

2019

# EVALUACIÓN IN VITRO DE LA CAPACIDAD ANTIFUNGICA DE TÉS DE COMPOST DE FLORA NATIVA INOCULADOS CON CEPAS NATIVAS DE TRICHODERMA SPP.

OLIVARES VILLENA, MAKARENA FRANCISCA

---

<https://hdl.handle.net/11673/48744>

*Repositorio Digital USM, UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA*

**UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARIA  
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUÍMICA Y AMBIENTAL  
VALPARAISO – CHILE**



**“EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA  
DE TÉS DE COMPOST DE FLORA NATIVA INOCULADOS  
CON CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma spp.*”**

**MAKARENA FRANCISCA OLIVARES VILLENA**

**MEMORIA DE TITULACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE:  
INGENIERO CIVIL QUÍMICO**

**PROFESOR GUÍA: DRA. CAMILA MERY ARAYA  
PROFESOR CO – REFERENTE: DRA. MARCELA CARVAJAL TOCORNAL**

**DICIEMBRE – 2019**

## **Agradecimientos**

Agradecer a mi familia por todo el apoyo brindado durante estos años de estudios y por guiarme en la vida, en especial a mis padres y a mi querido hermano Francisco, quien siempre confió en mí y en mis capacidades, y que hoy, desde un plano superior, sigue guiándome, apoyándome y cuidándome.

A mis amigos de universidad por el apoyo incondicional en los buenos y malos momentos, y por hacer que la estancia en la Universidad fuera más agradable.

A los amigos de mi hermano por su preocupación y apoyo incondicional.

Finalmente, a mi profesora Marcela Carvajal, por su apoyo, paciencia y guía en la realización de este proyecto de título, y por permitirme ser parte del proyecto FIC, con el cual he podido desarrollarme y crecer como persona y profesional, además de estar integrado por un equipo de excelentes personas (team fungi), a los cuales les tengo un cariño enorme por toda la buena onda y ayuda brindada para este proyecto.

## Resumen

En las últimas décadas el uso excesivo de pesticidas y fertilizantes sintéticos ha causado el agotamiento de la biodiversidad del suelo y afectado la seguridad alimentaria. Ante esto y la creciente cultura de un desarrollo amigable con el medio ambiente es que surgen los bioinsumos, sustancias de origen natural que se aplican sobre plantas, semillas o suelo como nutrición y/o protección, y con un mercado que crece a tasas anuales del 15%. Dentro de estos, uno de los productos que ha despertado gran interés es el té de compost, solución acuosa con alta actividad biológica obtenida por la fermentación de compost maduro en agua, que se caracteriza por contener microorganismos y nutrientes benéficos, y cuyos alcances como fitosanitario permanecen poco estudiados. Esta investigación busca estudiar los alcances del potencial biológico de tés de compost de flora nativa por sí solos y con inoculación de un consorcio de cepas nativas de *Trichoderma* spp. (hongo con capacidad biocontroladora de microorganismos). Para ello, se evalúa la capacidad antifúngica y se caracterizan los compost de origen de cada té mediante análisis físico – químicos y análisis citotóxicos frente a hongos fitopatógenos de interés comercial en Chile (*Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Lasiodiplodia theobromae*). Los resultados físico – químicos indican diferencias significativas entre la flora nativa y el control (compost comercial) debido, principalmente, a la calidad y procedencia de los compost utilizados. Además, se aíslan, secuencian y seleccionan tres cepas nativas de *Trichoderma* spp. con las que se elabora un consorcio con alto efecto de biocontrol de hongos fitopatógenos: *T. harzianum* (aislado de compost de Peumo), *T. asperellum* (aislado de compost de Boldo) y *T. asperellum* (aislado de compost de Lilén). Estas cepas inoculadas en cada té de compost de flora nativa mejoran significativamente el efecto supresor de los tés de compost sobre los patógenos evaluados, destacando el té de Boldo inoculado, con una inhibición del crecimiento micelial de 89,2% para *B. cinerea*, 86% para *F. oxysporum* y 68,5% para *L. theobromae*; siendo esta última la mayor inhibición alcanzada entre los diversos tés de compost sobre dicho patógeno. Estos resultados presentan el potencial uso del té de compost de Boldo inoculado con cepas nativas de *Trichoderma* spp. como bioinsumo para el control de enfermedades causadas por hongos, lograr sostenibilidad ambiental y seguridad alimentaria en la industria de la agricultura, la que hoy se ve dañada por el uso de pesticidas sintéticos, los cuales van perdiendo efectividad en el tiempo al generar resistencia en los patógenos.

# Índice

Agradecimientos .....	ii
Resumen.....	iii
Índice.....	iv
Índice de Figuras.....	vi
Índice de Tablas .....	viii
1. Introducción .....	1
2. Hipótesis y Objetivos.....	3
2.1 Hipótesis.....	3
2.2 Objetivo General .....	3
2.3 Objetivos Específicos .....	3
3. Antecedentes Generales .....	4
3.1 Hongos Patógenos en Agricultura.....	4
3.1.1 <i>Botrytis cinerea</i> .....	6
3.1.2 <i>Fusarium oxysporum</i> .....	8
3.1.3 <i>Lasiodiplodia theobromae</i> . .....	10
3.2 Bioinsumos.....	13
3.2.1 Mercado Nacional de Bioinsumos .....	13
3.3 Té de compost.....	16
3.3.1 Calidad del Compost.....	18
3.3.2 Té de Compost No Aireado (NCT).....	19
3.3.3 Té de Compost Aireado (ACT).....	20
3.3.4 Propiedades y beneficios del té de compost.....	20
3.3.5 Aplicación .....	21
3.4 Flora Nativa.....	23
3.5 <i>Trichoderma</i> spp. como biocontrolador en agricultura. ....	25
3.5.1 Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> spp. frente a hongos patógenos. .....	26
3.5.2 Función de <i>Trichoderma</i> spp. en la planta. ....	27
4. Materiales y Método .....	28
4.1 Materiales .....	28
4.1.1 Compost de Flora Nativa .....	28
4.1.2 Medios de Cultivo.....	28
4.1.3 Cepas Fúngicas Patógenas .....	29
4.2 Metodología Analítica.....	29
4.2.1 Preparación del Té de Compost. ....	29
4.2.2 Caracterización del té de compost.....	30
4.2.3 Aislamiento de microorganismos.....	31

4.2.4	Identificación de cepas fúngicas. ....	31
4.2.5	Incompatibilidad intraespecífica e interespecífica entre <i>Trichoderma</i> spp. ....	33
4.2.6	Confrontación preliminar de <i>Trichoderma</i> spp. sobre el crecimiento de cepas fúngicas patógenas. ....	33
4.2.7	Efecto antagonico de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Lasiodiplodia theobromae</i> . ....	34
4.2.8	Inoculación de té de compost de flora nativa con <i>Trichoderma</i> spp.....	35
4.2.9	Efecto directo de tés de compost con y sin inoculación de <i>Trichoderma</i> spp. sobre el crecimiento de patógenos.....	36
4.3	Análisis estadístico .....	37
5.	Resultados .....	38
5.1	Caracterización físico – química y microbiológica del Té de Compost de Flora Nativa.....	38
5.1.1	Análisis nutricional. ....	38
5.1.2	Análisis microbiológico .....	39
5.2	Aislamiento e Identificación de cepas fúngicas. ....	42
5.3	Incompatibilidad intraespecífica e interespecífica de <i>Trichoderma</i> spp. ....	45
5.4	Confrontación preliminar de <i>Trichoderma</i> spp. sobre cepas fúngicas patógenas. ....	46
5.5	Efecto antagonico de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Lasiodiplodia theobromae</i> ..	47
5.6	Inoculación de té de compost de flora nativa con <i>Trichoderma</i> spp.....	49
5.7	Efecto de té de compost de flora nativa con y sin inoculación de <i>Trichoderma</i> spp. sobre cepas fúngicas patógenas.....	51
6.	Discusión.....	60
7.	Conclusiones y Recomendaciones .....	64
8.	Referencias.....	66
9.	Anexos.....	71
	Anexo A: Recuento de Hongos Filamentosos.....	71
	Anexo B: Análisis de varianza ANOVA y Prueba de Múltiples Rangos.....	72
	• Recuento de Microorganismos.....	72
	• Antagonismo entre <i>Trichoderma</i> spp y <i>L. theobromae</i> .....	73
	• Comparación Recuento de Microorganismos en Tés de Compost con y sin inoculación de <i>Trichoderma</i> spp.....	74
	• Efecto directo de Tés de compost con y sin inoculación de <i>Trichoderma</i> spp. sobre cepas fúngicas patógenas.....	75
	Anexo C: Incompatibilidad de <i>Trichoderma</i> spp. ....	79
	Anexo D: Efecto directo de Tés de Composto con y sin inoculación de consorcio de <i>Trichoderma</i> spp. sobre patógenos. ....	80

## Índice de Figuras

Fig. 1. Estructura microscópica de hongo filamentoso septado.....	4
Fig. 2. Triángulo de la Enfermedad .....	5
Fig. 3. Aislado de <i>Botrytis cinerea</i> a partir de Arándano.....	6
Fig. 4. Ciclo de propagación de <i>Botrytis cinerea</i> .....	7
Fig. 5. Aislado de <i>Fusarium oxysporum</i> desde hoja de palto .....	9
Fig. 6. Ciclo de propagación de <i>Fusarium oxysporum</i> . .....	10
Fig. 7. Aislado de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> desde hoja de palto .....	11
Fig. 8. Ciclo de vida de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> .....	12
Fig. 9. Bioinsumos comercializados en Chile (2015) .....	14
Fig. 10. Bioinsumos para control de plagas y enfermedades comercializados en Chile (2015) .....	15
Fig. 11. Distribución porcentual de ingredientes activos utilizados en bioinsumos para plagas y enfermedades. ....	15
Fig. 12. Principales microorganismos en formulaciones de bioinsumos para el control de plagas y enfermedades.....	16
Fig. 13. Sistema de producción de Té de Compost.....	17
Fig. 14. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Trichoderma</i> spp. ....	26
Fig. 15. Preparación del té de compost en frascos de cultivo y etapa de filtrado. ....	29
Fig. 16. Esquema recuento de microorganismos mediante dilución seriada y plaqueo en medios selectivos.....	30
Fig. 17. Esquema aislamiento de hongo filamentoso.....	31
Fig. 18. Esquema de confrontación preliminar de hongo patógeno con distintas cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	34
Fig. 19. Esquema de confrontación de <i>Trichoderma</i> spp. con <i>Lasiodiplodia theobromae</i> .....	35
Fig. 20. Esquema de Recuento de esporas en cámara de Neubauer. ....	35
Fig. 21. Recuento de bacterias heterótrofas totales durante 5 días de preparación de tés de compost de flora nativa. ....	40
Fig. 22. Recuento de hongos filamentosos totales durante 5 días de preparación de tés de compost de flora nativa. ....	41
Fig. 23. Recuento de Hongos Filamentosos al quinto día de elaboración de los diversos tés de compost. ....	42
Fig. 24. Aislados de <i>Trichoderma</i> spp. y cepa de <i>Clonostachys rosea</i> desde los té de compost de flora nativa .....	44
Fig. 25. Enfrentamientos de incompatibilidad de especies de <i>Trichoderma</i> spp. aisladas desde los tés de compost de flora nativa. a) <i>T. harzianum</i> (Lilén) vs <i>T.asperellum</i> (Lilén). b) <i>T. asperellum</i> (Lilén) vs <i>T. asperellum</i> (Naranjillo). c) <i>T. harzianum</i>	

(Peumo) vs <i>T. harzianum</i> (Boldo). En rojo se delimita la zona de la barrera de defensa y coloración en el medio de cultivo. ....	45
Fig. 26. Confrontación preliminar de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. y de <i>Clonostachys rosea</i> sobre cepas fúngicas patógenas. ....	47
Fig. 27. Antagonismo de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Lasiodiplodia theobromae</i> .....	48
Fig. 28. Recuento de esporas en cámara Neubauer. En a) se presenta el cuadrante secundario central bajo el aumento 10x del microscopio. En b) se presenta un cuadrante bajo el aumento 40x del microscopio.....	49
Fig. 29. Comparación de recuento de bacterias heterótrofas totales entre los diversos té de compost y té de compost con <i>Trichoderma</i> spp. ....	50
Fig. 30. Comparación de recuento de hongos filamentosos entre los diversos té de compost y té de compost con <i>Trichoderma</i> spp.....	51
Fig. 31. Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de los diferentes tratamientos sobre <i>Botrytis cinerea</i> . ....	53
Fig. 32. Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de los diferentes tratamientos sobre <i>Fusarium oxysporum</i> . ....	54
Fig. 33. Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de los diferentes tratamientos sobre <i>Lasiodiplodia theobromae</i> .....	56
Fig. 34. Crecimiento micelial de los patógenos a los 2, 7 y 14 días de incubación....	57
Fig. 35. Esquema resumen de inoculación de consorcio de <i>Trichoderma</i> spp. a tés de compost de flora nativa, posibles efectos y resultados vistos debido a la inoculación. ....	59
Fig. 36 Recuento de Hongos Filamentosos totales en placa Petri para cada Té de Compost de Flora Nativa durante 5 días de preparación. ....	71
Fig. 37. Comparación de inhibición de crecimiento micelial de Tés de compost de F. Nativa con y sin inoculación de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>B. cinerea</i> .....	80
Fig. 38. Comparación de inhibición de crecimiento micelial de Tés de compost de F. Nativa con y sin inoculación de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>F. oxysporum</i> . ....	81
Fig. 39. Comparación de inhibición de crecimiento micelial de Tés de compost de F. Nativa con y sin inoculación de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>L. theobromae</i> . ....	82

## Índice de Tablas

Tabla 1. Parámetros físico – químicos para Clase A y B de compost según NCh 2880 .....	18
Tabla 2. Características físico – químicas de los Compost de Flora Nativa. ....	38
Tabla 3. Recuento de bacterias [UFC/ml] en los diversos té de compost. ....	39
Tabla 4. Recuento de hongos en los diversos té de compost.....	41
Tabla 5. Número total de cepas aisladas e Identificación de <i>Trichoderma</i> spp. desde té de compost de flora nativa. ....	43
Tabla 6. Crecimiento micelial de <i>L. theobromae</i> frente cepas de <i>Trichoderma</i> spp. y porcentaje de inhibición micelial a 5 días del ensayo. ....	48
Tabla 7. Recuento de esporas de <i>Trichoderma</i> en cámara de Neubauer e inóculo usado en té de compost.....	49
Tabla 8. Porcentaje de crecimiento relativo (RG) y diámetro de crecimiento de <i>Botrytis cinérea</i> bajo tratamiento de té de compost de flora nativa con y sin inoculación de <i>Trichoderma</i> spp. ....	52
Tabla 9. Porcentaje de crecimiento relativo (RG) y diámetro de crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> bajo tratamiento de té de compost de flora nativa con y sin inoculación de <i>Trichoderma</i> spp.....	54
Tabla 10. Porcentaje de crecimiento relativo (RG) y diámetro de crecimiento de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> bajo tratamiento de té de compost de flora nativa con y sin inoculación de <i>Trichoderma</i> spp.....	55
Tabla 11. Resumen de resultados de inhibición micelial en patógenos .....	57

## 1. Introducción

El uso de fertilizantes y pesticidas sintéticos en la agricultura ha permitido durante años a los agricultores modificar sus sistemas de producción a fin de aumentar la productividad de sus cultivos además de mantener controlado los daños causados por plagas y enfermedades, que no sólo causan pérdidas económicas significativas, sino que también, amenazan con la seguridad alimentaria (Moore, et al., 2019). Sin embargo, durante las últimas décadas se ha visto a nivel mundial el efecto negativo que tiene el uso excesivo de éstos, agotando la biodiversidad del suelo y causando daño al medio ambiente y a la salud humana y animal (Martínez, 2018), además de generar resistencia en los patógenos. Se estima que alrededor del 40% de los suelos agrícolas a nivel mundial está degradado por estas prácticas poco amigables con el medio ambiente (Portal Frutícola, 2018).

La globalización, el comercio y el cambio climático han contribuido en los últimos años al incremento de la propagación de plagas y enfermedades que afectan a la agricultura, estimándose que causan el 30% de las pérdidas mundiales de producción de cultivos (FAO, 2017), donde cada año las enfermedades de las plantas, que son causadas por hongos, virus o bacterias, cuestan a la economía mundial alrededor de US\$220 mil millones (FAO, 2019). La mayoría de las enfermedades que atacan a los cultivos son causadas por hongos patógenos, siendo algunos de los más importantes en Chile, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* y *Lasiodiplodia theobromae*, los cuales afectan diversos cultivos tales como tomate, vid y palto respectivamente, y causan grandes pérdidas económicas en el sector agrícola al no existir productos 100% efectivos para su control y que a la larga van generando resistencia en los microorganismos.

Debido a lo expresado anteriormente y, al creciente desarrollo de alternativas viables para una agricultura sustentable, es que surge el interés por el uso de los bioinsumos, los cuales son productos de origen biológico destinados a mejorar la calidad y salud de las plantas y suelos (Red Chilena de Bioinsumos, 2017). Uno de los bioinsumos que durante la última década ha presentado un gran interés en la agricultura es el té de

compost, que consiste en una solución a base de compost maduro y agua, rica en nutrientes, microorganismos benéficos y con potencial en tratamientos para el control de enfermedades causadas por fitopatógenos (Diánez, et al., 2011), siendo el compost proveniente de desechos verdes considerado como ventajoso frente a otros desechos orgánicos, ya que presentan un menor riesgo de toxicidad y una interesante actividad microbiológica (Morales, et al., 2017). Por ello, es que el compost de flora nativa chilena resulta atractivo debido a su origen determinado como proveniente de especies endémicas, tales como, el Boldo (*Peumus boldus*), Quillay (*Quillaja saponaria*), Peumo (*Cryptocarya alba*), Lilén (*Azara celastrina*) y Naranjillo (*Citronella mucronata*). Estas especies pertenecen al bosque esclerófilo, destacando por sus hojas duras perennes, su capacidad de soportar prolongados periodos de sequía y por poseer propiedades medicinales, muchas de ellas ligadas a la diversidad de la microbiota del suelo presente en cada compost. Esta característica le otorga interesantes propiedades biológicas aportada por microorganismos biocontroladores, los cuales son recomendados en la adición del té para mejorar la supresión de enfermedades (Bernal-Vicente, et al., 2012).

Actualmente, existen escasos estudios referidos a la efectividad de té de compost sobre fitopatógenos específicos con impacto en la agricultura nacional, además, no existe información detallada respecto al impacto de aplicaciones en conjunto de té de compost y microorganismos biocontroladores. Por lo anterior, la presente investigación busca evaluar la capacidad antifúngica *in vitro* de diversos tés de compost de flora nativa chilena con y sin inoculación de un consorcio de cepas fúngicas biocontroladoras sobre fitopatógenos de interés comercial.

## **2. Hipótesis y Objetivos**

### **2.1 Hipótesis**

El té de compost de flora nativa inoculado con cepas nativas de *Trichoderma* spp. posee mayor actividad antifúngica que el té de compost comercial y de flora nativa sin inocular.

### **2.2 Objetivo General**

Evaluar el efecto antifúngico de distintos té de compost de flora nativa con y sin inoculación de un consorcio de *Trichoderma* spp. sobre tres fitopatógenos de interés comercial.

### **2.3 Objetivos Específicos**

- I. Determinar características físico – químicas del compost comercial (residuos de tomate) y de flora nativa, y características microbiológicas de los té de compost de flora nativa.
- II. Aislar, identificar y seleccionar cepas nativas de *Trichoderma* spp. proveniente de los té de compost de flora nativa para la formación de un consorcio.
- III. Evaluar capacidad antifúngica de los té de compost de flora nativa con y sin inoculación de *Trichoderma* spp. sobre cepas fitopatógenas de *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Lasiodiplodia theobromae*.

### 3. Antecedentes Generales

#### 3.1 Hongos Patógenos en Agricultura

Los hongos son un grupo de organismos, generalmente microscópicos, eucarióticos, que carecen de clorofila y poseen paredes celulares compuestas por distintas proporciones de quitina, celulosa, pectina, glucano, hemicelulosa, proteínas y glucoproteínas. La mayoría poseen un soma vegetativo, conocido como micelio, que consta de filamentos microscópicos continuos y ramificados llamados hifas. Su reproducción es mediante esporas sexuales o asexuales, siendo estas últimas denominadas conidios, los cuales se desprenden de las hifas laterales llamadas conidióforos (ver fig. 1). Los conidios una vez diseminados al ambiente permanecen en estado de latencia a la espera de hospedar un tejido en el cual puedan desarrollarse y causar enfermedad (Avance Biotechnologies, 2017).

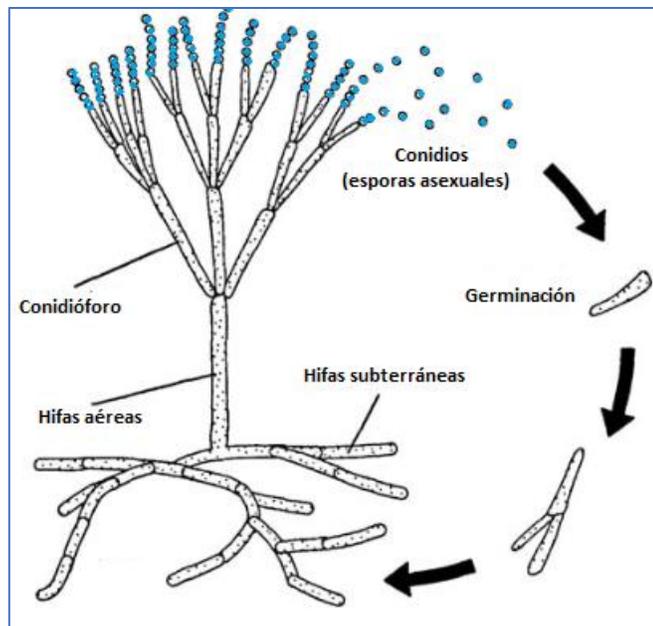


Fig. 1. Estructura microscópica de hongo filamentososo septado.

Fuente: (Cliffs Notes)

Los hongos participan activamente en los procesos de desintegración de materia orgánica, producción agrícola y procesamiento de alimentos, sin embargo, también constituyen el grupo con la mayor cantidad de agentes causantes de enfermedades en animales y plantas (Dean, et al., 2012), siendo denominados hongos patógenos, los cuales en la industria de la agricultura causan grandes pérdidas productivas,

provocando disminución de frutos en periodos de cosecha y de la brotación en la cosecha siguiente, representado a su vez un alto riesgo en la seguridad alimentaria (Avance Biotechnologies, 2017).

Para que el hongo patógeno cause enfermedad en la planta, se tienen que cumplir tres condiciones en un mismo momento: hospedero susceptible, presencia de patógeno y ambiente favorable, lo que también es conocido como el Triángulo de la Enfermedad (Fig. 2). El hospedero susceptible viene siendo la planta, la cual, dependiendo del tipo de planta, puede ser víctima de muchas enfermedades o de algunas particulares. Sin el hospedero ni las condiciones adecuadas, el patógeno (que puede ser hongo, bacteria, virus, nemátodos, micoplasmas y espiroplasmas) no puede causar ningún daño. Hay patógenos que son específicos de plantas y otros que tienen una amplia capacidad para atacar casi todo. Por último, el ambiente favorable se refiere a que se den las condiciones climáticas necesarias para que el patógeno prospere (Moore, et al., 2019).

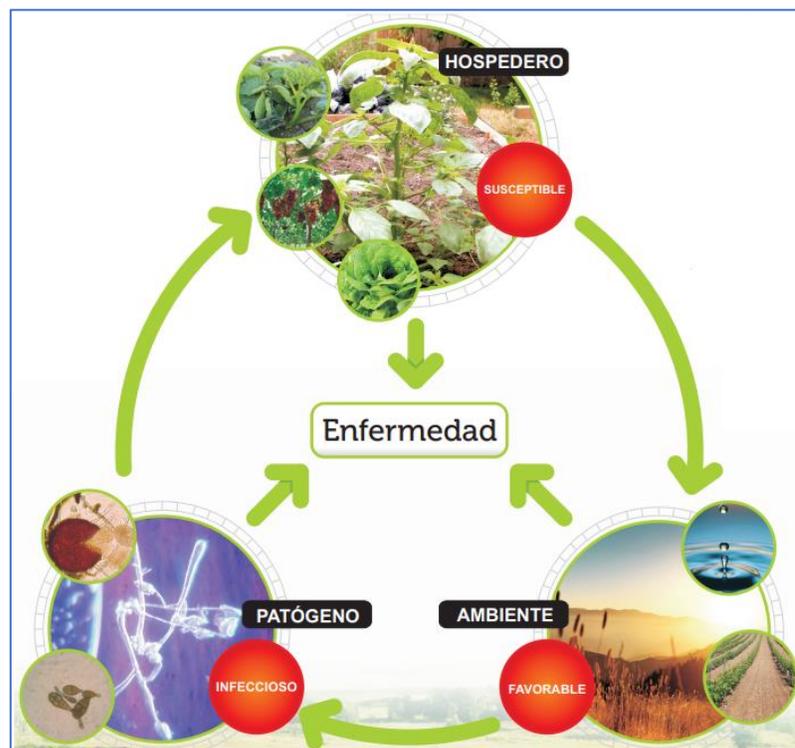


Fig. 2. Triángulo de la Enfermedad  
Fuente: (INIA)

A continuación, se presentan tres hongos patógenos que en Chile causan pérdidas en cultivos como el tomate, palta y vid:

### 3.1.1 *Botrytis cinerea*

Hongo patógeno del filo Ascomycota que afecta a más de 200 géneros vegetales, animales y bacterias, siendo su hospedador económicamente más importante la vid. Su enfermedad se conoce comúnmente como podredumbre de *Botrytis* o moho gris, y puede atacar al cultivo en cualquier estado de desarrollo e infectando cualquier parte de la planta (Benito, et al., 2000). Es considerado un hongo necrotrófico, pues se alimenta y parasita el huésped produciendo toxinas y otros componentes que destruyen las células del hospedero para así alimentarse de las células muertas (Kan & Veloso, 2018).

Morfológicamente, se caracteriza por poseer micelios de color gris – pardo y por la abundante esporulación de color gris (ver Fig. 3.c). Microscópicamente se observan los conidios (esporas asexuales) de forma oval en el extremo de los conidióforos grises ramificados (Fig.3.d). El hongo también produce esclerocios que corresponden a estructuras resistentes en condiciones adversas.

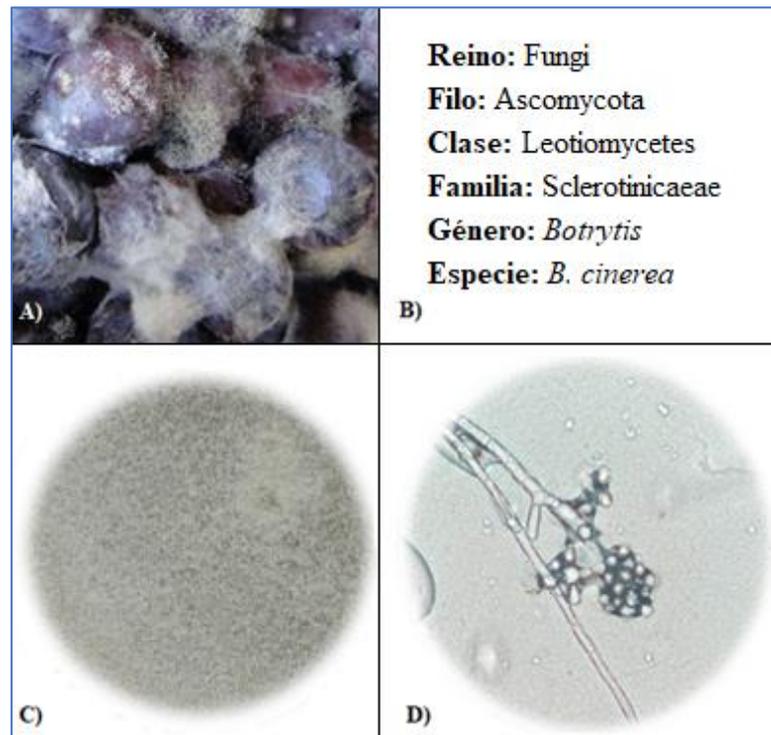


Fig. 3. Aislado de *Botrytis cinerea* a partir de Arándano.

- A) Síntomas de pudrición gris en arándano. B) Clasificación Taxonómica. C) Colonia de 7 días de edad cultivada en medio PDA. D) Ápice ramificado de un conidióforo con racimos de conidios.

