

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN FITOPATOLOGÍA



**“PROMOTORES DE DEFENSA QUÍMICOS Y
BIOLÓGICOS CONTRA INFECCIONES POR *Lasiodiplodia
theobromae* EN VID (*Vitis vinifera*)”**

Presentada por

JOSE MIGUEL SOTO HEREDIA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN FITOPATOLOGÍA**

Lima – Perú

2018

En el momento que alcanzo una de mis metas más anheladas, viene a mi memoria la ayuda, la motivación, y el sacrificio de quienes me inspiraron a avanzar, es por ello que dedico este trabajo traducido en un triunfo académico a:

Dios que sin su dirección y regalo de vida nada sería posible, por ello todo lo que tengo se lo debo a Él.

A mis padres Jorge Soto y Maria Heredia que invirtieron gran parte de sus fuerzas, tiempo y dinero para mi formación académica, los cuales agradezco a Dios por haberme dado dichos padres.

A mis hermanos Henry, Eduar, Jorge y Frick que en todo tiempo supieron orientarme a ser cada día mejor persona.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis sinceros agradecimientos a los profesionales y amigos que fueron mi punto de apoyo en el periodo de estudio y quisiera empezar nombrando:

A mi profesor patrocinador Ing. Mg. Sc. Carlos Cadenas, quien durante mis estudios me apoyó en mi formación profesional y por sus consejos que contribuyeron a la realización de este trabajo, por lo cual no solo lo considero un buen profesional sino también un buen amigo.

Al Ph. D. Luis Álvarez, quien siempre tuvo un consejo hacia mi persona, por su amabilidad y el deseo de ayuda.

Al Ing. Mg Sc. Juan Munive, gerente general de empresa Viveros los Viñedos por su apoyo en este trabajo y la disponibilidad de materiales brindados por la empresa.

A los miembros del jurado a la Dra. Leonor Mattos, Ing. Mg. Sc. Walter Apaza y el Ing. Mg. Sc. Andrés Casas por sus aportes en la mejora de este trabajo de investigación.

A mis compañeros de la universidad a Juan Jose (Güey), Alex Risco (El molesto) y Cledy Ureta que en algunos momentos difíciles supieron darme buenos consejos los cuales estoy muy agradecido.

A Cecilia castilla por apoyo en esta investigación en la disponibilidad rápida de los materiales que se utilizaron en trabajo.

ÍNDICE

	Página
CAPÍTULO I: INTRODUCCION	1
CAPÍTULO II: REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 La Vid (<i>Vitis vinifera</i>)	3
2.1.1 Origen y usos	3
2.1.2 Taxonomía	4
2.1.3 Características morfológicas	5
2.2 Condiciones ecológicas para el cultivo de la vid	7
2.2.1 Clima	7
2.2.2 Suelo	8
2.3 <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	8
2.3.1 Generalidades	8
2.3.2 Síntomas de la enfermedad	9
2.4 Defensas de las plantas	10
2.4.1 Activación de las defensas inducidas de las plantas	11
2.4.2 Resistencia sistémica en las plantas	15
2.5 Descripción de los productos utilizados en el presente trabajo de investigación	17
2.5.1. Fosfitos	17
2.5.2. Mananos oligosacáridos	18
2.5.3. Acibenzolar-S-Methyl y fosfito de potasio	18
2.5.4. <i>Trichoderma</i> sp. y <i>Bacillus subtilis</i>	20
CAPÍTULO III: MATERIALES Y METODOS	21
3.1 Localización	21
3.2 Recolección de muestra	21
3.3 Aislamiento e identificación del patógeno	21
3.4 Prueba de patogenicidad	23
3.4.1. Material vegetal	23
3.4.2. Preparación de inóculo	23
3.4.3. Inoculación	23
3.4.4. Evaluaciones	23
3.4.5 Reaislamiento de <i>L. theobromae</i>	24

3.5	Prueba de efectividad de los productos químicos y biológicos	24
3.5.1	Prueba de efectividad de los productos químicos ‘in vitro’	25
3.5.2	Prueba de efectividad de los productos biológicos ‘in vitro’	26
	a) Técnica de alimento envenenado	26
	b) Prueba de enfrentamiento	27
3.5.3	Prueba de control químico y biológicos en vivero	28
	a) Material vegetal	28
	b) Tratamientos	29
	c) Preparación de los productos químicos y biológicos.	30
	d) Aplicaciones preventivas	30
	e) Aplicaciones curativas	30
	f) Evaluaciones	31
	g) Reaislamiento de <i>L .theobromae</i> de las plantas inoculadas en los tratamientos.	33
	h) Diseño experimental en la prueba de productos químicos y biológicos en vivero.	33
	CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1	Aislamiento e identificación del patógeno	34
4.2	Prueba de patogenicidad	36
4.3	Prueba de control químico in vitro	37
4.4	Prueba de control biológico in vitro	43
	4.4.1 Técnica de medio envenenado	43
	4.4.2 Prueba de enfrentamiento	46
4.5	Prueba de control en invernadero	48
	4.5.1 Tratamiento de control curativo	48
	a) Incidencia de la enfermedad	50
	b) Severidad de los síntomas secundarios	51
	c) Severidad de pudriciones en los tallos	56
	d) Reaislamiento del patógeno	66
	4.5.2 Tratamiento de control preventivo	67
	a) Incidencia de la enfermedad	70
	b) Severidad de los síntomas secundarios	71

c) Severidad de pudriciones en los tallos	75
d) Reaislamiento de <i>L. theobromae</i>	86
CAPITULO V: CONCLUSIONES	88
CAPITULO VI: RECOMENDACIONES	89
CAPITULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
CAPITULO VIII: ANEXOS	99

ÍNDICE DE CUADROS

Pág.

