pH modification to 3.5 with lactic acid; c) conidia in water suspension. The controls were the biofungicide Serenade and the fungicide Switch, and absolute control only water. The antagonistic capacity of both strains was shown in all formulations, however, it was demonstrated the decrease of antagonistic capacity at 15°C. In commercial products case, only Switch was able to control *B. cinerea* in all temperatures tested.

In conclusion, through bioassays, the efficacy of all formulations tested in both strains in the control of the pathogen *B. cinerea* at temperatures above 15°C was demonstrated; however, this control decrease at temperatures below 15°C, being the application of chemical products a better option for the control of the disease.

Key words: *Eucalyptus* spp., diseases, *Clonostachys rosea*, *Botrytis cinerea*, Biological control, Formulations, Temperatures.

I. INTRODUCCIÓN.

Importancia del sector forestal en Chile.

En Chile el sector forestal se posiciona como un pilar fundamental en la economía, con una participación del 2,7% del Producto Interno Bruto (PIB) (INFOR, 2014). El país cuenta con un 22% de su territorio cubierto por vegetación boscosa, correspondiendo un 19% a plantaciones de especies exóticas, principalmente *Pinus radiata* D. Don. y *Eucalyptus* spp. con 1.5 y 0.8 millones de hectáreas respectivamente (INFOR 2014). Las especies de *Eucalyptus* han comenzado a adquirir importancia debido a la creciente demanda en mercados exteriores. Las principales especies utilizadas en Chile son *E. globulus* Labill. debido a su alto rendimiento pulperable y *E. nitens* Deane & Maiden, con un menor rendimiento, pero con la particularidad de poder establecerse en zonas más frías con un rápido crecimiento y poseer diversos usos madereros (López 2006).

Para mantener la alta tasa de forestación con *E. globulus* y *E. nitens* es necesario sostener altas producciones en vivero, lo que podría verse amenazado debido a problemas de enfermedades y plagas. Entre los mayores problemas que afectan la producción de eucalipto en viveros en Chile se encuentran las enfermedades fúngicas como damping off (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium* y *Phytophthora*), mildiú pulverulento (*Oidium eucalypti*), manchas foliares (complejo del género *Teratosphaeria*), entre otras patologías. Sin embargo, el patógeno con mayor relevancia es *Botrytis cinerea* Pers. Fr. (teleomorfo *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzl), que puede matar o debilitar lo suficiente las plantas impidiéndoles sobrevivir al proceso de traslado y subsecuente plantación (Escobar 2007). Este hongo es un patógeno necrótrofo causante de la enfermedad conocida como "moho gris" en más de 200 hospederos en el mundo (Elad et al, 2004; Williamson et al, 2007). En Chile está presente en la mayoría de los viveros con diferentes niveles de incidencia y severidad, llegando a ocasionar pérdidas superiores a 50 % en plántulas originadas por semillas (Butín y Peredo 1986; Zaldúa 2012). Además, en los últimos años se ha transformado en un serio problema en la pudrición de macro y micro-estacas (Sanfuentes y Zaldúa 2010).

En plantas de eucalipto, los síntomas del moho gris corresponden a manchas necróticas sobre la superficie de la hoja, y canchales de color gris violáceo a negro en el tallo, con abundante presencia de estructuras reproductivas cuando las condiciones ambientales son favorables (Figura 1) (Gonzales 1996). En la actualidad, el control de *B. cinerea* se ha basado en prácticas culturales, principalmente un monitoreo constante, eliminación de plantas con síntomas y restos de cultivo; y especialmente mediante la aplicación de fungicidas con diferentes formas de acción. Estos fungicidas químicos, a pesar de ser eficaces contra *B. cinerea*, cuando son utilizados sin planificación adecuada y monitoreamiento pueden generar el surgimiento de poblaciones resistentes del patógeno (Esterio 2012). Estudios previos han demostrado la resistencia de *B. cinerea* a fungicidas benzimidazoles, dicarboximidas y fenilcarbamatos (Álvarez 1991, Carreño *et al.* 1990, Valdés 2000, Latorre *et al.* 2001, Ponce-Gonzales *et al.* 2000). En ensayos realizados *in-vitro* constantes aplicaciones de fungicidas a base de benzimidazoles han creado nuevas formas fenotípicas de *B. cinerea*, resistentes a estos compuestos (Ciampi, 2002).

Otro factor que desestimula la aplicación de fungicidas es la necesidad de adquirir una certificación tanto nacional (CERTFOR) como internacional de bosques, como la otorgada por Forest Stewardship Council (FSC), reduciendo la disponibilidad de productos químicos (como herbicidas, insecticidas y fungicidas) que puede utilizarse en la producción forestal. Actualmente, la certificación FSC es exigida en los principales países del mundo y garantiza competitividad en los mercados de destino, posibilitando mejores precios de las materias primas, entre otras (FSC 2012). Así, por ejemplo, esta norma prohíbe la utilización de los fungicidas Mancozeb y Benomil, ambos, efectivos botryticidas, pero a su vez tóxicos tanto para el ambiente como para las personas.



FIGURA 1.Planta de *Eucalyptus globulus* atacada por *Botrytis cinerea*. Abundante esporulación en tallo de la planta(A). Conidióforos y conidias del patógeno (B).

En el área forestal como también agrícola, cada día se buscan nuevas formas de control de este y otros patógenos, principalmente debido al incremento de la discusión pública sobre los pesticidas químicos y los efectos adversos sobre el medio ambiente y la salud humana (Jensen et al. 2007). Dentro de estos métodos alternativos de control, se encuentran los agentes de control biológico.

Control biológico como alternativa.

Baker & Cook (1974) definen el control biológico como "una reducción de densidad del inóculo o de las actividades determinantes de enfermedades provocadas por un patógeno o parásito en sus estados de actividad o dormancia, por uno o más organismos, realizado naturalmente o a través de manipulación del ambiente, hospedero o antagonista, o por la introducción en masa de uno o más antagonistas". De las estrategias anteriormente

mencionadas, en la actualidad, la más utilizada en el control biológico de patógenos es la introducción en masa de uno o más antagonistas, elaborándose la mayor cantidad de productos biológicos comerciales existentes en la actualidad en el mercado, como Serenade ® en todas sus presentaciones, 3 Tac ®, Nacillus ®, entre otros (Sag, 2012).

Existen dos razones que han aumentado el énfasis en el biocontrol, primero es que los fungicidas ya no son considerados como la "panacea", debido a los costos asociados al desarrollo de estos, en segundo lugar debido a las consecuencias ambientales de la excesiva dependencia de estos productos, lo que los hace cada vez menos aceptables. En cambio, el control biológico es aceptado por su alto atractivo para reducir o eliminar el uso de fungicidas junto con un aumento en los conocimientos biológicos de estos agentes, y en la posibilidad de su manipulación genética (Stasz, 1990).

Las investigaciones en control biológico se han focalizado en hongos filamentosos, principalmente de los géneros *Trichoderma* y *Clonostachys*. Dentro de estos géneros, *Trichoderma* ha recibido más atención, estudiándose su acción contra hongos fitopatógenos desde hace más de 80 años. En cambio, el género *Clonostachys* solo hace algunos años que comenzó a ser investigado. Las especies de *Clonostachys* son saprófitos comunes que se encuentran principalmente en el suelo, pero también pueden estar asociadas a raíces, tallos, hojas, frutos y semillas de plantas, siendo ampliamente distribuidos en varios ecosistemas (Zaldúa 2012; Sutton *et al* 1997). En el caso específico de *B. cinerea*, Peng & Sutton (1991) estuvieron entre los pioneros en descubrir la capacidad de aislados de *Clonostachys* en el control de este patógeno en frutilla.

En la actualidad, existen una diversidad de estudios que demuestran la eficiencia del control biológico frente a *B. cinerea*. Sutton y Peng (1991, 1993) en bioensayos utilizando hojas y pétalos de frutilla redujeron casi completamente la esporulación de *B. cinerea*, semejante al fungicida Captan. Morandi *et al.* (2002) aplicando un aislado de *C. rosea*, o en conjunto con el fungicida Mancozeben cultivos de rosas, redujeron el moho gris entre 30 y 50%

respectivamente; Nobreet *al.* (2005) demostraron la eficacia de aislados de *C. rosea* en el control de *B. cinerea* en rosa, frutilla, tomate y *E. globulus*. Cota *et al.* (2008, 2009) aplicando *C. rosea* obtuvieron una reducción en la incidencia del moho gris en frutillas en cultivos de invernadero y campo.

Importancia de la formulación.

En los procesos finales de desarrollo de un producto de control biológico, los agentes de biocontrol son ensayados en pruebas de campo. Mantener o incrementar esta capacidad de control dependerá de diversos factores, como el tipo de patógeno, la forma de antagonismo del agente de biocontrol y el ambiente donde se desarrolla la interacción de agente y patógeno. Entre los factores ambientales relevantes están la cantidad de precipitación, periodo de mojamiento foliar, la temperatura, humedad relativa, entre otras (Wilcox y Seem, 1993). Las variables ambientales en invernaderos son controlables, siendo un factor importante para el crecimiento de las plantas, sin embargo, en viveros sin esta posibilidad de control ambiental, una adecuada formulación de los productos biológicos pasan a constituirse en un factor determinante en la eficacia de control de estos productos.

La formulación de un producto microbiano es definido como un producto compuesto por la biomasa de un agente de control biológico e ingredientes para mejorar la supervivencia y la eficacia del producto (Schisleret *al.*, 2004). Dentro del tipo de ingredientes que se utilizan para obtener una mejor formulación se encuentran estabilizantes, desecantes, surfactantes, dispersantes, protectores UV, pegamentos, entre otros (Schisleret *al.*, 2004). Entre las formulaciones empleadas en productos comerciales, las más utilizadas son (Faria y Wraight, 2007):

- a) Polvo mojable: Productos que con el agua forman un sistema heterogéneo de dos fases, separables por medios mecánicos o reposo. Son partículas finamente divididas que llevan absorbido el principio activo (Agritec, 2012).
- b) Granulado: Formulación sólida de flujo libre y con tamaño de granulo determinado. Este tipo de formulación es más elaborada ya que se necesita de un sistema de control que mantenga el granulado del mismo tamaño y con el ingrediente activo fuertemente adherido o incorporado a los gránulos.
- c) Cebos: Formulación diseñada para atraer y ser comida para las plagas blanco. Este tipo de formulación es principalmente utilizado como micoinsecticida o micoacaricida.
- d) Gránulos dispersables en agua: Consiste en gránulos que son aplicados después de desintegración y dispersión en agua.
- e) Suspensión concentrada: Una suspensión estable del/los ingrediente(s) activo en agua destinado para diluir en agua antes de su uso.
- f) Aceite miscible concentrado fluido: Suspensión estable del/los ingrediente(s) destinada a la dilución en un líquido orgánico antes de su uso.
- g) Dispersión en aceite: Suspensión estable del/los ingrediente(s) activo en un fluido inmisible en agua que puede contener otro ingrediente activo disuelto (s) destinado a la dilución en agua antes de su uso. Esta formulación contiene emulsionantes que permite la mezcla con agua para pulverizar.

Dentro de las formulaciones anteriormente descritas, las más aplicadas en la parte aérea son el polvo mojable y la suspensión concentrada, debido a la facilidad de ser aplicado mediante aspersores. En el caso de cebos este tipo de formulación sería útil para el control de insectos,

mientras que aceite miscible concentrado fluido y dispersión en aceite son formulaciones frecuentemente utilizadas en control biológico de malezas (Faria y Wraight, 2007). Un producto en seco (polvos mojables) tiene menos peso y menores riesgos de contaminación, esto debido al tipo de esporas que utilizan, las cuales por lo general son de resistencia, por lo cual este método de formulación funciona bien para el caso de hongos (Fravel, 2005).

En toda formulación se distinguen tres tipos principales de componentes: el principio activo, como conidios, micelio o clamidiosporas; el diluyente o vehículo, sólido o líquido, siendo un material inerte; y finalmente los adyuvantes, los cuales tienen función protectora, dispersante o adherente (Cárdenas, 2010). Los productos biológicos que utilizan hongos como principio activo normalmente corresponden a su fase conidial (reproducción asexual de los organismos). En el mercado internacional existen disponibles formulaciones granuladas, polvos mojables y suspensiones en óleo emulsionable (Bettioli y Morandi, 2009).

En nuestro país existen 22 productos de control biológico comercializados (Anexo, Tabla 9), siendo formulados como polvo mojable, polvo seco, pasta o suspensión concentrada (SAG, 2012), basados principalmente basados en hongos del género *Trichoderma* y bacterias del género *Bacillus*. Según la ficha técnica de estos productos, Binab T, Serenade, 3 Tac (en todas sus formulaciones), Trichonativa, Trichoderma suspensión y Harztop, son recomendados para su utilización contra *Botrytis cinerea*, y todos formulados en polvo mojable o suspensión concentrada. Estos productos pueden ser aplicados a la parte aérea de la planta, siendo restringida su aplicación en para aplicaciones en aeronaves.

En la elección de una formulación de productos biológicos, es fundamental considerar los factores ambientales adversos que pueden afectar la capacidad de control (Braret al. 2006), siendo los más importantes:

- a) Radiación UV:

La radiación solar, especialmente el espectro de radiación UV (UV-B: 280-310 nm y UV-A: 320-400 nm) es el principal responsable de la inactivación de microorganismos. Se ha demostrado que la radiación entre 250 y 400 nm son letales para esporas de *B.thuringiensis*(Bt), por otro lado, radiación solar entre 300 y 750 nm puede llegar a inactivar rápidamente a las esporas Bt. Existen formulaciones de carácter oleoso que permiten la protección de las esporas de la radiación, además de la adición de compuestos fotoprotectores.

Edginton *et al*(2010) constataron una reducción en la germinación de conidias de *Beauveria bassiana* debido a la exposición a radiación solar por una hora, desde 89.4% a 2.8% de germinación. También constataron que la leche en polvo formulada al 20% y la albumina de huevo al 10% entregaron una buena protección a la radiación solar.

Liu y Lin(2013), utilizando dióxido de titanio y óxido de silicio en formato de nanopartículas, mantuvieron la germinación de conidias de *B. bassiana* y *Metarhiziumanisopliae* sobre el 50% después de exposición a radiación UV directa hasta por 2 h. Además, se demostró que ambas especies aplicadas con nano partículas de dióxido de titanio (0.5% v/p) no presentaron efectos negativos en cultivo de coliflor.

b) Lluvia y rocío:

En algunos casos este factor puede ser más importante en la degradación de los productos que la radiación solar, en especial en aquellos casos en que se bloquea la luz solar (por ejemplo en zonas boscosas). Behle *et al* (1997) reportaron que 3 cm de lluvia reduce en 20% la eficacia de los biopesticidas a base de Bt, debido a que son lavados por la lluvia y rocío. Existe una gran cantidad de productos que mejoran la resistencia de los productos a la lluvia. Experimentos utilizando almidón de maíz demostraron que actúa como adherente en la superficie foliar, con resultados similares a micro cápsulas de harina de maíz (Guerra *et al*, 2000).

c) pH:

Para el caso de productos basados en Bt se ha indicado que este mantiene su estabilidad en rangos de pH entre 3 a 11. Jones y Burges (1998) demostraron que al aumentar el pH, las cepas son capaces de aumentar su capacidad de resistencia a pH, asimismo, si hay un aumento de temperatura, la sensibilidad al pH también aumenta. Por lo general los productos en base a BT se comercializan con soluciones tamponadas en pH 4 a 5, de manera de inhibir la mayor cantidad de microorganismos contaminantes posibles.