Se desarrolla en condiciones donde la temperatura oscila entre 18 a 32 [°C] y humedades relativas entre 90-95%. Además, sobrevive en el suelo a las condiciones adversas como esclerocios o como micelio en residuos de la cosecha anterior, y se propaga a través de los vientos y lluvias, causando nuevas infecciones. Los síntomas comienzan con el debilitamiento en hojas, tallos y flores, las lesiones se propagan rápido y forman áreas acuosas en el fruto (INIA, 2015).

- **Ciclo de propagación:**

La infección comienza con la adhesión y germinación de las esporas sobre la superficie del huésped, luego ingresa al tejido vegetal a través de heridas, aberturas naturales o por la participación de distintas actividades enzimáticas. El patógeno se establece en la zona y provoca la muerte de las células, dando lugar a la formación de lesión primaria como mecanismo de defensa de la planta. Una vez que el patógeno vence esta barrera inicia su diseminación y colonización por el tejido vegetal produciendo, además, una nueva generación de esporas (Benito, et al., 2000), la cuales pueden iniciar un nuevo ciclo de infección (Fig. 4).

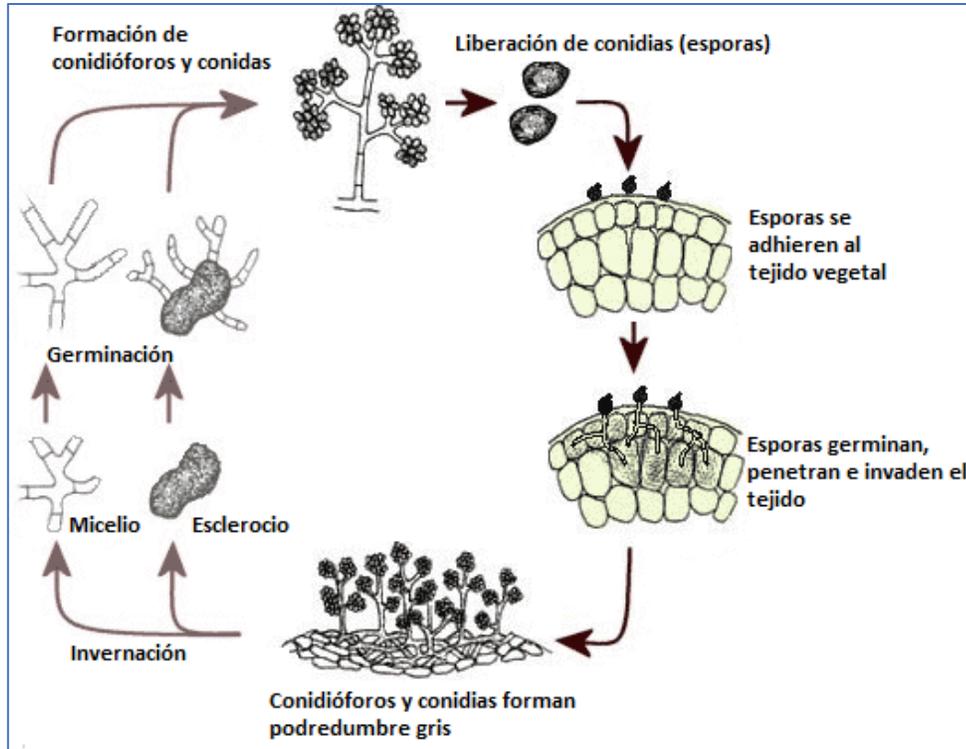


Fig. 4. Ciclo de propagación de *Botrytis cinerea*.

Fuente: (Benito, et al., 2000)

- **Control:**

La forma de mantener los cultivos libres de éste patógeno es removiendo o destruyendo el material vegetal que alberga el inóculo del patógeno, evitando el sombreado y la fertilización nitrogenada excesiva. En estados críticos, lo anterior se debe complementar con la aplicación de botricidas (INIA, 2016).

Algunos productos biológicos que han demostrado ser eficientes en el control de esta enfermedad son a base de *Trichoderma* y *Bacillus subtilis* (Avance Biotechnologies, 2017).

### **3.1.2 *Fusarium oxysporum***

Hongo patógeno del filo Deuteromycota presente en más de 32 países y que afecta a más de 90 cultivos de importancia comercial como lo es el tomate y la cebolla (González, et al., 2012). Su desarrollo se ve favorecido por temperaturas entre los 22 [°C] y 32 [°C], altas humedades relativas y días con baja intensidad lumínica, además de otros factores como: suelos ácidos, arenosos, con bajo pH, pobres en nitrógenos y ricos en potasio. Infecta a la planta a través de heridas ocasionadas en las raíces por maquinarias o nematodos, ocasionando la enfermedad llamada marchitez vascular (Millas & France, 2017).

Morfológicamente en un hongo que al inicio presenta un micelio de color blanco y luego produce una pigmentación de color rosado, púrpura o anaranjado. Microscópicamente, se caracteriza por presentar dos tipos de conidios: los macroconidios que son esporas asexuales hialinos y generalmente con tres tabiques; mientras que los microconidios son pequeños hialinos unicelulares (Fig.5). También, presenta estructuras de resistencias conocidas como clamidosporas (Millas & France, 2017).

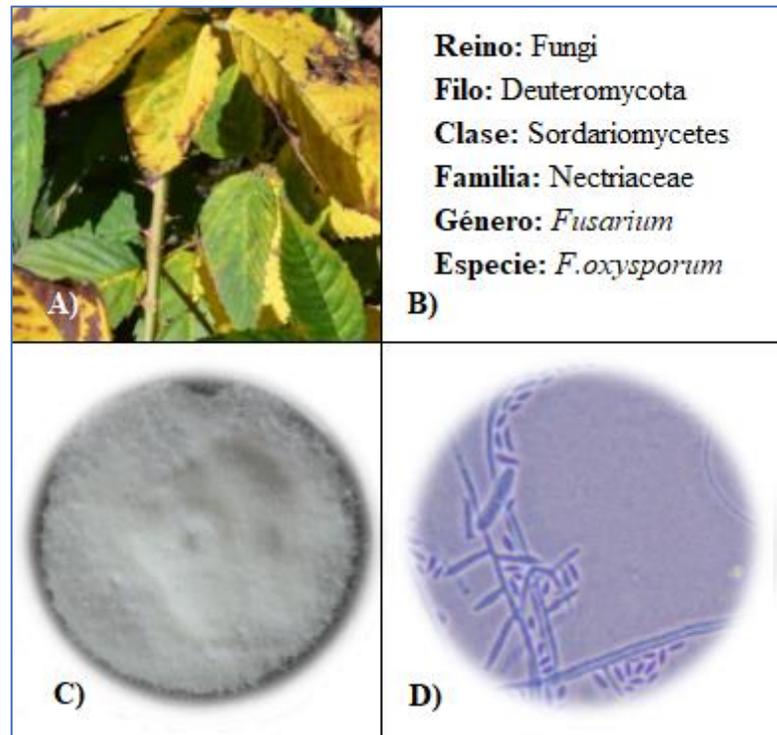


Fig. 5. Aislado de *Fusarium oxysporum* desde hoja de palto

A) Síntomas de marchitez. B) Clasificación Taxonómica. C) Colonia de 7 días de edad cultivada en medio PDA. D) Microconidios.

- **Ciclo de propagación:**

El hongo sobrevive en restos vegetales infectados o como clamidosporas, y se transmite por semillas o plantines infectados, maquinaria, agua de riego o aire. El micelio o espora puede ingresar a la planta por grietas causadas por raíces laterales emergentes o por heridas en la raíz, para luego infectar el xilema y colonizar todo el sistema vascular de la planta, bloqueando y tapando los vasos, y produciendo enzimas y toxinas que provocarán el colapso de las células, contribuyendo a la expresión de la enfermedad mediante clorosis de las hojas basales, marchitamiento y eventualmente necrosis y muerte total de la planta (Agris, 2005).

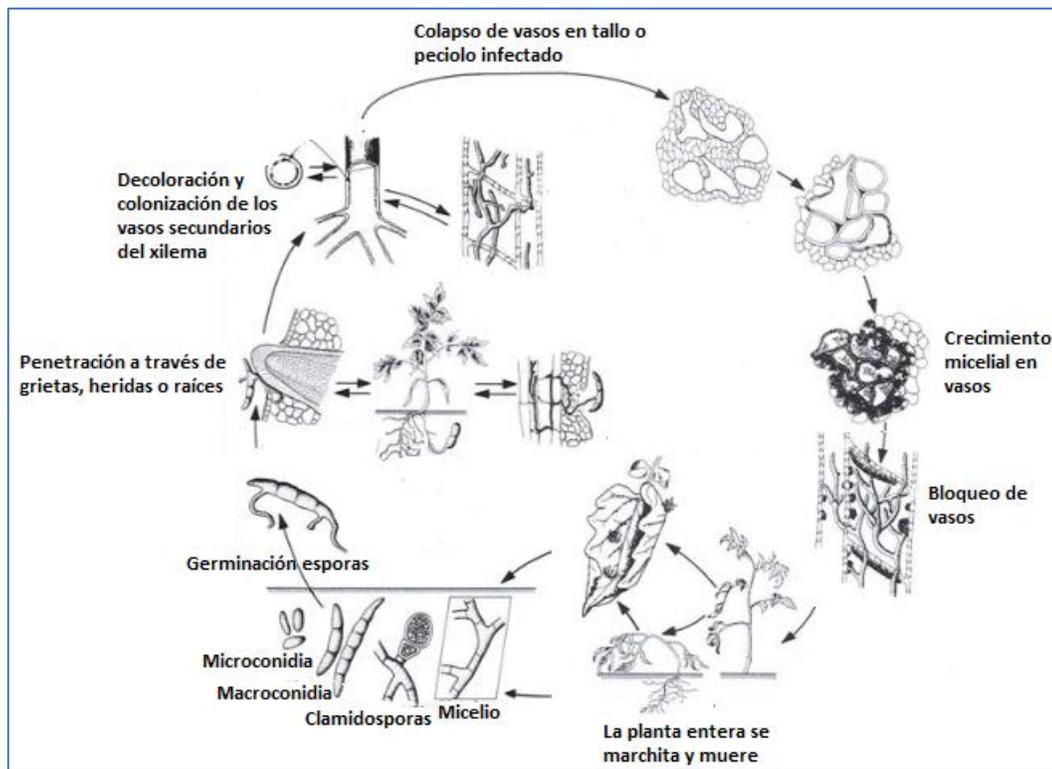


Fig. 6. Ciclo de propagación de *Fusarium oxysporum*.

Fuente: (Agrios, 2005)

- **Control:**

Para evitar que el patógeno se siga propagando, el suelo puede ser desinfectado mediante vapor, Dazomet (desinfectante de suelo), Metam sodio (fumigante) o solarización. Además, se recomienda usar nitrato de calcio como fertilizante en lugar de nitrato de amonio, ya que el primero inhibe el crecimiento de este hongo; elevar el pH del suelo cercano a 7. También se recomienda usar plantas sanas desde almácigo y evitar el movimiento del patógeno en el suelo infectado (Millas & France, 2017).

Algunos agentes de control biológico, como *Trichoderma*, han sido usados exitosamente (CER, 2016).

### 3.1.3 *Lasiodiplodia theobromae*.

Hongo patógeno Ascomyceto con un amplio rango de huéspedes, destacando el palto, cítricos y la vid, causando pudrición de la raíz, tizón y muerte regresiva en la mayoría de las especies que infecta. Es saprófito, pero se le considera un patógeno latente,

encontrándose endófito en tejidos sanos de la planta y siendo patógeno cuando el hospedero está debilitado o estresado (Picos, et al., 2015).

Morfológicamente, es un hongo con micelio blanco en un comienzo, y que con el tiempo se torna de color gris a negro y se van formando los picnidios (estructura reproductora asexual) (Fig. 7). Microscópicamente, se observan conidios elípticos, hialinos y unicelulares que son de color marrón oscuro cuando están maduros y blanco cuando son inmaduros (Picos, et al., 2015).

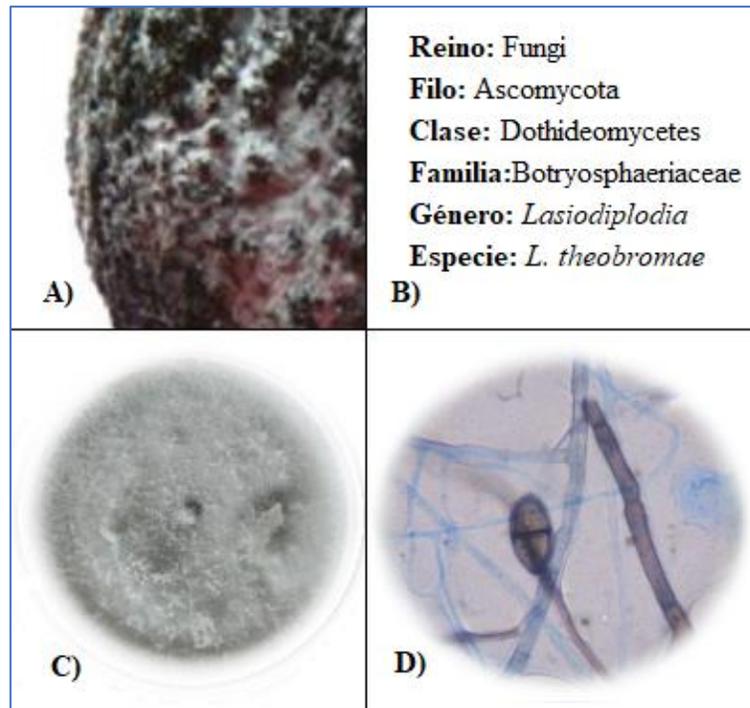


Fig. 7. Aislado de *Lasiodiplodia theobromae* desde hoja de palto  
A) Síntomas de marchitez. B) Clasificación Taxonómica. C) Colonia de 7 días de edad cultivada en medio PDA. D) Conidios maduros septado.

- **Ciclo de propagación:**

El hongo se mantiene como picnidios en el exterior de la madera, estos producen y liberan los conidios, los cuales se dispersarán por acción del viento y lluvia contagiando a otras especies. Los conidios infectan a la planta a través de cortes o daños en la madera, germinando y colonizando el sistema vascular. Los primeros síntomas que se observan es el marchitamiento en las ramas laterales y luego a toda la planta

ocasionando finalmente su muerte. Cuando los frutos son infectados, el patógeno puede permanecer latente hasta que estos maduran (Picos, et al., 2015).

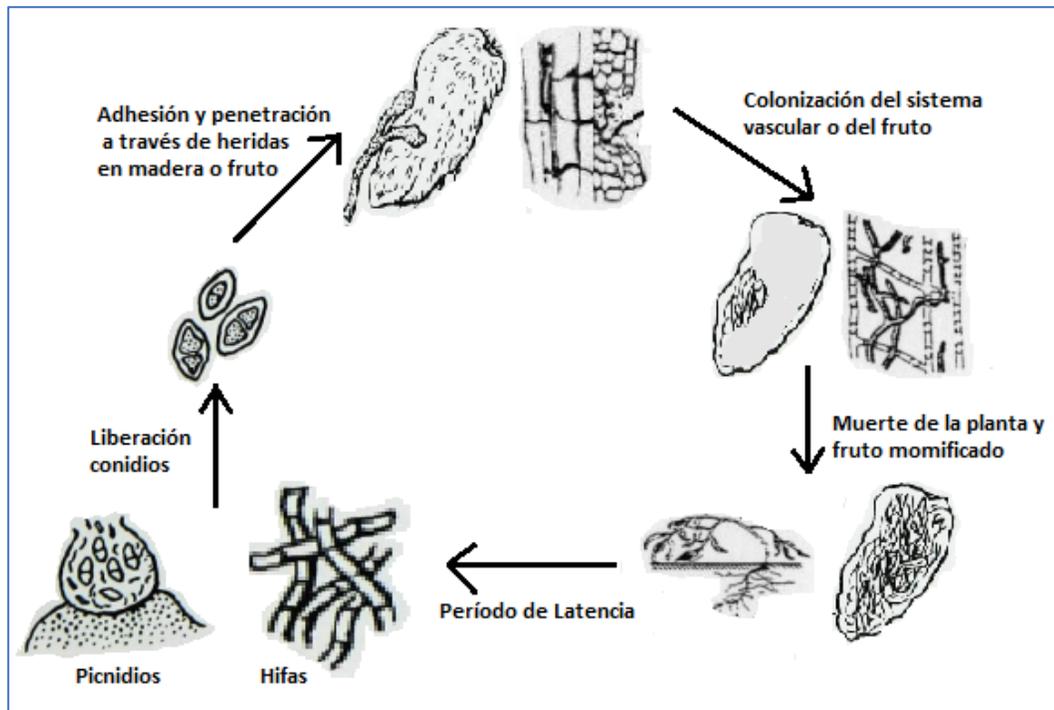


Fig. 8. Ciclo de vida de *Lasiodiplodia theobromae*  
Fuente: (Ogundana, 1983)

- **Control:**

De manera preventiva se recomienda podar toda herida ya que resultan puntos de entrada para el hongo; evitar periodos de estrés, sobre todo hídrico, y no colocar frutos cosechados en el suelo puesto que favorecen la dispersión del hongo.

Como tratamiento químico se recomienda realizar aplicaciones foliares en base a cobre, además, de ozono, yodo y cloro, los cuales intervienen en la germinación de esporas. Fungicidas como Tebuconazol, Iprodione, hipoclorito sódico, Procloraz, entre otros, también han disminuido la incidencia de la enfermedad (Picos, et al., 2015). En cuanto a control biológico, no se tiene mucha información para este hongo, sin embargo, un estudio realizado por Silimea y Korsten recomienda la utilización de *Bacillus licheniformis* para el control de Antracnosis y de hongos de la familia *Botryosphaeriaceae* (Silimela & Korsten, 2007).

## 3.2 Bioinsumos

Un bioinsumo es una sustancia, agente biológico o mezcla de éstos, de origen natural, que se aplica sobre plantas, semillas, suelo o sustrato para favorecer la productividad, calidad y salud de las plantas, suelos y/o sustratos. Pueden tratarse de microorganismos, macroorganismos, extractos biológicos o biomoléculas naturales y sus equivalentes (Red Chilena de Bioinsumos, 2017). Según la Red Chilena de Bioinsumos, existen bioinsumos para nutrición vegetal y para defensa fitosanitaria, clasificándolos en cuatro categorías:

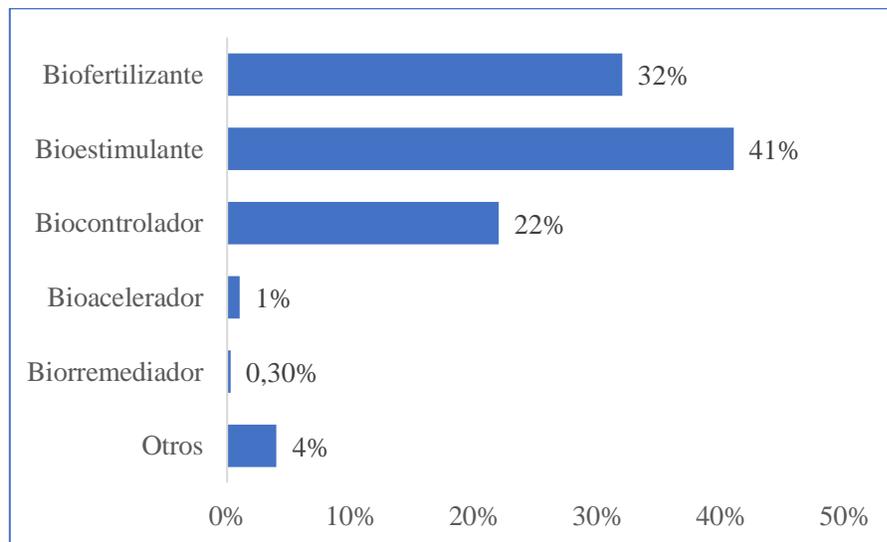
- **Biofertilizantes:** Agente biológico, sustancia o mezcla de éstos, que aumentan la disponibilidad de nutrientes para la planta.
- **Bioestimulantes:** Agente biológico, sustancia o mezcla de éstos, que activan o mejoran mecanismos de nutrición y/o desarrollo de la planta.
- **Control Biológico:**
  - **Biocontrolador:** sustancias, agentes biológicos o mezcla de ellos que previenen o controlan la manifestación de una plaga.
  - **Bioplaguicida:** sustancias, agentes biológicos o mezcla de ellos que destruyen una plaga o patógeno vegetal.
  - **Otros mecanismos de defensa fitosanitaria:** sustancias, agentes biológicos o mezcla de ellos que activan o mejoran el mecanismo de defensa fitosanitaria de forma directa o indirecta, pero que no interactúan directamente con plagas o patógenos vegetales.
- **Biomejoradores:** Sustancia, agente biológico o mezcla de ellos que mejoran las características del suelo o sustrato, como pH, textura, salinidad, retención de humedad, infiltración, aireación, materia orgánica, neutralización o descomposición de contaminantes, mejorando las condiciones de desarrollo para la planta. (Red Chilena de Bioinsumos, 2017)

### 3.2.1 Mercado Nacional de Bioinsumos

En Chile, en 1998 se realizaron los primeros ensayos con insumos biológicos en la Universidad de Talca, y cuatro años más tarde nació Bio Insumos Nativa, pionero en

el desarrollo de Bioinsumos y que hoy en día abarca el 50% del mercado chileno, compitiendo con empresas multinacionales como Bayer CropScience, BASF, Syngenta o Arysta (Red Agrícola, 2017), quienes buscan ganar un espacio en un sector que cada temporada crece en adeptos, pues se esperan incrementos a tasas del 15% mientras que los agroquímicos solo crecen a tasas del 2% anual (Vilella, 2019).

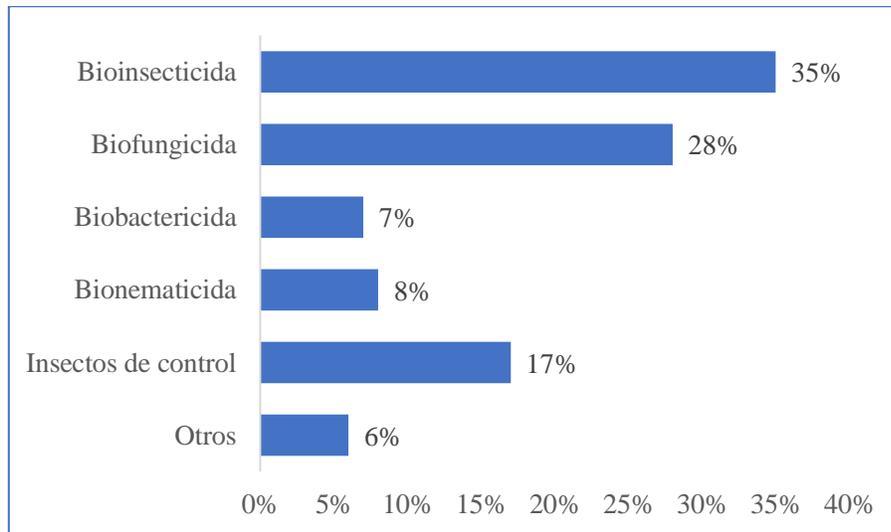
Un reciente estudio realizado por la Universidad Técnica Federico Santa María (UTFSM) en colaboración con la Red de Chilena de Bioinsumos, ODEPA y empresas productoras y comercializadoras de bioinsumos, reveló que Chile no cuenta con normativa con relación a la producción y/o calidad de los bioinsumos de uso agrícola, siendo tratados como productos de origen sintético, además de existir poca información sistematizada sobre los productos comercializados y sus niveles de ventas. Los resultados de este estudio indicaron que existen al menos 70 empresas que comercializan bioinsumos, donde el 34% son productoras, el 50% importa estos productos y el 16% los produce e importan. De un total de 389 bioinsumos que se comercializan en el país, 210 son importados desde diferentes países, mientras que solo 131 bioinsumos aparecen en el registro aduanero con su nombre comercial. De los bioinsumos que se comercializan en el país se tienen productos del tipo biofertilizantes, biorremediadores, biocontroladores, entre otros (Fig.9) (Martínez, et al., 2017).



**Fig. 9. Bioinsumos comercializados en Chile (2015)**

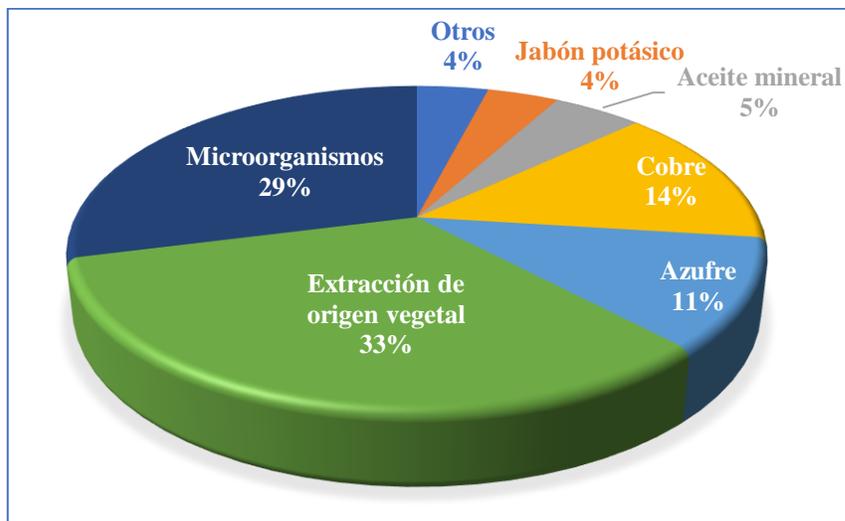
**Fuente:** (Martínez, et al., 2017)

Así mismo, para el control de plagas y enfermedades destacan los bioinsecticidas, y biofungicidas (Fig. 10).



**Fig. 10. Bioinsumos para control de plagas y enfermedades comercializados en Chile (2015)**  
**Fuente:** (Martínez, et al., 2017)

Por otra parte, la formulación de los bioinsumos para el control de plagas y enfermedades que se comercializan en el país es variada (Fig. 11), siendo los extractos de origen vegetal los ingredientes activos más presentes en el mercado seguido de los microorganismos (Donoso, et al., 2011).



**Fig. 11. Distribución porcentual de ingredientes activos utilizados en bioinsumos para plagas y enfermedades.**

**Fuente:** (Donoso, et al., 2011)

Por último, de acuerdo al listado “Insumos visados para uso en agricultura nacional, de acuerdo al D.S. N°2/2016” del Sub departamento de Agricultura Orgánica del SAG, entre los microorganismos utilizados en las distintas formulaciones de bioinsumos para el control biológico (Fig. 12), destacan los hongos del género *Trichoderma* y las bacterias del género *Bacillus* (CER, 2016).

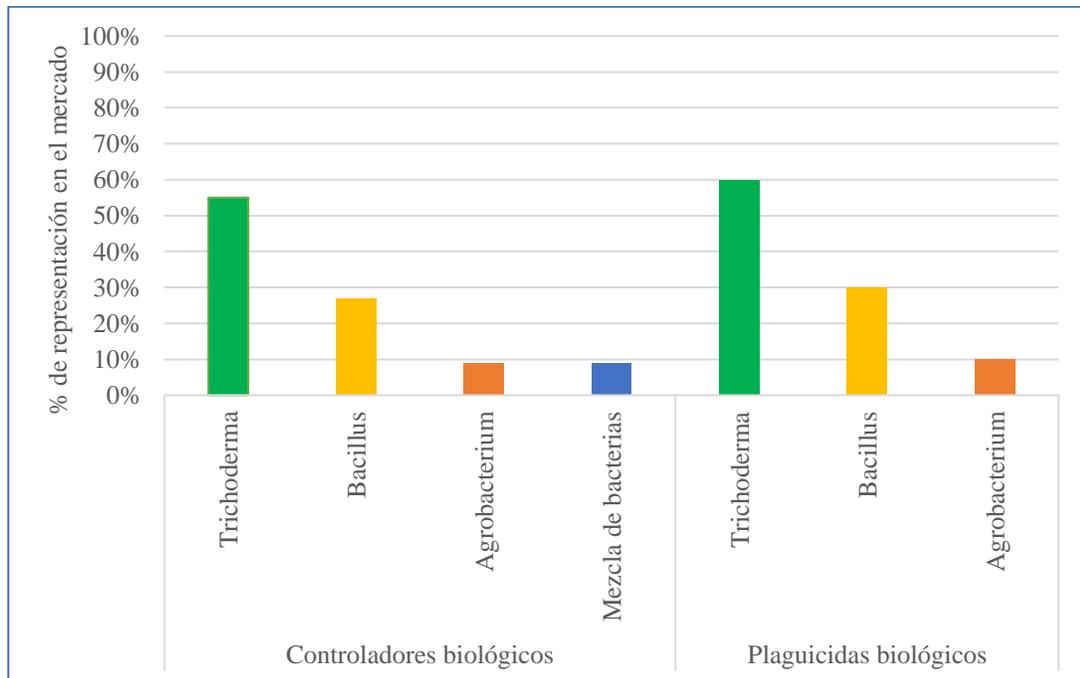


Fig. 12. Principales microorganismos en formulaciones de bioinsumos para el control de plagas y enfermedades

Fuente: (CER, 2016)

### 3.3 Té de compost

El té de compost es una solución acuosa de alta actividad biológica obtenida por fermentación de compost maduro en agua, en una proporción de 1:5 a 1:10 % (v/v) (Al-Dahmani, et al., 2003), que se caracteriza por contener microorganismos beneficiosos (bacterias, hongos filamentosos, protozoos y nemátodos) y nutrientes que le aportan vitalidad y fuerza a los cultivos para hacer frente a enfermedades y plagas, con el fin de reducir el uso de pesticidas y fertilizantes químicos (Compostadores, 2017). Los microorganismos presentes en el té de compost ocuparán los sitios de

infección de la planta y alrededor antes que los microorganismos patógenos, actuando por competencia y produciendo compuestos inhibidores ante la llegada de algún patógeno (Ingham, 2005).