Cuadro 1	Tratamientos con los productos químicos y biológicos utilizados en la prueba <i>in vitro</i> para el control de <i>L. theobromae</i> .	24
Cuadro 2	Tratamientos con los productos químicos utilizados en la prueba <i>in vitro</i> para el control de <i>L. theobromae</i> .	25
Cuadro 3	Tratamientos con los correspondientes productos biológicos utilizados en la prueba <i>in vitro</i> para el control de <i>L. theobromae</i> .	26
Cuadro 4	Dosis de los biocontroladores utilizados en la suspensión para impregnar los discos de papel filtro para utilizar en la prueba de enfrentamiento con <i>L. theobromae</i> .	27
Cuadro 5	Prueba de enfrentamiento <i>in vitro</i> entre <i>L. theobromae</i> y los biocontroladores.	28
Cuadro 6	Tratamientos de productos químicos y biológicos contra <i>L. theobromae</i> , en fase de vivero.	29
Cuadro 7	Momentos de las inoculaciones de <i>L. theobromae</i> en los plantones de vid y de las aplicaciones de productos químicos y biológicos.	31
Cuadro 8	Escala de evaluación de síntomas secundarios en plantones de vid afectados por <i>L. theobromae</i>	32
Cuadro 9	Radio de crecimiento y porcentaje de inhibición de <i>L. theobromae</i> en la prueba de control químico <i>in vitro</i> a los 3 días después de la siembra.	38
Cuadro 10	Cuadro de análisis de variancia de la prueba <i>in vitro</i> de la prueba de enfrentamiento.	41
Cuadro 11	Prueba de Tukey para el crecimiento radial promedio de <i>L. theobromae</i> en tratamientos con productos químicos.	42
Cuadro 12	Prueba <i>in vitro</i> con productos biológicos.	43
Cuadro 13	Prueba de Tukey para el crecimiento radial promedio de <i>L. theobromae</i> en tratamientos con productos biológicos.	44
Cuadro 14	Tratamientos de la prueba de enfrentamiento y crecimiento de los hongos evaluados.	47
Cuadro 15	Números y porcentajes de plantas infectadas con <i>L. theobromae</i> por cada tratamiento, tanto en los patrones como en los injertos	50
Cuadro 16	Evaluación de síntomas secundarios en los diferentes tratamientos por infecciones por <i>L. theobromae</i> representado en grados de infección.	51
Cuadro 17	Cuadro de análisis de variancia de las áreas de infecciones por <i>L. theobromae</i> de los injertos en la metodología curativa.	63
Cuadro 18	Prueba de Tukey de los resultados obtenidos en el área de las infecciones por <i>L. theobromae</i> en el injertos en la metodología curativa según los tratamientos utilizados para el control de la enfermedad	64

Cuadro 19	Cuadro de análisis de variancia de las áreas de infección por <i>L. theobromae</i> de los patrones en la metodología curativa.	65
Cuadro 20	Prueba de Tukey de los resultados obtenidos en el área de las infecciones por <i>L. theobromae</i> en los patrones en la metodología curativa según los tratamientos utilizados para el control de la enfermedad	66
Cuadro 21	Porcentaje de plantas con reaislamiento de <i>L. theobromae</i>	67
Cuadro 22	Números y porcentajes de plantas infectadas con <i>L. theobromae</i> por cada tratamiento, tanto en los patrones como en los injertos.	70
Cuadro 23	Evaluación de síntomas secundarios en los diferentes tratamientos por infecciones por <i>L. theobromae</i> representado en grados de infección.	71
Cuadro 24	Cuadro de análisis de variancia de las áreas de infecciones por <i>L. theobromae</i> en los injertos en la metodología preventiva.	82
Cuadro 25	Prueba de Tukey de los resultados obtenidos en el área de las infecciones por <i>L. theobromae</i> en el injerto en la metodología preventiva según los tratamientos utilizados para el control de la enfermedad	83
Cuadro 26	Cuadro de análisis de variancia de las áreas de infecciones por <i>L. theobromae</i> en los injertos en la metodología preventiva.	84
Cuadro 27	Prueba de Tukey de los resultados obtenidos en el área de las infecciones por <i>L. theobromae</i> en el patrón en la metodología preventiva según los tratamiento utilizados para el control de la enfermedad.	85
Cuadro 28	Porcentaje de plantas con reaislamiento de <i>L. theobromae</i> .	86

ÍNDICE DE FIGURAS**Pág.**

Figura 1	Vía biosintéticas de las fitoalexinas isoflavonoides	13
Figura 2	Comparación de rutas metabólicas de resistencia en plantas.	17
Figura 3	Aislamiento de <i>L. theobromae</i> en plantas de vid.	22
Figura 4	Identificación del hongo	35
Figura 5	Prueba de patogenicidad	37
Figura 6	Crecimiento de <i>L. theobromae</i> en la prueba de control químico in vitro a los 3 días después de la siembra.	39
Figura 7	Curva de crecimiento promedio de <i>L. theobromae</i> en la prueba de control químico in vitro.	39
Figura 8	Crecimiento de las colonias de <i>L. theobromae</i> en los diferentes tratamientos.	40
Figura 9	Comparación del testigo (T) y del tratamiento de medio MEA conteniendo <i>T. harzianum</i> (T.h).	45
Figura 10	Comparación del testigo (T) y del tratamiento de medio MEA conteniendo <i>Bacillus subtilis</i> (B.s.).	45
Figura 11	Enfrentamiento in vitro de <i>L. theobromae</i> (Lt) con <i>T. harzianum</i> (Th).	46
Figura 12	Enfrentamiento in vitro de <i>L. theobromae</i> (L.t) con <i>B. subtilis</i> (Bs).	47
Figura 13	Síntomas secundarios y signo de la enfermedad presentados en la metodología curativa.	49
Figura 14	Comparación visual de síntomas secundarios en diferentes tratamientos en la metodología curativa (a-e).	54
Figura 15	Comparación visual de síntomas secundarios en diferentes tratamientos en la metodología curativa (f-j).	55
Figura 16	Comparaciones de áreas de las infecciones por <i>L. theobromae</i> en los injertos de la metodología curativa.	56
Figura 17	Comparaciones de áreas de las infecciones por <i>L. theobromae</i> en patrones de la metodología curativa.	56
Figura 18	Comparaciones de áreas de las infecciones por <i>L. theobromae</i> entre los injertos y patrones de la metodología curativa.	57
Figura 19	Comparación de los injertos en los diferentes tratamientos en la metodología curativa.	58
Figura 20	Comparación de los patrones en los diferentes tratamientos en la metodología curativa.	59
Figura 21	Comparaciones de longitudes de las infecciones por <i>L. theobromae</i> en los injertos en la metodología curativa.	60
Figura 22	Comparaciones de longitudes de las infecciones por <i>L. theobromae</i> en los patrones en la metodología curativa.	60