Los hongos también son afectados por efecto del pH tanto en su crecimiento vegetativo como también en el proceso de germinación de conidias.

d) Temperatura:

Las temperaturas juegan un rol fundamental en la persistencia post aplicación de los bioproductos. En el caso de los productos BT, se ha observado que temperaturas bajo 10°C y superiores a 30 °C pueden tener un efecto deletéreo en la actividad contra patógenos. Este proceso puede ocurrir por la inactivación del principio activo. Para el caso de aislados fúngicos, se han encontrado aislados de *Trichoderma* tolerantes a bajas temperaturas. Kredics *et al* (2003) probaron *in vitro* 360 aislados de *Trichoderma* obteniendo aislados de *T. harzianum* y *T. viride* con buen crecimiento a 5°C y con actividad antagónica a 10°C contra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

e) Follaje:

La expansión de la hoja y los metabolitos producidos en la superficie afectan directamente la acción de los organismos, especialmente volátiles como aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, y otros derivados presentes en las hojas.

En hojas de rápido desarrollo (tomates, papas o algodón), en pocos días la formulación se encuentra dispersa en toda la hoja. De hecho, se ha demostrado para el caso de los productos Bt

pueden persistir entre 20 a 30 días en bosques en comparación a entornos agrícolas, donde persisten entre horas a pocos días (Fuxa, 1989).

Ejemplos de formulación.

Walker y Connick(1983) utilizaron alginato de sodio para producir pellets de los hongos *Alternaria macrospora* Zimm, *Fusarium lateritium* Nees ex Fr. y *Colletotrichum malvarum* (A. Braun & Casp) Southworth, los cuales fueron desarrollados como potenciales microherbicidas. En condiciones *in vitro* probó el potencial germinativo de los antagonistas presentes en los pellets, demostrando que no existe diferencia entre mantenerlo en una suspensión de agua.

Lynet *et al* (2007) patentaron un aislado de *Aspergillus flavus* formulado en granulos dispersables en agua. La base de esta formulación correspondía a arcilla de caolín calcinado, utilizando carboximetilcelulosa como aglutinante y trehalosa, además de otros inertes usados. El azúcar (trehalosa) funciona como osmoprotector, un adhesivo post aplicación y un potencial nutriente para el hongo. Utilizando esta formulación, se alcanzó la supervivencia del antagonista a 4°C hasta por dos años, sin disminución de su concentración (orden de 10^8), junto con una efectiva colonización de la parte aérea en dos variedades de maíz modificado genéticamente (gen de resistencia Bt y resistente a glifosato), sin diferencias con el control (conidias del antagonista en agua).

Lewis y Lumsden (2000) realizaron una formulación que no requería condiciones estériles. Esta formulación consistió en una mezcla seca de vermiculita, salvado de trigo en polvo y distintos aislados de *Trichoderma* y *Clonostachys*, producidos en un fermentador. Las mezclas aplicadas a un suelo infestado con *R. solani* redujeron la mortalidad en plantas de pimentón.

Jensen *et al* (2000) utilizando *C. rosea* IK 726 formulado en turba de musgo, salvado de trigo y agua, controlaron *Fusarium calmorum* en semillas de cebada. Jayarajet *et al* (2006) aplicando *T. harzianum* en siete formulaciones (talco, lignita, lignita con cenizas, polvo mojable, pasta de bentonita, pasta de polietilenglicol y gel de gelatina-glicerina) redujeron el damping-off en

tomates causado por *Pythium aphanidermatum*.

Control Biológico en Chile con *Clonostachys rosea*.

En el caso de Chile, los trabajos con *C. rosea* han sido escasos. Molina *et al*(2006) realizaron una prospección en viveros en la Región del Bío-Bío, aislando más de 70 microorganismos con los cuales se realizaron bioensayos para seleccionar agentes de control de *B. cinerea*. Entre los aislados se encontraron dos *Clonostachys* y algunas especies de *Trichoderma* las cuales suprimieron casi completamente al patógeno en bioensayos realizados en discos de *E. globulus*.

Entre estos aislados, *C. rosea* A10 y A11 redujeron la incidencia de *B. cinerea* en mini estacas de *E. globulus* con niveles de control de 54 y 71% respectivamente, semejante al uso de fungicidas operacionales (chlorotalonil) junto con obtener mayores índices de enraizamientos en miniestacas (Sanfuentes y Zaldúa 2010). Estos mismos aislados fueron probados en un vivero comercial de *E. globulus* en condiciones de cielo descubierto y en condiciones de invernadero aplicados quincenal y mensualmente, respectivamente. En ambos ensayos al menos uno de los aislados de *C. rosea* redujo la incidencia de *B. cinerea* semejante al efecto del fungicida Captan (Musiet, 2013).

Los estudios anteriores demostraron la eficacia de *C. rosea* A10 y A11 en la inhibición y control de *B. cinerea* en ensayos *in vitro* y de campo respectivamente, sin embargo, según reportes citados anteriormente, es posible, mediante la formulación de estos aislados mejorar su capacidad de supervivencia a diversos factores ambientales.

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.

Hipotesis.

La formulación de los agentes de biocontrol *Clonostachys rosea* A10 y A11 no tendrá efecto en la eficacia de control sobre *Botrytis cinerea* en producción operacional de plantas de *Eucalyptus globulus* y mini estacas del clon híbrido *E. globulus* x *E. nitens* X-65.

Objetivo general.

- Optimizar una formulación de *Clonostachys rosea* A10 y A11 para el control del moho gris en la producción operacional de plantas de *E. globulus* y miniestacas del clon híbridos *E. globulus* x *E. nitens* X-65.



Objetivos específicos.

- Estudiar el efecto de distintas formulaciones en la germinación de conidias de *C. rosea* A10 y A11.
- Determinar el efecto de distintas formulaciones de *C. rosea* A10 y A11 en el control de *Botrytis cinerea* en plantas de *E. globulus* e híbrido *E. globulus* x *E. nitens* X-65 en condiciones de producción operacional.

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Efecto de distintas formulaciones en la germinación de conidias de *C. rosea* A10 y A11.

3.1.1. Prueba de productos individuales.

Fueron probados diversos productos adyuvantes para verificar su efecto en la germinación de conidias en los aislados de *C. rosea* A10 y A11, previamente estudiadas en el Laboratorio de Patología Forestal (Molina *et al*, 2006; Sanfuentes y Zaldúa, 2010; Zaldúa, 2012; Musiet, 2013).

Para cada producto adyuvante fueron empleadas tres concentraciones (Tabla 1), colocándose 20 µl de cada producto sobre en portaobjetos (autoclavados previamente a 121°C durante 20 min) que tenían una capa de agar agua al 1%. Los portaobjetos fueron mantenidos 24 h en cámara húmeda, consistentes en placas de Petri (autoclavadas previamente) que en su fondo tenía papel toalla estéril humedecida con agua destilada estéril (ADE) y sobre el papel una malla plástica desinfectada con hipoclorito de sodio al 5% durante 5 min..

TABLA 1. Productos adyuvantes probados para formulación de *Clonostachys rosea* A10 y A11 con sus respectivas concentraciones (g/L).

Tipo de adyuvante	Producto	Concentración (g/L)		
Protector solar	Dióxido de titanio	2	4	6
Emulsificante	Carboximetilcelulosa	0,5	1	2
Humidificante	Carbonato de potasio	0,5	1	2
	Carbonato de calcio	0,5	1	2
Estabilizante (Inerte)	Alginato de sodio	10	15	20
	Almidón de maíz	10	15	20
	Glicerol	20	35	50

3.1.2. Prueba de productos combinados.

Se realizó un ensayo de germinación con ambos aislados de *C. rosea*, combinando los adyuvantes que no tuvieron efecto inhibitorio en la germinación de los antagonistas, siguiendo la misma metodología descrita en 3.1.1 (Tabla 2).

TABLA 2. Combinación de adyuvantes utilizados en los ensayos de germinación de *Clonostachys rosea* A10 y A11, con sus respectivas concentraciones.

Mezcla	Adyuvante (g/L)						de
	Alginato de Sodio	Almidón de maíz	Carbonato de Calcio	Carbonato de Potasio	Carboximetilcelulosa	Dióxido titanio	
1	15	-	-	1	-	4	
2	15	-	-	1	0.5	4	
3	15	-	1	-	-	4	
4	15	-	1	-	0.5	4	
5	-	15	-	1	-	4	
6	-	15	-	1	0.5	4	
7	-	15	1	-	-	4	
8	-	15	1	-	0.5	4	

3.1.3. Evaluación y análisis estadístico.

Luego de 24 h de incubación en cámara húmeda, se procedió a evaluar la germinación de las conidias mediante microscopio óptico Zeiss con aumento de 400x. Una conidia se consideró germinada cuando su tubo germinativo tenía 1.5 veces el tamaño de la conidia. Cada tratamiento contó con tres repeticiones. Para el análisis estadístico se realizó un análisis normal de varianzas (ANOVA) y para detectar diferencias significativas entre los tratamientos se utilizó el test Tukey, con significancia de $P=0.05$.

3.2. Eficacia de formulaciones de *C. rosea* A10 y A11 en el control de *B. cinerea* en mini estacas del clon híbridos *E. globulus* x *E. nitens* X-65y plantas de *E. globulus* en condiciones de producción operacional.

3.2.1. Sitio de ensayo

Fueron realizados dos ensayos en el vivero Carlos Douglas, perteneciente a Forestal Mininco S.A., localizado en la Comuna de Yumbel, Región del Bío-Bío. Los ensayos fueron conducidos bajo condiciones de producción comercial entre el 5 de Febrero y el 1 de Abril de 2014 (ensayo de verano) y entre el 15 de Abril y 18 de Junio de 2014 (ensayo de otoño).

3.2.2. Material vegetal y condiciones de ensayos.

El ensayo fue instalado el 5 de febrero de 2014 (ensayo de Verano), utilizándose mini estacas del clon híbrido X-65 (*E.nitens* x *E. globulus*), proporcionado por Forestal Mininco S.A.

Durante el ensayo, las estacas fueron mantenidas en invernadero, a una temperatura promedio de 22°C y humedad de 80%. Las estacas fueron confeccionadas a partir de plantas madres de cuatro años y luego repicadas a substrato fibra de coco en bandejas las cuales contaban con 244 cavidades. Los primeros 20 días las estacas fueron humectadas mediante nebulización cada 5 min por 5 s. Fue suplementado el riego en aquellos sectores del invernadero que recibían una menor cantidad de agua. Luego de siete días se disminuyó el riego a frecuencias de 30 min y después de 35 d las estacas pasaron a vivero con cielo cubierto, recibiendo riego tres veces al día.

En el ensayo de otoño se utilizaron plantas de *E. globulus* originadas por semillas, que tenían alrededor de 20 cm. Estas plantas fueron mantenidas en bandejas de 100 cavidades y se mantuvieron en condiciones de invernadero bajo semi sombra, con riego dos veces al

díadurante tres meses.

3.2.3. Producción de inóculo de *C. rosea*.

Los antagonistas fueron cultivados en medio de cultivo agar papa dextrosa (APD) por cuatro semanas a 24°C. Posteriormente, se procedió a colectar las conidias con agua destilada estéril (ADE), ajustándose a una concentración de 1×10^7 conidias/mL con la ayuda de un hematocitometro. Para la producción masal de los antagonistas se utilizó la metodología propuesta por Krausset *al.* (2002). Desde las placas previamente cultivadas con los aislados de *Clonostachys* se realizó una suspensión de conidias y se aplicó mediante inyección de 6 mL en 600 g de arroz esterilizado (autoclavado a 121°C por 20 min) dispuestos en bolsas plásticas. Previamente el arroz estuvo en remojo en agua por 24 h y luego eliminándose el exceso de agua. Las bolsas se mantuvieron en incubación a 20°C con fotoperiodo 12/12, agitándose cada tres días durante un periodo de tres semanas. Para la colecta de conidias, el arroz fue puesto en ADE o en cada una de las cuatro formulaciones, según correspondía y se agitó por un tiempo de 60 min. Posterior a esto se realizó la suspensión de conidias la que fue ajustada a una concentración de 1×10^7 conidias/mL con la ayuda de un hematocitometro.

3.2.4. Tratamientos.

En el ensayo de verano, los tratamientos consistieron en la aplicación de ambos aislados de *C. rosea* (A10 y A11) en cuatro formulaciones (Tabla 3), *C. rosea* solo en agua, un producto biológico comercial Serenade ® WP (*Bacillus subtilis* aislado QST 713), el fungicida Iprodione (3-(3,5-dichlorophenyl)-*N*-isopropyl-2,4-dioxoimidazolidine-1-carboxamide) y el control (solo aplicación de agua). Para la aplicación de Serenade se utilizó la dosis indicada por el fabricante así como para Iprodione, de 3.5 g/L y 2 g/L respectivamente. El inóculo de *B. cinerea* en el vivero fue natural.

TABLA 3. Tratamientos utilizados en ensayo de verano, correspondientes a mini estacas del clon híbrido *Eucalyptus globulus x Eucalyptus nitens* X65.

N°	Formulado	Agente
1	Formulación 1 ^a	<i>Clonostachys rosea</i> A10
2	Formulación 2 ^b	<i>C. rosea</i> A10
3	Formulación 3 ^c	<i>C. rosea</i> A10
4	Formulación 4 ^d	<i>C. rosea</i> A10
5	Formulación 1	<i>C. rosea</i> A11
6	Formulación 2	<i>C. rosea</i> A11
7	Formulación 3	<i>C. rosea</i> A11
8	Formulación 4	<i>C. rosea</i> A11
9	Control*	Agua
10	Serenade	<i>Bacillus subtilis</i> QST 713
11	Agua	<i>C. rosea</i> A 10
12	Agua	<i>C. rosea</i> A11
13	Fungicida*	

^aFormulación 1: Dióxido de titanio 4g/L, carbonato de potasio 1g/L, alginato de Sodio 10 g/L; carboximetilcelulosa 0.5 g/L.

^bFormulación 2: Dióxido de titanio 4g/L, carbonato de calcio 1g/L, alginato de Sodio 10 g/L, carboximetilcelulosa 0.5 g/L.