La efectividad del té de compost varía según el tipo y calidad de compost, el manejo y el procedimiento utilizado para su elaboración (Morales, et al., 2017). En general, la elaboración del té de compost se realiza a temperatura ambiente y en un recipiente o biorreactor al cual se le agrega compost maduro y agua limpia (no clorada en la medida posible) y se deja fermentar durante un determinado periodo de tiempo. El compost puede estar dentro de una bolsa de algodón o tejido permeable no tóxico, o bien se puede agregar de manera directa al agua y una vez pasado los días de fermentación se realiza el proceso de filtrado (ver Fig.13). Además, al té de compost se le pueden agregar fuentes de carbono extra al inicio del proceso con el fin de aumentar la biomasa microbiana (Compostadores, 2017) o bien al final, antes de la aplicación foliar, para así mejorar la actividad de los microorganismos y que puedan “pegarse” o unirse mejor al follaje (Ingham, 2005).

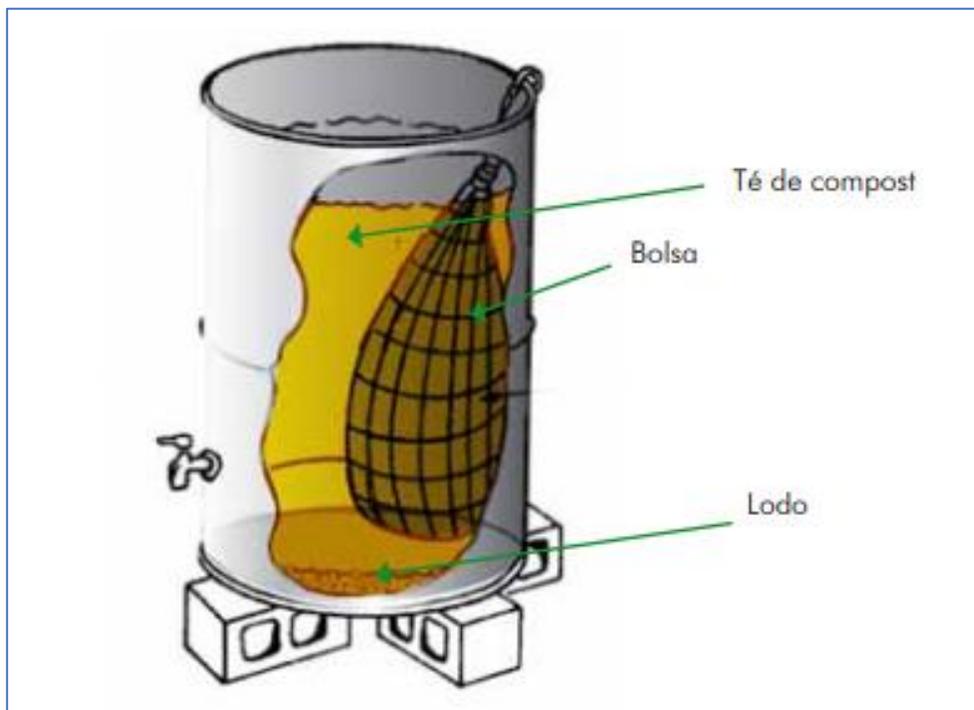


Fig. 13. Sistema de producción de Té de Compost

Fuente: (Román, et al., 2013)

### 3.3.1 Calidad del Compost

El compost según la norma chilena NCh 2880 es un producto inocuo y libre de efectos fitotóxicos, que está constituido principalmente por materia orgánica estabilizada y que resulta del proceso de compostaje (INN, 2015). En dicha norma, además, se establecen tipos de compost:

- **Compost Clase A:** compost de alto nivel de calidad que cumple con las normas. No representa restricciones de uso, ya que se ha sometido a un proceso de humificación. Puede ser aplicado directamente y sin necesidad de mezclarlo previamente con otros materiales.
- **Compost Clase B:** compost de nivel intermedio que cumple con las normas para su clase. Presenta algunas restricciones de uso y para ello, requiere ser mezclado con otros elementos adecuados.
- **Compost Inmaduro o subestándar:** materia orgánica que ha pasado por las etapas de descomposición inicial, pero no ha alcanzado las de enfriamiento y maduración, etapas necesarias para obtener un compost de clase A o B. Para ser utilizado debe mezclarse con otros elementos. (INN, 2015)

El compost debe cumplir con una serie de requisitos sanitarios y físico – químicos, siendo algunos de ellos los siguientes:

Tabla 1. Parámetros físico – químicos para Clase A y B de compost según NCh 2880

	Compost Clase A	Compost Clase B
<b>Metales pesados: Arsénico</b>	15 mg/kg	20 mg/kg
<b>Cadmio</b>	2 mg/kg	8 mg/kg
<b>Cobre</b>	100 mg/kg	1000 mg/kg
<b>Cromo</b>	120 mg/kg	600 mg/kg
<b>Mercurio</b>	1 mg/kg	4 mg/kg
<b>Níquel</b>	20 mg mg/kg	80 mg/kg
<b>Plomo</b>	100 mg/kg	300 mg/kg
<b>Zinc</b>	200 mg/kg	2000 mg/kg t
<b>pH</b>	5,0 – 8,5	
<b>Conductividad eléctrica</b>	<3 dS/m	≤ 8 dS/m
<b>Relación C/N</b>	≤25	≤ 30
<b>Materia orgánica</b>	≥ 20%	

Fuente: (INN, 2015)

En cuanto a los requisitos sanitarios el compost no deberá tener presencia de *Salmonella* sp. y las coliformes fecales deberán estar en una concentración inferior a 1000 NMP por gramo de compost en base seca.

La calidad del compost es una de las variables más importantes en el proceso de elaboración del té de compost, ya que de él se extraerán los microorganismos y nutrientes que aportarán posteriormente beneficios al suelo y las plantas. Por esto, es que el proceso de compostaje se debe llevar a cabo a totalidad ya que, de esta manera, se asegura que los microorganismos beneficiosos superen la concentración de los patógenos, ya sea, por competencia, inhibición, consumo por depredadores o por las altas temperaturas alcanzadas durante el proceso (Ingham, 2005).

Otra variable importante durante el proceso de elaboración del té de compost y la cual permite su clasificación, es la aireación.

### **3.3.2 Té de Compost No Aireado (NCT).**

Solución de compost maduro y agua que puede o no ir con una fuente extra de carbono, y no se proporciona aireación continua o intermitente durante el proceso (Ingham, 2005). Por lo general, en este té de compost la biomasa microbiana no es muy activa y el proceso de fermentación dura entre una y dos semanas (Compostadores, 2017).

En condiciones anaeróbicas muchos microorganismos se volverán inactivos o morirán, y se perderán nutrientes, por lo tanto, un té de compost anaeróbico no repondrá toda la red alimentaria del suelo ni podrá ser un proveedor de nutrientes ya que solo aportará con bacterias anaerobias y levaduras. Además, en aplicaciones foliares los microorganismos anaerobios no podrán realizar sus funciones puesto que se encontrarán en un ambiente aeróbico, mientras que en aplicación radicular se verá un bajo efecto del té de compost solo desde el punto de vista de la red alimentaria del suelo. En general, la condición anaeróbica no es la adecuada ya que en el té de compost los hongos filamentosos y bacterias que ayudan a la reestructuración del suelo mueren o quedan inactivos, al igual que los protozoos, nematodos y microartrópodos. Esto trae como causa que no ocurra el ciclo de nutrientes, los cuales además en condiciones anaeróbicas, se pierden por volatilización al convertirse en formas gaseosas de oxígeno reducido (Ingham, 2005).

### **3.3.3 Té de Compost Aireado (ACT).**

Solución de compost maduro y agua, con o sin fuente extra de carbono, y al cual se le proporciona aireación durante el proceso. La aireación permite una mayor transferencia de microorganismos desde el compost al agua y, por ende, la biomasa microbiana resulta más activa (Ingham, 2005), además, estimula el crecimiento de los microorganismos beneficiosos. El proceso de fermentación puede durar entre 24 [h] a 5 días por lo general (Compostadores, 2017).

Se debe proporcionar una concentración adecuada de oxígeno para así asegurar que los microorganismos generados se mantengan vivos y activos, logrando un producto de óptima calidad. El oxígeno se difunde en el agua por medio de las burbujas de aire, teniéndose que a menor tamaño de burbuja mayor es la superficie de intercambio y, por ende, más eficiente es la transferencia de oxígeno al agua. Por otro lado, si la aireación es demasiada, el té puede sobrecargarse de oxígeno, lo que es perjudicial para los microorganismos beneficiosos, (Ingham, 2005). Para que el té sea aeróbico, éste debe tener una concentración mayor a 6 ppm de oxígeno disuelto en la solución (Ingham, 2005).

### **3.3.4 Propiedades y beneficios del té de compost**

La principal función del té de compost es la de proporcionar microorganismos benéficos que tienen la capacidad de consumir los exudados y restos que genera la planta, de manera que al ser aplicado preventivamente ocuparán los lugares de ataque antes que los patógenos, generándose así competencia por sustrato o espacio, antibiosis o micoparasitismo al momento de enfrentarse con los patógenos. Por otra parte, los nutrientes contenidos en el té de compost contribuirán a que los mismos microorganismos estén bien nutridos y puedan desarrollar sus funciones más rápido. Además, los microorganismos aportados al suelo al retener los nutrientes alrededor de la planta no permitirán que se transfieran al agua, por lo que no habrá contaminación de aguas subterráneas. Por ende, la aplicación del té de compost aumentará los microorganismos y la actividad enzimática del suelo, generándose los siguientes beneficios (Compostadores, 2017; Kim, et al., 2015; Ingham, 2005):

- Detoxifica y da estructura al suelo, ya que mejora la porosidad de éste.
- Mejora la retención del agua en el suelo, reduciendo su uso hasta en un 50%.
- Restablece la microflora del suelo.
- Mejora el ciclo de nutrientes de la planta.
- Aporta vitalidad y fuerza a la planta.
- Fortalece el sistema de defensa de la planta.
- Inhibición de patógenos a nivel radicular y foliar según sea su aplicación.
- La aplicación foliar contribuirá a abrir más las estomas de la planta, aumentando la reducción de CO<sub>2</sub>.
- Aumenta la calidad agroalimentaria
- Se reduce el consumo de insumos químicos.
- Compatible con equipos de aplicación estándar
- Condiciones de trabajo más seguras.

### 3.3.5 Aplicación

El té de compost tiene la ventaja de poder ser usado a nivel foliar y radicular. La aplicación en el suelo proporcionará nutrientes y protección a la planta. En cambio, si se aplica en las hojas actúa como pesticida natural. Éste se debe aplicar inmediatamente una vez producido, ya que así se asegura que se conserve el mayor número posible de nutrientes y microorganismos beneficiosos iniciales (Compostadores, 2017).

- **Aplicación Foliar:** al aplicar microorganismos benéficos en las superficies aéreas de las plantas de forma preventiva los organismos que causan enfermedades no pueden encontrar sitios de infección o recursos alimenticios al ya encontrarse ocupados por los microorganismos benéficos, debido a la rápida colonización de estos últimos y a los mecanismos de competencia, antibiosis y parasitismo que se generan entre ambos tipos de microorganismos (benéficos y patógenos). Por lo general, la aplicación del té se realiza sin diluirlo ya que es importante mantener la concentración de microorganismos pues de no ser así la cobertura es inadecuada en la superficie de las hojas. Si en las hojas de la planta ya existen síntomas de la enfermedad el té se debe aplicar

inmediatamente sobre el área afectada y los alrededores donde pudo haberse diseminado.

La dosis foliar recomendada es de 50 [L/ha] cada una semana durante el periodo de infección de la enfermedad. (Ingham, 2005). Un factor crítico de la aplicación foliar es la cobertura de la superficie de la hoja, puesto que los microorganismos benéficos que aporte el té deben consumir los exudados de la superficie de la hoja, no dejando comida para los microorganismos causantes de enfermedades y evitando así que germinen y crezcan. Además, la aplicación debe ser tal que todos los sitios de posible infección en la hoja deben ser ocupados por los microorganismos benéficos otorgando protección. Se requiere un mínimo del 70% de cobertura en la superficie de la hoja para establecer una protección, y al menos un 5% de la cobertura deber ser biomasa fúngica beneficiosa para evitar que la enfermedad se establezca en las hojas de la planta (Ingham, 2005).

**Aplicación del Suelo:** ayuda a desarrollar una barrera biológica alrededor de las raíces, proporciona nutrientes para mejorar el crecimiento de las plantas y mejora la estructura del suelo. Si el suelo se encuentra bien provisto de microorganismos y nutrientes antes de la aplicación, una sola aplicación ya es suficiente para prevenir enfermedades en las raíces, por el contrario, será necesario aplicar té cada dos semanas durante 1 mes para mantener y reestablecer la salud del suelo (Ingham, 2005). Un factor para considerar en la aplicación del té de compost es el tipo de suelo al que se aplica (textura, compactación y materia orgánica), puesto que en un suelo arenoso el té y los microorganismos que lo componen se drenarán más rápido que un suelo limoso donde el té permanecerá por más tiempo en la superficie. El porcentaje de materia orgánica del suelo también es importante ya que permitirá que los microorganismos agregados por el té continúen creciendo en el suelo. Por último, la compactación también influye ya que reduce la capacidad del agua para moverse a través del suelo y aumenta la probabilidad de generar ambientes anaeróbicos.

### 3.4 Flora Nativa

Como ya se mencionó, la calidad y tipo de compost que se utilice para elaborar el té es un factor importante a considerar, teniéndose que los desechos verdes compostados se consideran ventajosos en comparación a otros desechos orgánicos ya que presentan un menor riesgo de toxicidad en cuanto a presencia de metales pesados, contaminantes, hidrocarburos aromáticos, virus, coliformes fecales y salmonella, además de presentar una interesante actividad microbiológica (Morales, et al., 2017). Por ello, resulta atractivo analizar la microbiota de algunas especies de la flora nativa presentes en la zona central.

La flora nativa corresponde al conjunto de especies vegetales que pertenecen a una zona y ecosistema determinado, y que puede ser endémico o no. Una flora es de origen nativo endémico cuando está presente en un área muy específica y no se encuentra en otro sector, y es de origen nativo no endémico cuando habita en una región, pero no de manera muy puntual. En Chile existen múltiples tipos de climas y ambientes por lo que hay gran diversidad de flora y fauna, aproximadamente existen cuatro mil plantas nativas y casi la mitad son endémicas. La zona central es de alta riqueza y endemismo, donde se distribuye el mayor porcentaje a nivel nacional de árboles, arbustos, enredaderas, entre otros (PAR Explora Valparaíso, 2014). Gran parte de los árboles nativos endémicos de la zona central pertenecen al bosque esclerófilo, donde sus especies vegetales se caracterizan por sus hojas duras perennes que les permiten capturar la humedad desde el ambiente y soportar prolongados periodos de sequía. La existencia de este bosque es fundamental para el desarrollo de la vida del sector, ya que sirve de hogar para varias especies de mamíferos, reptiles, insectos y microorganismos (GEF, 2017). Dentro de las especies nativo endémico de la zona se tienen las siguientes:

- **Boldo (*Peumus boldus*)**

Árbol de tamaño mediano perteneciente al orden Laurales, familia *Monimiaceae*, que se distribuye entre la Región de Coquimbo y la Región de Los Lagos, presentando una mayor abundancia en la zona mediterránea. Es de muy lento crecimiento, de follaje perenne y florece entre agosto y septiembre en su hábitat nativo. Sus hojas presentan un fuerte aroma y son utilizadas con propósitos culinarios y medicinales. Presentan un

principio activo alcaloide que es la boldina, la cual tiene efectos coleréticos, colagogos y diuréticos; y en menores concentraciones otros alcaloides como isoboldina y laurotenina.

De las hojas es posible extraer alrededor de un 2% de aceite esencial que es fuertemente aromático, rico en eucaliptol y ascaridol (EMA, 2009), y que en el siglo XX se recomendaba para la infestación de helmintos o lombrices.

Estudios han demostrado que las hojas trituradas de *Peumus boldus* tienen actividad insecticida contra plagas de productos almacenados (Silva, et al., 2003), además de poseer efecto fungicida contra *Penicillium* spp (Aguilar, et al., 2012), *Fusarium* spp (Bittner, et al., 2009), *Aspergillus niger* y *A. flavus* (Aguilar, et al., 2012).

- **Lilén (*Azara celsastrina*)**

Arbusto pequeño de hojas perennes, perteneciente a la familia *Flacurtáceae* y que habita entre la Región de Coquimbo y del Bio Bio. Su uso es más ornamental y no se tienen estudios sobre si posee propiedades medicinales o antifúngicas (Chile Flora, 2006).

- **Naranjillo (*Citronella mucronata*)**

Árbol siempre verde de la familia *Icacinaceae* que crece de forma discontinua entre la Región de Coquimbo y de los Lagos. Sus hojas son usadas en infusiones y contienen hasta un 0,15% de cafeína. Su uso es más ornamental (Garrido & Echeverría, s.f.).

- **Peumo (*Cryptocarya alba*)**

Árbol perennifolio de la familia *Lauraceae* que se distribuye desde el sur de la región de Coquimbo hasta la Araucanía. Su madera es muy dura y resistente al agua, siendo utilizada para fabricar hormas de zapato y piezas de carretas. La corteza es muy taninosa y se utiliza en curtiembres y para teñir de anaranjado (Chile Nativo, 2011).

Un compuesto que se ha aislado de las hojas y de la corteza es la reticulina, un tipo de alcaloide que posee propiedades hepatoprotectores (Benedetti, 2012). Además, de las hojas se ha obtenido aceite esencial compuesto de p-cymol, alfapineno, linalol y limoneno (Ruiz, 2011), del cual se ha observado una leve actividad antimicrobiana y antifúngica frente a *Penicillium* sp. y *Fusarium oxysporum* (Avello, et al., 2012), además de *Colletotrichum graminícola* (Rana, et al., 2016).

- **Quillay (*Quillaja saponaria*)**

Árbol siempre verde perteneciente a la familia *Rosaceae* que habita entre la región de Coquimbo y la Araucanía. Se considera una de las especies más interesantes que crecen en la zona semiárida de Chile, por el aprovechamiento de su corteza de la cual se extrae saponina para múltiples usos (INFOR, INDAP, FIA, 2000), tales como champú, dentífrico, jabón, detergente, cosméticos, contra polillas, etc. En la actualidad muchas vacunas contienen saponina, ya que actúa como un amplificador de la señal de alarma para gestar la respuesta inmunológica (Duery, 2003).

En algunos viñedos se aplica saponina en el suelo mediante riego por goteo, viéndose un aumento en la productividad de las uvas y protegiendo las raíces de los ataques de nemátodos (Duery, 2003). Estudios han indicado que quillay es una planta con actividad antifúngica (Apablaza, et al., 2002) e insecticida en larvas de las especies *Aedes aegypti* y *Culex pipiens* (Pelah, et al., 2002)

### **3.5 *Trichoderma* spp. como biocontrolador en agricultura.**

La *Trichoderma* es un género de hongo de la división Ascomycota que está presente en los ecosistemas del suelo y raíces. Posee especies reconocidas por sus características biocontroladoras de patógenos de suelo y por inducir la estimulación del crecimiento de las plantas (Donoso, et al., 2008). Es un hongo saprófito de vida libre y que interactúa de manera simbiótica con las plantas (Harman, et al., 2004), es de fácil aislamiento y cultivo, además de estar biológicamente adaptado para una colonización agresiva debido a su alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y amplia gama de sustratos sobre los que puede crecer, convirtiendo este género como un eficiente agente de control biológico (Infante, et al., 2009).

Morfológicamente, se caracterizan por presentar al inicio un micelio de color blanco y a medida que va creciendo se torna de un color amarillento o verde oscuro, con abundante esporulación. Bajo el microscopio es posible observar sus conidióforos ramificados (Fig. 14).

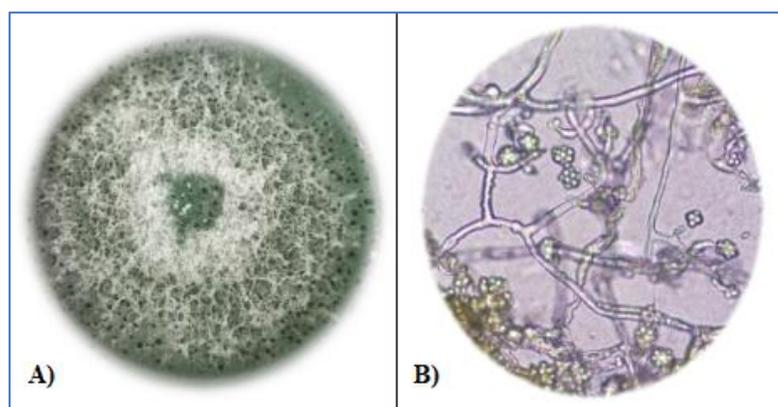


Fig. 14. Características macroscópicas y microscópicas de *Trichoderma* spp.  
 A) Colonia de 7 días de crecimiento en medio de cultivo PDA. B) Conidióforo.

Actualmente, en la agricultura se está intensificando su uso como inoculante dado que induce el fortalecimiento de la planta y actúa como biocontrol. Sin embargo, la colonización de la *Trichoderma* inoculada en el suelo dependerá del nivel de materia orgánica (bajo un 2% el hongo no se desarrolla), de la carga de patógenos y del manejo del suelo debido al alto uso de cobre y fungicidas. Entre las cepas que hoy se utilizan se encuentra *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma gamsii* y *Trichoderma koningii* (Agromática, 2017). Además, el efecto de control es mayor cuando se aplican consorcios de la misma especie (relación intraespecífica) o de especies diferentes (relación interespecífica), interactuando entre sí y mostrando un comportamiento antagónico (interacción incompatible) que puede producir una mayor inhibición de los patógenos y, por ende, ampliar el rango de control de estos (Moo Koh, et al., 2018).

### 3.5.1 Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. frente a hongos patógenos.

Su mecanismo de acción para el control de patógenos es por (Barra, et al., 2014):

- **Micoparasitismo:** el hongo toma contacto directo con los patógenos y producen metabolitos que degradan las paredes celulares provocando la muerte del hongo patógeno.
- **Antibiosis:** el hongo produce metabolitos secundarios que actúan como sustancias antimicrobianas que inhiben el crecimiento de los hongos patógenos.

- **Competencia:** el hongo coloniza los tejidos de la planta disminuyendo el espacio y alimento necesario para el establecimiento y crecimiento de los hongos patógenos.

Además, presentan mecanismos de acción biorreguladora indirecta, destacando la inducción de defensas fisiológicas y bioquímicas (desactivación de toxinas o enzimas segregadas por microorganismos patógenos), y la capacidad de aprovechar elementos nutritivos y brindar un ambiente adecuado al desarrollo de las raíces (Benítez, et al., 2004).

### **3.5.2 Función de *Trichoderma* spp. en la planta.**

La *Trichoderma* al alimentarse de otros hongos reduce la capacidad de crecimiento y afección a las raíces por parte de los patógenos principalmente, generando un estado de suelo supresivo donde no existe la aparición de ningún hongo patógeno en la suficiente concentración como para causar un daño en la planta.

Dentro de las funciones de la *Trichoderma* destacan las siguientes (Agromática, 2017):

- Destruye la pared celular de hongos patógenos mediante enzimas y antibióticos que excretan al medio.
- Parasitismo y eliminación de hifas de hongos.
- Generación de resistencia adquirida, por lo que es apta para aplicaciones foliares.
- Generación de suelos supresivos, por lo que no hay proliferación de hongos patógenos.
- De manera indirecta, estimula las raíces para aumentar la capacidad de asimilación de nutrientes.

## 4. Materiales y Método

### 4.1 Materiales

#### 4.1.1 Compost de Flora Nativa

Se utilizan cinco compost de flora nativa que fueron recolectados de los primeros 15 [cm] de la capa superior del suelo conteniendo principalmente materia orgánica vegetal proveniente de las hojas de los árboles. Se dispone de alrededor de 1 [kg] de cada compost, de los cuales 500 [g] fueron destinados para análisis físico – químicos que fueron externalizados a la empresa AGQLabs.

Los compost utilizados y del lugar que fueron recolectados son los siguientes:

- **Boldo:** Fundo Quillay, Colliguay, Región de Valparaíso.
- **Lilén:** Fundo Quillay, Colliguay, Región de Valparaíso.
- **Naranjillo:** Parque el Boldo, Zapallar, Región de Valparaíso.
- **Peumo:** Fundo Quillay, Colliguay, Región de Valparaíso.
- **Quillay:** Cajón del Maipo, Región Metropolitana.

Además, se realiza el control con un compost de clase A a base de residuos de tomate y que es comercializado por la Cooperativa Agrícola de Reciclaje Weltun Mapu (Limache).

#### 4.1.2 Medios de Cultivo

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

- **Agar Papa Dextrosa (PDA):** medio de cultivo para el crecimiento de hongos y levaduras. Está compuesto por 4 [g/L] de Infusión de papa, 20 [g/L] de dextrosa y 15 [g/L] de agar. Además, para algunos ensayos fue suplementado con Cloranfenicol (antibiótico) en una concentración de 200 [mg/L] con el fin de inhibir el crecimiento bacteriano.
- **Agar de Soya Trypticosa (TSA):** medio de cultivo para bacterias que está compuesto por Triptona 10 [g/L], extracto de levadura 5 [g/L] y cloruro de sodio 5 [g/L]. Para la preparación de placas de cultivo de TSA se agregó 40 [g/L].

### 4.1.3 Cepas Fúngicas Patógenas

Se trabajarán con tres cepas de hongos patógenos disponibles en el laboratorio: *Botrytis cinerea* aislada de arándano, *Fusarium oxysporum* y *Lasiodiplodia theobromae*, ambos aislados de hoja de palto.

## 4.2 Metodología Analítica

### 4.2.1 Preparación del Té de Compost.

Se utilizan los compost de flora nativa chilena y el compost comercial que se encuentran disponibles en el centro de Biotecnología de la UTFSM. En condiciones de laboratorio se prepara el té de compost mezclando compost con agua estéril (agua destilada autoclavada a 121[°C] por 20 [min]) en una proporción de 1:5 % v/v (Morales, et al., 2017) para obtener 300 [mL] de té, la preparación se realiza en frascos de cultivo de 550 [mL]. Los frascos son dejados a 24 [°C] y 150 rpm de agitación en incubador agitador orbital durante 5 días (Fig 15. A). Finalmente, la mezcla es filtrada con una tela de algodón esterilizada (Fig.15. B) para eliminar partículas de gran tamaño propias del compost (Diáñez, et al., 2006).