Figura 23	Comparaciones de longitudes de las infecciones por <i>L. theobromae</i> entre los injertos y los patrones en la metodología curativa.	61
Figura 24	Síntomas secundarios y signo de la enfermedad presentados en la metodología preventiva (a-i).	69
Figura 25	Comparación visual de síntomas secundarios en diferentes tratamientos en la metodología preventiva (a-e).	73
Figura 26	Comparación visual de los síntomas secundarios en diferentes tratamientos en la metodología preventiva (f-j)	74
Figura 27	Comparación de áreas de las infecciones por <i>L. theobromae</i> en los injertos de la metodología preventiva	75
Figura 28	Comparaciones de áreas de las infecciones por <i>L. theobromae</i> en los patrones de la metodología preventiva.	75
Figura 29	Comparaciones de las áreas por infecciones por <i>L. theobromae</i> entre los injertos y patrones de la metodología preventiva.	76
Figura 30	Comparación de injertos de los diferentes tratamientos con raspado cortical de la metodología preventiva.	77
Figura 31	Comparación de patrones de los diferentes tratamientos con raspado cortical de la metodología preventiva.	78
Figura 32	Comparaciones de longitudes de las infecciones por <i>L. theobromae</i> en los injertos de la metodología preventiva.	79
Figura 33	Comparaciones de longitudes de las infecciones por <i>L. theobromae</i> en los patrones de la metodología preventiva.	79
Figura 34	Comparaciones de las longitudes por infecciones por <i>L. theobromae</i> entre los injertos y patrones de la metodología preventiva.	80

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Rango de tamaño de las conidias de <i>L. theobromae</i> en micras	99
Anexo 2	Datos obtenidos de la evaluación del crecimiento de <i>L. theobromae</i> en la prueba de medio envenenado con los productos químicos.	100
Anexo 3	Datos obtenidos de las evaluaciones de la prueba de medio envenenado con los productos biológicos.	101
Anexo 4	Datos obtenidos de las evaluaciones en la prueba de enfrentamiento con los productos biológicos.	102
Anexo 5	Temperatura promedio de los meses Enero a Junio estación meteorológica FONAGRO (Senamhi)- Chincha Baja-Chincha-Ica	103
Anexo 6	Datos obtenidos de la evaluación de las áreas de infección en milímetros (cm ²) en el injerto de la metodología curativa.	104
Anexo 7	Datos obtenidos de la evaluación de las áreas de infección en milímetros (cm ²) en el patrón de la metodología curativa.	105
Anexo 8	Datos obtenidos de la evaluación de las áreas de infección en milímetros (cm ²) en el injerto de la metodología preventiva.	106
Anexo 9	Datos obtenidos de la evaluación de las áreas de infección en milímetros (cm ²) en el patrón de la metodología preventiva.	107

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar el efecto de seis sustancias químicas (Ácido fosforoso, fosetil-Al, fosfito de potasio, sulfato de cobre pentahidratado, mananos oligosacáridos, acibenzolar-S-methyl) y dos agentes biológicos (*Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum*), en el control de *Lasiodyplodia theobromae*, utilizados como inductores de defensas en plantas de vid. En laboratorio se evaluó la efectividad en la inhibición del crecimiento de *L. theobromae* de los productos químicos y de los agentes biológicos mediante la técnica del alimento envenenado. Adicionalmente se evaluó la efectividad de los agentes biológicos mediante la técnica de enfrentamiento dual. La mayor inhibición de *L. theobromae* se obtuvo con el tratamiento con ácido fosforoso (100 %) en el caso de los productos químicos, y entre los biológicos, el tratamiento con *B. subtilis* inhibió el 88.7 % el crecimiento de *L. theobromae*. En vivero se utilizaron plantas de vid ‘Red Globe’ sobre patrón ‘Harmony’, las cuales fueron inoculadas con micelio de *L. theobromae*, tanto en la variedad como en el patrón. Los tratamientos fueron aplicados en dos estrategias de control, preventiva y curativa. En la estrategia preventiva se realizaron tres aplicaciones foliares de los productos con intervalos de diez días entre aplicación, y cinco días después de la última aplicación se realizó la inoculación de *L. theobromae*. En la estrategia curativa primero se inoculó el patógeno y cinco días después se empezaron las aplicaciones de los productos, realizándose tres aplicaciones en intervalos de diez días entre aplicaciones. El mejor control de *L. theobromae* en vivero se obtuvo con los tratamientos: Mananos oligosacáridos y Acibenzolar-S-Methyl, tanto en aplicaciones preventivas como en curativas.