^cFormulación 3: Dióxido de titanio 4g/L, carbonato de potasio 1g/L, almidón de maíz 10 g/L, carboximetilcelulosa 0.5 g/L.

^dFormulación 4: Dióxido de titanio 4g/L; carbonato de calcio 1g/L, almidón de maíz 10 g/L, carboximetilcelulosa 0.5 g/L.

*Fungicida Iprodione. Dosis indicada por el productor /viverista.

Las aplicaciones se realizaron mediante aspersión cada 10 días para todos los tratamientos, a excepción del fungicida. La aplicación de los productos consistió en 100 mL por cada bandeja, la que se realizó de manera uniforme sobre toda la bandeja. Para el caso del fungicida se utilizó la metodología operacional de la empresa, la cual consistía en sumergir las estacas en la solución de fungicida y posteriormente eran repicadas a las bandejas. Este tratamiento solo se

llevó a cabo al momento del montaje del ensayo.

En el ensayo de verano se probaron ambos aislados de *C. rosea* (A10 y A11) en tres formulaciones (Tabla 4). Como control se utilizó el biofungicida Serenade® WP (*Bacillus subtilis* aislado QST 713), una rotación de fungicidas comerciales proporcionado por la empresa y un control absoluto (solo aplicación de agua). Las aplicaciones fueron semanales y consistieron en 100 mL de cada formulación o producto, los cuales se asperjaron a cada una de las bandejas que contenían 100 plantas.

TABLA 4. Tratamientos probados en ensayo de otoño, correspondiente a plantas de semillas de *Eucalyptus globulus*.

Tratamiento	Formulado	Agente
		<i>Clonostachys rosea</i>
1	Formulación 1 ^a	A10
2	Formulación 2 ^b	<i>C. rosea</i> A10
3	Formulación 3 ^c	<i>C. rosea</i> A10
4	Formulación 1	<i>C. rosea</i> A11
5	Formulación 2	<i>C. rosea</i> A11
6	Formulación 3	<i>C. rosea</i> A11
7	Serenade*	<i>Bacillus subtilis</i>
8	Agua	
9	Rotación de fungicidas**	

*Dosis indicada por el fabricante;

**Teldor 1g/L, Tebuconazole 1g/L, Switch 1g/L, Horizon 1g/L.

^aFormulación 1: Dióxido de titanio 4g/L, carbonato de potasio 1g/L, almidón de maíz 10 g/L, carboximetilcelulosa 0.5 g/L.

^bFormulación 2: Suspensión de conidias en agua con modificación de pH a 3.5 añadiendo ácido láctico.

^cFormulación 3: Suspensión de conidias en Agua.

3.2.5. Evaluaciones.

En el ensayo de verano, luego de 40 días se procedió a coleccionar las primeras y últimas siete columnas de cada una de las bandejas (total de 144 plantas). Con estas plantas se evaluó el enraizamiento de las estacas, clasificándose como enraizada, con formación de callo, no enraizada (planta verde sin formación de raíz o callo) y muerta. Además se evaluó posible fitotoxicidad en las hojas de las mini estacas, teniendo como respuesta sin toxicidad, <50% y >50% desíntomas en las hojas. Las plantas muertas fueron evaluadas para determinar el agente causal mediante la metodología de cámara húmeda. Además se realizaron aislamientos en medio de cultivo APD (50%) previa desinfección superficialmente de las mini estacas por 10 s con alcohol al 70%, hipoclorito de sodio al 5% por 2 min seguido de tres lavados con ADE.

En el ensayo de otoño, las evaluaciones consistieron en la eliminación de plantas muertas de manera semanal, las cuales fueron evaluadas en el Laboratorio de Patología Forestal para verificar el agente causal. Como metodología se utilizaron cámaras húmedas a las plantas, para estimular y visualizar esporulación de los conidióforos característicos de *B. cinerea* con ayuda de una lupa estereoscópica (x5).

3.2.6. Diseño experimental y análisis estadístico.

El ensayo de verano fue conducido en un diseño completamente al azar con tres repeticiones para cada tratamiento. La unidad experimental correspondía a la bandeja con 244 plantas. Para el enraizamiento se realizó un análisis normal de varianza (ANOVA) y para detectar diferencias significativas entre los tratamientos se utilizó el test LSD con un nivel de significancia de $P=0.05$.

Para el ensayo de otoño la unidad experimental fue una bandeja (100 plantas) con seis repeticiones para cada uno de los tratamientos. Las bandejas se dispusieron en un diseño completamente al azar. Se realizó un análisis normal de varianzas (ANOVA) y para detectar

diferencias significativas entre los tratamientos se utilizó test LSD con un nivel de significancia de $P=0.05$.



3.3. Bioensayos de antagonismo de *B. cinerea* en discos de hoja a diversas temperaturas.

3.3.1 Material vegetal.

Los bioensayos fueron realizados de acuerdo a metodología propuesta por Sutton y Peng (1991) con algunas modificaciones. Hojas de *E. globulus* jóvenes y en buen estado fitosanitario fueron recolectadas desde rebrotes presentes en zonas cercanas a la Universidad de Concepción. Estas hojas recibieron el tratamiento descrito en el punto 3.2.1.

3.3.2 Inoculación de discos, tratamientos y temperaturas de incubación.

De placas conteniendo los antagonistas *C. rosea* A10 y A11 creciendo en medio APD, durante 21 d a 25°C se procedió a añadir ADE y obtener una suspensión de conidias, la cual fue ajustada a 1×10^7 conidias/mL con la ayuda de un hematocitometro. Los discos fueron inoculados mediante inmersión en la suspensión de conidias durante un minuto. Luego, los discos fueron puestos en cámara húmeda, que consistía de una placa de Petri estéril que tenía un papel saturado de ADE en el fondo y una malla plástica encima. La placa con los discos de hojas fueron incubados durante 24h a temperaturas de 10, 15, 20, 25 y 30°C. Posterior a 24 h de inoculados los antagonistas se procedió a aplicar 1 mL del patógeno *B. cinerea* a una concentración de 1×10^5 conidias/mL mediante aspersión sobre los discos de hoja. Pasadas 24 h de la inoculación con el patógeno, se pasaron los discos de hoja a medio PCA (Paraquat Cloranfenicol Agar) incubándose por 10 días en las temperaturas anteriormente señaladas. Para cada temperatura se realizarán dos controles; uno solamente con ADE y otro solo con la aplicación del patógeno. Para la evaluación del ensayo se utilizó la escala visual propuesta por Sutton y Peng (1991), obteniendo un grado de esporulación (GE) por tratamiento, el que considera la colonización y abundancia de conidióforos del patógeno (Tabla 5).

TABLA 5. Descripción de los grados utilizados para la evaluación de bioensayos a distintas

temperaturas con discos de hoja de *Eucalyptus globulus*.

GE	Descripción
1	Sin presencia de <i>Botrytis cinerea</i>
2	Esporulación menor del 25%
3	Esporulación entre 25 y 50%
4	Esporulación mayor del 50%.
5	Esporulación 100%, conidióforos dispersos
6	Esporulación 100%, conidióforos distribuidos en forma irregular.
7	Conidióforos colonizando en forma densa y homogénea todo el disco.

3.3.3 Diseño experimental y análisis de datos.

La unidad experimental correspondió a la placa Petri con 15 discos de hojas cada una, y contó con cuatro repeticiones. El diseño experimental fue completamente aleatorio. Se utilizó el análisis estadístico no paramétrico Kruskal Wallis, con el uso del software Statistix 8. Para determinar diferencias se utilizó la prueba de contraste Kruskal-Wallis con 95% de confianza.

3.4. Bioensayo de antagonismo con diferentes formulaciones para el control de *B. cinerea*.

3.4.1. Material vegetal.

Los bioensayos se realizaron de acuerdo a la metodología descrita por Peng y Sutton (1991) y Molina *et al* (2006) con algunas modificaciones. Hojas de *E. globulus* jóvenes y en buen estado fitosanitario fueron recolectadas desde rebrotes presentes en zonas cercanas a la Universidad de Concepción. De estos se confeccionaron discos de 1 cm de diámetro. Los discos fueron desinfestados superficialmente con etanol 70% por 10 s, hipoclorito de sodio al 5% por 2 min, y lavados tres veces ADE.

3.4.2. Inoculación de discos, tratamientos y temperaturas de incubación.

Los discos se inocularon por inmersión durante un minuto con los antagonistas *C. rosea* A10 y A11 en las tres distintas formulaciones:

- **Formulación 1:** Dióxido de titanio (4 g/L), carbonato de potasio (1 g/L), almidón de maíz (10 g/L) y carboximetilcelulosa (0.5 g/L).
- **Formulación 2:** Suspensión de conidias en agua con modificación de pH a 3.5 añadiendo ácido láctico.
- **Formulación 3:** Suspensión de conidias en agua.

Todas las formulaciones contenían una concentración de los antagonistas de 1×10^7 conidias/mL.

Los tratamientos controles consistieron en solo aplicación de *B. cinerea* y el otro solo ADE. Además de estos, se añadió como controles los biofungicidas Trichonativa® (mezcla de *Trichodermas* perteneciente a la empresa BioNativa) y Serenade® (*B.subtilis*) (1×10^7 conidias

o esporas/mL), además del fungicida Switch (mezcla de cyprodinil y fludioxinil) en la dosis recomendada por el fabricante (80 g/L).

Los discos se dispusieron en placas de Petri, que contenían papel toalla estéril y encima una malla plástica esterilizada con hipoclorito de sodio al 5%, conformando una cámara húmeda. Las placas se incubaron por 24 h a 15, 20 y 25°C. Luego se aplicó mediante aspersion 1 mL por placa del hongo patógeno *B. cinerea*, en concentración de 1×10^5 conidias/mL. Pasadas 24 h, los discos de hojas fueron dispuestos en medio de cultivo PCA (Agar 20 g/L, Paraquat 1 g/L y Cloranfenicol 50 mg/L), mantenidas las placas durante diez días, con fotoperiodo de 12 h a las tres temperaturas de incubación anteriormente mencionadas.

Para la evaluación del ensayo se utilizó la escala visual propuesta por Sutton y Peng (1991), obteniendo un grado de esporulación (GE) por tratamiento, el que considera la colonización y abundancia de conidióforos del patógeno (Tabla 5).

3.4.3. Diseño experimental y análisis estadístico.

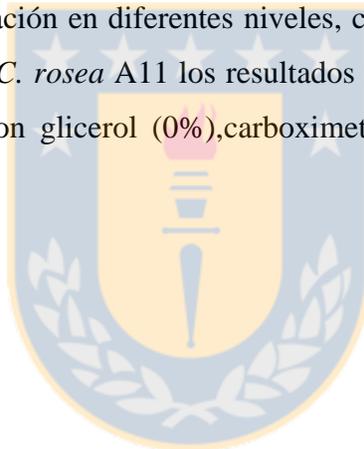
La unidad experimental consistió de una placa Petri que contenía 15 discos de hojas cada una y contó con cuatro repeticiones. El diseño experimental fue completamente al azar. Se utilizó el análisis estadístico no paramétrico Kruskal Wallis, con el uso del software Statistix 8. Para determinar diferencias se utilizó la prueba de contraste Kruskal-Wallis con 95% de confianza.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Efecto de distintas formulaciones en la germinación de conidias de *C. rosea* A10 y A11.

4.1.1. Prueba de productos para formulación.

Los productos de carbonato de potasio y calcio, alginato de sodio y maicena no afectaron la germinación de conidias de *C. rosea* A10 en las concentraciones probadas (Figura 2), fluctuando la germinación entre 95-98%. Entretanto, glicerol, carboximetilcelulosa y dióxido de titanio redujeron la germinación en diferentes niveles, con valores entre 0-10%, 82-86% y 84-87% respectivamente. Para *C. rosea* A11 los resultados fueron semejantes, siendo inhibida la germinación de conidias con glicerol (0%), carboximetilcelulosa (81-78%) y dióxido de titanio (82-86%) (Figura 3).



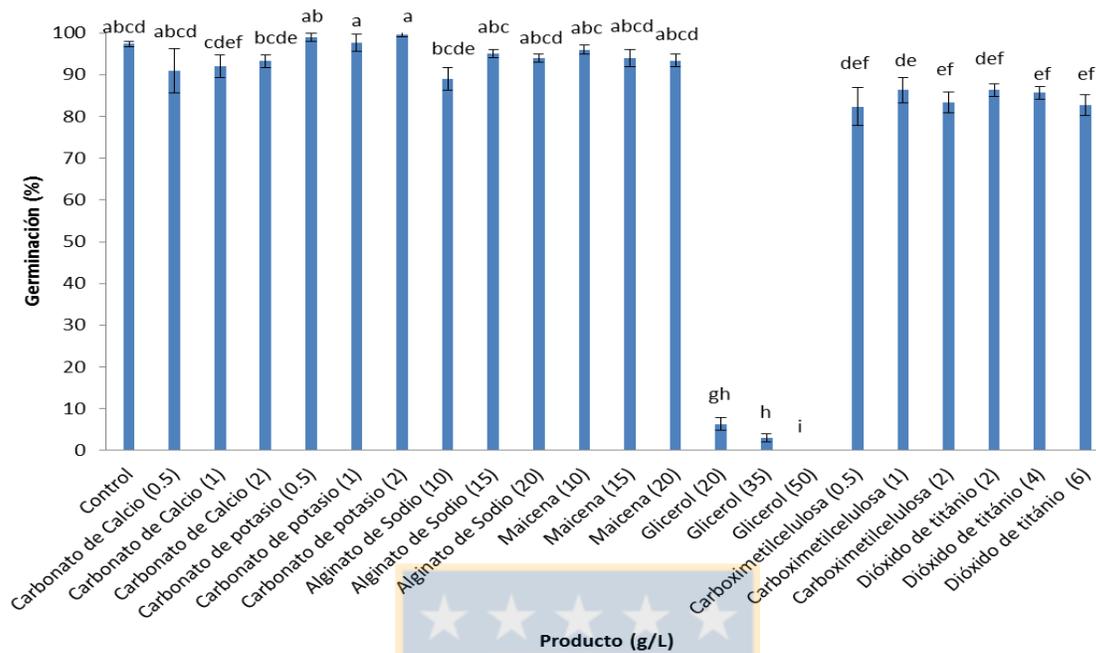


FIGURA 2. Germinación de conidias de *Clonostachys rosea* A10 para los productos ensayados en tres concentraciones (g/L). Barras indican la desviación estándar de los tratamientos y letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según test Tukey ($P=0.05$).