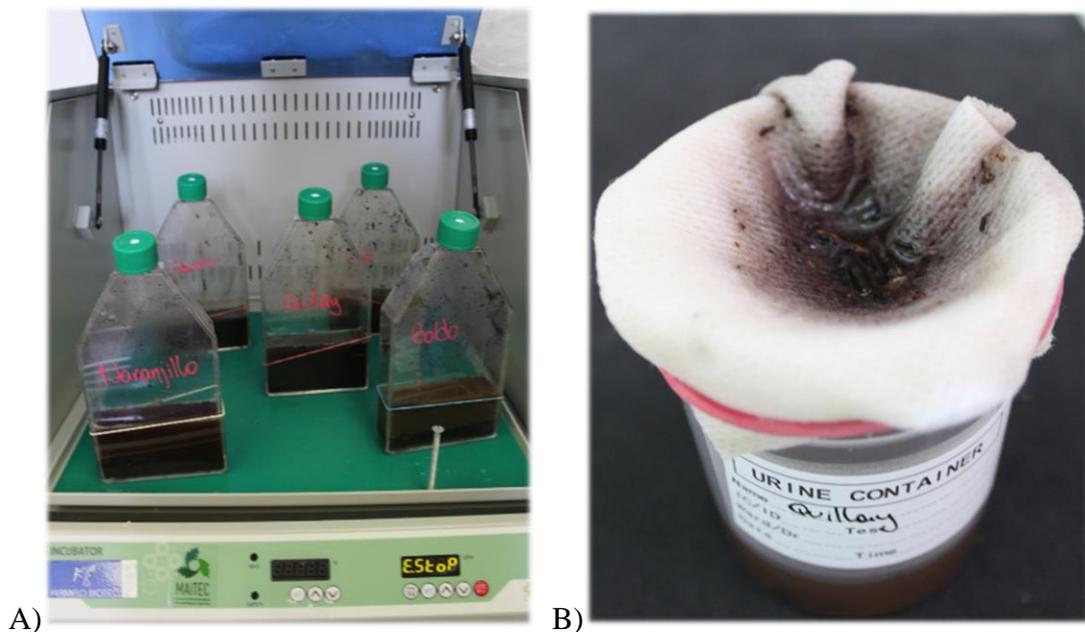


Fig. 15. Preparación del té de compost en frascos de cultivo y etapa de filtrado.  
A) Frascos de cultivo con té de compost sujetos con elásticos al incubador agitador orbital.  
B) Frasco con tela de algodón para filtrado.

#### 4.2.2 Caracterización del té de compost

El análisis físico – químico de los compost utilizados, correspondiente a pH, conductividad eléctrica, materia orgánica, fósforo disponible, potasio disponible, nitrógeno total y relación C/N, se externaliza a la empresa AGQLabs.

Para el análisis microbiológico, se determina el recuento de microorganismos (hongos y bacterias) mediante diluciones seriadas de los té de compost llegando hasta la dilución  $10^{-5}$  (Fig.16), para luego evaluar cada 24 [h] durante 5 días la carga microbiana de los té, y así, determinar la cantidad de días de elaboración donde se obtenga la máxima carga microbiana. El recuento de bacterias heterótrofas totales se realiza inoculando  $100\mu\text{L}$  de la dilución  $10^{-4}$  de los té en una placa Petri de 90mm con medio TSA e incubando durante 24 [h] a  $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El recuento de hongos filamentosos totales se realiza inoculando  $100\mu\text{L}$  de la dilución  $10^{-2}$  de los té en una placa Petri de 90mm con medio PDA suplementado con cloranfenicol. Se dejan incubando por 5 días a  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El recuento para hongos y bacterias se realiza en triplicado y los resultados se expresan en UFC/mL (Renaloea, 2014).

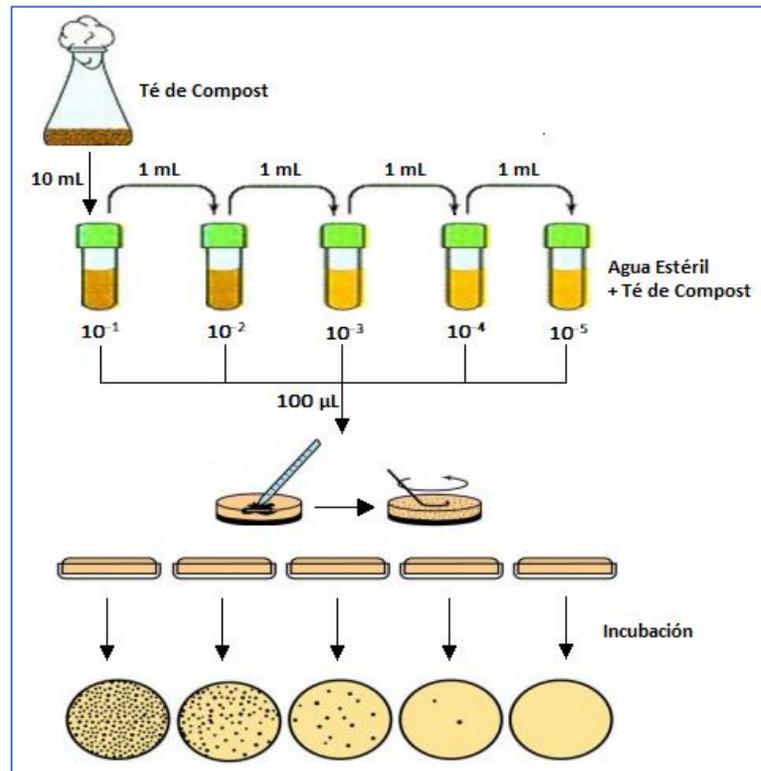


Fig. 16. Esquema recuento de microorganismos mediante dilución seriada y plqueo en medios selectivos.

El recuento de microorganismos se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$N = \frac{\bar{c}}{v \cdot d} \quad (\text{Ec.1})$$

Donde: - C: promedio de colonias contadas en las placas correspondiente a una misma dilución. La placa contada debe tener entre 10 – 150 ufc.

- V: volumen del inóculo sembrado en la placa Petri en mililitros.

- d: dilución escogida para realizar el recuento.

#### 4.2.3 Aislamiento de microorganismos.

Del recuento de hongos filamentosos se aíslan cepas con diferentes morfologías y se seleccionan aquellas que presenten una morfología similar a *Trichoderma* spp., para luego evaluar antagonismo contra los patógenos fúngicos y formar un consorcio con tres cepas que serán inoculadas en los respectivos tés de compost de flora nativa. El aislamiento se realiza con aguja hipodérmica y se inocula en placa Petri de 60mm de diámetro con medio PDA.

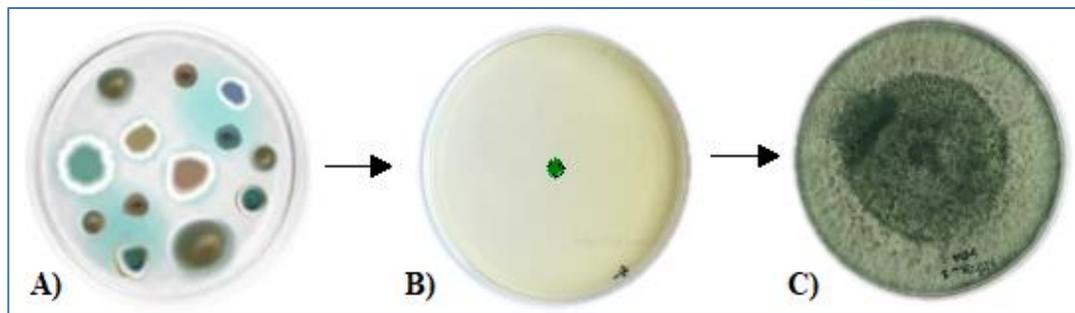


Fig. 17. Esquema aislamiento de hongo filamentoso  
A) Recuento y selección de hongo. B) Aislamiento de hongo. C) Colonia de hongo pura y aislada.

#### 4.2.4 Identificación de cepas fúngicas.

A las cepas putativas *Trichoderma* spp. aisladas se les realizó extracción de ADN, PCR con marcadores moleculares ITS y secuenciación para identificación molecular.

Para la extracción se añade micelio del hongo seleccionado con 5 días de crecimiento a un tubo Eppendorf de 1,5 [ml] y con un palillo estéril se muele el micelio. Luego se agregan 500  $\mu$ L de tampón de lisis (2% de CTAB, 100 mM de Tris-HCl, 1.4 M de NaCl, 1% de PVP, 20 mM de Na<sub>2</sub>EDTA, 0.2% de LiCl, pH ajustado a ~ 8) y se vuelve

a moler junto al micelio, incubar por 30 [min] a 65[°C]. A continuación, se centrifuga a 10.000 rpm durante 5 [min] a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo y se añade la misma cantidad de volumen de Cloroformo: Isoamil-Alcohol, el tubo se voltea suavemente varias veces y se centrifuga a 12.000 rpm durante 10 [min] a temperatura ambiente. La fase superior se pasa a un nuevo tubo y se agrega un volumen equivalente de Isopropanol frío (-20[°C]) para precipitar el ADN (almacenar la mezcla a -20[°C] durante 30 [min]). Centrifugar a 14.000 rpm durante 10 [min] a temperatura ambiente. El sobrenadante es removido y se agregan 500µL de etanol al 70%, volviendo a centrifugar a 12.000 rpm por 5 [min]. El sobrenadante se desecha y el pellet se deja secar a temperatura ambiente. Finalmente, se disuelve en 50µL de agua libre de nucleasas y se almacena a -20 [°C] (Huanca-Mamani, et al., 2014). El pellet disuelto se lleva por 10 [min] a una temperatura de 96[°C], luego a hielo por 5 [min] y se centrifuga a 13.000 rpm durante 10 [min], recuperando 5µL en un tubo Eppendorf de 1,5 [mL]. En un tubo para PCR (200 µL) para 50 µL de reacción se utilizan: 22µL de agua libre de nucleasas, 25µL GoTaq Green Master Mix, 1 µL del Partidor ITS6 (5'-GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG-3'), 1µL del Partidor ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') y 1µL de ADN de la muestra a secuenciar. Finalmente, los tubos son llevados al Termociclador para realizar el PCR donde las condiciones de ciclo son las siguientes: 1 ciclo de 10 min a 94°C, 35 ciclos a 94°C, 55°C y 72°C por 30 segundos cada uno, y 1 ciclo de 10 min a 72°C. Las muestras son almacenadas a -20[°C]. Durante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se amplifican las regiones ITS – 1 e ITS – 2 mediante los partidores ITS6 e ITS4 (White, et al., 1990). La región ITS es el marcador genético más comúnmente utilizado en la secuenciación de hongos por ser una región muy conservada que está separada por secuencias divergentes muy variables que representan una huella genómica para cada hongo, permitiendo un fácil diseño de los partidores.

Los productos PCR son comprobados mediante electroforesis en gel agarosa al 1% (p/v) en buffer TBE y con 1,5 µL de Safeview a 90 [V] durante 40 minutos.

Finalmente, los productos de PCR son enviados a secuenciar a la Plataforma de Secuenciación y Tecnologías Ómicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile,

quien cuenta con la tecnología ABI PRISM 3100 para la obtención automática de la secuencia de nucleótidos a partir de templados de PCR y plásmidos. Las secuencias obtenidas son analizadas y comparadas con el banco de genes de Blast.NCBI (National Center for Biotechnology Information).

#### **4.2.5 Incompatibilidad intraespecífica e interespecífica entre *Trichoderma* spp.**

Las cepas de *Trichoderma* spp. aisladas desde tés de compost de flora nativa se enfrentarán para determinar incompatibilidad intraespecífica (misma especie) o interespecífica (diferentes especies). Para ello, en placas Petri de 90mm de diámetro con medio de cultivo PDA se colocan 2 discos de micelio (siete días de crecimiento) de 5 mm de diámetro de distintas cepas confrontados. Las confrontaciones se realizan en triplicado y utilizando como testigo los aislados individuales. Las placas se dejan en incubación a 24 [°C] durante 7 días. Al final del ensayo se seleccionan las cepas fúngicas con mayor incompatibilidad considerando tres características: a) el crecimiento proporcional (50%/50%) de ambos aislados en la placa de Petri, b) la presencia de barrera micelial (incompatibilidad de los aislados) y c) la coloración en el medio de cultivo (Moo Koh, et al., 2018).

#### **4.2.6 Confrontación preliminar de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de cepas fúngicas patógenas.**

De las *Trichoderma* spp. aisladas se realiza un ensayo previo de antagonismo donde en el centro de la placa Petri, con medio de cultivo PDA, se coloca un disco de 5 mm de diámetro con micelio del patógeno: *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Lasiodiplodia theobromae* (de siete días de crecimiento), y sobre los ejes horizontal y vertical se ponen los discos de 5 mm de diámetro con *Trichoderma* spp de siete días de crecimiento (Fig. 18. A). Las placas se realizan en triplicado y son incubadas a 24 [°C] durante 7 días (Villamil, et al., 2012). El control negativo de inhibición del crecimiento del patógeno se realiza colocando discos con medio de cultivo PDA sin micelio de *Trichoderma* spp. sobre el eje horizontal y vertical. Las colonias de *Trichoderma* spp. que presenten una interacción con el patógeno, reduciendo su crecimiento o

modificando su forma, se preseleccionan para evaluar antagonismo *in vitro* contra el patógeno *Lasiodiplodia theobromae* (Martínez, et al., 2013).

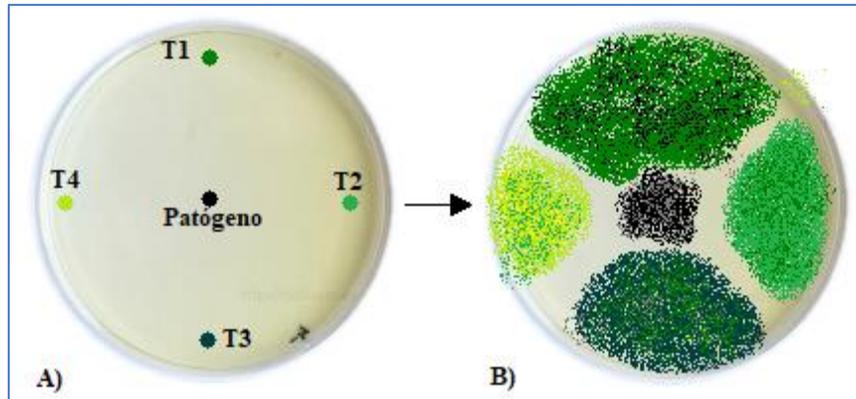


Fig. 18. Esquema de confrontación preliminar de hongo patógeno con distintas cepas de *Trichoderma* spp. A) Cepa fitopatógena confrontada con distintas cepas nativas de *Trichoderma* spp. B) Crecimiento de hongos confrontados luego de 7 días de incubación

#### 4.2.7 Efecto antagonístico de *Trichoderma* spp. sobre *Lasiodiplodia theobromae*.

Se realiza un segundo ensayo confrontando las *Trichoderma* spp. que mejores resultados hayan presentado en el ensayo de incompatibilidad y de confrontación preliminar con el patógeno *Lasiodiplodia theobromae*, por ser el hongo más invasivo de los patógenos que se están evaluando al presentar una velocidad de crecimiento micelial mayor, siendo altamente competitiva para *Trichoderma* spp.. Para ello, en una placa Petri de 90mm con medio de cultivo PDA, se coloca en un lado de la placa un disco de 5 mm de diámetro con micelio del patógeno y en frente otro disco de 5 mm de diámetro con micelio de *Trichoderma* spp. (Fig.19). El ensayo se realiza en triplicado y las placas se dejan incubando a 24 [°C] durante 5 días. El control se realiza confrontando el patógeno con un disco de medio de cultivo PDA sin micelio. Se mide el diámetro de crecimiento del patógeno al último día y se calcula el porcentaje de inhibición (I) de crecimiento micelial (Mbarga, et al., 2012; Diáñez, et al., 2006):

$$I (\%) = \left(1 - \frac{c_n}{c_0}\right) \cdot 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde: - Cn: diámetro de crecimiento del patógeno en presencia de antagonista.

-C<sub>0</sub>: diámetro de crecimiento del patógeno control.

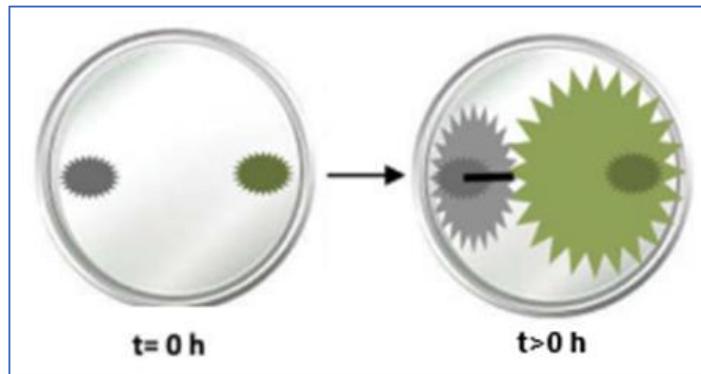


Fig. 19. Esquema de confrontación de *Trichoderma* spp. con *Lasiodiplodia theobromae*.  
 A) Inóculo de *L. theobromae* (gris) y *Trichoderma* spp. (verde) en t=0h. B) Inhibición de *L. theobromae* (-) frente el crecimiento de *Trichoderma* spp. tras 5 días de incubación (t>0h).

De este ensayo, se seleccionan las tres cepas que mejores resultados presenten, teniendo en consideración el ensayo de incompatibilidad entre *Trichoderma* spp.

#### 4.2.8 Inoculación de té de compost de flora nativa con *Trichoderma* spp.

Con las tres cepas seleccionadas se realiza el recuento de esporas mediante el uso de la cámara de Neubauer (Fig.20), para lo cual se recolectan las esporas por inundación de agua estéril en la placa de PDA y se inocula con 10 [μL] entre el cubreobjeto y la cámara, donde el líquido se introduce por capilaridad. El recuento se realiza en el cuadrado secundario central bajo el aumento 40x del microscopio, contando 5 de los 25 cuadros que lo componen.

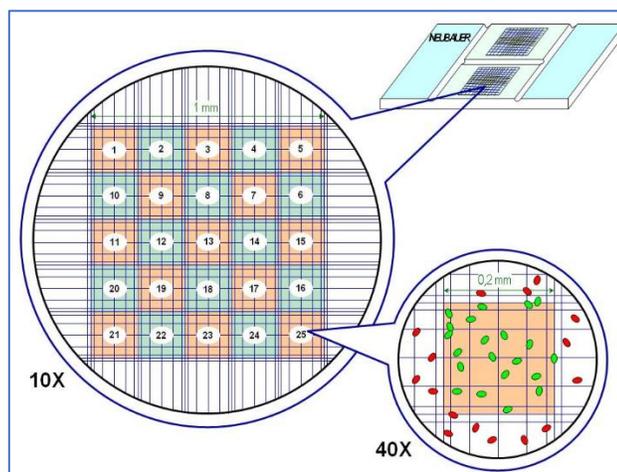


Fig. 20. Esquema de Recuento de esporas en cámara de Neubauer.  
 En 10X se presentan los 25 cuadros del cuadrado secundario central de la cámara. En 40X se observa que las esporas en verde son las cuantificables y no las rojas que están fuera de los límites del cuadro contable.

Se ajusta la concentración a  $10^6$  [esporas/mL], para que, al inocularlo en el té, este quede con una concentración de  $5 \cdot 10^4$  [esporas/mL] (Siddiqui, et al., 2007). La concentración inicial de esporas ( $c_1$ ) se obtiene mediante la siguiente ecuación para el recuento realizado en el cuadrado secundario central (Fuentes, 2019):

$$c_1 \left[ \frac{\text{esporas}}{\text{ml}} \right] = \frac{\bar{c} \cdot f_d}{0,000004 [\text{ml}]} \quad (\text{Ec.3})$$

Donde: -  $c$ : promedio de esporas contadas en los 5 cuadros del cuadrado secundario central.

-  $f_d$ : factor de dilución sobre el cual se está realizando el recuento de esporas. Si no hay dilución el factor es 1.

Por último, para el ajuste de la concentración se utiliza la siguiente ecuación:

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2 \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde: -  $c_1$ : concentración inicial de esporas/ml.

-  $c_2$ : concentración final de esporas/ml.

-  $V_1$ : volumen inicial.

-  $V_2$ : volumen final.

#### **4.2.9 Efecto directo de té de compost con y sin inoculación de *Trichoderma spp.* sobre el crecimiento de patógenos**

Se realiza un estudio *in vitro* para analizar el efecto de los té de compost de flora nativa con y sin inoculación de *Trichoderma spp.* en el crecimiento relativo de fitopatógenos en placas Petri. El medio será preparado mediante la adición del té de compost en una proporción del 10% (v/v) al medio PDA fundido a  $60$  [°C]. Luego el medio es vertido a placas de 90 mm y es inoculado con micelio en crecimiento activo del fitopatógeno (7 días de crecimiento) en el medio de la placa mediante un disco de PDA de 5 mm de diámetro. Se realiza control con adición de agua estéril al medio PDA. Se realizan 3 réplicas por tratamiento y el diámetro de la colonia del fitopatógeno se mide a los 2, 7 y 14 días después de la inoculación. Se calcula el porcentaje de inhibición (I) de crecimiento micelial y el crecimiento relativo de la colonia (RG) de acuerdo a la siguiente ecuación (Morales, et al., 2017):

$$RG (\%) = \frac{D_1}{D_0} \cdot 100 \quad (\text{Ec.5})$$

Donde: -  $D_1$ : diámetro de hongo patógeno en medio de cultivo con Té de Compost.

-  $D_0$ : diámetro de hongo patógeno en medio de cultivo control.

### **4.3 Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos serán analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA), donde un valor  $P < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. Para determinar cuáles medias eran significativamente diferentes de otras, los resultados se sometieron a Prueba de Múltiples Rangos. Los análisis se realizaron haciendo uso del programa Statgraphics Centurion XVI.I

## 5. Resultados

### 5.1 Caracterización físico – química y microbiológica del Té de Compost de Flora Nativa

#### 5.1.1 Análisis nutricional.

En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos del análisis físico – químico realizado por AGQ Labs para los distintos compost utilizados en la elaboración del té de compost:

Tabla 2. Características físico – químicas de los Compost de Flora Nativa.

Parámetro físico – químico	Unidad	Compost					
		R. de Tomate	Boldo	Lilén	Naranjillo	Peumo	Quillay
<b>pH</b>	[-]	8,49	5,25	5,44	5,46	4,84	6,18
<b>Conductividad Eléctrica</b>	dS/m a 20°C	7,73	0,21	0,30	0,32	0,17	0,004
<b>Nitrógeno Total</b>	mg/kg	11.155	10.320	11.180	2.808	3.469	12.320
<b>Fósforo Disponible</b>	mg/kg	2067	127	99,5	163	58,8	147
<b>Potasio Disponible</b>	meq/100g	15,5	2,31	3,33	1,4	0,28	3,49
<b>Materia Orgánica</b>	%	13,4	22,8	38,4	5,82	7,62	42,9
<b>Relación C/N</b>	[-]	6,99	12,8	19,9	12	12,7	20,2

Se observa que el pH para los compost de flora nativa es menor al compost control (Residuos de tomate), sin embargo, se encuentran dentro del límite establecido en la norma chilena a excepción del Peumo. Para la conductividad eléctrica se observan diferencias significativas entre el compost control y los de flora nativa, sin embargo, se encuentran dentro de lo establecido en la norma chilena NCh2880, donde el compost control sería catalogado como uno de clase B ( $CE \leq 8$  dS/m), lo cual difiere de lo informado por la cooperativa que lo clasifica como un compost de clase A. En cuanto al nitrógeno total se tiene que el compost de Naranjillo y Peumo poseen una baja concentración en comparación a los otros compost, siendo esta diferencia significativa, mientras que para el fósforo y potasio disponible también se tienen diferencias significativas de los compost de flora nativa con relación al control, el cual, además,

tiene altas concentraciones de estos macronutrientes. Para la materia orgánica se tiene porcentajes que los compost de Boldo, Lilén y Quillay cumplen con la norma NCh2880 al ser mayor al 20%, no así para el control que tiene un 13,4% mientras que el Naranjillo y Peumo poseen un 5,82% y 7,62% respectivamente. Finalmente, la relación C/N de los compost también se encuentran dentro de lo establecido en la norma con la diferencia que los de flora nativa poseen una mayor relación en comparación con el control.

En general, la composición de los compost de flora nativa están dentro de los límites aceptables del compostaje según la norma chilena NCh2880, por lo que podría ser clasificado como compost de clase A, sin embargo, con este análisis nutricional no es posible determinar con exactitud la calidad del compost, puesto que hacen falta el análisis sanitario, de metales pesados y germinación de maleza.

### 5.1.2 Análisis microbiológico

Para el recuento de bacterias en los distintos té de compost de flora nativa, se tiene en general un aumento de la carga bacteriana (UFC/mL) a medida que aumentan los días de preparación del té (Fig.21) siendo, por ende, el quinto día de preparación el que mayor recuento presenta. También se presenta una variación que tiende a ser significativa ( $P < 0,05$ ) entre un día y otro (Tabla 3). En cuanto al té de compost comercial (R. Tomate) se observa un mayor recuento al segundo día, el cual no difiere significativamente del recuento del quinto día que, además, presenta uno de los menores recuentos de bacteria en comparación a los té de compost de flora nativa.

Tabla 3. Recuento de bacterias [UFC/ml] en los diversos té de compost.

Té de Compost	Día 0 UFC/ml $10^6$	Día 1 UFC/ml $10^6$	Día 2 UFC/ml $10^6$	Día 3 UFC/ml $10^6$	Día 4 UFC/ml $10^6$	Día 5 UFC/ml $10^6$
<b>R. Tomate</b>	$2,1 \pm 0,3^d$	$3,9 \pm 0,8^c$	$9,5 \pm 0,4^a$	$8,5 \pm 0,5^b$	$8,8 \pm 0,5^{ab}$	$9,1 \pm 0,5^{ab}$
<b>Peumo</b>	$3,9 \pm 0,3^e$	$5,7 \pm 0,3^d$	$8,1 \pm 0,5^c$	$10,7 \pm 0,3^a$	$9,4 \pm 0,2^b$	$10,9 \pm 0,3^a$
<b>Quillay</b>	$4,7 \pm 0,7^c$	$9,7 \pm 0,3^b$	$10,9 \pm 0,3^a$	$11,3 \pm 0,4^a$	$11,4 \pm 0,5^a$	$11,5 \pm 0,2^a$
<b>Lilén</b>	$1,9 \pm 0,3^e$	$2,9 \pm 0,6^e$	$4,3 \pm 0,8^d$	$6,9 \pm 0,4^c$	$8,5 \pm 0,6^b$	$13,6 \pm 0,7^a$
<b>Naranjillo</b>	$3,3 \pm 0,3^d$	$4,5 \pm 0,4^c$	$5,7 \pm 0,4^b$	$6,0 \pm 0,4^b$	$8,7 \pm 0,4^a$	$9,1 \pm 0,5^a$
<b>Boldo</b>	$3,7 \pm 0,3^{cd}$	$2,7 \pm 0,6^d$	$4,3 \pm 0,6^c$	$6,1 \pm 0,3^b$	$5,8 \pm 1,1^b$	$9,7 \pm 1,3^a$

Diferentes letras en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

En el Anexo B se presentan los resultados del análisis de varianza ANOVA y de la Prueba de Múltiples Rangos para el Recuento de Bacterias y Hongos.

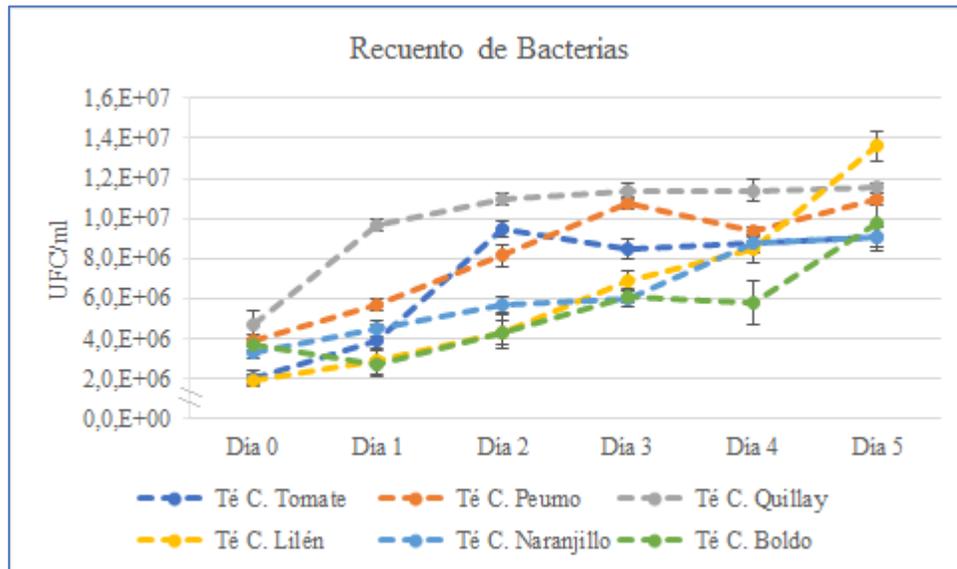


Fig. 21. Recuento de bacterias heterótrofas totales durante 5 días de preparación de tés de compost de flora nativa.