Palabras clave: *Lasiodyplodia theobromae*, *Vitis vinifera*. Mananos oligosacáridos, Acibenzolar-s-metil

ABSTRACT

A research work was done to evaluate the effect of six chemical defense inducers (phosphorous acid, fosetyl-Al, potassium phosphite, copper sulfate pentahydrate, mannan oligosaccharides, acibenzolar-S-methyl) and two biological agents (*Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*), in the control of *Lasiodiplodia theobromae* in grape vine plants. Effectiveness of growth inhibition by the chemical products and of the biological agents were evaluated in the laboratory by the technique of poisoned food. Additionally, the effectiveness of the biological agents was evaluated through the dual confrontation technique. Among the chemicals, highest inhibition of *L. theobromae* was obtained with phosphorous acid (100%), and among the biological treatments, *B. subtilis* inhibited the growth of *L. theobromae* by 88.7%. At nursery, 'Red Globe' grapevine plants on 'Harmony' rootstock, were inoculated with *L. theobromae* mycelium, either on scion and rootstock. Treatments were applied following preventive and curative strategies. In the preventive strategy, three foliar applications of the products were made at ten days intervals. Five days after the last application, the inoculation of *L. theobromae* was performed. In the curative strategy, the pathogen was first inoculated, and five days later the applications of the products were started. Three applications were applied at ten-day intervals. The best control of *L. theobromae* in the nursery was obtained with the treatments: Mananos oligosaccharides and Acibenzolar-S-Methyl, both in preventive and curative strategies.

Keywords: *Lasiodiplodia theobromae*, *Vitis vinífera*, Mannan oligosaccharides, Acibenzolar-s-methyl

I. INTRODUCCION

La vid (*Vitis vinifera* L.) es uno de los cultivos más extensamente cultivados en el mundo cubriendo un área de 10 millones de hectáreas aproximadamente. Se desarrolla tanto en regiones templadas como tropicales, pero la mayoría de los viñedos están establecidos en zonas de climas templados, concentrándose la mayor cantidad en Europa.

La especie *V. vinifera* de Europa y Asia occidental es la única significativamente cultivable, sus bayas son suculentas, grandes y con aptitudes viníferas. El jugo de sus frutos fermentados se transforma en vino y brandy. También se consume en fresco como uva de mesa y, mediante su almacenamiento en frío en ambos hemisferios, se puede consumir durante todo el año. También, por secado, el fruto se convierte en pasas que tienen un alto valor nutritivo. Los jugos no fermentados, el jugo concentrado helado y las conservas, son otras formas de consumo de sus frutos (Pearson 2011).

El cultivo de la vid constituye una de las actividades frutícolas de mayor importancia en el Perú por su extensión, por su valor de producción y por ser fuente de la materia prima que requiere la industria vitivinícola nacional.

El cultivo de vid es afectado por diversas enfermedades que merman la producción tales como la muerte regresiva (*Lasiodiplodia theobromae*), la enfermedad de Petri (*Phaeoacremonium spp.* y *Phaeoconiella chlamydospora*), la Yesca, la Eutipiosis (*Eutypa lata*), la podredumbre blanca (*Armillaria sp.*), la pudrición de las raíces (*Rosellinia necatrix*), la Oidiosis de la vid (*Uncinula necator*), el mildiu de la vid (*Plasmopara viticola*), el moho gris o podredumbre gris de las uvas (*Botrytis cinerea*), tumores o agallas del cuello (*Agrobacterium tumefaciens*) (Reynier 1989).

La enfermedad causada por *Lasiodiplodia theobromae* ocasiona una reducción del crecimiento y un decaimiento general de las plantas de vid. Esta enfermedad afecta principalmente a las plantas jóvenes causando enormes pérdidas en nuevas plantaciones. Las

fuentes de inóculo de esta enfermedad son el material de propagación infectado y la liberación de propágulos infectivos (conidias) que se diseminan a otras plantas. (Mugnai *et al.* 1999, Poscoe & Cotral 2000).

En campos instalados con vid es difícil curar las plantas infectadas con *Lasiodiplodia theobromae* debido a que este hongo se localiza en tallo a nivel de patrón e injerto y la principal fuente de inóculo es el material de propagación infectado, por tal motivo, durante el proceso de propagación de la vid en vivero y en campo, se debe tomar medidas que eviten la contaminación del material.

Diferentes estudios muestran el potencial de ciertos productos químicos y biológicos para el control de diversas enfermedades, por ello, esta investigación tiene el propósito de determinar la eficacia de diversos productos de naturaleza química y biológica como inductores de resistencia para prevenir y curar la muerte regresiva causada por *Lasiodiplodia theobromae* en vid (*Vitis vinifera*), *in vitro* y en vivero.

Los objetivos del presente trabajo de investigación fueron:

- a. Establecer la eficacia del control, *in vitro*, de seis productos inductores de resistencia de naturaleza química (Ácido fosforoso, fosetil de aluminio, fosfito de potasio, sulfato de cobre pentahidratado, mananos oligosacáridos, acibenzolar S-methyl) y dos de naturaleza biológica (*Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum*), frente a *Lasiodiplodia theobromae*.
- b. Determinar la eficacia en vivero de seis productos inductores de defensa de naturaleza química (Ácido fosforoso, fosetil de aluminio, fosfito de potasio, sulfato de cobre pentahidratado, mananos oligosacáridos, acibenzolar S-methyl) y dos de naturaleza biológica como *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* en el control curativo y la prevención de la muerte regresiva causada por *Lasiodiplodia theobromae* en vid (*V. vinifera*).