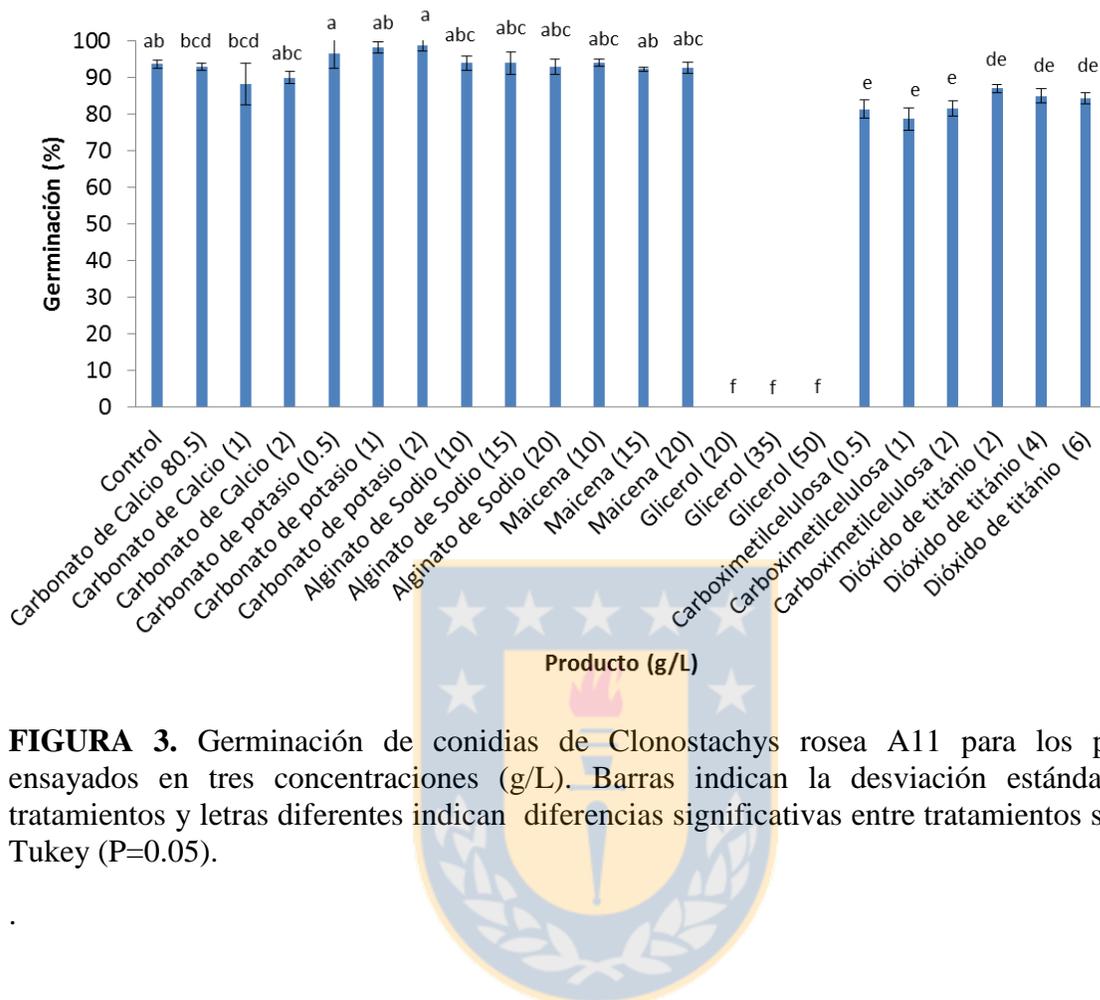


FIGURA 3. Germinación de conidias de *Clonostachys rosea* A11 para los productos ensayados en tres concentraciones (g/L). Barras indican la desviación estándar de los tratamientos y letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según test Tukey (P=0.05).

4.1.2. Prueba de productos combinados.

La mezcla de productos no presentó diferencias significativas entre sí ni con el control para ambos aislados de *C. rosea* (Figura 4 y 5), siendo en todos los casos la germinación superior al 90%.

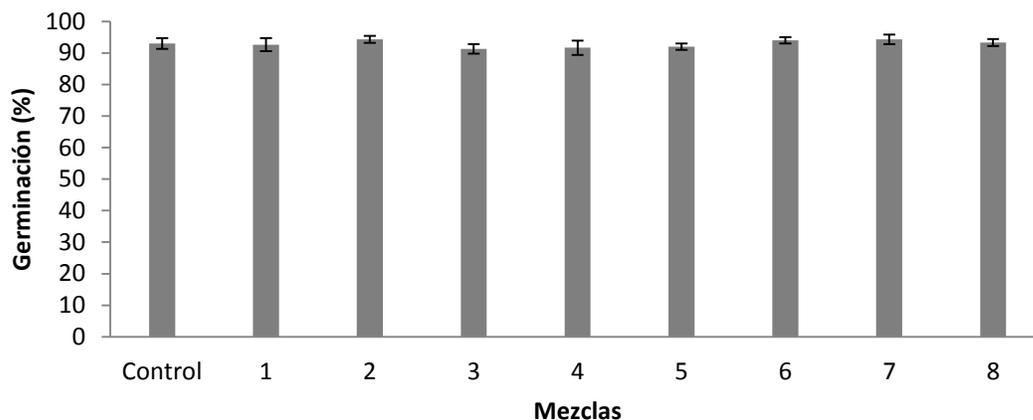


FIGURA 4. Germinación de conidias de *Clonostachys rosea* A10 para las combinaciones de productos. Control: suspensión de conidias en agua; Mezcla 1: alginato de sodio, carbonato de potasio, dióxido de titánio (15:1:4 g/L); Mezcla 2: alginato de sodio, carbonato de potasio, carboximetilcelulosa, dióxido de titanio (15:1:0.5: 4g/L); Mezcla 3: alginato de sodio, carbonato de calcio, dióxido de titanio (15:1:4 g/L); Mezcla 4: alginato de sodio, carbonato de calcio, carboximetilcelulosa, dióxido de titanio(15:1:0.5:4 g/L); Mezcla 5: almidón de maíz, carbonato de potasio, dióxido de titanio (15:1:4 g/L); Mezcla 6: almidón de maíz, carbonato de potasio, carboximetilcelulosa, dióxido de titanio (15:1:0.5:4 g/L); 7: Mezcla almidón de maíz (15 g/L), carbonato de calcio (1 gr/L), dióxido de titanio (4 g/L); Mezcla 8: almidón de maíz, carbonato de calcio, carboximetilcelulosa, dióxido de titanio (15:1:0.5:4 g/L). Barras indican la desviación estándar de los tratamientos.

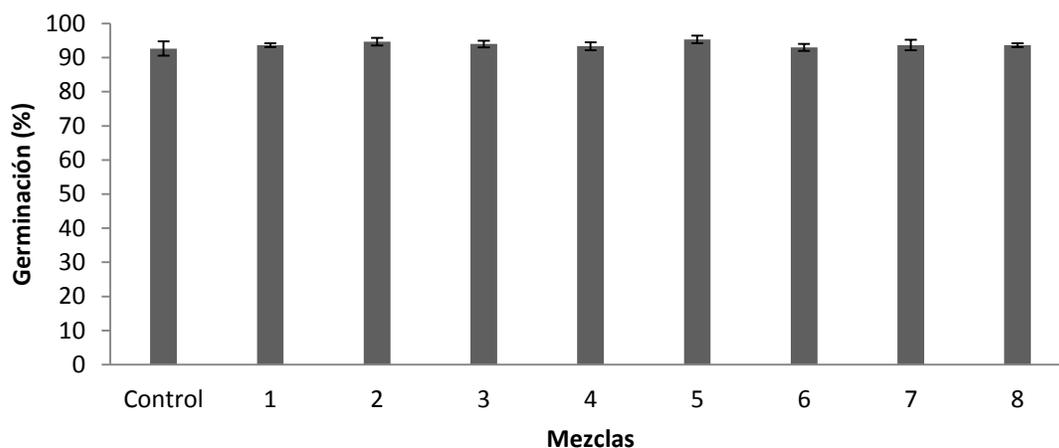


FIGURA 5. Germinación de conidias de *Clonostachys rosea* A11 para las combinaciones de productos. Control: suspensión de conidias en agua; Mezcla 1: alginato de sodio, carbonato de potasio, dióxido de titanio (15:1:4 g/L); Mezcla 2: alginato de sodio, carbonato de potasio, carboximetilcelulosa, dióxido de titanio (15:1:0.5: 4 g/L); Mezcla 3: alginato de sodio, carbonato de calcio, dióxido de titanio (15:1:4 g/L); Mezcla 4: alginato de sodio, carbonato de calcio, carboximetilcelulosa, dióxido de titanio (15:1:0.5:4 g/L); Mezcla 5: almidón de maíz, carbonato de potasio, dióxido de titanio (15:1:4 g/L); Mezcla 6: almidón de maíz, carbonato de potasio, carboximetilcelulosa, dióxido de titanio (15:1:0.5:4 g/L); 7: Mezcla almidón de maíz (15 g/L), carbonato de calcio (1 gr/L), dióxido de titanio (4 g/L); Mezcla 8: almidón de maíz, carbonato de calcio, carboximetilcelulosa, dióxido de titanio (15:1:0.5:4 g/L). Barras indican la desviación estándar de los tratamientos.

En el proceso de formulación de antagonistas contra hongos de suelo normalmente se utilizan formulaciones simples, en las cuales se hace crecer el agente de control biológico sobre un substrato específico, de manera de realizar producción masaly ser aplicadodirectamente en elsuelo (Lewis y Lumsden, 2000; Jensen *et al*, 2000). Para el caso de patógenos aéreos, como es el caso de *B. cinerea*, las formulaciones preferidas son fermentaciones líquidas con adición de algún adyuvante.

La función que tiene cada uno de los productos dentro de la formulación es de importancia. En el caso del protector solar, evita que el principio activo de los productos de control biológico sean afectados por la radiación UV, pudiendo inactivar o matar al agente utilizado (Edgintonet *al*, 2010; Liu y Lin, 2013). Dentro de los compuestos más probados en la protección agentes es el dióxido de titanio en formato de nano partículas, aunque también se

ha demostrado la acción fotoprotectora de otros productos, como leche en polvo y albumina de huevo (Edginton *et al*, 2010).

Para el caso de los emulsificantes estos son útiles cuando se busca mezclar una fase acuosa con una fase oleosa. En literatura ha sido usada la carboximetilcelulosa como emulsificante en emulsiones simples, principalmente en formulación para microherbicidas (Auld *et al*, 2003).

La humidificación corresponde al desplazamiento de un fluido en contacto de una superficie, por otro fluido (Miñana, Goncalves, 2011). En el caso de las formulaciones fúngicas, esta permitiría un mejor desplazamiento del principio activo (en este caso las conidias) en la superficie de las hojas. No existe información de los productos humidificantes probados sobre la germinación de conidias en *C. rosea*, sin embargo, estudios han demostrado que concentraciones de 5mM de carbonato de potasio puede inhibir *in vitro* el crecimiento de patógenos como *Penicillium digitatum* y *B. cinerea* (Smilanick *et al*, 1998; Palmer *et al*, 1997)

El estabilizante más citado en literatura corresponde al alginato de sodio el cual es utilizado para la producción de pellets conteniendo los controladores, principalmente microherbicidas (Walker y William, 1983). Este tipo de formulación ha ido mejorando, llegando a realizar nano pellets con la alginato de sodio como estabilizante (Mohammed *et al*, 2009). Pereira y Roberts (1991) probaron la formulación de *M. anisopliae* y *B. bassiana* con almidón de maíz gelatinizado demostrando que esta formulación produce más conidias por gramo que formulaciones con alginato de sodio.

En la literatura consultada no se encontró la utilización de estos productos en conjunto para obtención de una formulación, ni su efecto en germinación de conidias de *C. rosea*. Cada uno de los adyuvantes probados en el ensayo de germinación podrían brindar diversas ventajas a los antagonistas *C. rosea* A10 y A11, como fue discutido previamente.

4.2. Efecto de formulaciones de *C. rosea* A10 y A11 en el control de *B. cinerea* en mini estacas del clon híbrido *E. globulus* x *E. nitens* X-65 y plantas de *E. globulus* en condiciones de producción operacional.

4.2.1. Ensayo de verano.

En las estacas muertas no se detectó la presencia de *B. cinerea*. Esto se debió probablemente a las variables ambientales presentes en el invernadero, las cuales no se mantuvieron en temperatura ni humedad óptimos para la esporulación del patógeno.

En el enraizamiento de estacas solo con la formulación 2 para ambas cepas (Dióxido de titanio 4 g/L, carbonato de calcio 1 g/L, alginato de sodio 10 g/L y carboximetilcelulosa 0.5 g/L) y la aplicación de Iprodione se obtuvo un menor porcentaje de enraizamiento que el control (Figura 6A). Además existió una alta variabilidad en los tratamientos 5, 8, 9 y 10, debido principalmente a un efecto de borde, donde al menos una de las bandejas de estos tratamientos recibió agua en forma constante a diferencia del resto de las bandejas.

En el caso de formación de callos no evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos con el control agua, salvo el tratamiento 5 (dióxido de titanio 4 g/L, carbonato de potasio 1g/L, alginato de sodio 10 g/L y carboximetilcelulosa 0.5 g/L) (Figura 6B), sin embargo, es importante destacar que este tratamiento fue influenciado por efecto borde. En el caso de las plantas no enraizadas hubo un mayor porcentaje en el tratamiento 6 (40% aproximadamente), siendo igual a la mortalidad encontrada por la aplicación de iprodione.

Un mayor porcentaje de plantas muertas ocurrió en los tratamientos 2 y 6 (formulación 2 para ambas cepas, correspondiente a dióxido de titanio 4 g/L, carbonato de calcio 1 g/L, alginato de sodio 10 g/L y carboximetilcelulosa 0.5 g/L) y 13 (Iprodione), encontrándose la mortalidad cercana a un 10% (Figura 6D), siendo diferente al resto de los tratamientos. Ninguno de estos casos fue confirmado como *B. cinerea* al realizar análisis en laboratorio (traspaso a medio de

cultivo y verificar esporulación mediante cámara húmeda). Esta mortalidad podría deberse principalmente a la mortalidad asociada al estrés por traspaso de las mini estacas a sustrato (cercana al 10%), además de las condiciones ambientales presentes en el invernadero, las cuales no eran las óptimas para el proceso de enraizamiento.

Se presentó fitotoxicidad en las hojas de las mini estacas en todos los tratamientos en los cuales se utilizó alginato de sodio, encontrándose daños sobre un 50% en severidad e incidencia en las hojas presentes en las mini estacas (Figura 7). En literatura no se ha encontrado que el alginato de sodio fuese fitotóxico para plantas, sin embargo, cabe destacar que ninguna formulación de las citadas anteriormente fueron aplicadas directamente en formato líquido, siendo aplicadas como pellets a base de este compuesto.