En el recuento de hongos filamentosos en general es posible apreciar que la carga fúngica (UFC/ml) aumenta a medida que pasan los días de preparación (Fig.22), además de presentarse diferencias significativas entre un día y otro de la elaboración del té (Tabla 4). De la Fig. 22 también es posible apreciar que la carga fúngica del té de compost comercial (R. Tomate) es la mayor al quinto día de preparación del té, siendo similar al recuento del té de Boldo, no así para el té de Peumo que presenta el menor recuento de hongos.

En el Anexo A se adjunta figura con imágenes de los recuentos de hongos realizados durante los 5 días de elaboración de los tés de compost.

Tabla 4. Recuento de hongos en los diversos té de compost.

Té de Compost	Día 0 UFC/ml 10 <sup>4</sup>	Día 1 UFC/ml 10 <sup>4</sup>	Día 2 UFC/ml 10 <sup>4</sup>	Día 3 UFC/ml 10 <sup>4</sup>	Día 4 UFC/ml 10 <sup>4</sup>	Día 5 UFC/ml 10 <sup>4</sup>
<b>R.Tomate</b>	18,7 ± 1,5 <sup>d</sup>	22,7 ± 1,5 <sup>c</sup>	28,0 ± 1,0 <sup>b</sup>	23,3 ± 2,1 <sup>c</sup>	25,0 ± 2,6 <sup>bc</sup>	32,7 ± 1,5 <sup>a</sup>
<b>Peumo</b>	2,7 ± 0,6 <sup>d</sup>	8,3 ± 1,5 <sup>c</sup>	10,7 ± 1,2 <sup>ab</sup>	12,0 ± 1,0 <sup>a</sup>	9,7 ± 0,6 <sup>bc</sup>	11,3 ± 0,6 <sup>ab</sup>
<b>Quillay</b>	5,0 ± 1,0 <sup>e</sup>	8,7 ± 1,5 <sup>d</sup>	8,3 ± 0,6 <sup>d</sup>	14,0 ± 1,0 <sup>b</sup>	11,3 ± 1,2 <sup>c</sup>	19,3 ± 1,5 <sup>a</sup>
<b>Lilén</b>	18,7 ± 2,5 <sup>a</sup>	18,3 ± 3,1 <sup>a</sup>	20,3 ± 2,5 <sup>a</sup>	18,7 ± 1,5 <sup>a</sup>	20,3 ± 2,1 <sup>a</sup>	17,3 ± 1,5 <sup>a</sup>
<b>Naranjillo</b>	16,3 ± 1,5 <sup>c</sup>	13,3 ± 1,5 <sup>d</sup>	21,3 ± 1,5 <sup>b</sup>	26,3 ± 1,5 <sup>a</sup>	22,7 ± 1,2 <sup>b</sup>	27,7 ± 1,2 <sup>a</sup>
<b>Boldo</b>	20,0 ± 2,0 <sup>c</sup>	16,7 ± 2,1 <sup>d</sup>	17,7 ± 1,5 <sup>cd</sup>	25,0 ± 2,0 <sup>b</sup>	29,3 ± 1,5 <sup>a</sup>	31,3 ± 1,2 <sup>a</sup>

Diferentes letras en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).

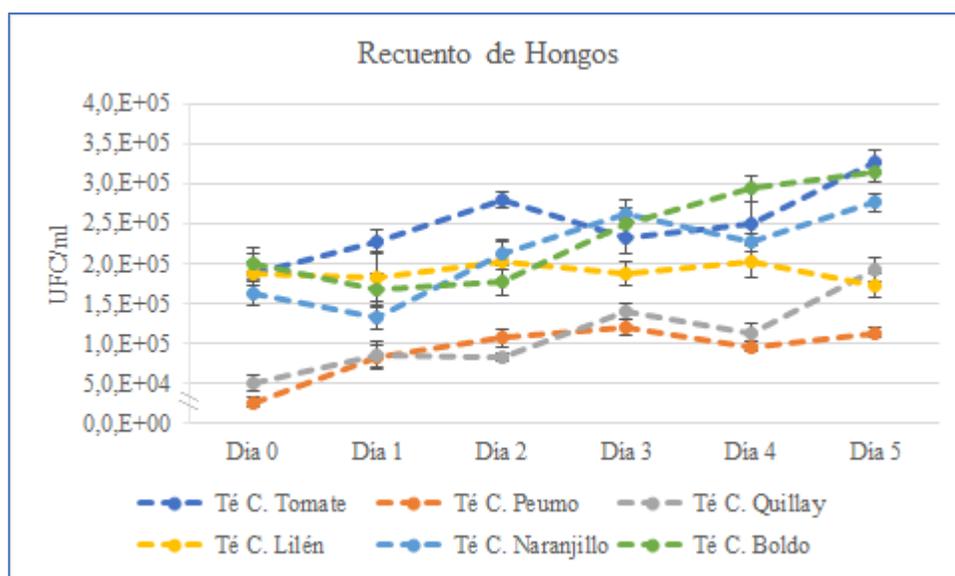


Fig. 22. Recuento de hongos filamentosos totales durante 5 días de preparación de té de compost de flora nativa.

De acuerdo a lo anterior, se determina que la preparación del té de compost de flora nativa tendrá una duración de 5 días a 150 rpm y 24 [°C] a fin de tener la mayor carga microbiana presente en los té de compost.

Por último, en la siguiente Fig. 23 se presenta el recuento de hongos al quinto día de preparación de los té de compost observándose, en general, que los de flora nativa tienen una mayor diversidad que el de residuos de tomate (control), diversidad que es

independiente del recuento, pues un alto recuento de microorganismos no implica necesariamente una alta diversidad y viceversa.

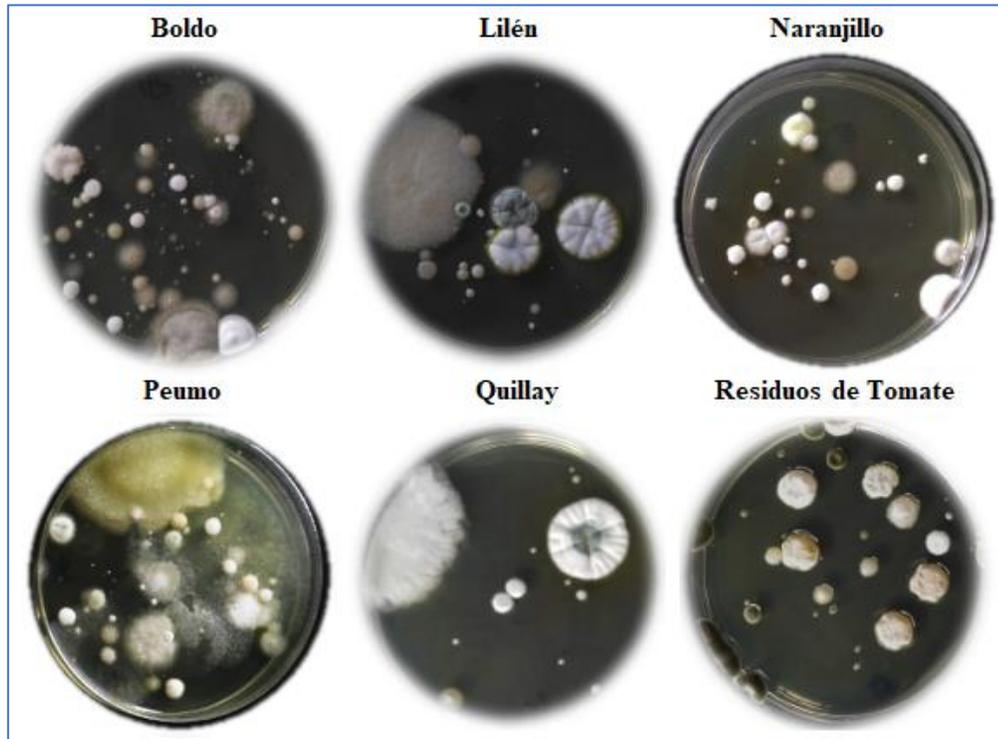


Fig. 23. Recuento de Hongos Filamentosos al quinto día de elaboración de los diversos té de compost.

## 5.2 Aislamiento e Identificación de cepas fúngicas.

Del recuento de hongos filamentosos en los té de compost de flora nativa se aislaron un total de 88 cepas fúngicas, de los cuales 11 presentaban morfología similar *Trichoderma* spp. Además, se incluye una doceava cepa correspondiente a *Clonostachys rosea* (100% identidad, 97% cover) aislada de té de compost de Lilén, especie fúngica que presenta reportes de actividad antagónica sobre *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum* (Flores, et al., 2015).

Los resultados obtenidos de las comparaciones de las secuencias de nucleótidos de la región ITS – 1 e ITS – 2 permitieron realizar la identificación de las especies con un porcentaje de identidad del 99,8 – 100%, predominando tres especies: *Trichoderma*

*asperellum*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma paraviridescens*. A continuación, se resumen los resultados obtenidos:

Tabla 5. Número total de cepas aisladas e Identificación de *Trichoderma* spp. desde té de compost de flora nativa.

Té de Compost	N° Total de Cepas aisladas	N° Cepas de Trichoderma	Especie	% cover	% identidad
<b>Boldo</b>	15	1	<i>T. asperellum</i>	100	100
<b>Lilén</b>	13	2	<i>T. asperellum</i>	100	100
			<i>T. harzianum</i>	100	100
<b>Naranjillo</b>	20	2	<i>T. asperellum</i>	100	100
			<i>Trichoderma</i> sp.	-	-
<b>Peumo</b>	18	2	<i>T. harzianum</i>	100	99,8
			<i>T. asperellum</i>	100	100
<b>Quillay</b>	22	4	<i>T. asperellum</i>	100	100
			<i>T. harzianum</i>	100	100
			<i>T. paraviridescens</i>	100	100
			<i>Trichoderma</i> sp.	-	-

Como se observa en la Tabla 5, de las 11 cepas con morfología similar a *Trichoderma* spp. solo fue posible secuenciar 9 de ellas. En la siguiente figura se presentan las distintas morfologías de todos los aislados de *Trichoderma* spp. desde los té de compost de flora nativa:

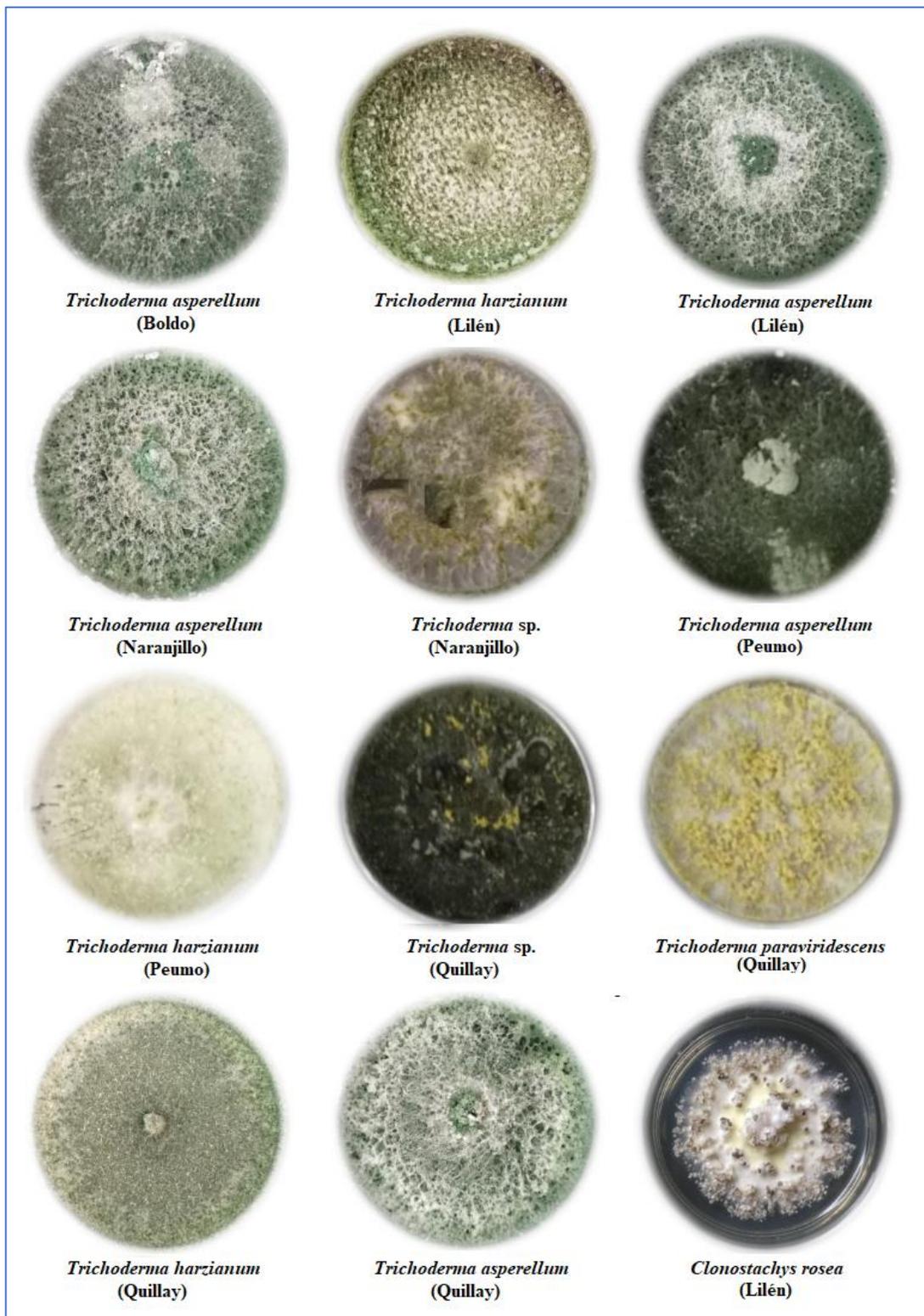


Fig. 24. Aislados de *Trichoderma* spp. y cepa de *Clonostachys rosea* desde los té de compost de flora nativa

### 5.3 Incompatibilidad intraespecífica e interespecífica de *Trichoderma* spp.

El ensayo se realiza con los 9 aislados secuenciados de *Trichoderma* spp., realizándose 36 enfrentamientos duales, de los cuales 14 presentaron la misma capacidad de competencia, creciendo de manera proporcional en el área de la placa Petri (50% – 50%). De ellos, 11 enfrentamientos presentaron barrera de defensa entre 0,3 [cm] y 0,5 [cm], mientras que 5 presentaron barrera de defensa y coloración de 0,7 a 1,0 [cm]. En el Anexo C se presenta la tabla con los resultados obtenidos para cada confrontación. En la Fig. 25 a) es posible apreciar una condición no deseada, puesto que la cepa *Trichoderma asperellum* (Lilén) tiene mayor predominancia de crecimiento que la cepa *Trichoderma harzianum* (Lilén), sin embargo, es posible apreciar una gran barrera de defensa con coloración (incompatibilidad interespecífica). En b) se observa un crecimiento proporcional de las cepas de *Trichoderma asperellum* de Lilén y Naranjillo además de presentar una barrera de defensa de 0,3 [cm] (incompatibilidad intraespecífica); y en c) es posible apreciar una condición deseada de incompatibilidad, donde las cepas de *Trichoderma harzianum* (Peumo) y *Trichoderma asperellum* (Boldo) presentan crecimiento proporcional en la placa Petri, además de una barrera de defensa con coloración (incompatibilidad interespecífica).

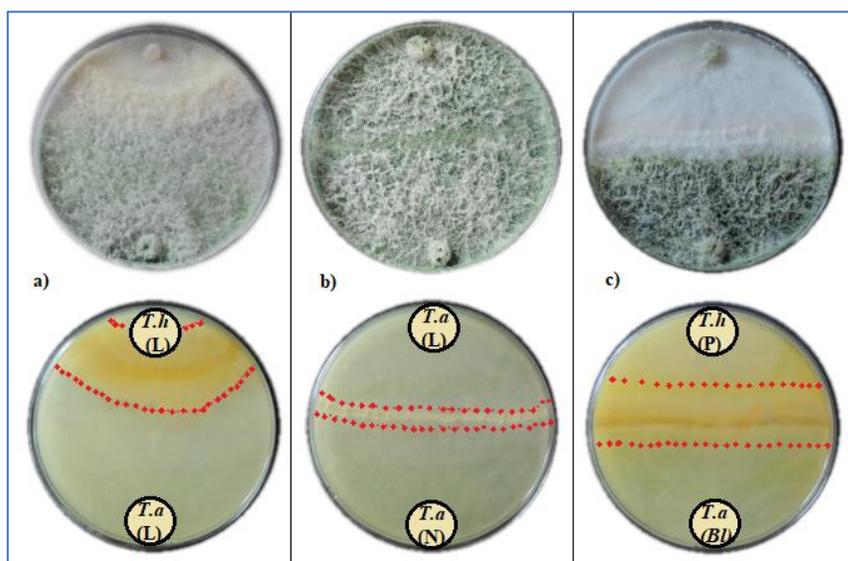


Fig. 25. Enfrentamientos de incompatibilidad de especies de *Trichoderma* spp. aisladas desde los téis de compost de flora nativa. a) *T. harzianum* (Lilén) vs *T. asperellum* (Lilén). b) *T. asperellum* (Lilén) vs *T. asperellum* (Naranjillo). c) *T. harzianum* (Peumo) vs *T. harzianum* (Boldo). En rojo se delimita la zona de la barrera de defensa y coloración en el medio de cultivo.

De acuerdo a lo mencionado, 6 cepas de *Trichoderma* spp presentan las características deseadas para la formación de un consorcio: 1 cepa de *Trichoderma harzianum* aislada de Peumo y 5 cepas de *Trichoderma asperellum*, cada una aislada de los respectivos téis de compost de Boldo, Lilén, Naranjillo, Peumo y Quillay.

#### **5.4 Confrontación preliminar de *Trichoderma* spp. sobre cepas fúngicas patógenas.**

Se realiza con las 11 cepas de *Trichoderma* spp y la cepa de *Clonostachys rosea*, frente a las 3 cepas de patógenos: *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *L.theobromae*, observándose (Fig. 26) que las 3 cepas de *T. harzianum* (T.h) aisladas de Peumo (P), Lilén (L) y Boldo (Bl) presentan algún tipo de efecto antagonista sobre el crecimiento micelial de los patógenos, así como también las 5 cepas de *T. asperellum* (T.a) aisladas de Boldo, Lilén, Naranjillo (N), Peumo y Quillay (Q). La cepa *T. paraviridescens* no se selecciona porque presenta un efecto mínimo en comparación a las otras *Trichoderma* sp.. Las otras 2 cepas de *Trichoderma* spp., si bien presentan algún efecto, no se incluyen por no estar secuenciadas. La cepa de *Clonostachys rosea* no se selecciona, ya que frente a las *Trichoderma* spp. presenta un crecimiento menor por lo que no es posible apreciar un efecto antagonista sobre el crecimiento de los patógenos. También, se observa que la cepa del patógeno *Lasiodiplodia theobromae* al séptimo día de evaluación presenta un crecimiento micelial que abarca toda la placa, mientras que los otros patógenos cubren la mitad o menos de ella. A ello, se suma que las posibles cepas con efecto inhibidor presentan un menor crecimiento en presencia de éste patógeno, razón por la cual se debe evaluar el efecto directo de las *Trichoderma* spp. con *L. theobromae* mediante confrontación dual

Finalmente, considerando los resultados de este ensayo se preseleccionan las 6 cepas de *Trichoderma* spp que presentaron las condiciones deseadas de incompatibilidad para evaluar el efecto antagonista contra *Lasiodiplodia theobromae*.

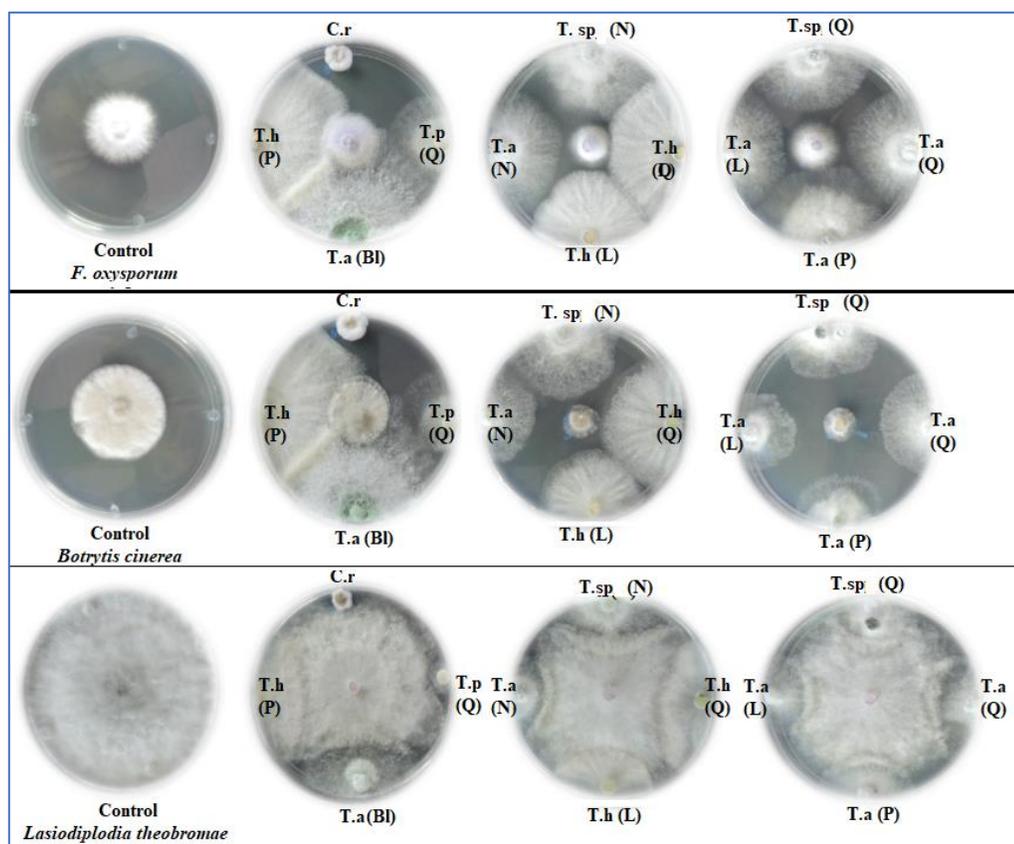


Fig. 26. Confrontación preliminar de cepas de *Trichoderma* spp. y de *Clonostachys rosea* sobre cepas fúngicas patógenas.

T.a: *Trichoderma asperellum*. – T.h: *Trichoderma harzianum*. – T.sp.: *Trichoderma* sp. – C.r: *Clonostachys rosea* – Bl: Boldo. – L: Lilén. – N: Naranjillo. – P: Peumo. – Q: Quillay

### 5.5 Efecto antagónico de *Trichoderma* spp. sobre *Lasiodiplodia theobromae*.

Las seis cepas preseleccionadas para evaluar antagonismo contra *L. theobromae* sí presentaron actividad, observándose que el crecimiento del patógeno cesa cuando entra en contacto con las *Trichoderma* spp.

En Fig. 27 a) se tiene el control del patógeno, en b) se confronta *T. harzianum* (Peumo) y *L. theobromae* observándose una mayor predominancia del crecimiento del patógeno en la placa Petri, además, de coloración y una barrera de defensa entre ambas cepas, mientras que en c) se observa un crecimiento proporcional de *T. asperellum* (Boldo) y *L. theobromae* con la presencia de barrera de defensa y coloración en el medio de cultivo.

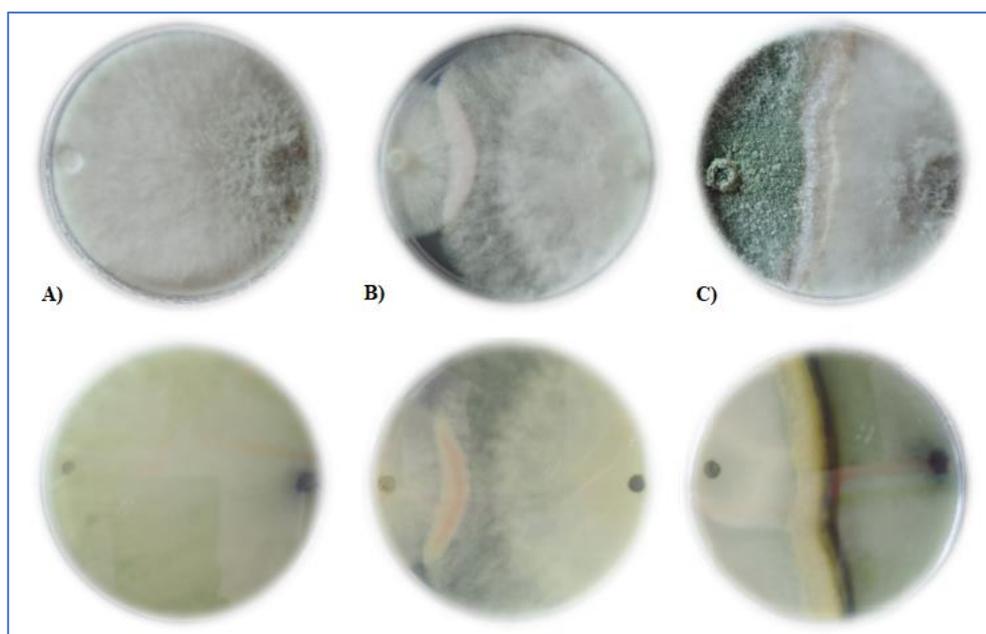


Fig. 27. Antagonismo de las cepas de *Trichoderma* spp. contra *Lasiodiplodia theobromae*. A) Control *L. theobromae*. B) *T. harzianum* (Peumo) vs *L. theobromae*, al reverso de la placa se observa coloración en barrera de defensa. C) *T. asperellum* (Boldo) vs *L. theobromae*, al reverso de la placa se observa barrera de defensa y coloración.

En la Tabla 6 se presenta el diámetro de crecimiento del patógeno a los 5 días de realizado el ensayo con diferencias significativas respecto al control ( $P < 0,05$ ), mientras que solo *Trichoderma asperellum* (Boldo) presenta un porcentaje de inhibición mayor al 50%.

Tabla 6. Crecimiento micelial de *L. theobromae* frente cepas de *Trichoderma* spp. y porcentaje de inhibición micelial a 5 días del ensayo.

Cepa Fúngica	Diámetro [mm] <i>L. theobromae</i>	Inhibición micelial [%]
<i>T. harzianum</i> (Peumo)	54,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	36,8
<i>T. asperellum</i> (Boldo)	41,7 ± 0,2 <sup>d</sup>	51,5
<i>T. asperellum</i> (Lilén)	43,7 ± 0,2 <sup>d</sup>	49,2
<i>T. asperellum</i> (Naranjillo)	53,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	37,5
<i>T. asperellum</i> (Peumo)	46,7 ± 0,2 <sup>c</sup>	45,7
<i>T. asperellum</i> (Quillay)	52,0 ± 0,2 <sup>b</sup>	39,5
<b>Control</b>	86,0 ± 0 <sup>a</sup>	0

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

En Anexo B se presenta el análisis de varianza y la Prueba de Múltiples Rangos.

Finalmente, se seleccionan 3 cepas para formar el consorcio que será inoculado en los téis de compost de flora nativa: *Trichoderma harzianum* (Lilén) que si bien presenta el porcentaje de inhibición frente a *L. theobromae* más bajo, es necesaria para generar la incompatibilidad interespecífica con las otras dos cepas seleccionadas que fueron *Trichoderma asperellum* aisladas de Boldo y Lilén respectivamente, las cuales presentan la mayor inhibición frente al patógeno, generando barreras de defensa entre ellas (incompatibilidad intraespecífica) y coloración en el medio de cultivo frente a *T. harzianum*.

### 5.6 Inoculación de té de compost de flora nativa con *Trichoderma* spp.

En la Tabla 7 se presenta la concentración inicial de esporas por mililitro para las 3 cepas seleccionadas, la cual fue obtenida mediante el recuento en la cámara de Neubauer como se aprecia en la Fig. 28.