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. La vid (*Vitis vinifera* Linneo)

2.1.1. Origen y usos

La vid (*Vitis vinifera* L.) es uno de los cultivos más antiguos del mundo ya que sus orígenes se remontan prácticamente a la aparición misma del hombre. En los comienzos, éste se alimentaba de los frutos de las plantas que crecían de forma silvestre en su entorno y, posteriormente, al igual que muchas de las plantas que les resultaban útiles, la domesticó para utilizarla para su consumo. El origen geográfico de la vid se sitúa entre Europa y Asia Central, en la región del Cáucaso, entre el Mar Negro y el Mar Caspio. Los primeros indicios de la actividad vitícola aparecen en esta zona, y datan de 5000 años antes de Cristo. A partir de aquí el cultivo de la vid fue extendiéndose hacia occidente pasando por Mesopotamia, Siria, Fenicia, Egipto y Grecia y de ahí al resto de Europa y del mundo. Los colonos españoles fueron los que lo introdujeron en América del Norte desde donde se extendió a todo el continente americano (Hidalgo 2002). Esta especie fue traída a México por los españoles, para posteriormente pasar de este país a Perú, Chile, Argentina y, en los siglos XVII y XVIII, a California (Macías 1993).

La uva, fruto de la vid, se ha utilizado para consumo en fresco o conservado bajo forma de pasas; pero también para la producción del vino, una de las bebidas más populares y milenarias que se conoce. Estas tres formas de consumo son tan tradicionales y antiguas como el cultivo mismo (Hidalgo 2002). El vino era conocido en todos los pueblos antiguos, desde la India pasando por Grecia, Egipto y en el Imperio Romano. Desde el siglo V hasta el Renacimiento, la viticultura fue mantenida y mejorada en Europa por las órdenes religiosas y la nobleza. Posteriormente, la colonización española expandió la producción y consumo del vino por el Nuevo Mundo (Surico 2000).

2.1.2. Taxonomía

La vid está clasificada, según Cronquist y Takhtajan (1980), de la siguiente manera:

Reino	: Vegetal
Agrupación	: Cormofitas
Tipo	: Fanerógamas
Subtipo	: Angiospermas
Clase	: Dicotiledóneas
Subclase	: Dialipétalas
Orden	: Ramnales
Familia	: Vitácea
Género	: <i>Vitis</i>
Especie	: <i>V. vinifera</i>

La botánica sistemática sitúa a la vid en la más importante agrupación del reino vegetal: las Cormofitas (plantas con raíz, tallo y hoja, autótrofas con clorofila y reproducción constante sexual además de la vegetativa): Tipo Fanerógamas o Espermafitas (plantas con flores y semillas); Subtipo Angiospermas (plantas con semillas encerradas en un ovario); Clase Dicotiledóneas (con dos hojas embrionarias en la base de la plántula); Orden Ramnales (plantas leñosas con un solo ciclo de estambres situados delante de los pétalos). En la Familia Vitaceae (flores con corola de pétalos soldados superiormente y de prefloración valvar, con cáliz poco desarrollado, gineceo generalmente bicarpelar y bilocular, con fruto en baya) y en el Género *Vitis* (con flores exclusivamente dioicas en las especies silvestres, y hermafroditas o unisexuales en las cultivadas) (Hidalgo 2002).

La familia Vitácea, a la que pertenece la vid, incluye a los géneros *Ampelopsis*, *Cissus*, *Parthenocissus* y *Tetrastigma* entre otros. El género *Vitis*, al que corresponden las vides cultivadas, según la clasificación clásica se divide en dos secciones o subgéneros: *Euvinis* y *Muscardinia*. El subgénero *Muscardinia* contiene tres especies de las cuales solamente una es cultivada, *V. rotundifolia*. Esta especie, originaria del sur de Estados Unidos, muestra resistencia a varias enfermedades y al insecto responsable de la filoxera, *Dactyloshpaera vitifoliae*, por lo que presenta gran interés en la mejora del cultivo de la vid (Hidalgo 2002).

El subgénero *Euvitis* comprende unas 30 especies que se distribuyen mundialmente de la siguiente manera: **a) Americanas:** agrupa a una veintena de especies que presentan pocas aptitudes viníferas con la excepción de *V. labrusca*. Del resto, existen varias que por su resistencia a la filoxera se han utilizado como patrones o para la producción de plantas madres e híbridos productores directos. Entre los más importantes se citan *V. riparia*, *V. rupestris*, *V. berlandieri* y *V. cordifolia*. **b) Asiáticas:** existen unas veinte especies que no presentan apenas interés para la producción de uva. Entre ellas se encuentra *V. amurensis*; y **c) Europeas:** sólo hay una especie, *V. vinifera*. Esta es la que presenta las mejores cualidades para la producción de uva de mesa, pasas y vino. Incluye varios miles de variedades o cultivares como resultado de cruzamientos naturales. La selección natural ha eliminado los individuos peor adaptados al medio y posteriormente el hombre ha seleccionado las variedades que más se adaptan a sus necesidades de producción. Esta especie presenta el gran inconveniente de ser altamente sensible a la filoxera y a varias enfermedades (Hidalgo 2002).

2.1.3. Características morfológicas

La vid es un arbusto sarmentoso y trepador, que se fija a tutores naturales o artificiales, cuando estos tutores faltan, se extiende sobre la superficie del terreno, en posición más o menos erguida, ocupando extensiones de alguna consideración (Hidalgo 2002).