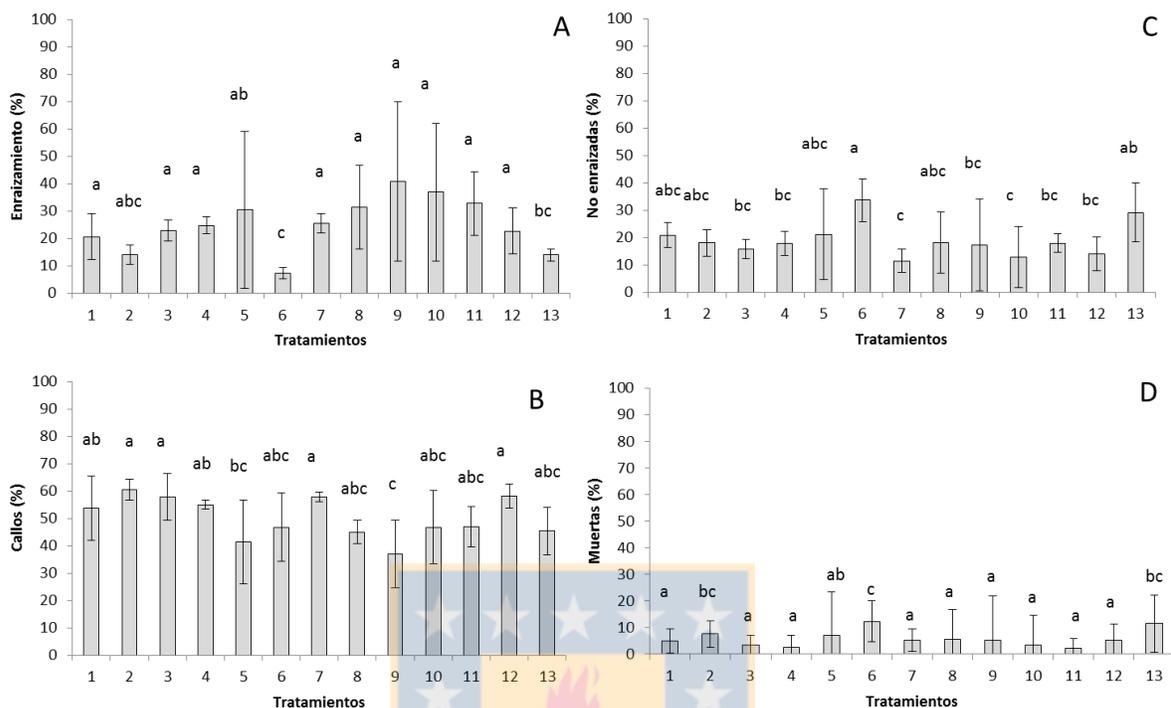


FIGURA 6 . Porcentaje de enraizamiento correspondiente a mini estacas del clon híbrido *E. globulus* x *E. nitens*X-65 (A), formación de callos (B), plantas no enraizadas (C) y plantas muertas (D) correspondientes al ensayo de verano. Barras indican desviación estándar de los tratamientos. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre los tratamientos según test LSD P=0.05. Tratamientos 1 y 5: Dióxido de titanio (4 g/L), carbonato de potasio (1 g/L), alginato de sodio (10 g/L); carboximetilcelulosa(0.5 g/L).; Tratamiento 2 y 6: Dióxido de titanio (4 g/L), carbonato de calcio (1g/L), alginato de sodio (10 g/L), carboximetilcelulosa(0.5 g/L).; Tratamiento 3 y 7: Dióxido de titanio (4 g/L), carbonato de potasio (1g/L), almidon de maíz(10 g/L), carboximetilcelulosa(0.5 g/L); Tratamiento 4 y 8: Dióxido de titanio (4 g/L), carbonato de calcio (1g/L), almidón de maíz 10 (g/L), carboximetilcelulosa(0.5 g/L). Tratamientos 1 al 4 corresponden a mezclas con cepa *C. rosea* A10; tratamientos del 5 al 8 corresponden a mezclas cepa *C. rosea* A11. Tratamiento 9: aplicación de agua.; Tratamiento 10: Serenade.; Tratamiento 11: suspensión de conidias en agua de *C. rosea*A10.; Tratamiento 12: suspensión de conidias en agua *C. rosea* A11.; Tratamiento 13: Iprodione.

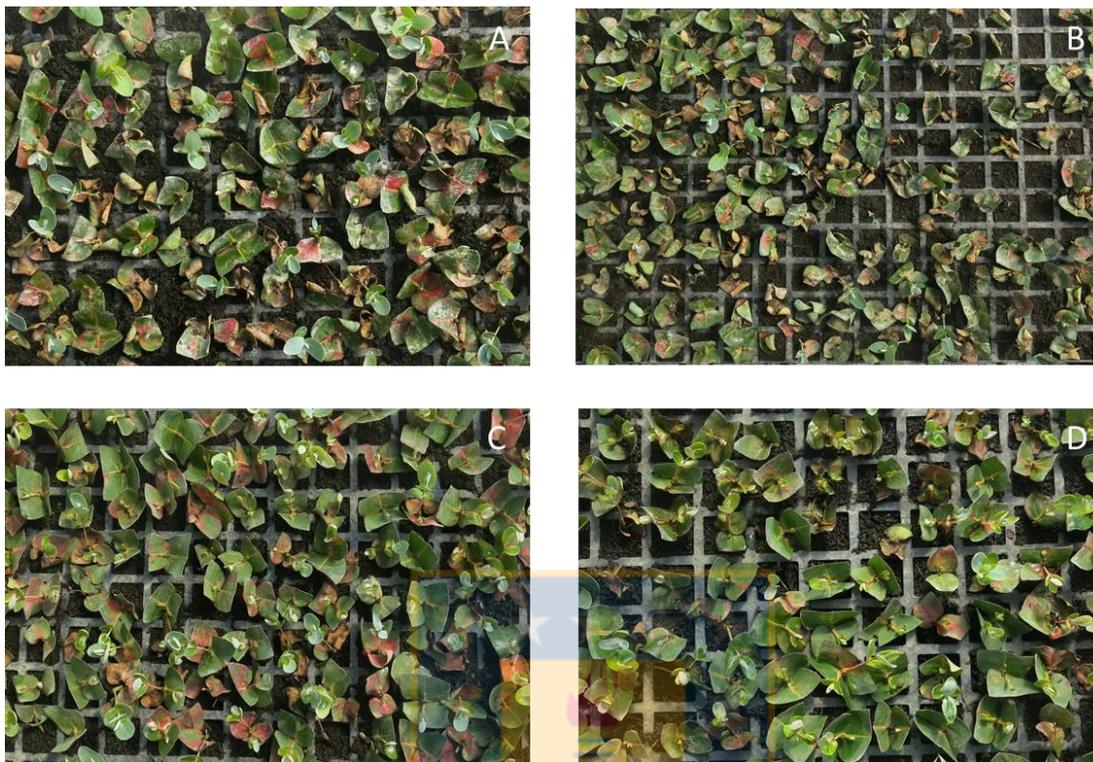


FIGURA 7. Tratamientos con la cepa de *Clonostachys rosea* A10 (A, C) y A11 (B, D) en ensayo de verano (mini estacas del clon híbrido *E. globulus* x *E. nitens*X-65) presentando entre sus componentes alginato de sodio (A y B) y con almidón de maíz (C y D) respectivamente.

Existen reportes de bacterias promotoras de crecimiento y enraizamiento. Estudio de hongos promotores de enraizamiento en el género *Eucalyptus* no han sido reportados, sin embargo, si existen estudios de hongos como promotores de crecimiento, los cuales se han enfocado principalmente en el género *Trichoderma*. En estudios realizados por Contreras *et al*(2009), se demostró que inoculando *in-vitro* plántulas de maíz con dos aislados de *Trichoderma* hubo un incremento en el número de raíces laterales.

Otros estudios realizados en plantas de maíz inoculadas con este microorganismo afecto el sistema radicular, lo cual se tradujo en un aumento de rendimiento en campo del cultivo de maíz. Entre los efectos observados se incluyó un aumento de la biomasa radicular y raíces secundarias (López *et al.*, 2005).

En Chile no existe ningún microorganismo comercial asociado a promoción de enraizamiento, sin embargo, existen productos, como Trichonativa ® el cual dentro de sus especificaciones indica que como promotor de crecimiento en plántulas de *P. radiata*. Los reportes anteriores indican que existen hongos del género *Trichoderma* que podrían actuar como promotores de enraizamiento, sin embargo, del género *Clonostachys* no se ha presentado ningún reporte, excepto el nombrado por Sanfuentes y Zaldúa (2010) donde indican que habría un aumento de raíces, siendo esto solo una observación realizada por los investigadores.

A pesar de no haber aislado *Botrytis* este ensayo permitió realizar un primer screening de las formulaciones probadas, pudiendo descartar aquellas que contenían alginato de sodio como estabilizante, debido a la presencia de fitotoxicidad en las hojas de las mini estacas.



4.2.2. Ensayo de otoño.

Los tratamientos con *C. rosea* en todas sus formulaciones no mostraron diferencias con el control agua, encontrándose el porcentaje de mortalidad de plantas entre 4 y 8%. La rotación de fungicidas y Serenade demostraron controlar el moho gris, alcanzando una mortalidad de 0.17 y 1.83% respectivamente (Figura 8). De las plantas muertas, el 100% correspondió a *B. cinerea*.

La baja eficacia de *C. rosea* en el control del patógeno es atribuida a las bajas temperaturas en la época en que se realizó el ensayo, donde las temperaturas en el vivero tuvieron una mínima de -1.2°C y una máxima de 19.8°C . La temperatura promedio de los días en los cuales se mantuvo el ensayo fue de 10.9°C . Ningún día contó con periodos de más de 3 horas consecutivas con temperaturas mayores a 15°C , mientras que las temperaturas media supero los 15°C solo dos días (Figura 9). La mortalidad de plantas comenzó a ocurrir en conjunto a la baja de las temperaturas medias y el proceso de cierre de follaje, periodo que ocurrió entre la primera y tercera semana de mayo (Figura 10). Las primeras plantas muertas correspondían a plantas suprimidas.

En estudios realizados por Cota *et al* (2008) en condiciones *in vitro*, distintos aislados de *C. rosea* provenientes de Brasil tienen su crecimiento y esporulación óptimos a 25°C . Temperaturas de 10°C o inferiores disminuyó el crecimiento micelial y la esporulación de los aislados a tasas casi nulas, razón por la cual Buck (2004) señala que a bajas temperaturas es preferible la utilización de fungicidas para el control de *B. cinerea*. Estudios previos de *C. rosea* A10 y A11 demostraron una disminución en su potencial de germinación y crecimiento en condiciones *in vitro* a 15°C (Zaldúa, 2012) resultados similares a los reportados por Cota *et al* (2008).

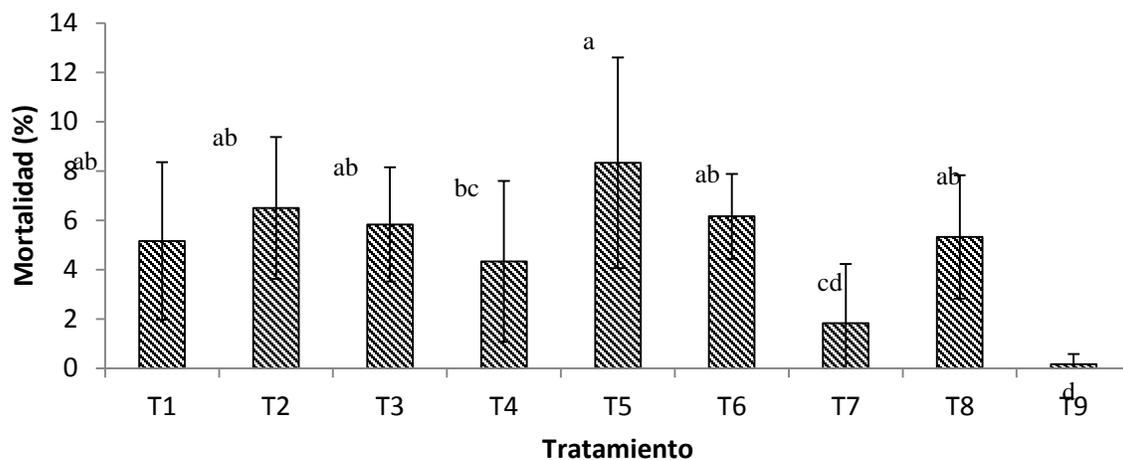


FIGURA 8. Mortalidad de plantas (porcentaje) por *B. cinerea* en los diferentes tratamientos al finalizar el ensayo. Las barras muestran desviación estándar de los tratamientos. T1 y T4: Formulación 1 correspondiente a dióxido de titanio 4 g/L, carbonato de potasio 1g/L, almidón de maíz 10 g/L, carboximetilcelulosa 0.5 g/L.; T2 y T5: Formulación 2 correspondiente a suspensión de conidias en agua con modificación de pH a 3.5 añadiendo ácido láctico. T3 y T6: Suspensión de conidias de *C. rosea* en agua. T1 a T3 correspondiente a cepa de *C. rosea* A10; T4 a T6 correspondiente a cepa de *C. rosea* A11; T7: Aplicación de Serenade; T8: Aplicación agua; T9: Rotación de fungicidas. Diferentes letras muestran diferencia significativa entre los tratamientos según test LSD P=0.05.

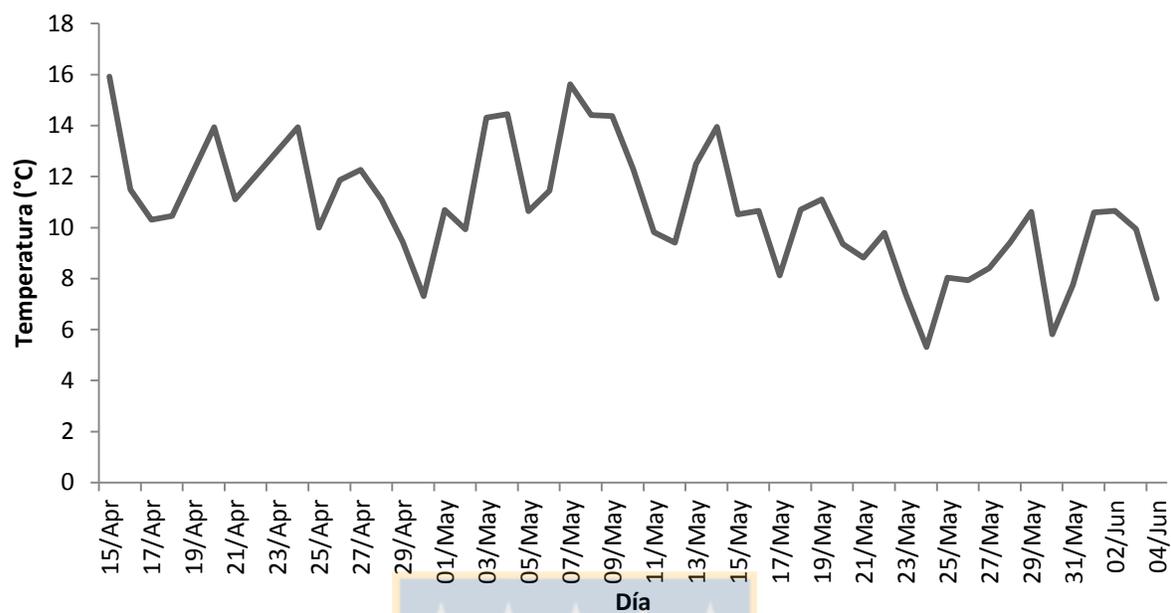


FIGURA 9. Comportamiento de temperaturas promedio en el vivero Carlos Douglas Yumbel entre el 15 de Abril y 4 de Junio de 2014.