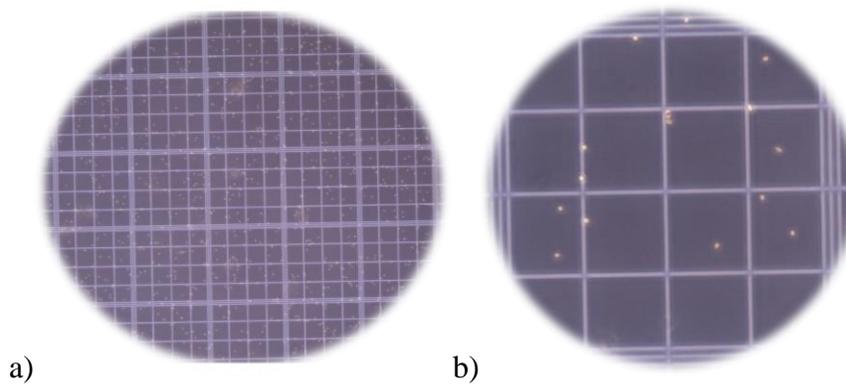


Fig. 28. Recuento de esporas en cámara Neubauer. En a) se presenta el cuadrante secundario central bajo el aumento 10x del microscopio. En b) se presenta un cuadrante bajo el aumento 40x del microscopio.

Además, se presenta el volumen que debe ser inoculado en el té a fin de obtener la concentración deseada de  $5 \cdot 10^4$  [esporas/ml] (Siddiqui, et al., 2007) en los 300 [mL] de los diversos téis de compost preparados.

Tabla 7. Recuento de esporas de *Trichoderma* en cámara de Neubauer e inóculo usado en té de compost.

Cepa	Concentración inicial [Esporas / ml]	Inóculo [μL]	Concentración final [Esporas / ml]
<i>T. harzianum</i> (Peumo)	$4,59 \cdot 10^6$	1300	$2,0 \cdot 10^4$
<i>T. asperellum</i> (Boldo)	$7,13 \cdot 10^6$	630	$1,5 \cdot 10^4$
<i>T. asperellum</i> (Lilén)	$7,66 \cdot 10^6$	585	$1,5 \cdot 10^4$

Para la preparación del té de compost de flora nativa inoculado con cepas de *Trichoderma* spp. se procede a realizar el procedimiento descrito en el inciso 4.2.1 con la diferencia que la cepa de *Trichoderma harzianum* (Peumo) es agregada pasada las 24 [h] de elaboración en una concentración de  $2 \cdot 10^4$ [esporas/ml], mientras que las *Trichoderma asperellum* son agregadas al tercer día a una concentración de  $1,5 \cdot 10^4$ [esporas/ml] por cada cepa. La cepa de *Trichoderma harzianum* es inoculada antes, ya que tarda más en crecer y esporular que *T. asperellum*. Al quinto día se detiene la incubación del té y se procede a realizar el ensayo directo con los patógenos. Se realiza recuento de microorganismos y se compara con el obtenido en los tés de compost de flora nativa sin inocular al quinto día, observándose en general una disminución de hongos filamentosos y de bacterias heterótrofas totales como se aprecia en la Fig. 29 y 30 respectivamente, siendo estas diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). En Anexo B se presenta el análisis de varianza y la Prueba de Múltiples Rangos.

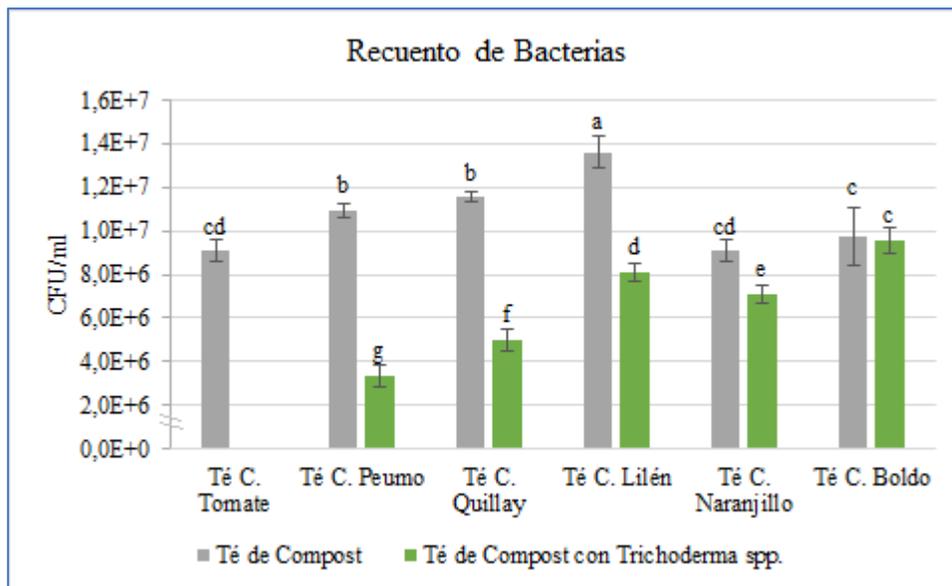


Fig. 29. Comparación de recuento de bacterias heterótrofas totales entre los diversos té de compost y té de compost con *Trichoderma* spp.

\*Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

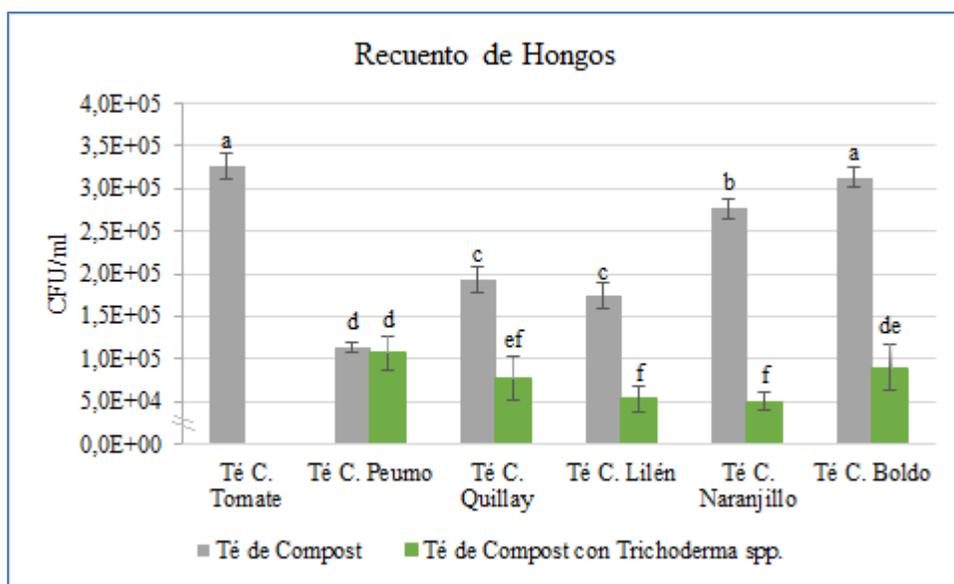


Fig. 30. Comparación de recuento de hongos filamentosos entre los diversos té de compost y té de compost con *Trichoderma* spp.  
 \*Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

La disminución de microorganismos en los tés de compost inoculados con *Trichoderma* spp. puede deberse al efecto antagonista que tiene el hongo frente a los otros microorganismos patógenos, ya sea por competencia de nutrientes o espacio, antibiosis y/o micoparasitismo.

### 5.7 Efecto de té de compost de flora nativa con y sin inoculación de *Trichoderma* spp. sobre cepas fúngicas patógenas.

- ***Botrytis cinerea*:**

En la Tabla 8 se tiene que la inoculación del consorcio de *Trichoderma* spp. a los tés de compost de flora nativa mejora el efecto supresor sobre el crecimiento del patógeno *Botrytis cinerea*, teniéndose un RG (crecimiento relativo) menor al 50% (valor de referencia para determinar un alto efecto supresor) (Morales, et al., 2017), el cual mejora significativamente para el té de Peumo y Naranjillo que presentaban un RG de 51,9% y 60,2% (bajo efecto supresor) cuando no estaban inoculados. En cuanto al diámetro de crecimiento del patógeno desde el segundo día de incubación es posible observar efectos inhibitorios de parte de la mayoría de los tés de compost (con y sin

inoculación) en comparación al control, menos para los té de compost no inoculados de Lilén, Peumo y Naranjillo, con los cuales no se tienen diferencias significativas. Al cabo del día 7 y 14 de incubación se observa un mayor efecto sobre el diámetro de crecimiento del patógeno en todos los tratamientos y con diferencias significativas respecto al control.

Tabla 8. Porcentaje de crecimiento relativo (RG) y diámetro de crecimiento de *Botrytis cinérea* bajo tratamiento de té de compost de flora nativa con y sin inoculación de *Trichoderma* spp.

Patógeno	Té de Compost	RG %	Día 2 [mm]	Día 7 [mm]	Día 14 [mm]
<i>Botrytis cinerea</i>	Boldo	16,3	5,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	11,0 ± 2,2 <sup>b</sup>	13,6 ± 3,2 <sup>bc</sup>
	Boldo Inoculado	10,8	5,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	9,0 ± 1,2 <sup>a</sup>
	Lilén	16,6	6,8 ± 0,5 <sup>cd</sup>	14,2 ± 0,9 <sup>c</sup>	13,8 ± 1,3 <sup>bc</sup>
	Lilén Inoculado	9,0	5,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	8,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	7,5 ± 0,6 <sup>a</sup>
	Naranjillo	60,2	6,9 ± 0,5 <sup>cd</sup>	54,9 ± 2,5 <sup>e</sup>	50,1 ± 5,7 <sup>d</sup>
	Naranjillo Inoculado	11,1	6,6 ± 0,2 <sup>cb</sup>	9,0 ± 0,5 <sup>ab</sup>	9,2 ± 1,0 <sup>a</sup>
	Peumo	51,9	7,1 ± 0,1 <sup>cd</sup>	41,5 ± 2,8 <sup>d</sup>	43,2 ± 4,1 <sup>e</sup>
	Peumo Inoculado	13,6	5,9 ± 0,6 <sup>a</sup>	9,8 ± 0,7 <sup>ab</sup>	11,3 ± 1,6 <sup>ab</sup>
	Quillay	18,7	6,0 ± 0,3 <sup>ab</sup>	13,6 ± 0,6 <sup>c</sup>	15,6 ± 1,9 <sup>c</sup>
	Quillay Inoculado	11,7	5,9 ± 0,6 <sup>a</sup>	8,7 ± 1,7 <sup>ab</sup>	9,7 ± 0,8 <sup>ab</sup>
Residuos de Tomate	11,1	5,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	8,8 ± 3,1 <sup>ab</sup>	9,2 ± 3,0 <sup>a</sup>	
Control		100	7,2 ± 0,7 <sup>d</sup>	52,4 ± 4,6 <sup>f</sup>	83,3 ± 3,5 <sup>f</sup>

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).

En la Fig. 31 se tiene que el consorcio de *Trichoderma* spp. inoculado aumenta la inhibición del crecimiento micelial del patógeno en todos los té de compost de flora nativa de manera significativa, en especial para el Té de Peumo y Naranjillo, alcanzándose inhibiciones del crecimiento micelial entorno al 90%. Respecto al té de compost comercial, correspondiente al té de residuos de tomate, se tiene que los otros té difieren significativamente de éste cuando no están inoculados, mientras que presenta porcentajes de inhibición similares y sin diferencias significativas con los té de compost inoculados.

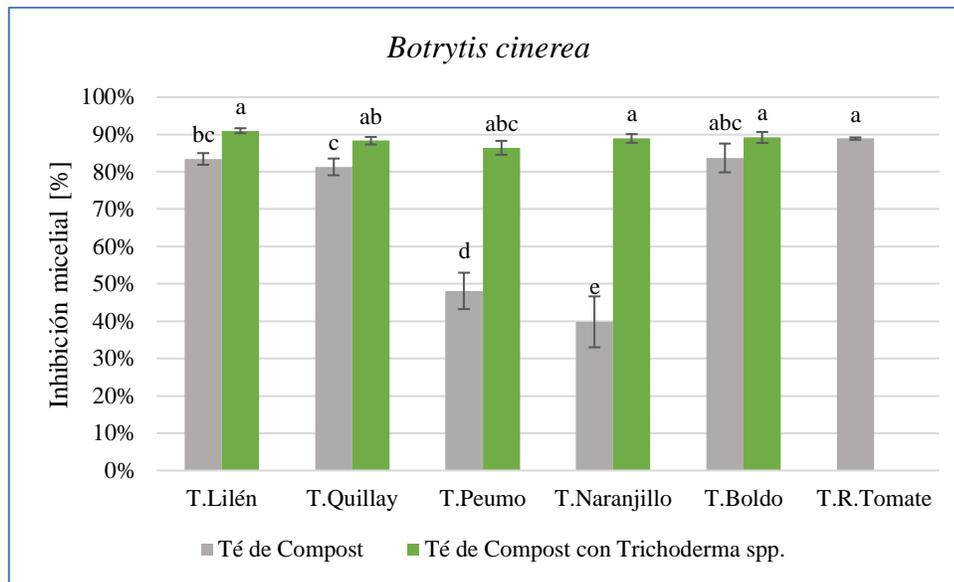


Fig. 31. Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de los diferentes tratamientos sobre *Botrytis cinerea*.

\*Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).

- ***Fusarium oxysporum*:**

En la Tabla 9 se tiene que la inoculación del consorcio de *Trichoderma* spp. a los té de compost de flora nativa mejora significativamente el efecto supresor sobre el crecimiento del patógeno *Fusarium oxysporum*, teniéndose un crecimiento relativo (RG) menor al 50% al igual que en los té de compost sin inocular. En cuanto al diámetro de crecimiento del patógeno, para el segundo día en las placas de los distintos té de compost de flora nativa ya es posible apreciar un efecto inhibitorio respecto al crecimiento del patógeno control, efecto inhibitorio que es más notorio a los 7 y 14 días del ensayo y con diferencias significativas entre un tratamiento y otro.

Tabla 9. Porcentaje de crecimiento relativo (RG) y diámetro de crecimiento de *Fusarium oxysporum* bajo tratamiento de té de compost de flora nativa con y sin inoculación de *Trichoderma* spp

Patógeno	Té de Compost	RG %	Día 2 [mm]	Día 7 [mm]	Día 14 [mm]
<i>Fusarium oxysporum</i>	Boldo	24,1	11,2 ± 0,8 <sup>b</sup>	14,3 ± 2,2 <sup>c</sup>	19,6 ± 2,3 <sup>cd</sup>
	Boldo Inoculado	14,0	10,5 ± 0,3 <sup>ab</sup>	9,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	11,4 ± 1,6 <sup>a</sup>
	Lilén	28,2	9,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	13,1 ± 2,8 <sup>bc</sup>	23,0 ± 1,7 <sup>d</sup>
	Lilén Inoculado	14,5	9,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	10,3 ± 0,6 <sup>ab</sup>	11,8 ± 1,2 <sup>a</sup>
	Naranjillo	44,9	13,8 ± 1,0 <sup>c</sup>	24,7 ± 3,2 <sup>e</sup>	36,5 ± 2,6 <sup>f</sup>
	Naranjillo Inoculado	16,6	9,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	14,0 ± 0,8 <sup>c</sup>	13,5 ± 2,0 <sup>ab</sup>
	Peumo	34,3	16,2 ± 1,8 <sup>d</sup>	18,1 ± 3,2 <sup>d</sup>	27,9 ± 3,3 <sup>e</sup>
	Peumo Inoculado	15,6	15,9 ± 0,6 <sup>d</sup>	14,6 ± 1,6 <sup>c</sup>	12,7 ± 2,4 <sup>a</sup>
	Quillay	21,0	12,7 ± 1,3 <sup>c</sup>	14,7 ± 0,5 <sup>c</sup>	17,1 ± 4,5 <sup>bc</sup>
	Quillay Inoculado	13,7	15,3 ± 0,6 <sup>d</sup>	16,0 ± 1,2 <sup>cd</sup>	11,1 ± 0,7 <sup>a</sup>
Residuos de Tomate	36,0	9,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	18,2 ± 3,1 <sup>d</sup>	29,2 ± 3,7 <sup>e</sup>	
Control		100,0	20,3 ± 0,9 <sup>e</sup>	57,7 ± 11,2 <sup>f</sup>	81,3 ± 5,2 <sup>g</sup>

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).

En la Fig. 32 se observa que el consorcio inoculado aumenta la inhibición del crecimiento micelial del patógeno en todos los té de compost de flora nativa cercano a un 85% y con diferencias significativas (P<0,05) en comparación a los té de compost sin inocular y compost comercial (residuos de tomate).

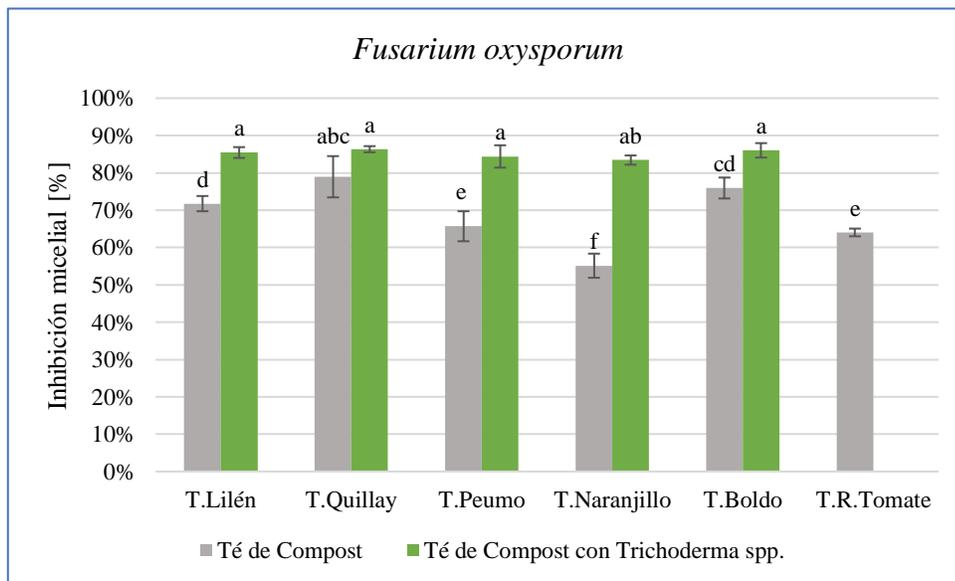


Fig. 32. Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de los diferentes tratamientos sobre *Fusarium oxysporum*.

\*Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).

- ***Lasiodiplodia theobromae*:**

En la Tabla 10 se indica que la inoculación del consorcio de *Trichoderma* spp. a los té de compost de flora nativa mejora significativamente el efecto supresor sobre el crecimiento del patógeno *Lasiodiplodia theobromae*, presentando valores de un crecimiento relativo (RG) menor al 50% en 4 de los 5 té de compost inoculado, existiendo diferencias significativas con los té de compost no inoculados, los cuales presentan un bajo efecto supresor al tener un crecimiento relativo mayor al 50%. En cuanto al diámetro de crecimiento del patógeno para el segundo día ya es posible apreciar un efecto inhibitorio de los té de compost con diferencias significativas respecto al control, mientras que para los días 7 y 14 del ensayo se tiene un efecto inhibitorio mayor por los té de compost inoculados, no así los no inoculados, donde el té de Peumo, Naranjillo y Quillay no presentan un efecto significativo sobre el crecimiento *L. theobromae* comparado con el control.

**Tabla 10. Porcentaje de crecimiento relativo (RG) y diámetro de crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* bajo tratamiento de té de compost de flora nativa con y sin inoculación de *Trichoderma* spp**

Patógeno	Té de Compost	RG %	Día 2 [mm]	Día 7 [mm]	Día 14 [mm]
<b><i>Lasiodiplodia theobromae</i></b>	Boldo	62,7	30,4 ± 0,8 <sup>b</sup>	58,1 ± 2,4 <sup>e</sup>	53,9 ± 10,0 <sup>cd</sup>
	Boldo Inoculado	31,5	30,2 ± 1,0 <sup>b</sup>	26,7 ± 1,7 <sup>ab</sup>	27,1 ± 0,8 <sup>a</sup>
	Lilén	69,0	34,8 ± 1,4 <sup>c</sup>	48,1 ± 7,2 <sup>d</sup>	59,4 ± 13,5 <sup>d</sup>
	Lilén Inoculado	54,6	33,4 ± 2,7 <sup>bc</sup>	42,8 ± 1,7 <sup>cd</sup>	45,0 ± 3,5 <sup>bc</sup>
	Naranjillo	95,8	39,4 ± 0,9 <sup>d</sup>	79,6 ± 0,6 <sup>fg</sup>	82,4 ± 3,6 <sup>e</sup>
	Naranjillo Inoculado	49,4	39,5 ± 4,1 <sup>d</sup>	35,7 ± 3,3 <sup>bc</sup>	42,5 ± 1,7 <sup>b</sup>
	Peumo	99,6	46,9 ± 0,9 <sup>e</sup>	81,9 ± 1,3 <sup>fg</sup>	85,7 ± 0,6 <sup>e</sup>
	Peumo Inoculado	48,8	45,2 ± 2,9 <sup>e</sup>	43,3 ± 1,7 <sup>d</sup>	42,0 ± 3,2 <sup>b</sup>
	Quillay	94,6	46,7 ± 1,4 <sup>e</sup>	76,5 ± 5,0 <sup>f</sup>	81,4 ± 1,5 <sup>e</sup>
	Quillay Inoculado	45,6	44,2 ± 2,8 <sup>e</sup>	44,0 ± 6,5 <sup>d</sup>	39,2 ± 1,7 <sup>b</sup>
Residuos de Tomate	53,6	24,1 ± 1,5 <sup>a</sup>	32,9 ± 9,3 <sup>a</sup>	46,1 ± 13,0 <sup>bc</sup>	
Control		100,0	57,5 ± 1,8 <sup>f</sup>	86,0 ± 0 <sup>g</sup>	86,0 ± 0 <sup>e</sup>

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).

En la Fig. 33 se observa que el consorcio de *Trichoderma* spp. inoculado aumenta la inhibición del crecimiento micelial del patógeno cercana al 50% en todos los té de compost de flora nativa significativamente (P<0,05). Respecto al té de compost

comercial, se tiene que los otros tés (inoculados y no) difieren significativamente de éste, ya sea por un mayor o menor efecto supresor sobre *L. theobromae*.

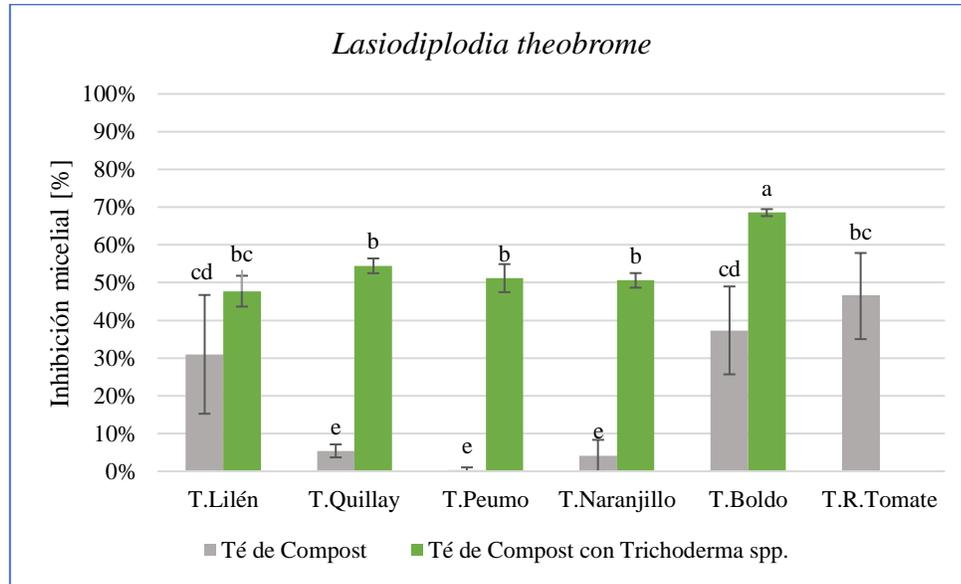


Fig. 33. Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de los diferentes tratamientos sobre *Lasiodiplodia theobromae*

\*Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

De los resultados obtenidos para las tres cepas de patógenos fúngicos se puede observar que la inoculación de un consorcio de *Trichoderma* spp. al té de compost mejora significativamente el efecto supresor de este sobre el crecimiento micelial de los patógenos, destacando el té de Boldo inoculado al presentar un mayor efecto de inhibición cercano al 70% para el patógeno *L. theobromae*, el cual como se mencionó en el ensayo de confrontación preliminar, presenta una velocidad de crecimiento muy alta en comparación a los otros patógenos, tal como se puede observar en la Fig. 34 correspondiente al crecimiento micelial medido en el control de cada patógeno:

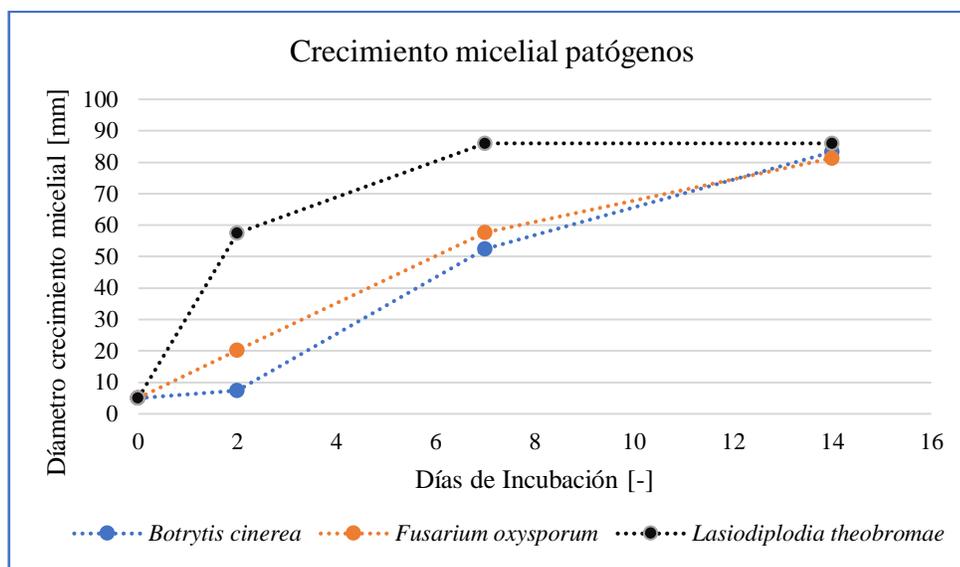


Fig. 34. Crecimiento micelial de los patógenos a los 2, 7 y 14 días de incubación.

En el siguiente cuadro se presenta un resumen con los resultados de inhibición obtenidos en este ensayo para los téis de compost con y sin inoculación del consorcio de *Trichoderma* spp.:

Tabla 11. Resumen de resultados de inhibición micelial en patógenos

Té de Compost	Inhibición sin inoculación			Inhibición con inoculación		
	B	F	L	B	F	L
<b>Boldo</b>	84%	76%	37%	89%	86%	69%
<b>Lilén</b>	83%	72%	31%	91%	85%	48%
<b>Naranjillo</b>	40%	55%	4%	89%	83%	51%
<b>Peumo</b>	48%	66%	0%	86%	84%	51%
<b>Quillay</b>	81%	79%	5%	88%	86%	54%
<b>Residuos de tomate</b>	89%	64%	46%	[-]	[-]	[-]

\* B: *Botrytis cinerea*. – F: *Fusarium oxysporum*. – L: *Lasiodiplodia theobromae*

En el Anexo D se encuentran imágenes con los resultados obtenidos del ensayo.

Los respectivos análisis de varianza (ANOVA) y Prueba de Múltiples Rangos se presentan en el Anexo B

Finalmente, en Fig. 35 se presenta un esquema que resume la metodología realizada para el té de compost inoculado, lo que estaría ocurriendo en el té al momento de la inoculación y lo que se observó como resultado debido a ella, es decir, al momento de inocular la cepa de *Trichoderma harzianum* y luego las 2 cepas de *Trichoderma asperellum* debiese haber ocurrido en el té un efecto antagonista (competencia, antibiosis o micoparasitismo) ya que se observó una disminución en la carga microbiana respecto de los té de compost sin inoculación. A su vez, la presencia del consorcio de *Trichoderma* spp. aumentó el efecto antagonista de los té, lo cual se atribuye a la capacidad biocontroladora que posee el hongo y a la interacción entre ellos, ya sea por una incompatibilidad interespecífica (distintas especies) o intraespecífica (misma especie).