La vid está dotada de un gran poder de emisión de raíces. Normalmente la mayoría de ellas se encuentra a una profundidad comprendida entre 0.6 m y 1.5 m, pudiendo penetrar en suelos arenosos hasta 3,60 m. Las plantas obtenidas por vía vegetativa (estacas), poseen raíces numerosas y muy ramificadas, mientras que las provenientes de semilla tienen su raíz pivotante bien característica. El tallo está constituido por el tronco, las ramas principales, los sarmientos y las yemas. El tronco, que no es otra cosa que la continuación hacia arriba de los órganos de la planta del subsuelo, es generalmente tortuoso y cubierto por una corteza más o menos caduca (*Vitis vinifera*, *V. labrusca*, etc.), que en el caso de especies del subgénero *Muscadina* (*V. rotundifolia*) está adherida. La corteza cada año crece en diámetro, añadiendo una capa nueva de madera, justamente debajo de la corteza.

Las ramas principales, de similares características que el tronco, constituyen las primeras ramificaciones de éste. Las ramas secundarias o brotes anticipados, surgen directamente de yemas situadas en las ramas primarias, son más cortas y difícilmente poseen flores y racimos (Hidalgo 2002).

Las yemas están constituidas generalmente por tres brotes parcialmente desarrollados con hojas rudimentarias, o bien con hojas y racimos florales, cubiertos por escamas que están impregnadas con suberina y revestidas con pelillos que protegen las partes interiores contra el secamiento. En condiciones normales, solamente uno de los tres brotes desarrollados parcialmente crece en primavera, constituyendo el punto de crecimiento primario. Las yemas se clasifican en: vegetativas, fruteras, axilares, latentes y adventicias. Las yemas vegetativas producen solamente hojas. Las yemas fruteras producen hojas y racimos florales, los cuales se localizan en posición opuesta a las hojas en el tercero y cuarto, cuarto y quinto, o quinto y sexto nudo, contados a partir de la base (nacimiento del sarmiento). Las yemas axilares normalmente salen de la axila de las hojas. Las yemas latentes son yemas axilares que por alguna razón permanecen inactivas una estación o más. Las yemas adventicias se desarrollan en cualquier parte de la vid, excepto en la punta de un brote o en las axilas de las hojas. (Hidalgo 2002).

Las hojas son el crecimiento expandido de un brote que nace en un nudo y tiene una yema en su axila. Cada hoja tiene tres partes: peciolo, brácteas y limbo, el cual posee senos, lóbulos y nervaduras cuyas características varían según la especie y variedad. (Hidalgo 2002).

Los zarcillos son considerados por algunos autores como el aborto de una inflorescencia y sirven para sujetar los brotes, protegiéndolos de la acción del viento. Al comienzo son herbáceos, para volverse leñosos en el otoño (Hidalgo 2002).

Las flores las lleva en un racimo constituido por un eje principal, llamado raquis, del cual salen ramas que se dividen para formar pedicelos, que son los que llevan las flores individuales. La porción del raquis que se extiende desde el brote hasta su primera rama se llama péndulo. El eje principal con todas sus ramificaciones (raquis, ramas y pedicelos) se denominan escobajo. Aunque la mayoría de las variedades comerciales de *Vitis vinifera* son

perfectas (con órganos masculinos y femeninos bien desarrollados en la misma flor), existen también flores puramente femeninas o puramente masculinas. La flor de la vid, a diferencia de la mayoría de las flores de otras especies, no se abre en la extremidad superior de la corola, sino que esta se desprende de la base en el momento de la floración y cae al suelo (Hidalgo 2002).

El racimo de uvas es el conjunto de frutos de la vid, puede tener forma regular o irregular. El escobajo es la parte leñosa del racimo que sirve de soporte a los granos, cuya composición al estado verde es parecida a la de las hojas, representando el 5 % del peso del total del racimo. Los granos son la parte carnosa del racimo, constituido por bayas, cuyas características son propias de cada variedad y que, por lo general, contienen semillas, siendo sus principales elementos: azúcares, agua, taninos, ácidos y potasa, que representan el 95% del peso total del racimo (Hidalgo 2002).

2.2. Condiciones ecológicas para el cultivo de la vid

2.2.1. Clima

De todos los componentes del clima, la temperatura es una de las más importantes, el umbral de temperatura de crecimiento aparente para el cultivo de la vid está entre 10 °C y 30 °C; el crecimiento se acelera al aumentar la temperatura. El rango óptimo se sitúa entre 25 y 30 °C., por encima de 30 o 32 °C, el crecimiento se vuelve lento y se detiene hacia los 38 °C (Reynier 2002).

El cultivo de la vid se adapta muy bien a diferentes condiciones climáticas y tipos de suelo. Si bien es exigente en calor y sensible a las heladas, durante el invierno, cuando la planta está en receso, puede soportar temperaturas de hasta -15 °C; aunque una vez ocurrida la brotación, una exposición a tan sólo -2 °C puede ocasionar la pérdida total de la cosecha. En el otro extremo puede sobrellevar temperaturas de hasta 40 °C y, en ocasiones, de hasta 45 °C. Las temperaturas óptimas para el cultivo de la vid en sus distintas etapas de desarrollo serían las siguientes: apertura de yemas entre 9 y 10 °C; floración entre 18 y 22 °C; floración a cambio de color entre 22 y 26 °C; cambio de color a maduración entre 20 y 24 °C; vendimia entre 18 y 22 °C (Reynier 1989).

2.2.2. Suelo

En cuanto a sus requerimientos de suelo, se adapta muy bien a diferentes tipos; no obstante, la calidad del vino puede variar según el tipo de suelo dónde se cultiva, por lo que éste resulta un factor determinante en la producción. Asimismo, la vid es muy resistente a la sequía; una vez cubiertas las necesidades mínimas de agua, con unas pocas lluvias puede vegetar sin problemas (Hidalgo 2002).

Un componente importante del terreno para la vid es la materia orgánica, un terreno pobre tiene menos de 1.5 % de materia orgánica, uno suficientemente dotado tiene de 1,5 a 2,5% y uno bien dotado tiene de 2,5 a 3,5%. La vid se adapta a muchísimos terrenos, además hay una cierta gama de patrones que permite adaptarse a las más variadas exigencias (Reynier 1989).