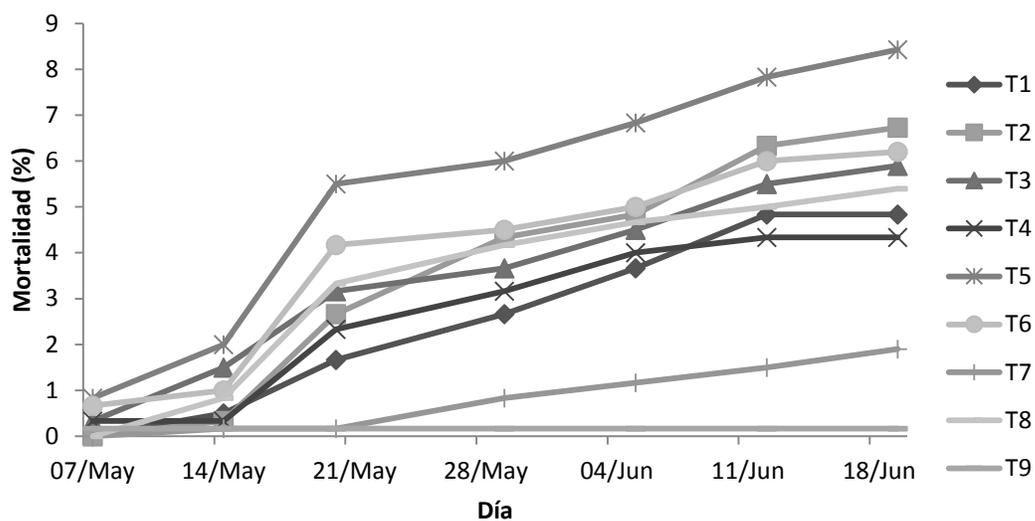


FIGURA 10. Curva de progreso de la enfermedad en los diferentes tratamientos al 19 de Junio de 2014. T1 y T4: Formulación 1 correspondiente a dióxido de titanio 4 g/L, carbonato de potasio 1g/L, almidón de maíz 10 g/L, carboximetilcelulosa 0.5 g/L.; T2 y T5: Formulación 2 correspondiente a suspensión de conidias en agua con modificación de pH a 3.5 añadiendo ácido láctico. T3 y T6: Suspensión de conidias de *C. rosea* en agua. T1 a T3 correspondiente a cepa de *C. rosea* A10; T4 a T6 correspondiente a cepa de *C. rosea* A11; T7: Aplicación de Serenade; T8: Aplicación agua; T9: Rotación de fungicidas. Diferentes letras muestran diferencia significativa entre los tratamientos según test LSD $P=0.05$.

Posterior al pick de enfermedad producido entre los días 14 y 21 de mayo hubo una estabilidad en el avance de la enfermedad, debido principalmente a la homogenización de las plantas.

Una variable no contemplada dentro de este ensayo es la medición de tasa fotosintética en las plantas aplicadas. Al ser asperjada, la formulación con dióxido de titanio se mantuvo remanente en las plantas, viéndose una coloración blanca constante (Figura 11). Es importante destacar que en la gran mayoría de publicaciones donde se utiliza este compuesto como protector solar, es utilizado en forma de nano partícula (tamaño de partículas entre 1 y 100 nm), permitiendo una buena adherencia y sin formar capas en las superficies de las hojas, a diferencia del utilizado en este caso, el cual era dióxido de titanio utilizado como recubrimiento, lo cual tendría adherencia a la superficie de la hoja.

Para mejorar los rendimientos de *C. rosea* a bajas temperaturas se podría realizar fusión de protoplastos con otras especies que toleren mejor condiciones de frío. Este tipo de metodología es utilizada para obtener recombinación genética a través de parasexualidad, lo que permite la fusión de protoplastos, aunque estos sean de especies distintas (Stasz, 1990). Además de esto, se podría probar el efecto de agentes mutagenicos sobre estas cepas como radiación UV, para posteriormente escoger aquellas cepas que sean capaces de sobrevivir a bajas temperaturas (idealmente menores de 10°C) y también mantengan su capacidad antagonica en un rango considerable de temperaturas (entre 5 y 30°C, temperaturas entre las cuales se mantienen los viveros forestales de la región del BíoBío durante el año).

Otra opción es la utilización de cepas adaptadas a bajas temperaturas, como es el caso de aislados de *T. viride* y *T. polysporum*, especies comúnmente encontradas en ambientes donde predominan temperaturas menores a 10°C (Papavizas, 1985; Kredicset al, 2003).

Este ensayo demostró que las formulaciones de *C. rosea* A10 y A11 probadas para controlar el moho gris en plantas de *E. globulus* no tuvo efecto en la eficacia de estas.

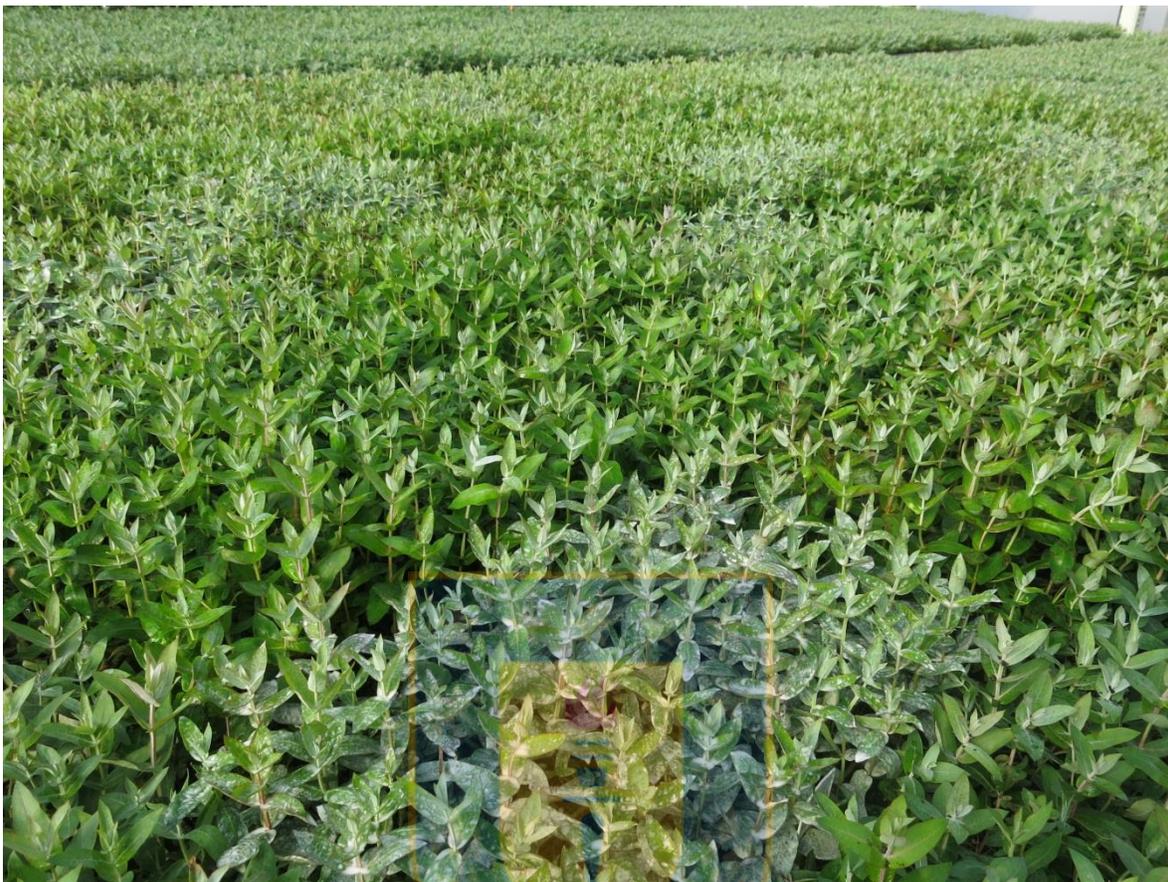


FIGURA 11. Ensayo de semillas montado en Vivero Carlos Douglas Yumbel. En la imagen es posible observar remanente en las plantas de *E. globulus* en tratamiento de *C. rosea* formulado con dióxido de titanio

4.3. Bioensayos de antagonismo de *B. cinerea* en discos de hoja a diversas temperaturas.

No hubo diferencias significativas entre los tratamientos a 30°C, temperatura a la cual se presentó muy poca esporulación del patógeno, solo presente en el control patógeno. A 25°C aumentó la esporulación del patógeno en el control patógeno, sin embargo, ambas cepas lograron suprimir la esporulación. A 20°C, *C. rosea* A11 suprimió la esporulación del patógeno mientras que *C. rosea* A10 disminuyó su esporulación, sin suprimirlo del todo. No hubo diferencias en control entre ambos aislados. Al disminuir la temperatura a 15°C se aprecia una leve disminución en la esporulación del patógeno en comparación a 20°C. Las cepas de *C. rosea* mostraron diferencia significativa en el control de *Botrytis*, siendo la cepa A10 menos eficiente en control del patógeno. A pesar que la cepa de *C. rosea* A11 resultó mejor estadísticamente, a esta temperatura también se apreció esporulación del patógeno. A temperaturas de 20 y 25°C se pudo apreciar esporodocios del antagonista (Figura 12) Finalmente, a 10°C ambas cepas de *C. rosea* no tuvieron diferencia significativa entre sí, observándose una disminución en la capacidad de control de ambas cepas (Tabla 6).

El comportamiento presentado por ambos aislados son semejantes a los obtenidos *in vitro* por Cota *et al* (2008), donde comprobaron en distintos aislados de *C. rosea* provenientes de Brasil que estos tienen su crecimiento y esporulación óptimos a 25°C, por el contrario, en temperaturas a 10°C o inferiores, el crecimiento micelial y esporulación de los aislados disminuyó, por lo cual, a bajas temperaturas es preferible la utilización de fungicidas para el control de *B. cinerea* (Buck, 2004). Los ensayos realizados por Zaldúa (2012) demuestran un comportamiento similar de ambas cepas de *C. rosea* A10 y A11 en las temperaturas probadas en ensayos de discos de hoja (15, 20 y 25°C).

Los resultados obtenidos en los bioensayos demuestra que la probable causa que las formulaciones estudiadas en el ensayo de otoño no hayan sido eficaces en el control de *B. cinerea* fuese debido a las bajas temperaturas presentes en el vivero (resultados ensayo 4.2.2).

TABLA 6. Grado de esporulación (GE) en los bioensayos de control de *B. cinerea* con aplicación de *C. rosea* A10 y A11 a distintas temperaturas.

30 °C		25 °C		20°C		15 °C		10 °C	
Tratamiento	GE								
CA ^a	1.0								
CP ^a	1.2	CP ^b	3.4	CP ^b	5.0	CP ^c	4.5	CP ^c	2.4
A10 ^a	1.0	A10 ^a	1.0	A10 ^a	1.1	A10 ^b	1.4	A10 ^b	1.7
A11 ^a	1.0	A11 ^a	1.0	A11 ^a	1.0	A11 ^a	1.2	A11 ^b	1.6

CA: Control agua; CP: Control Patógeno; A10: *C. rosea* A10; A11: *C. rosea* A11.

*Letras diferentes muestran diferencias significativas según test Kruskal-Wallis con P=0.05.



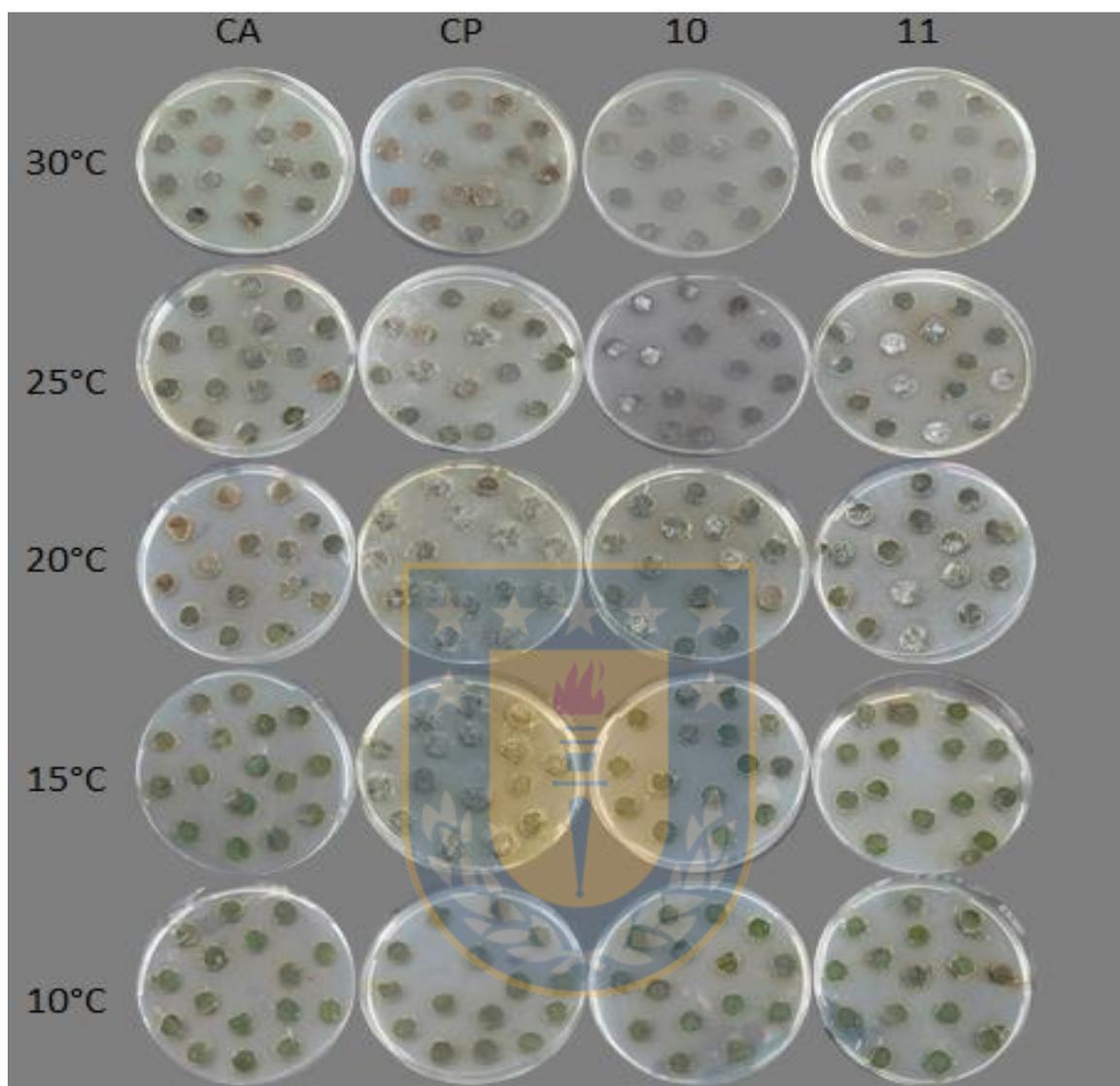


FIGURA 12. Bioensayo realizado a diferentes temperaturas (30, 25, 20, 15 y 10°C) para el control de *B. cinerea* utilizando los antagonistas *C. rosea* A10 y A11. CA: control agua (aplicación solo agua); CP: Control patógeno (solo aplicación de suspensión de conidias de *B. cinerea*), 10: Aplicación del antagonista *C. rosea*A10 24 h antes de la aplicación del patógeno; 11: Aplicación del antagonista *C. rosea*A1124 h antes de la aplicación del patógeno.