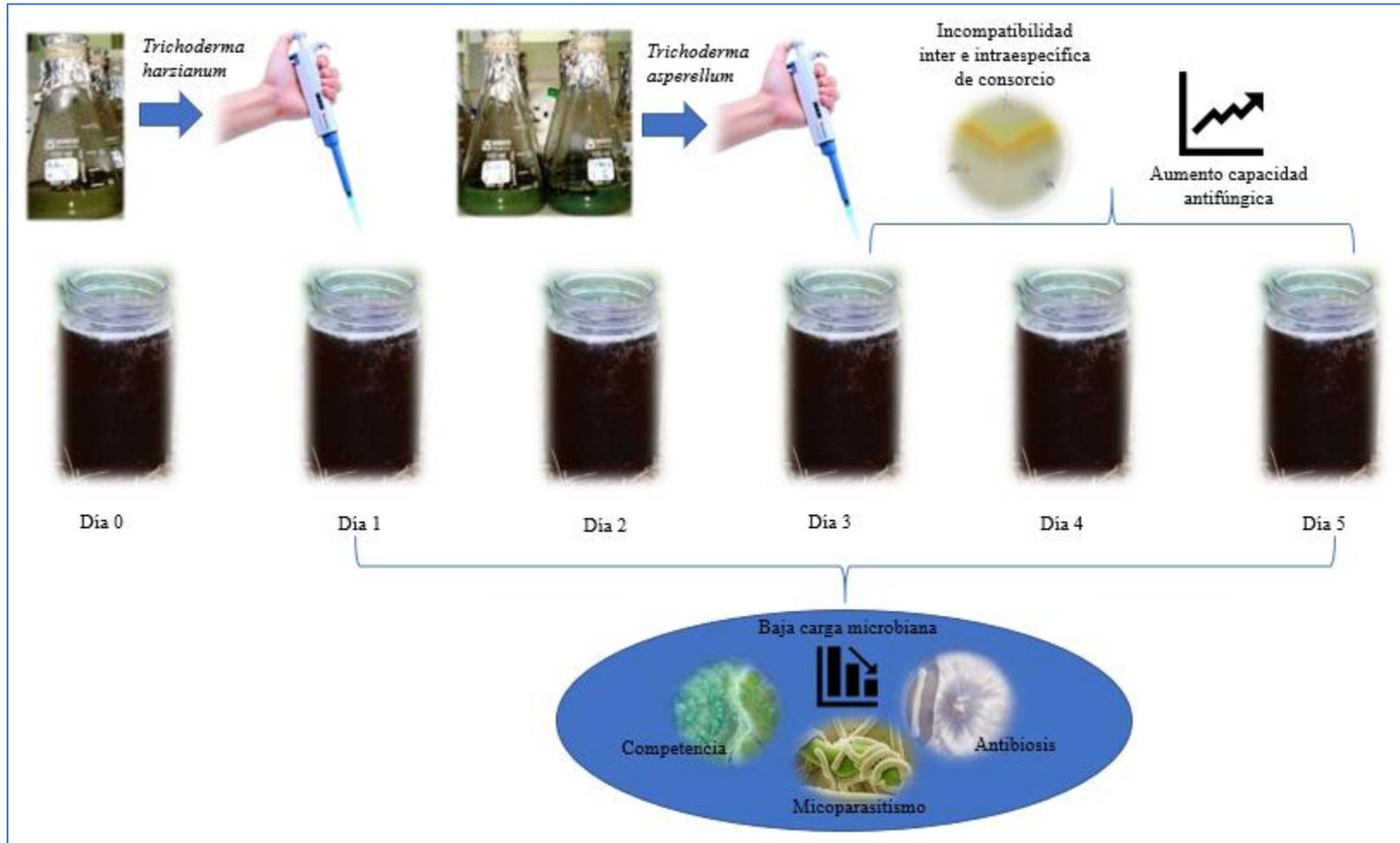


Fig. 35. Esquema resumen de inoculación de consorcio de *Trichoderma* spp. a tés de compost de flora nativa, posibles efectos y resultados vistos debido a la inoculación.

## 6. Discusión.

Del análisis físico – químico realizado a los téis de compost se tiene que las principales diferencias de los distintos parámetros medidos se puede atribuir a la naturaleza de los compost analizados, puesto que el compost de residuos de tomate es un compost comercial que ha pasado por todo el proceso de compostaje (sistema industrializado de conversión de los residuos orgánicos en fertilizantes) con el fin de obtener un producto rico en materia orgánica, nutrientes y de alta actividad microbiana, mientras que los de flora nativa corresponden a un “compost natural” donde no existe un proceso de compostaje que potencie la actividad microbiana y, por ende, el enriquecimiento con micro y macro nutrientes. Esto también se ve reflejado en la relación C/N, ya que al ser mayor en el compost de flora nativa indica que tienen más cantidad de carbono y energía que el compost comercial, lo cual implica una baja actividad de parte de los microorganismos en la descomposición de la materia orgánica y, por ende, un menor aporte de macro nutrientes (nitrógeno, fósforo y potasio).

En cuanto al recuento de microorganismos se observaron diferencias significativas entre los distintos compost utilizados, lo cual después se ve reflejado en la capacidad inhibitoria que tienen sobre los patógenos fúngicos. Además, no solo se observan diferencias en cuanto a la carga microbiana, sino que también en diversidad, sobre todo en hongos filamentosos, donde los compost de flora nativa poseen una mayor diversidad en comparación con el compost comercial, sin embargo, dentro de esta diversidad pudiesen encontrarse hongos patógenos que en el compost comercial no están o se encuentran en una muy baja concentración, ya que este último es sometido a una etapa donde la temperatura alcanza entre 60 – 70 [°C] sobreviviendo microorganismos benéficos y una concentración mínima de patógenos en forma de estructuras de resistencias como son las esporas en los hongos. Esto además explicaría el por qué al inocular los téis de compost de flora nativa con el consorcio de *Trichoderma* spp. la carga microbiana disminuye, ya que al ser un hongo biocontrolador y biológicamente adaptado para una colonización agresiva de los sustratos, ejerce un efecto antagonista sobre el crecimiento de los patógenos ya sea por competencia, antibiosis o micoparasitismo (Holguín & Mora, 2009).

Dentro de la diversidad de hongos presentes en los recuentos de los distintos té de compost de flora nativa fue posible aislar 11 cepas nativas de *Trichoderma* spp. siendo 9 de ellas secuenciadas e identificándose 5 cepas de *T. asperellum*, 3 cepas de *T. harzianum* y 1 cepa de *T. paraviridescens*. Al evaluar la incompatibilidad entre las cepas nativas de *Trichoderma* spp. se observó que la cepa de *T. harzianum* (Peumo) tuvo una mayor incompatibilidad interespecífica con *T. asperellum* (Boldo) al presentar los criterios establecidos: crecimiento proporcional (50%) en la placa Petri, formación de barrera de defensa y antibiosis mediante la coloración del medio de cultivo (Moo Koh, et al., 2018). Considerando esto, se destacan 6 cepas para formar el consorcio inoculado al té de compost. En dicho consorcio debe estar presente *T. harzianum* (Peumo), ya que es la cepa que genera la incompatibilidad interespecífica con mayor frecuencia en los ensayos duales, lo que es importante a considerar puesto que varias investigaciones han indicado que el efecto de control es mayor cuando se aplican consorcios de microorganismos y que al interactuar entre sí pueden demostrar un comportamiento antagónico que incluso puede ampliar el rango de control de patógenos. (Moo Koh, et al., 2018).

Luego, las cepas aisladas de *Trichoderma* spp. son confrontadas con los patógenos *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *L. theobromae*, observándose que 8 cepas afectaban el crecimiento del patógeno, correspondiente a las especies *T. harzianum* y *T. asperellum*, las cuales han demostrado efectividad antagónica sobre *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Lasiodiplodia theobromae* (Gaitán, et al., 2014; Holguín & Mora, 2009; Bhadra, et al., 2014). Además, se realiza un segundo ensayo de antagonismo con el patógeno *Lasiodiplodia theobromae*, el cual presenta una alta velocidad de crecimiento comparada a los otros patógenos llegando incluso a ser altamente competitivo con *Trichoderma* spp., lo cual se refleja con los resultados obtenidos donde, en general, el crecimiento del patógeno es mayor que el de *Trichoderma* spp., salvo para *T. asperellum* (Boldo) que presenta una inhibición del 51,5% y de *T. asperellum* (Lilén) con un porcentaje de inhibición del 49,2% en las cuales, además, fue posible observar un mecanismo de competencia y antibiosis (coloración del medio de cultivo en la zona

del cordón de barrera). Teniendo en cuenta este ensayo y el de incompatibilidad, se definen las 3 cepas que forman el consorcio: *T. harzianum* (Peumo), *T. asperellum* (Boldo) y *T. asperellum* (Lilén), las que fueron inoculadas a los tés de compost de flora nativa a una concentración inicial de  $2 \cdot 10^4$ ,  $1,5 \cdot 10^4$  y  $1,5 \cdot 10^4$  [esporas/ml], respectivamente. La inoculación se realizó en distintos tiempos dado que la cepa de *T. harzianum* (Lilén) presenta un menor porcentaje de inhibición contra *L. theobromae* en comparación a *T. asperellum*.

En el ensayo final de este trabajo se evaluó *in vitro* el efecto directo de los tés de compost de flora nativa sobre los patógenos con y sin la inoculación del consorcio de *Trichoderma* spp., observándose que el efecto supresor del té aumenta significativamente al inocular *Trichoderma* spp., destacando el Té de Boldo donde se alcanza un porcentajes de inhibición del 89,2% para *F. oxysporum*, 86% para *B. cinerea* y 68,5% en *L. theobromae*, siendo la inhibición más alta de éste último entre los distintos tés de flora nativa evaluados. Siddiqui et al. (2007) reporta que la efectividad de los tés de compost sin inoculación es menor que los inoculados con *Trichoderma harzianum* frente al patógeno *Choanephora cucurbitarum*, atribuyendo esta diferencia al resultado de la interacción que puede existir entre el antagonista (*Trichoderma* spp.) y las características físico – químicas y microbiológicas del té de compost como tal. Por ende, en este estudio se puede concluir que el aumento del efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los patógenos se debe a la inoculación del consorcio de *Trichoderma* spp., cepas que entre sí ya poseen una incompatibilidad interespecífica y que puede verse potenciada con la interacción de los microorganismos propios del té de compost, así como de los metabolitos y nutrientes presentes.

Los resultados obtenidos en esta investigación son interesantes ya que presentan una gran oportunidad para el desarrollo de un bioinsumo que pueda sustituir y/o complementar el uso de los pesticidas sintéticos en la industria de la agricultura, los cuales han ocasionado que varios microorganismos desarrollen resistencia a estos productos además de causar daño al medio ambiente. Ante ello, este estudio representa una primera etapa en la cual se verifica *in vitro* el efecto antagonista de los tés de compost de flora nativa sobre patógenos fúngicos y como éste mejora al inocularlo con

cepas nativas de *Trichoderma* spp., proporcionando así una base para futuras pruebas *in vivo* y posterior optimización del proceso productivo, las cuales de llevarse a cabo y con éxito, representarían una gran oportunidad para ofrecer en un futuro a la industria de la agricultura una alternativa segura, con bajo impacto ambiental y de buen control de calidad.

## 7. Conclusiones y Recomendaciones

Del presente trabajo se concluye que la hipótesis planteada al inicio es aceptada, demostrándose que la inoculación de un consorcio de cepas nativas de *Trichoderma* spp. mejora de manera significativa el efecto supresor de los té de compost de flora nativa, destacando en ello el té de compost de Boldo al alcanzar una inhibición del crecimiento micelial del 68,5% para *L. theobromae*, 86% para *F. oxysporum* y 89,2% para *B. cinerea*.

De los objetivos planteados se tiene que las principales diferencias en cuanto a las características físico – químicas de los compost y microbiológicas de los té de compost de flora nativa y control, se deben a que este último es el resultado de un proceso industrial de compostaje que tiene como fin producir un producto rico en macro y micronutrientes y con alta actividad microbiana benéfica, a diferencia de la flora nativa que proviene de un compostaje natural y en el cual dentro de los microorganismos pueden haber incluso patógenos. Dentro de la diversidad de hongos presentes en los té de flora nativa fue posible aislar, secuenciar y seleccionar tres cepas nativas biocontroladoras: una de *Trichoderma harzianum* (Peumo) y dos de *Trichoderma asperellum* (Boldo y Lilén), las cuales presentaron incompatibilidad inter e intraespecífica y mejoraron el efecto antagonista de los té de compost de flora nativa sobre los patógenos evaluados. Tras la inoculación del consorcio se observó una disminución en la carga microbiana de los té de flora nativa, lo que confirmaría la presencia de cepas patógenas que fueron inhibidas por la presencia de *Trichoderma* spp. ya sea por competencia, micoparasitismo y/o antibiosis.

Finalmente, con los resultados obtenidos, el té de compost de Boldo inoculado con cepas nativas de *Trichoderma* spp. podría ser una alternativa de bioinsumo utilizado como medida de control ecológica en la agricultura, yendo de la mano con el actual desarrollo de una agricultura orgánica y amigable con el medio ambiente.

A modo de recomendación, se sugiere validar los resultados de antagonismo del té de compost de Boldo inoculado con cepas nativas de *Trichoderma* spp. con ensayos *in vivo*, además de evaluar el efecto sobre el crecimiento de la planta a la cual se aplique,

así como también la vida útil del té y las condiciones de almacenamiento que debiese tener. Pues de obtenerse buenos resultados, la factibilidad de formular un té de compost de Boldo inoculado con cepas nativas de *Trichoderma* spp. presenta una gran oportunidad, primero porque el género *Trichoderma* spp. es de fácil aislamiento, cultivo y rápido desarrollo en varios sustratos; y segundo porque el mercado de bioinsumos presenta una tasa de crecimiento anual de un 15% frente a un 2% de los pesticidas sintéticos, acompañado de la creciente cultura orgánica en productores quienes, si bien incurren en la elaboración de sus propios té, no cuentan con una investigación de laboratorio que respalde y certifique la calidad e inocuidad de lo que están aplicando a sus cultivos, respaldo y certificación que si se entregaría con la formulación del té de compost de Boldo inoculado con cepas nativas de *Trichoderma* spp.

## 8. Referencias

- Agrios, G., 2005. *Plant Pathology 5th Edition*. New York: Elsevier Academic Press.
- Agromática, 2017. *Agricultorers*. [En línea] Available at: <http://agriculturers.com/que-funcion-tienen-las-trichodermas-en-agricultura/>
- Aguilar, S. y otros, 2012. Actividad insecticida del polvo de *Peumus boldus*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, pp. 420-430.
- Al-Dahmani, J., Abbasi, P., Miller, S. & Hoitink, H., 2003. Suppression of bacterial spot of tomato with foliar sprays of. *Plant Disease Vol 87*, pp. 913-919.
- Apablaza, G., Díaz, M., San Martín, R. & Moya, E., 2002. Control de oidio de las cucurbitáceas con. *Ciencia e Investigación Agraria*, pp. 83-90.
- Avance Biotechnologies, 2017. *Red Agrícola*. [En línea] Available at: <http://www.redagricola.com/cl/avance-biotechnologies-controlar-botrytis-cinerea-fase-latencia/>
- Avello, M. y otros, 2012. Efectos antimicrobianos de extractos de plantas chilenas de las familias Lauraceae y Atherospermataceae. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, pp. 73-83.
- Barra, L., Millas, P. & Ortiz, J., 2014. *INIA*. [En línea] Available at: [http://www.endofitos.com/gallery/end\\_mecanismos\\_baja-ts1569545217.jpg](http://www.endofitos.com/gallery/end_mecanismos_baja-ts1569545217.jpg)
- Benedetti, S., 2012. *Productos forestales no madereros*. [En línea] Available at: [http://www.pfnm.cl/paqtecnologicos/peumo/monografia\\_peumo.pdf](http://www.pfnm.cl/paqtecnologicos/peumo/monografia_peumo.pdf)
- Benítez, T., Rincón, A., Limón, M. & Codón, A., 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, pp. 249-260.
- Benito, E., Arranz, M. & Eslava, A., 2000. Factores de Patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de Micología*, pp. 43-46.
- Bernal-Vicente, A., Ros, M. & Pascual, J., 2012. Inoculation from *Trichoderma harzianum*. *Bioresources*, pp. 1948-1960.
- Bhadra, M., Khair, A., Hossain, A. & Sikder, M., 2014. Efficacy of *Trichoderma* spp. and fungicides against *Lasiodiplodia theobromae*. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, pp. 125-130.
- Bittner, M. y otros, 2009. Fungistatic Activity Of Essential Oils Extracted from *Peumus boldus* Mol., *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde and *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul. (Chilean Monimiaceae). *Chilean Journal of Agricultural Research*, pp. 30-37.
- CER, 2016. *Centro de Investigación y Desarrollo Agrícola*. [En línea] Available at: Bioproductos para el control de hongos y bacterias: alternativas y usos como parte de un plan de manejo integrado
- Chile Flora, 2006. *Chile Flora*. [En línea] Available at: <http://www.chileflora.com/Florachilena/FloraSpanish/HighResPages/SH0419.htm>

- Chile Nativo, 2011. *Nuestro Chile Nativo*. [En línea] Available at: <http://nuestrochilenativo.blogspot.com/2011/09/el-senor-de-los-bosques-esclerofilos-el.html>
- Cliffs Notes, s.f. *Cliffs Notes*. [En línea] Available at: <https://www.cliffsnotes.com/study-guides/biology/microbiology/the-fungi/structure-and-physiology-of-fungi>
- Compostadores, 2017. *Compostadores*. [En línea] Available at: <http://www.compostadores.com/descubre-el-compostaje/la-cosecha-el-compost-casero/153-te-de-compost.html>
- Dean, R. y otros, 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, pp. 414-430.
- Diáñez, F. y otros, 2006. *Efecto supresor de los extractos acuosos del compost sobre la movilidad de zoosporad de Pythium y Phytophthora*. s.l., s.n.
- Diáñez, F. y otros, 2011. *Phytoma*. [En línea] Available at: <https://www.phytoma.com/images/tecnicasdecontrol.pdf>
- Donoso, E., Díaz, B. & Jiménez, M., 2011. *Estudio desarrollo tecnológico y adopción de insumos ecológicos: línea base 2010 y prospectiva*, s.l.: Fitonova Limitada.
- Donoso, E., Lobos, G. & Rojas, N., 2008. Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* en vivero. *Revista Bosque (Valdivia)*, pp. 52-57.
- Duery, L., 2003. *Clima de Emperdimiento Organizado*. [En línea] Available at: <http://www.ceo.cl/609/article-30909.html>
- EMA, 2009. *European Medicines Agency*. [En línea] Available at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/superseded-assessment-report-peumus-boldus-molina-folium\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/superseded-assessment-report-peumus-boldus-molina-folium_en.pdf)
- FAO, 2017. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. [En línea] Available at: <http://www.fao.org/news/story/en/item/469269/icode/>
- FAO, 2019. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. [En línea] Available at: <http://www.fao.org/news/story/en/item/1187738/icode/>
- Flores, W., Chico, J. & Cerna, L., 2015. Actividad antagonica in vitro de *Clonostachys rosea* sobre *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*. *Rebiol*, pp. 34-42.
- Fuentes, M., 2019. *Hemocytometer*. [En línea] Available at: <https://www.hemocytometer.org/hemocytometer-square-size/>
- Gaitán, J. B., Ferrucho, R. L. & Herrera, J. G., 2014. Efecto de dos cepas de *Trichoderma* en el control de *Botrytis cinerea* y la calidad del fruto en fresa (*Fragaria sp.*). *Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas*, pp. 44-56.
- Garrido, N. & Echeverría, C., s.f. *Ministerio del Medio Ambiente*. [En línea] Available at:

- [http://www.mma.gob.cl/clasificacionespecies/fichas12proceso/fichas/Citronella\\_mucronata\\_12RCE\\_PAC.pdf](http://www.mma.gob.cl/clasificacionespecies/fichas12proceso/fichas/Citronella_mucronata_12RCE_PAC.pdf)
- GEF, 2017. *Corredores biológicos de montaña*.
  - González, I., Arias, Y. & Peteira, B., 2012. Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* - Tomate. *Revista de Protección Vegetal*, pp. 1-7.
  - Harman, G. y otros, 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiol*, pp. 43-56.
  - Holguín, V. & Mora, J., 2009. Dinámica microbiana en vermicompostas comerciales con y sin inoculación del hongo *Trichoderma* spp.. *Revista Luna Azul ISSN*, pp. 25-31.
  - Huanca-Mamani, W., Salvatierra, R. & Sepúlveda, G., 2014. A fast and efficient method for total DNA extraction from soil filamentous fungi. *IDESIA*, pp. 75-78.
  - Infante, D., Martínez, B., González, N. & Reyes, Y., 2009. Mecanismo de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, pp. 14-21.
  - INFOR, INDAP, FIA, 2000. *Monografía de Quillay (Quillaja saponaria)*, s.l.: s.n.
  - Ingham, E. R., 2005. *The Compost Tea Brewing Manual*. Oregon: Soil Foodweb Incorporated.
  - INIA, 2015. *INIA*. [En línea] Available at: [http://www.inia.cl/wp-content/uploads/2015/08/2\\_cropcheck\\_arandanos.pdf](http://www.inia.cl/wp-content/uploads/2015/08/2_cropcheck_arandanos.pdf)
  - INIA, 2016. *Instituto de Investigaciones Agropecuarias*. [En línea] Available at: <http://www.inia.cl/sanidadvegetal/2016/11/08/moho-gris-botrytis-cinerea/>
  - INIA, s.f. *INIA*. [En línea] Available at: <http://biblioteca.inia.cl/medios/intihuasi/documentos/fitopatologia.pdf>
  - INN, 2015. *NCh 2880. Of2015: Compost - Requisitos de Calidad y clasificación*, s.l.: s.n.
  - Kan, J. & Veloso, J., 2018. Many shades of grey in Botrytis - Host plant interactions. *Trends in Plant Science*, pp. 613-622.
  - Kim, M. J. y otros, 2015. Effect of Aerated Compost Tea on the Growth Promotion of Lettuce, Soybean, and Sweet Corn in Organic Cultivation. *The Plant Pathology Journal*, pp. 259-268.
  - Martínez, M., Ortega, R. & Valdés, S., 2017. *Bioproductos en Chile: Un nuevo e interesante mercado*, s.l.: s.n.
  - Martínez, P. y otros, 2013. *Antagonismo in vitro de hongos endófitos frente a Fusarium circinatum*. España, s.n., pp. 2-10.
  - Martínez, R., 2018. Los peligros de los fertilizantes químicos. *Bioeco actual*, pp. 20-21.

- Mbarga, J. y otros, 2012. *Trichoderma asperellum*: A potential biocontrol agent for *Pythium myriotylum*, causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon. *Crop Protection*, pp. 18-22.
- Millas, P. & France, A., 2017. *Instituto de Investigaciones Agropecuarias*. [En línea] Available at: <http://www.inia.cl/wp-content/uploads/FichasTécnicasSanidadVegetal/Ficha%2073%20Marchitez%20vascular%20en%20tomate.pdf>
- Moo Koh, F. y otros, 2018. Incompatibilidad interespecífica de especies de *Trichoderma* contra *Meloidogyne incognita* en *Solanum lycopersicum*. *Scientia Fungorum*, pp. 37-45.
- Moore, D., Robson, G. D. & Trinci, A. P., 2019. *David Moore's World of Fungi*. [En línea] Available at: [http://www.davidmoore.org.uk/21st\\_Century\\_Guidebook\\_to\\_Fungi\\_PLATINUM/Ch14\\_01.htm](http://www.davidmoore.org.uk/21st_Century_Guidebook_to_Fungi_PLATINUM/Ch14_01.htm)
- Morales, M. R., Pérez, R. & Gómez, M. A., 2017. Efficiency of garden waste compost teas on tomato growth and its suppressiveness against soilborne pathogens. *Scientia Agricola*, pp. 400-409.
- Ogundana, S., 1983. Life cycle of *Botryodiplodia thebromae*, a soft rot pathogen of yam. *Journal Phytopathology*, pp. 204-213.
- PAR Explora Valparaíso, 2014. *PAR Explora Valparaíso Academias*. [En línea] Available at: <http://www.academiasexplora.cl/?p=3304>
- Pelah, D., Abramovich, Z., Markus, A. & Wiesman, Z., 2002. The use of commercial saponin from *Quillaja saponaria* bark as a natural larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Journal of Ethnopharmacology*, pp. 407-409.
- Picos, P. y otros, 2015. *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, pp. 54-74.
- Portal Frutícola, 2018. *Portal Frutícola*. [En línea] Available at: <https://www.portalfruticola.com/noticias/2018/10/17/importante-ahorro-en-agua-e-insumos-con-produccion-de-te-de-compost/>
- Rana, M., Singh, Y. & Singh Bisht, K., 2016. In vitro evaluation of essential oils, biocontrol agents and fungicides against *Colletotrichum graminicola* causing anthracnose of sorghum. *Journal of Environment and Bio-Sciences*, pp. 299-302.
- Red Agrícola, 2017. *Red Agrícola*. [En línea] Available at: <http://www.redagricola.com/cl/analisis-del-mercado-los-bioinsumos-cambios-la-industria-los-productos-biologicos/>
- Red Chilena de Bioinsumos, 2017. *Bioinsumos*. [En línea] Available at: <https://bioinsumos.cl/que-son/>

- Red Chilena de Bioinsumos, 2017. *Red Chilena de Bioinsumos*. [En línea] Available at: <https://bioinsumos.cl/que-son/>
- Renaloea, 2014. *Anmat*. [En línea] Available at: [http://www.anmat.gov.ar/renaloea/docs/Analisis\\_microbiologico\\_de\\_los\\_alimentos\\_Vol\\_III.pdf](http://www.anmat.gov.ar/renaloea/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_III.pdf)
- Román, P., Martínez, M. & Pantoja, A., 2013. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. [En línea] Available at: <http://www.fao.org/3/i3388s/I3388S.pdf>
- Ruiz, M., 2011. Efecto de Extractos acuosos del follaje de ocho especies arbóreas nativas de Chile en la capacidad infestiva de *Meloidogyne hapla* Chitwood (1949).. *Tesis Licenciado en Agronomía, Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. Escuela de Agronomía*, p. 65.
- Siddiqui, Y., Meon, S., Mohd, I. & Asgar, A., 2007. Trichoderma-fortified compost extracts for the control of choanephora wet rot in okra production. *Crop Protection*, pp. 385-390.
- Silimela, M. & Korsten, L., 2007. Evaluation of pre-harvest *Bacillus licheniformis* sprays to control mango fruit diseases. *Crop Protection*, pp. 1474-1481.
- Silva, G., Pizarro, D., Casals, P. & Berti, M., 2003. Evaluación de plantas medicinales en polvo para. *Rev. bras. Agrociência*, pp. 383-388.
- Vilella, F., 2019. *Agriculturers*. [En línea] Available at: <https://agriculturers.com/el-mercado-de-bioinsumos-para-el-agro-crece-a-tasas-del-15-anual/>
- Villamil, J., Blanco, J. & Viteri, S., 2012. Evaluación in vitro de Microorganismos Nativos por su Antagonismo contra *Moniliophthora roreri* Cif & Par en Cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, pp. 6305-6315.
- White, T., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*, pp. 315-322.