2.3. *Lasiodiplodia theobromae*

2.3.1. Generalidades

Lasiodiplodia theobromae (Pat.) Griffon & Maubl (Sin. *Botryodiplodia theobromae*) es un patógeno común de plantas en áreas tropicales y subtropicales del mundo. Está asociado con varios síntomas incluyendo canchros, muertes regresivas y pudrición de raíces en un amplio rango de hospedantes (Punithalingam 1980). Los canchros vasculares y la muerte regresiva de vid, causados por *L. theobromae*, fueron reportados por primera vez en 1972 en Egipto; después de cincuenta años un estudio en campo llevados fuera de California, mostraron que *L. theobromae* es un importante patógeno de vid (Levitt and Munnecke 1987). Estudios recientes muestran que dicho patógeno ha sido significativamente asociado con declinamientos de vid en Sudáfrica y Australia (Taylor *et al.* 2005, Wood and Wood 2005). *L. theobromae* and *Diplodia seriata* fueron un problema mayor en la producción de uva en las áreas más importantes del cultivo de vid de México (Urbez-Torres 2008).

L. theobromae es un hongo imperfecto y se considera el anamórfo o fase asexual del Ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* ((Phillips *et al.* 2007). Este hongo es el causante de la enfermedad conocida como la muerte regresiva de ramas, se encuentra ampliamente distribuido en regiones tropicales y subtropicales presentándose en un amplio rango de plantas (Punithalingam 1976). A pesar de que el hongo puede penetrar directamente a los

tejidos sanos del hospedante, su desarrollo es más rápido cuando penetra por las heridas (Cedeño *et al.* 1995). Los picnidios se forman sobre el tejido infectado en presencia de la luz solar, pudiendo formarse cientos de ellos; por lo que es importante, en condiciones de campo, el recojo y quema de los restos vegetales infectados sobre los cuales se observan en forma de polvo negro y granuloso (Mont 1993).

En medio de cultivo forma micelio aéreo que se vuelve gris después de 6 a 8 días con producción de picnidias después de un mes, las conidias son de forma elipsoidal de pared gruesa, inicialmente hialinas y sin septas con medidas de 20 a 25 (22.5) × 12 a 14 (13) micras. Las conidias luego se tornan de color marrón al momento de madurar, con una septa transversal y con estrías longitudinales en la pared. (Holiday 1995). Se ha comprobado que este patógeno crece en un rango de pH de 4 a 10, mostrando una gran adaptabilidad a las condiciones adversas para su crecimiento (Michelena *et al.* 2001).

L. theobromae, crece vigorosamente en diferentes medios de cultivo, posee una gran capacidad para utilizar los carbohidratos como única fuente de carbono y energía, pues crece rápidamente en presencia de altas concentraciones de almidón y sacarosa, esta característica, unida a su gran poder de penetración en tejidos vegetales, explica la rapidez con que es capaz de multiplicarse en plantas, pudiendo causar desde daños simples a severos (Almeida *et al.* 2000).

2.3.2. Sintomatología de la enfermedad

Los síntomas externos que muestran las plantas afectadas por la enfermedad, incluyen producción de brotes débiles, necrosis en los márgenes de la hoja, acortamiento de entrenudos, hojas, tallos y ramas más pequeñas, posteriormente un decaimiento general que acaba con la muerte de la planta. Los síntomas internos son fácilmente apreciables en el tronco y en los brazos, al efectuar cortes trasversales, se observa necrosis en diferentes sectores y de consistencia dura, estas lesiones puede tener su origen en la base de las ramas afectadas y se extienden hacia debajo a la zona del injerto. Aunque la enfermedad puede causar un colapso rápido y muerte de plantas jóvenes, lo normal es que el decaimiento sea lento y progresivo, produciéndose el amarillamiento de las hojas, la muerte de alguna rama y la reducción del crecimiento a partir del primer año después de plantación (Oliveira *et al.* 2004).

2.4. Defensa de las plantas

Las plantas pueden poseer mecanismos constitutivos de defensa que proveen, de forma pasiva, resistencia contra patógenos. Los mecanismos de resistencia constitutiva o "preformada" se pueden dividir en mecanismos de defensa estructurales constitutivos, como por ejemplo la presencia de capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, formación de ceras, entre otros; y mecanismos de defensa químicos constitutivos, tales como la acumulación de compuestos tóxicos en las células vegetales. (Osbourn 1996). De esta forma, los mecanismos constitutivos de resistencia en las plantas se basan en los rasgos distintivos de una especie o cultivar particular y generalmente no involucra una respuesta activa del hospedante ante la presencia del patógeno (Collinge *et al.* 1994).

A diferencia de la defensa constitutiva, los mecanismos inducidos de defensa, también llamados como resistencia inducida, se activan solamente como una respuesta al ataque de un patógeno (Collinge *et al.* 1994). El ataque de patógenos es una condición desfavorable que generalmente activa una serie de mecanismos de defensa en la planta cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección (Collinge *et al.* 1994).

La resistencia inducida es un mecanismo activo de defensa que involucra cambios claros en el metabolismo provocados por la expresión diferencial de genes. Por lo tanto, para que ocurra la inducción de la defensa, es necesaria la mediación de sistemas de reconocimiento específico, mediante los cuales la planta reconoce la presencia del patógeno (Hutcheson 1998).