4.4. Bioensayo de antagonismo con diferentes formulaciones para el control de *Botrytis cinerea*.

Los resultados fueron acorde con los resultados anteriores. A medida que la temperatura disminuye, la efectividad de ambas cepas de *C. rosea* (A10 y A11) en el control de *B. cinerea* disminuye, lo cual sucedió con todas las formulaciones probadas. En las pruebas realizadas a 25°C los tratamientos de *C. rosea* formulados y no formulados no presentan diferencias en el control de *Botrytis*, suprimiendo en todos los casos al patógeno. A 20°C, a pesar del aumento en la esporulación del patógeno, las formulaciones de ambos antagonistas probaron ser efectiva en el control, sin embargo, no suprimieron completamente al patógeno, como sí ocurrió a 25°C. A 15°C todos los tratamientos controlan al patógeno, pero se aprecia una disminución el control. A excepción de Serenade y Trichonativa, se mantuvieron todos en un índice de esporulación menor a 2. No hubo diferencia significativa entre las formulaciones, a excepción de la formulación 1 (dióxido de titanio 4 g/L, carbonato de potasio 1 g/L, almidón de maíz 10 g/L, carboximetilcelulosa 0.5 g/L) para la cepa A10, la cual, a pesar de controlar al patógeno, presentó diferencias con el resto de formulaciones (Tabla 8).

Los resultados, al igual que en el ensayo 4.3 y los reportados por Zaldúa (2012) demuestran disminución en el control a temperaturas menores. Esto también ocurrió con las tres formulaciones probadas en ambas cepas.

Los controles utilizados para este caso Trichonativa, Serenade y Switch dieron resultados desiguales. Trichonativa es un producto basado en una mezcla de tres cepas del género *Trichoderma*, utilizado principalmente para hongos de suelo. Solo a 25°C logró un control del patógeno, siendo menor al control obtenido con las formulaciones de ambas cepas de *C. rosea*. Switch, fungicida utilizado normalmente para el control de *B. cinerea*, controló en todas las temperaturas al patógeno, obteniendo una esporulación menor al 25% en todas las temperaturas ensayadas. En el caso de Serenade, biofungicida en base a *Bacillus subtilis*, en ninguno de los casos fue efectivo en el control de *B. cinerea*. Este producto ha sido diseñado para el control de *B. cinerea*, por lo que su bajo control podría deberse a la concentración a la

cual se aplicó (10^7), la cual es 10 veces menor a la utilizada en el ensayo de otoño, donde se obtuvo buen índice de control del patógeno en campo. En este estudio se utilizó a esta concentración para igual la concentración a la utilizada por los antagonistas.

La amplia batería de fungicidas utilizados en el ensayo de otoño (punto 3.2.4, tabla 3) hace difícil el poder competir con estos productos utilizando ambos aislados de *C. rosea* en el control del moho gris a bajas temperaturas. Diversos estudios han demostrado la eficacia de estos productos en el control de *B. cinerea*. Elad *et al* (1993) demostraron que al utilizar tebuconazole semanalmente aplicado con *T. harzianum* permitía el control de *B. cinerea* en plantas de zapallos italianos (*Cucumis sativus*). El fungicida Switch fue probado en bioensayos en discos de hoja de *E. globulus*, donde los resultados de control fueron similares (Sanfuentes *et al*, 2006). Los fungicidas comúnmente utilizados como botryticidas tienen la desventaja de generar cepas resistentes del patógeno si no se realizan planes adecuados. Baroffio *et al* (1993) demostraron que los fungicidas Teldor y Switch utilizados como fungicidas en ensayo de otoño son capaces de generar aislados resistentes en periodos de tiempo de 2 a 3 años sin un plan de manejo adecuado.

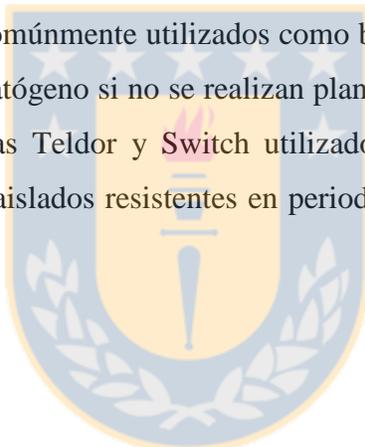


TABLA 7.Resultados del bioensayo con distintas formulaciones para ambas cepas de *C.rosea* A10 y A11 en el control de *B. cinerea* a distintas temperaturas.

25°C		20°C		15°C	
Tratamiento	GE	Tratamiento	GE	Tratamiento	GE
CA ^{*a}	1.0	CA ^a	1.0	CA ^a	1.0
CP ^{*c}	3.0	CP ^c	4.3	CP ^e	4.8
10 ^a	1.0	10 ^{bc}	1.3	10 ^{cd}	1.8
11 ^a	1.0	11 ^{bc}	1.4	11 ^{bcd}	1.6
F1 ^{**} 10 ^a	1.0	F1 10 ^{bc}	1.4	F1 10 ^d	2.0
F1 11 ^a	1.0	F1 11 ^{bc}	1.3	F1 11 ^{abc}	1.4
PH ^{***} 10 ^a	1.0	PH 10 ^{bc}	1.3	PH 10 ^{bcd}	1.7
PH11 ^a	1.0	PH 11 ^{bc}	1.3	PH 11 ^{abc}	1.4
SW ^{*a}	1.0	SW ^{bc}	1.4	SW ^{de}	1.3
SER ^{*b}	2.1	SER ^c	3.8	SER ^e	3.4
T ^{*b}	1.8	T ^c	3.0	T ^e	2.9

*SW: Switch; SER: Serenade; T: Trichonativa; CA: Control agua; CP: Control patógeno.

**F1: Formulación 1 para cada una de las cepas de *C. rosea* (A10 y A11).

***PH: Formulación con modificación de pH para cada una de las cepas de *C. rosea* (A10 y A11).

Diferentes letras representan diferencias significativas según comparación múltiple tuckey P=0.05.

V. CONCLUSIONES

Las pruebas de formulación se demostraron que es posible utilizar mezcla de compuestos para una formulación de ambas cepas de *C. rosea*.

El ensayo de verano, a pesar de no haber obtenido resultados en control de *B. cinerea* por no presentarse la enfermedad, se demostró la fitotoxicidad en hojas al ser formuladas ambas cepas con alginato de sodio.

En el ensayo de otoño se comprobó que la aplicación de *C. rosea* A10 y A11 en todas sus formulaciones es igual al control con agua, siendo inferior en el control en comparación a la aplicación del biofungicida Serenade y la rotación de fungicidas.

Los bioensayos realizados a diferentes temperaturas comprobaron la eficacia de *C. rosea* A10 y A11 en el control de *B. cinerea*, sin embargo, los índices de control disminuyen a temperatura de 15°C o menor. A su vez, las formulaciones de ambas cepas probadas en los bioensayos posteriores controlaron *B. cinerea* a temperaturas superiores a 15°C, siendo igual de efectivas que la aplicación del fungicida Switch.

En conclusión, se comprueba la hipótesis planteada, demostrando que las formulaciones probadas para *C. rosea* A10 y A11 no alteran la eficacia de control de *B. cinerea* en ensayos *in vitro* y operacionales de campo en mini estacas del clon híbrido *E. globulus* x *E. nitens* X-65 y plantas de *E. globulus*.

VI. BIBLIOGRAFÍA.

1. Agrios, G. 1936. Plant pathology/ George Agrios. – 5th ed. pp. El Sevier Academic Press.510- 514.
2. Agritec. 2012. Tipos de formulaciones. Disponible en web: http://www.agritec.com.uy/agritec_novedades/tipo-de-formulaciones/.
3. Alvarez, M. 1991. Resistencia cruzada negativa entre los fungicidas benomilo y dietofencab en aislamientos de *Botrytis cinerea* de vides. Agricultura técnica de Chile. 51, 171-176.
4. Auld, B.; Hetherington, S.; Smith, H. 2003. Advances in bioherbicide formulation. Weed biology and Management. 3, 61-67.
5. Baker, K.; Cook, R. 1974. Biological control of plant pathogens. San Francisco., Calif., Freeman, 433 p.
6. Baroffio, C.; Siegfried, W.; Hilber, U. 2003. Long-term monitoring for resistance of *Botryotinia fuckeliana* to anilinopyrimidine, phenylpyrrole and hydroxyanilide fungicide in Switzerland. Plant disease 87, 662-666
7. Behle, R.; McGuire, M.; Shasha, B. 1997. Effects of sunlight and simulated rain on the residual activity of *Bacillus thuringensis* formulations. Journal of economic entomology 90: 1506-1516.
8. Bettiol, W.; Morandi, M. 2009. Biocontrol de doenças de plantas: uso e perspectivas. Embrapa Meio Ambiente. Capítulo 1, Pags. 7-14.

9. Brar, S.; Verma, M.; Tyagi, R.; Valéro, J. 2006. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry*, 41: 323-342.
10. Buck, J. 2004. Combinations of fungicides with phylloplane yeasts for improved control of *Botrytis cinerea* on geranium seedlings. *Phytopathology*. 94, 196-202.
11. Butín, H.; Peredo, H. 1986. Hongos parásitos en coníferas de America del sur con especial referencia a Chile. *Biblioteca micológica*. 100p.
12. Capiéau, K.; Stenlind, J.; Stenström, E. 2004. Potential for biological control of *Botrytis cinerea* in *Pinus sylvestris* seedlings. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 19(4) 312-319.
13. Cardenas, Y. 2010. Metodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Fitosanidad* 14 (3). 189-195.
14. Carreño, I; Alvarez, M. 1990. Determinación de razas resistentes de *Botrytis cinerea* de vides a fungicidas dicarboximidas. *Agricultura Técnica* 50(3), 298-303.
15. Ciampi, L. 2002. *Introducción a la Patología Vegetal*. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia.
16. Contreras, H.; Marcías, L.; Cortés, C y López, J. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 149: 1579-1592.

17. Cota, L.; Maffia, L.; Mizubuti, E.; Macedo, P. 2009. Biological control by *Clonostachys rosea* a key component in the integrated management of strawberry gray mold. *Biological control* 50: 222-230.
18. Cota, L.; Maffia, L.; Mizubuti, E.; Macedo, P.; Antunes, R. 2008 .Biological control by *Clonostachys rosea* under field conditions. *Biological Control* 46 : 512-522.
19. Cota, L.; Maffia, L.; Mizubuti, E. 2008. Brazilian isolates of *Clonostachys rosea*: colonization under different temperature and moisture conditions and temporal dynamics on strawberry leaves. *Letters in Applied Microbiology*. 46, 312-317.
20. Cook, R.; Baker, K. 1983. The nature and practice of Biological Control. Amer. Phytophatol. Soc. Press. St. Paul, Minnesota. 539 pp.
21. Devotto, L.; Gerding, M. 2003. Respuesta de dos aislamientos chilenos de *Metarhiziumanisopliae* (Metschnikoff) Sorokin a la adición de un protector solar. *Agriculturatócnica*. 63(4), 339-346.
22. Douglas, G.; Goettel, M.; Johnson, D. 1995. Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Biological control* 5: 581-590.
23. Edgington, S.; Segura, H.; De la Rosa, W.; Williams, T. 2010. Photoprotection of *Beauveria bassiana*: Testing simple formulations for control of the coffee berry borer. *International Journal of Pest Management*. 46(3), 169-176.
24. Elad, Y.; Zaqs, Y.; 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.

25. Elad, Y., B. Williamson, P. Tudzynski, and N. Delen. 2004. *Botrytis: Biology, pathology and control*. 403 p. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
26. Escobar, R. 2007. Manual de viverización *Eucalyptus globulus* a raíz cubierta. Centro tecnológico de la planta forestal. Hualpén, Chile 230p.
27. Esterio, M. 2012. Resistencia de botrytis en uva de mesa. Redagricola. Disponible en web: www.redagricola.com/reportajes/fitosanidad/marcela-esterio-debemos-preservar-las-moleculas-botryticidas-que-nos-quedan. Consultado 1 de Julio, 2012.
28. Faria, R.; Wraight, S. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological control* 43:237-256.
29. Fravel, D. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*. 43:337-359.
30. FSC. 2012. Beneficios de la certificación. Disponible en web: http://www.cl.fsc.org/beneficios_de_la_certificacion.html. Consultado 20 Julio, 2012.
31. Fuxa, J. 1989. Fate of released entomopathogens with reference to risk assessment of genetically engineered microorganisms. *Entomological Society Annual Bull Winter*.
32. Guerra, T.; McGuire, M.; Behle, R.; Shasha, B.; Wong, G. 2000. Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economy Entomology* 93, 219-225.
33. Gonzales, G. 1996. Patología del genero eucalyptus en Chile. Centro nacional de capacitacion forestal. Corporacion nacional forestal. Concepción, Chile.