## 9. Anexos

### Anexo A: Recuento de Hongos Filamentosos

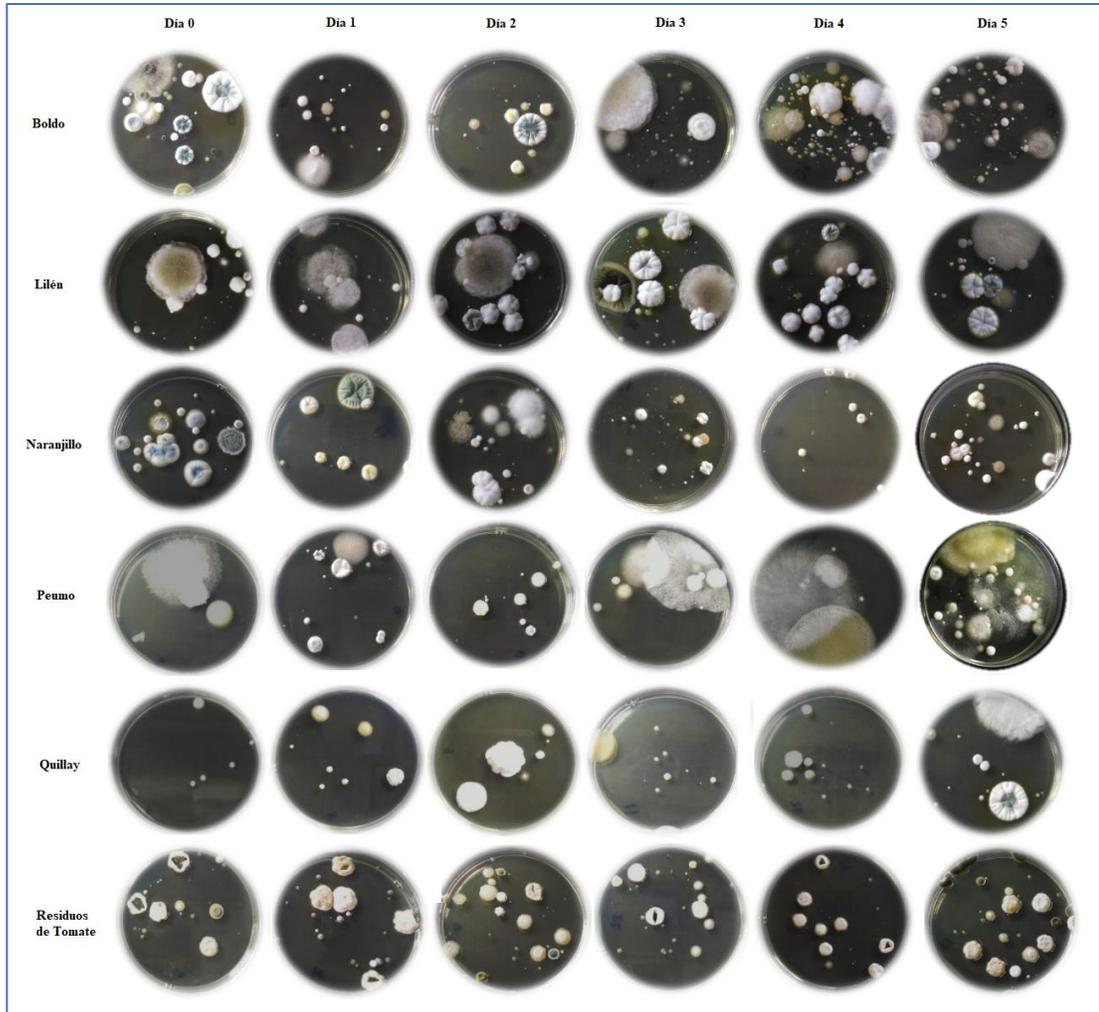


Fig. 36 Recuento de Hongos Filamentosos totales en placa Petri para cada Té de Compost de Flora Nativa durante 5 días de preparación.

## Anexo B: Análisis de varianza ANOVA y Prueba de Múltiples Rangos.

- **Recuento de Microorganismos**

A continuación, se presentan la prueba de múltiples rangos para el recuento de hongos de los 6 tés de compost evaluados durante 5 días de incubación:

R. Tomate				Peumo			
Col_1	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Col_3	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	186667,	X	0	3	26666,7	X
1	3	226667,	X	1	3	83333,3	X
3	3	233333,	X	4	3	96666,7	XX
4	3	250000,	XX	2	3	106667,	XX
2	3	280000,	X	5	3	113333,	XX
5	3	326667,	X	3	3	120000,	X

Quillay				Lilén			
Col_5	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Col_7	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	50000,0	X	5	3	5,23667	X
2	3	83333,3	X	1	3	5,26	X
1	3	86666,7	X	0	3	5,26667	X
4	3	113333,	X	3	3	5,27	X
3	3	140000,	X	2	3	5,30667	X
5	3	193333,	X	4	3	5,30667	X

Naranjillo				Boldo			
Col_9	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Col_11	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1	3	133333,	X	1	3	166667,	X
0	3	163333,	X	2	3	176667,	XX
2	3	213333,	X	0	3	200000,	X
4	3	226667,	X	3	3	250000,	X
3	3	263333,	X	4	3	293333,	X
5	3	276667,	X	5	3	313333,	X

Para bacterias se obtuvo lo siguiente en Pruebas de Múltiples Rangos:

R. Tomate				Peumo			
Día	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Día	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	2,06667E6	X	0	3	3,93333E6	X
1	3	3,86667E6	X	1	3	5,73333E6	X
3	3	8,46667E6	X	2	3	8,13333E6	X
4	3	8,8E6	XX	4	3	9,4E6	X
5	3	9,06667E6	XX	3	3	1,07333E7	X
2	3	9,46667E6	X	5	3	1,09333E7	X

Quillay				Lilén			
Día	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Día	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	4,66667E6	X	0	3	1,93333E6	X
1	3	9,66667E6	X	1	3	2,86667E6	X
2	3	1,09333E7	X	2	3	4,33333E6	X
3	3	1,13333E7	X	3	3	6,93333E6	X
4	3	1,14E7	X	4	3	8,46667E6	X
5	3	1,15333E7	X	5	3	1,36E7	X

Naranjillo				Boldo			
Día	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Día	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	3,33333E6	X	1	3	2,73333E6	X
1	3	4,53333E6	X	0	3	3,73333E6	XX
2	3	5,66667E6	X	2	3	4,33333E6	X
3	3	6,E6	X	4	3	5,8E6	X
4	3	8,73333E6	X	3	3	6,06667E6	X
5	3	9,06667E6	X	5	3	9,73333E6	X

- **Antagonismo entre *Trichoderma* spp y *L. theobromae***

Los resultados del análisis de varianza se presentan a continuación:

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	40,2267	6	6,70444	299,56	0,0000
Intra grupos	0,313333	14	0,022381		
Total (Corr.)	40,54	20			

Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se selecciona Pruebas de Múltiples Rangos:

<i>L.theobromae/Trichoderma</i> spp.	Casos	Media	Grupos Homogéneos
<i>T. asperellum</i> (Boldo)	3	4,16667	X
<i>T. asperellum</i> (Lilén)	3	4,36667	X
<i>T. asperellum</i> (Peumo)	3	4,66667	X
<i>T. asperellum</i> (Quillay)	3	5,2	X
<i>T. asperellum</i> (Naranjillo)	3	5,36667	X
<i>T. harzianum</i> (Peumo)	3	5,43333	X
Control <i>L.theobromae</i>	3	8,6	X

Se han identificado 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

- **Comparación Recuento de Microorganismos en Tés de Compost con y sin inoculación de *Trichoderma* spp.**

Para el recuento de hongos en tés de compost de flora nativa con y sin inoculación de *Trichoderma* spp. más el Té de Compost Control, se obtuvieron los siguientes resultados del análisis de varianza ANOVA:

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	3,12055E11	10	3,12055E10	67,75	0,0000
Intra grupos	1,01333E10	22	4,60606E8		
Total (Corr.)	3,22188E11	32			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de los Tés de Compost con y sin inoculación de *Trichoderma* spp., con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se selecciona Pruebas de Múltiples Rangos:

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Té Compost</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Naranjillo + <i>Trichoderma</i> spp.	3	50000,0	X
Lilén + <i>Trichoderma</i> spp.	3	53333,3	X
Quillay + <i>Trichoderma</i> spp.	3	76666,7	XX
Peumo	3	90000,0	X
Boldo + <i>Trichoderma</i> spp.	3	90000,0	X
Peumo + <i>Trichoderma</i> spp.	3	106667,	X
Lilén	3	173333,	X
Quillay	3	193333,	X
Naranjillo	3	233333,	X
Boldo	3	323333,	X
R. Tomate (Control)	3	326667,	X

Se han identificado 5 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Para bacterias se obtuvieron los siguientes resultados de los análisis ANOVA:

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2,36916E14	10	2,36916E13	57,66	0,0000
Intra grupos	9,04E12	22	4,10909E11		
Total (Corr.)	2,45956E14	32			

Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se selecciona Pruebas de Múltiples Rangos:

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Té de Compost</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Peumo + <i>Trichoderma</i> spp.	3	3,33333E6	X
Quillay + <i>Trichoderma</i> spp.	3	5,E6	X
R. Tomate (Control)	3	7,06667E6	X
Naranjillo + <i>Trichoderma</i> spp.	3	7,06667E6	X
Lilén + <i>Trichoderma</i> spp.	3	8,13333E6	XX
Naranjillo	3	8,53333E6	XX
Boldo + <i>Trichoderma</i> spp.	3	9,53333E6	XX
Boldo	3	9,73333E6	X
Quillay	3	1,03333E7	X
Peumo	3	1,04667E7	X
Lilén	3	1,36E7	X

Se han identificado 7 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

- **Efecto directo de Tés de compost con y sin inoculación de *Trichoderma* spp. sobre cepas fúngicas patógenas.**

La enumeración de los tés de compost corresponde a las siguientes:

1. Té Lilén
2. Té Quillay
3. Té Peumo
4. Té Naranjillo
5. Té Boldo
6. Té R. Tomate (control)
6. Té Lilén + *Trichoderma* spp.
7. Té Quillay + *Trichoderma* spp
8. Té Peumo + *Trichoderma* spp
9. Té Naranjillo + *Trichoderma* spp
11. Té Boldo + *Trichoderma* spp
12. Patógeno Control

- *Botrytis cinerea*

Se obtuvieron los siguientes resultados del análisis de varianza ANOVA para las mediciones de diámetro de crecimiento del patógeno *B.cinerea*:

Diámetro a los 2 días de incubación					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	14,7358	11	1,33962	8,85	0,0000
Intra grupos	3,63105	24	0,151294		
Total (Corr.)	18,3668	35			
Diámetro a los 7 días de incubación					
Entre grupos	11145,5	11	1013,23	445,09	0,0000
Intra grupos	54,6346	24	2,27644		
Total (Corr.)	11200,1	35			
Diámetro a los 14 días de incubación					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	18409,8	11	1673,62	278,74	0,0000
Intra grupos	144,102	24	6,00426		
Total (Corr.)	18553,9	35			

Donde en todos los casos se obtuvo un valor-P menor que 0,05, existiendo diferencias estadísticamente significativas, con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realiza la Pruebas de Múltiples Rangos, Método: 95,0 porcentaje LSD

Día 2			Día 7			Día 14		
Té de Compost	Media	G.H	Té de Compost	Media	G.H	Té de Compost	Media	G.H
11	5,42	X	11	7,67	X	7	7,49	X
5	5,49	X	7	8,04	X	11	8,99	X
7	5,75	X	8	8,74	XX	10	9,21	X
6	5,83	X	6	8,82	XX	6	9,25	X
8	5,86	X	10	8,99	XX	8	9,73	XX
9	5,88	X	9	9,84	XX	9	11,30	XX
2	6,03	XX	5	10,98	X	5	13,57	XX
10	6,59	XX	2	13,59	X	1	13,79	XX
1	6,79	XX	1	14,21	X	2	15,57	X
4	6,94	XX	3	42,85	X	3	43,22	X
3	7,07	XX	12	52,36	X	4	50,13	X
12	7,40	X	4	54,92	X	12	83,28	X

G.H: Grupos homogéneos

- *Fusarium oxysporum*

Se obtuvieron los siguientes resultados del análisis de varianza ANOVA para las mediciones de diámetro de crecimiento del patógeno *F. oxysporum*:

Diámetro a los 2 días de incubación					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	423,17	11	38,47	47,23	0,0000
Intra grupos	19,5477	24	0,814485		
Total (Corr.)	442,718	35			
Diámetro a los 7 días de incubación					
Entre grupos	5501,01	11	500,092	137,13	0,0000
Intra grupos	87,5223	24	3,64676		
Total (Corr.)	5588,53	35			
Diámetro a los 14 días de incubación					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	12784,9	11	1162,27	239,97	0,0000
Intra grupos	116,24	24	4,84335		
Total (Corr.)	12901,2	35			

Donde en todos los casos se obtuvo un valor-P menor que 0,05, existiendo diferencias estadísticamente significativas, con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realiza la Pruebas de Múltiples Rangos, Método: 95,0 porcentaje LSD

Té de Compost	Día 2		Día 7			Día 14		
	Media	G.H	Té de Compost	Media	G.H	Té de Compost	Media	G.H
7	8,98	X	7	9,07	X	8	11,10	X
6	9,32	X	1	10,25	XX	11	11,36	X
10	9,37	X	10	13,12	XX	7	11,83	X
1	9,49	X	5	13,95	X	9	12,68	X
11	10,47	XX	9	14,34	X	10	13,47	XX
5	11,20	X	2	14,63	X	2	17,11	XX
2	12,73	X	8	14,74	X	5	19,56	XX
4	13,78	X	3	15,98	XX	1	22,96	X
8	15,32	X	6	18,10	X	3	27,89	X
9	15,85	X	4	18,18	X	6	29,24	X
3	16,18	X	12	24,66	X	4	36,49	X
12	20,26	X	4	57,70	X	12	81,32	X

G.H: Grupos homogéneos

- *Lasiodiplodia theobromae*

Se obtuvieron los siguientes resultados del análisis de varianza ANOVA para las mediciones de diámetro de crecimiento del patógeno *L. theobromae*:

Diámetro a los 2 días de incubación					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2855,39	11	259,581	61,61	0,0000
Intra grupos	101,119	24	4,21328		
Total (Corr.)	2956,51	35			
Diámetro a los 7 días de incubación					
Entre grupos	14621,9	11	1329,26	69,59	0,0000
Intra grupos	458,446	24	19,1019		
Total (Corr.)	15080,4	35			
Diámetro a los 14 días de incubación					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	14487,7	11	1317,06	37,28	0,0000
Intra grupos	847,829	24	35,3262		
Total (Corr.)	15335,5	35			

Donde en todos los casos se obtuvo un valor-P menor que 0,05, existiendo diferencias estadísticamente significativas, con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realiza la Pruebas de Múltiples Rangos, Método: 95,0 porcentaje LSD

Té de Compost	Día 2		Día 7			Día 14		
	Media	G.H	Té de Compost	Media	G.H	Té de Compost	Media	G.H
6	24,1	X	11	26,68	X	11	27,05	X
11	30,24	X	6	32,89	XX	8	39,18	X
5	30,41	X	10	35,68	XX	9	41,98	X
7	33,38	XX	7	42,81	XX	10	42,49	X
1	34,78	X	9	43,27	X	7	44,96	XX
4	39,4	X	8	44,05	X	6	46,06	XX
10	39,45	X	1	48,11	X	5	53,89	XX
8	44,23	X	5	58,12	X	1	59,35	X
9	45,19	X	2	76,50	X	2	81,35	X
2	46,67	X	4	79,57	XX	4	82,42	X
3	46,94	X	3	81,85	XX	3	85,68	X
12	57,54	X	12	86,0	X	12	86,0	X

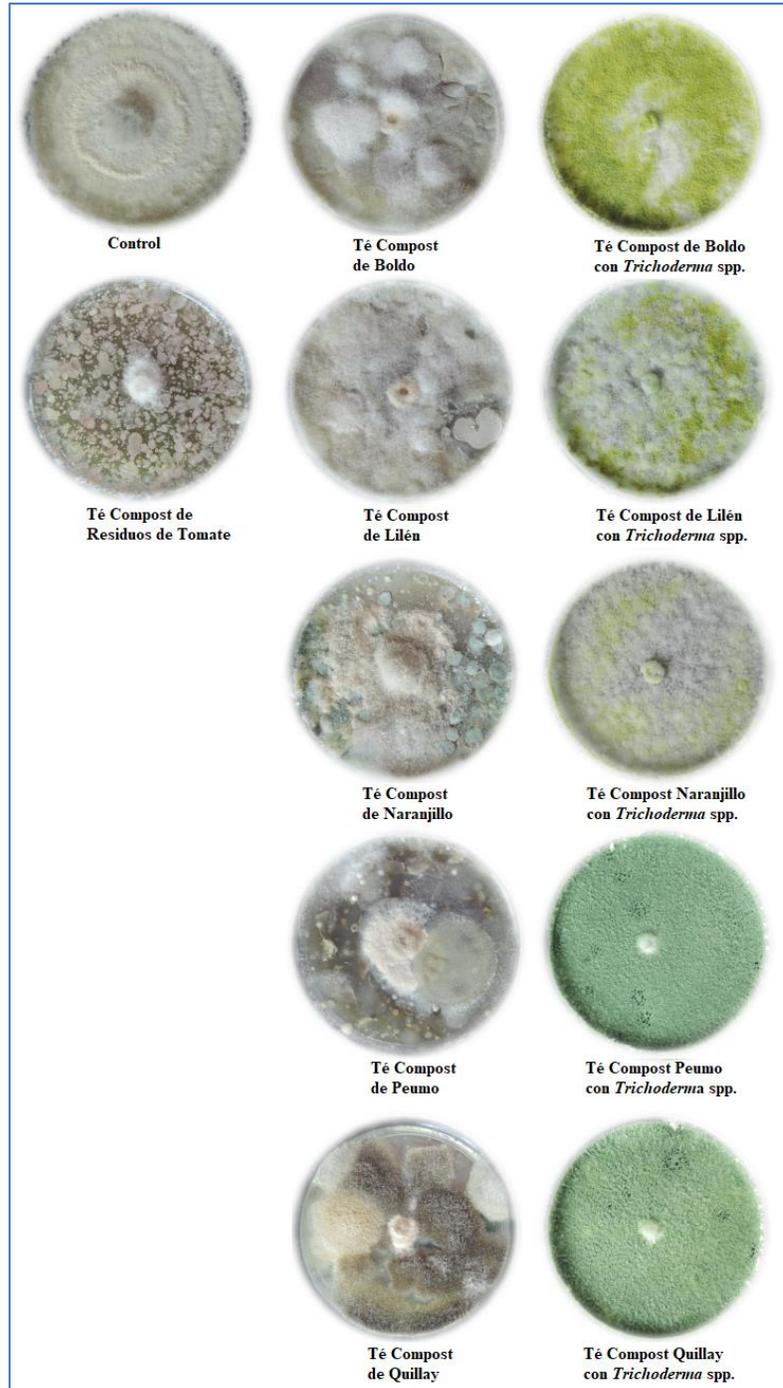
G.H: Grupos homogéneos

**Anexo C: Incompatibilidad de *Trichoderma* spp.**

Enfrentamiento	Crecimiento proporcional (50/50)	Barrera de defensa	Coloración del medio de Cultivo	Seleccionados
1. T.h(P)/ T.a(P)	X	X	X	X
2.T.h(P)/T.a(BI)	X	X	X	X
3. T.h(P)/T.a(L)	X	X	X	X
4. T.h(P)/T.h(L)	X	-	-	[-]
5. T.h(P)/T.a(N)	X	X	X	X
6. T.h(P)/T.h(Q)	-	-	-	[-]
7. T.h(P)/T.a(Q)	X	X	X	X
8. T.a(P)/ T.a(BI)	X	X	-	[-]
9. T.a(P)/ T.a(L)	-	-	-	[-]
10. T.a(P)/ T.h(L)	-	X	X	[-]
11. T.a(P)/ T.a(N)	X	X	-	[-]
12. T.a(P)/ T.h(Q)	-	X	X	[-]
13. T.a(P)/ T.a(Q)	X	X	-	[-]
14. T.a(BI)/ T.a(L)	X	X	-	[-]
15. T.a(BI)/ T.h(L)	-	X	X	[-]
16. T.a(BI)/ T.a(N)	-	X	-	[-]
17. T.a(BI)/ T.h(Q)	-	X	X	[-]
18. T.a(BI)/ T.a(Q)	-	X	-	[-]
19. T.a(L)/ T.h(L)	-	X	X	[-]
20. T.a(L)/ T.a(N)	X	X	-	[-]
21. T.a(L)/ T.h(Q)	-	X	X	[-]
22. T.a(L)/ T.a(Q)	X	X	-	[-]
23. T.h(L)/ T.a(N)	-	X	X	[-]
24. T.h(L)/ T.h(Q)	X	-	-	[-]
25.T.h(L)/ T.a(Q)	-	X	X	[-]
26. T.a(N)/ T.h(Q)	-	X	X	[-]
27. T.a(N)/ T.a(Q)	X	-	-	[-]
28. T.h(Q) /T.a(Q)	-	X	X	[-]
29. T.p(Q)/T.h(P)	-	X	-	[-]
30. T.p(Q)/T.a(P)	-	X	X	[-]
31. T.p(Q)/T.a(BI)	-	X	X	[-]
32. T.p(Q)//T.a(L)	-	X	X	[-]
33. T.p(Q)/T.h(L)	X	X	-	[-]
34. T.p(Q)/T.a(N)	-	X	X	[-]
35. T.p(Q)/T.h(Q)	-	X	X	[-]
36. T.p(Q)/T.a(Q)	-	X	X	[-]

**Anexo D: Efecto directo de Tés de Composto con y sin inoculación de consorcio de *Trichoderma* spp. sobre patógenos.**

- *Botrytis cinerea*:



**Fig. 37. Comparación de inhibición de crecimiento micelial de Tés de compost de F. Nativa con y sin inoculación de *Trichoderma* spp. sobre *B. cinerea*.**

- *Fusarium oxysporum*:

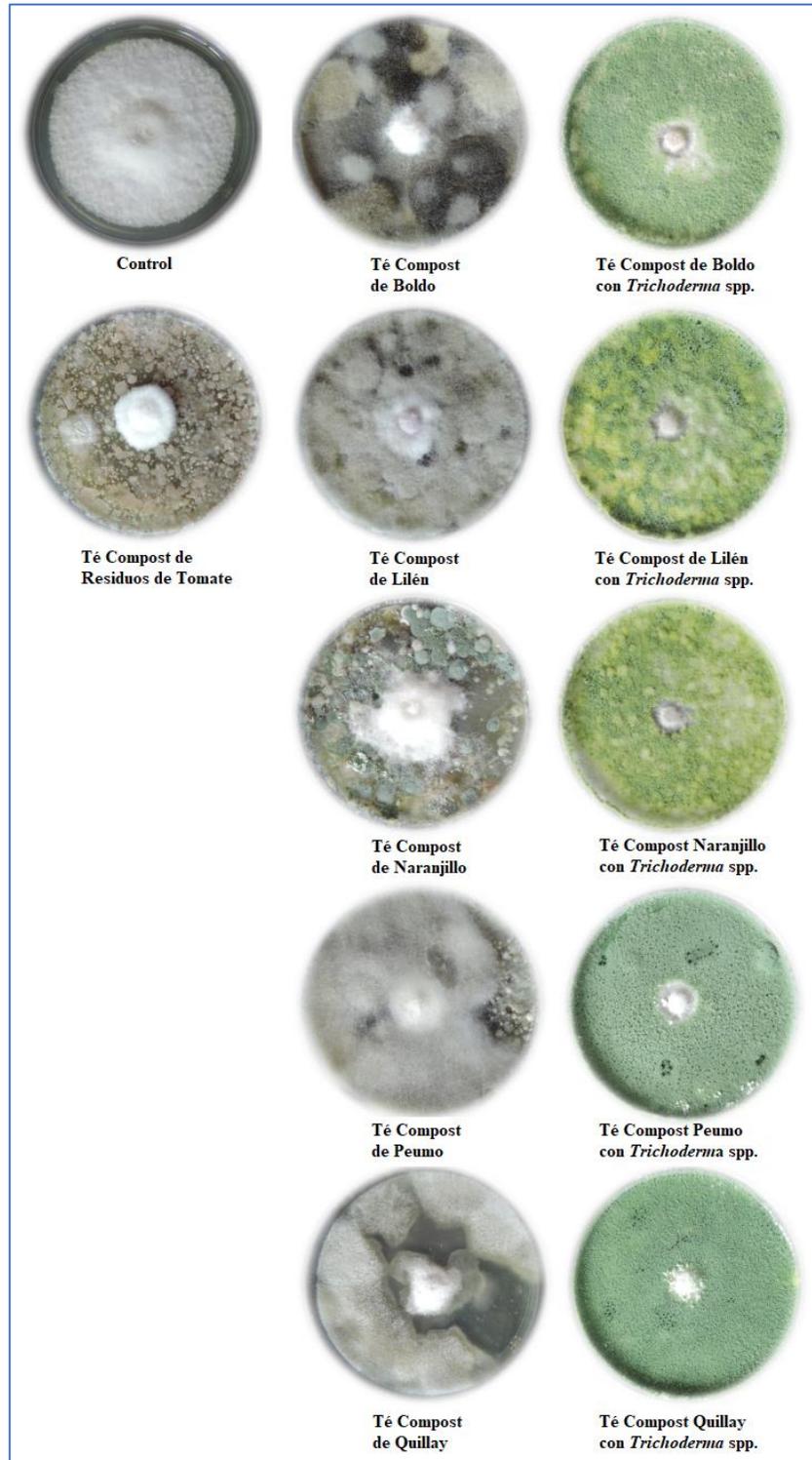


Fig. 38. Comparación de inhibición de crecimiento micelial de Tés de compost de F. Nativa con y sin inoculación de *Trichoderma* spp. sobre *F. oxysporum*.

- *Lasiodiplodia theobromae*

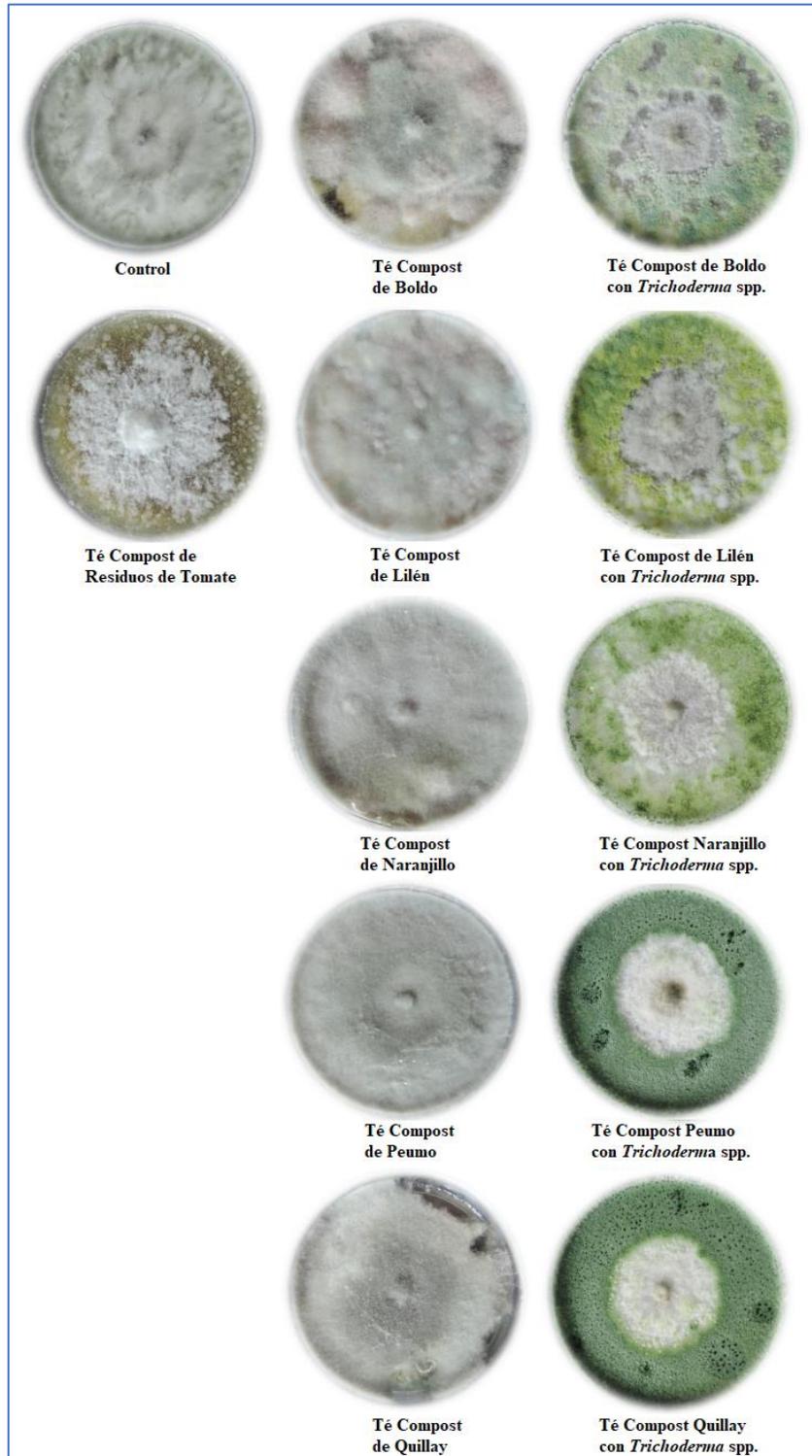


Fig. 39. Comparación de inhibición de crecimiento micelial de Tés de compost de F. Nativa con y sin inoculación de *Trichoderma* spp. sobre *L. theobromae*.