34. INFOR. 2014. El sector forestal Chileno 2014. Disponible en web: http://wef.infor.cl/sector_forestal/sectorforestal.php#/2
35. Jayaraj, J.; Radhakrishnan, N & Velazhahan, R. 2006. Development of formulation of *Trichoderma harzianum* strain M1 for control damping-off of tomato caused by *Pythium aphanidermatum*. *Phytopathology and Plant Protection*, 39(1), 1-8.
36. Jensen, B.; Knudsen, I.; Jensen, D. 2000. Biological seed treatment of cereals with fresh and long-term stored formulations of *Clonostachys rosea*: Biocontrol efficacy against *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology* 106: 233-242.
37. Jensen, B.; Knudsen, I.; Jensen, D. 2001. Survival of Conidia of *Clonostachys rosea* on Stored Barley Seeds and their biocontrol efficacy against seed-borne *Bipolaris sorokiniana*. *Biocontrol Science and Technology*. 12, 427-441.
38. Jensen, D.; Knudsen, M.; Lübeck, M.; Mamarabadi, M.; Hockenhull, J.; Jensen, B. 2007. Development of a biocontrol agent for plant disease control with special emphasis on the near commercial fungal *Clonostachys rosea* strain 'IK726'. *Australasian Plant Pathology* 36: 95-101.
39. Jones, K.; Burges, H. 1998. Formulation of bacterial, viruses and protozoa to control insects. In: Burges HD, editor. *Formulation of microbial biopesticides: beneficial micro-organisms, nematodes and seed treatments*. Kluwer Academic Publishers, pp 7-127.
40. Köhl, J.; Lombaers-Van der Plas, C.; Molhoek, W., Kessel, G.; Van Der Geijn, G. 1999. Competitive ability of the antagonist *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* at temperatures favourable for *Botrytis* spp. development. *Kluwer Academic Publisher, Biocontrol* 44, 329-346.

41. Krauss, U.; Martínez, A.; Hidalgo, E.; Hoopen, M.; Arroyo, C. 2002. Two-step liquid/solid state scaled up production of *Clonostachys rosea*. The British Mycological Society, 106 (12): 1449-1454.
42. Krauss, U.; Hidalgo, E.; Bateman, R.; Adonijah, V.; Arroyo, C.; García, J.; Croizer, J.; Brown, N.; Hoopen, G.; Holmes, K. 2010. Improving the formulation and timing of application of endophytic biocontrol and chemical agents against frosty pod rot (*Moniliophthoralaroreri*) in cocoa (*Theobroma cacao*). Biological Control 54: 230-240.
43. Kredics, L.; Antal, Z.; Manczinger, L.; Szekeres, A.; Kevei, F.; Nagy, E. 2003. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potencial. Foodtechnology and Biotechnology. 47, 37-42.
44. Latorre, B.; Lillo, C.; Rioja, M. 2001. Eficacia de los tratamientos fungicidas para el control de *Botrytis cinerea* de la vid en función de la época de aplicación. Ciencia e investigación agraria 28: 61-66.
45. Lewis, J.; Larkin, R.; Rogers, D. 1998. A formulation of *Trichoderma* and *Gliocladium* to reduce Damping-off caused by *Rhizoctonia solani* and saprophytic growth of the pathogen in soil mix. Plant Disease 82: 501-506.
46. Lewis, J.; Lumsden, R. 2000. Biocontrol of damping-off of greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with formulation of *Trichoderma* spp. Crop protection 20, 49-56.
47. Lignum, 2006. *Eucalyptus nitens*: una alternativa que se proyecta. Reportaje revista Lignum. Septiembre 2006, 39-41.

48. Li, G.; Huang, H.; Acharya, S.; Erickson, R. 2004. Biological control of blossom blight of alfalfa caused by *Botrytis cinerea* under environmentally controlled and field conditions. *Plant disease* 88(11): 1246-1251.
49. Liu, C. y Lin, P. 2013. Titanium dioxide nanoparticles as UV protectants for Enhancing the Survival of Conidia of the Entomopathogenic fungus. *International Journal of Innovative Biological Research*. 2, 21-29.
48. López, J.; Hernandez, E.; Sánchez, L.; Pérez, A.; Rampey, R.; Bartel, B.; Herrera, L. 2005. An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in *Arabidopsis*: identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation. *Plant Physiology* 137: 681–691
49. Lyn, M.; Abbas, H.; Zablutowicz, R. 2007. Water dispersible formulation for delivery of biocontrol fungi to reduce aflatoxin. *United States Patent* 20090060965 A1. 31 agosto 2007.
50. Miñana, M.; Goncalves, E. Aplicaciones cosméticas y farmacéuticas de los surfactantes. Laboratorio de formulación, interfaces, reología y procesos. Módulo de enseñanza en fenómenos interfaciales. Universidad de los Andes. Facultad de ingeniería Química. Mérida, Venezuela.
51. Mohammed, A.; Balaji, K.; Girilal, M.; Kalaichelvan, P.; Venkatesan, R. 2009. Mycobased synthesis of silver nanoparticles and their incorporation into sodium alginate films for vegetable and fruit preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemical*. 57, 6246 - 6252.
52. Morandi, M.; Sutton, J.; Maffia, L. 2000. Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. *European Journal of Plant Pathology*. 106: 439-448.

53. Morandi, M.; Maffia, L.; Sutton, J. 2001. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and debris. *Phytoparasitica* 29(2): 103-113.
54. Morandi, M.; Maffia, L.; Mizubuti, E.; Alfenas, A.; Barbosa, J. 2002. Supression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in Botrytis blight management in commercial greenhouse. *Biological control* 26: 311-317.
55. Musiet, 2013. Eficacia de *Clonostachys rosea* en el control del moho gris (*Botrytis cinerea*) en condiciones operacionales de producción de plantas de *Eucalyptus globulus*. Memoria de Título de Ingeniero en Biotecnología Vegetal. Universidad de Concepción. 25 pp.
56. Palmer, C.; Horst, R.; Lannghans, R. 1997. Use of bicarbonates to inhibit in vitro Colony Growth of *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 81: 1432-1438.
57. Nobre, S.; Maffia, L.; Mizubuti, E.; Cota, L.; Dias, A. 2005. Selection of *Clonostachys rosea* from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. *Biological Control* 34, 132-143.
58. Papavizas, G. Trichoderma and Gliocladium: Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual ReviewPhytophathology*, 23: 23-54
59. Paulitz, T.; Bélanger, R. 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annual reviews of Phytopathology*. 39 103-133.
60. Peng, G.; Sutton, J. 1991. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Canadian Journal Plant Pathology* 13: 247-257.

61. Pereira, R.; Roberts, D. 1991. Alginate and cornstarch mycelial formulations of entomopathogenic fungi *Bauveria bassiana* and *Metharhiziumanisopliae*. Entomological society of America. 84, 1657-1661.
62. Ponce-Gonzales, F.; García, M.; Lozoya, H.; Herrera, T. 2000. Resistencia de *Botrytis cinerea* (Pers.) Fr., a dos fungicidas benzimidazoles utilizados en floricultura. Revista Chapingo Serie Horticultura 8: 95-105.
63. Ragaei, M. 1999. Radiation protection of microbial pesticides. Journal of Applied Entomology. 123: 381-384.
64. SAG. Servicio Agrícola y Ganadero. 2012. Lista de plaguicidas autorizados al 17 de diciembre de 2012. Disponible en web: <http://www.sag.cl>. Consultado 22 de marzo de 2013.
65. Sanfuentes, E.; Molina, G.; Zaldúa, S.; Gonzáles, G. 2006. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales de Chile. Bosque 27: 126-134.
66. Sanfuentes, E.; Zaldúa, S. 2010. Control of *Botrytis cinerea* in *Eucalyptus globulus* mini-cuttings using *Clonostachys* and *Trichoderma* strains. Chilean Journal of Agricultural Researches 70: 576-582.
67. Schisler, D.; Slininger, P.; Behle, R.; Jackson, M. 2004. Formulation of *Bacillus* spp. For biological control of plant disease. Symposium: The nature and application of biocontrol microbes: *Bacillus* spp. Phytopathology, 94 (11): 1267-1261.

68. Singh, P.; Nautiyal, C. 2012. A novel method to prepare concentrated conidial biomass formulation of *Trichoderma harzianum* for seed application. *Journal of Applied Microbiology* 113, 1442-1450.
69. Smilanick, J.; Margosan, D.; Mlikota, F.; Usall, J.; Michael, I. 1999. Control of Citrus Green mold by Carbonate and Bicarbonate Salts and the Influence of Commercial Postharvest Practices on Their Efficacy. *Plant Disease*. 83, 139-145.
70. Stasz, T. 1990. Genetic improvement of fungi by protoplast fusion for biological control of plant pathogens. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Vol. 12, 322-327.
71. Sutton, J.; Peng, G. 1991. Epidemiology and management of botrytis leaf blight of onion and gray mould of strawberry: a comparative analysis. *Canadian Journal of Plant Pathology* 12: 100-110.
72. Sutton, J.; Peng, G. 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathology* 83: 615-621.
73. Sutton, J.; Zhang, P.; Hopkin, A. 1996. Inoculum concentration and time of application of *Gliocladium roseum* in relation to biocontrol of *Botrytis cinerea* in black spruce seedlings. *Canadian Journal Forest Research*, 26: 360-367.
74. Sutton, J.; Li, D.; Peng, G.; Yu, H.; Zhang, P.; Valdebenito, R. 1997. *Gliocladium roseum*, a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant disease* 81: 316-328.
75. Valdés, A. 2000. Comportamiento de fungicidas *in-vitro* e *in-vivo* hacia aislamientos resistentes a dicarboximidas de *Botrytis cinerea* en vides. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Chile. Tesis (Ingeniería Ejecución Agropecuaria)

76. Vásquez, C.; Saldarriaga, Y.; Pineda, F. 2006. Compatibilidad de *Bauveriabassiana* con fenoxicarb. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología Costa Rica. 78: 80-85.
77. Walker, L.; Connick, W. 1983. Sodium alginate for production and formulation of Mycoherbicides. Weed science. 31, 333-338.
78. Wilcox, W.; Seem, R. 1993. Relationship between strawberry gray mold incidence, environmental variables, and fungicide applications during different periods of the fruiting season. The American Phytopathological Society. 84,264-270.
79. Williamson, B.; Tudzynski, B.; Tudzynski, P.; Van, J. 2007. Pathogen profile *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Molecular plant pathology. 8 (5), 561-580.
80. Yohalem, D. 2003. Evaluation of fungal antagonists for grey mould management in early growth of pot roses. Association of Applied Biologists. 144:9-15.
81. Zaldúa, S. 2012. Caracterización de cepas de *Clonostachys rosea* para el control de *Botrytis cinerea* en viveros de *Eucalyptus globulus*. Tesis doctoral para Doctorado en Ciencias Forestales. Universidad de Concepción.

VII. ANEXOS.

TABLA 8. Productos biológicos comercializados en Chile. Fuente: SAG, 2012.

NOMBRE COMERCIAL	INGREDIENTE ACTIVO	CONCENTRACION	TIPO FORMULACION	AUTORIZACIÓN APLICACIÓN AEREA	CULTIVO PARA APLICACIÓN AEREA
DIPEL WG	<i>Bacillus thuringiensis</i>	6,4% P/P	GRANULADO DISPERSABLE	NO	NO
JAVELIN WG	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp KURSTAKI	85% p/p (7,5% p/p de delta endotoxina como toxina pura)	GRANULADO DISPERSABLE	NO	NO
DITERA WG	<i>Myrothecium verrucaria</i>	90% P/V	GRANULADO DISPERSABLE	NO	NO
NATURALIS L	<i>Beauveria bassiana</i> C epa ATCC 74040	7,16% (2,3X10 ⁷) esporas viables/ml)	CONCENTRADO SOLUBLE	NO	NO
MICOSPLAG WP	<i>Metarhiziumanisopliae</i> Cepa CenicaféMa 9236; <i>Beauveria bassiana</i> C epa CenicaféBb 9205; <i>Paecilomyces lilacinus</i> Cepa CenicaféPl 9301	80% p/p	POLVO MOJABLE	NO	NO
BETK-03	<i>Bacillus thuringiensis</i> Cepa N1, N2 y N3	1,81 % p/p (concentración total de 1 x 10 ⁸ ufc/g, en proporción de mezcla 1:1:1)	POLVO MOJABLE	NO	NO
BINAB PELLET GR T	<i>Trichoderma harzianum</i> / <i>Trichoderma polysporum</i>	32% p/p / 32% p/p (10.000 UFC/g)	GRANULADO	NO	NO
BINAB-T WP	<i>Trichoderma harzianum</i> / <i>Trichoderma polysporum</i>	32% p/p / 32% p/p (100.000 UFC/g)	POLVO MOJABLE	NO	NO
SERENADE ASO	<i>Bacillus subtilis</i> cepa QST 713	13,68 g/L (1x10 ⁹ ufc/g) (1,368% p/v)	SUSPENSION CONCENTRADA	NO	NO
SERENADE MAX	<i>Bacillus subtilis</i> Cepa QST 713	146 g/kg (7,3 x 10 ⁹) ufc/gr)	POLVO MOJABLE	AUTORIZADO	VIÑAS PARRONALES, MANZANOS Y
SERENADE DUST	<i>Bacillus subtilis</i>	3% p/p (30 g/kg) (5x10 ⁹) ufc/g)	POLVO SECO	NO	NO
SERENADE SULFODUST	<i>Bacillus subtilis</i> / AZUFRE	3% p/p (30 g/kg) (5x10 ⁹) ufc/g) / 70 % p/p (700 g/kg)	POLVO SECO	NO	NO

TRICHONATIV A	<i>Trichoderma</i> spp. (tres cepas)	3.71% p/p	SUSPENSION CONCENTRADA	NO	NO
TRICHO-D WP	<i>Trichoderma harzianum</i> Cepa ATTCC 20847-T22	20 % p/p	POLVO MOJABLE	NO	NO
3 TAC	<i>Trichoderma</i> spp. (Cuatrocepas)	30% p/p (25x10 ³) ufc/g)	POLVO MOJABLE	AUTORIZADO	VID, KIWI, TOMATE
3 TAEX	<i>Trichoderma</i> spp. (trescepas)	0.326 % P/P (25x10 ³) ufc/g)	LIQUIDO	NO	NO
NACILLUS	<i>Bacillus</i> spp (cinco cepas)	0.602 % p/p cada cepa (total=1.0 x 10 ⁸ ufc/ml)	POLVO MOJABLE	NO	NO
TIFI POLVO	<i>Trichoderma atroviride</i> Cepa MUCL45632	1.50%	POLVO MOJABLE		
TRICHODERM A PASTA	<i>Trichoderma harzianum</i> (Cepa T3 Los Robles)	0,25 % p/p (1*10 ⁹) conidias/gr)	PASTA	NO	NO
TRICHODERA MA SUSPENSION	<i>Trichoderma harzianum</i> (Cepa T3 Los Robles)	0,25 % p/v (1*10 ⁹) conidias/ml)	SUSPENSION CONCENTRADA	NO	NO
HARZTOP	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai cepa T22	1% p/v (1 x 10 ⁸ ufc/ml)	SUSPENSION CONCENTRADA	NO	NO
3 TAC-I/BETA	<i>Trichoderma</i> spp. (Trescepas)	30 % p/v (9% p/v / 9 % p/v / 12 % p/v)	POLVO MOJABLE	SÍ	VID, KIWI, TOMATE