La inducción de la defensa es una estrategia emergente de control que ha sido usado para protección de plantas contra patógenos vasculares (Benhamou and Bélanger 1998). La inducción de las resistencias es un estado de mejora de la capacidad defensiva de las plantas contra el ataque provocado por estímulos abióticos y bióticos, como fragmentos de pared celular de hongos y de plantas, extractos de plantas y sustancias químicas sintéticas, mediante el cual las defensas basales de las plantas son inducidos contra infecciones bióticas. (Knoester *et al.* 1999).

Investigaciones por cerca de 100 años han demostrado que las plantas pueden ser pre condicionadas a enfermedades. Inicialmente las investigaciones se referían a la inmunidad fisiológica que adquirirían. Tomó 60 años antes que los resultados del experimento de Ross fueran publicados. Ross utilizó el virus del mosaico del tabaco para sensibilizar el tabaco. Las inoculaciones las realizó cerca y lejos de hojas después inoculadas con otro patógeno para definir el concepto de “Resistencia localizada adquirida” y “Resistencia sistémica adquirida (SAR)”. Estos estudios permitieron desarrollar el modelo clásico de SAR durante 1980’s en otras plantas tales como Pepino (*Cucumis sativus* L.), frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) arroz (*Oryza sativa* L.) y *Arabidopsis thaliana*, demostrando que el SAR se conservó a través de diversas familias de plantas y fue efectiva contra amplio rango de virus, bacterias, hongos fitopatógenos así como planta parasita e insectos herbívoro. (Sticher *et al.* 1997).

Se requiere desarrollar sistemas de manejo integrado para la enfermedad; como una alternativa de control, y dentro de ellos tenemos el uso de activadores químicos de resistencia que permitirán reducir el número de aplicaciones y reducir la posibilidad de resistencia a los fungicidas por parte del patógeno. Además, estos productos ofrecen un buen control de la enfermedad y son inócuos para el hombre y el medio ambiente (Navia *et al.* 2000).

2.4.1. Activación de las defensas inducidas de las plantas

La activación de la defensa inducida en las plantas supone la existencia de mecanismos de reconocimiento mediante los cuales la planta determina la presencia del patógeno. Ciertas sustancias como carbohidratos, proteínas y pequeñas moléculas son capaces de actuar como inductor de defensa. Los inductores no-específicos son cualquier sustancia que induce la activación de defensa de forma no específica. Por ejemplo, los polímeros de azúcar que conforman la pared celular tanto de hongos como de las células vegetales, son reconocidos desde hace varios años como agentes capaces de inducir la expresión de genes de defensa en plantas (Darvill and Albersheim 1984). Esto es congruente con el hecho de que la muerte del tejido hospedante, causada por el ataque del patógeno o por una reacción de hipersensibilidad (HR), libera componentes de la pared celular vegetal que inducen la activación de defensa en tejidos adyacentes. De manera similar, la actividad de algunas enzimas hidrolíticas, producidas por la célula vegetal como reacción de defensa, liberan componentes de la pared celular de ciertos hongos que tienen un efecto inductor de

defensa en los tejidos vegetales. La reacción de defensa también se puede activar de forma no específica por factores abióticos como el choque térmico, la sequía, diversas sustancias químicas y la luz ultravioleta. En general, este tipo de inductores abióticos activan respuestas de defensa ya que provocan heridas y daño físico en los tejidos (Collinge *et al.* 1994).

El reconocimiento específico tiene lugar cuando ocurre una interacción entre las proteínas codificadas por los genes R y los correspondientes productos de los genes Avr del patógeno. Esta interacción da origen a una cascada de señales y otras vías de transducción que finalmente llevan a la expresión de genes asociados a la defensa (Hammond - Kosack and Jones 1996).

Los mecanismos de defensa que son inducidos como consecuencia del reconocimiento específico son los responsables de la resistencia, actuando muchas veces en conjunto para detener el avance del patógeno. Estos mecanismos incluyen principalmente la muerte celular por reacción hipersensible (HR), la acumulación de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, la acumulación de enzimas hidrolíticas y la acumulación de sustancias de refuerzo que evitan el avance del patógeno, entre otros (Collinge *et al.* 1994). La HR además está asociada a la expresión simultánea o paralela de otros mecanismos de defensa, incluyendo la acumulación de fitoalexinas, lignina, suberina y proteínas ricas en hidroxiprolina; y con la producción y acumulación de altas cantidades de proteínas relacionadas con la patogénesis o proteínas PR, que se asocian con el fenómeno de resistencia sistémica adquirida o SAR (Ryals *et al.* 1996). A pesar de que la HR es un mecanismo sumamente efectivo que produce una reacción de resistencia casi absoluta, aún no existe consenso que defina si la HR es directamente responsable de la resistencia, al privar de tejido vivo y nutrientes al patógeno, o si más bien su acción está basada en la acumulación de compuestos dañinos que simultáneamente matan al patógeno y a las células hospedantes (Heath 2000). Sin embargo, cada vez existe más evidencia de que el proceso de HR ocurre como resultado de una necrosis controlada de forma similar a la apoptosis o muerte celular programada conocida en los tejidos animales (Raff 1998). El fenómeno de muerte celular programada o PCD está mediado por una explosión oxidativa que libera agentes altamente oxidantes llamados AOS "active oxygen species", tales como el superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Levine *et al.* 1994). La reacción hipersensible parece ocurrir como un programa suicida activo y organizado, y no como consecuencia de un colapso celular pasivo producido por el ataque del patógeno o por toxinas

derivadas de éste (Gilchrist 1998). La generación de la PCD está relacionada mediante señales con la activación y coordinación de los otros mecanismos de defensa. Se ha demostrado que el H₂O₂ tiene además una función como señal difundible implicada en la inducción de otros mecanismos de defensa (Orozco-Cárdenas *et al.* 2001).

Las fitoalexinas se definieron originalmente como metabolitos secundarios de bajo peso molecular con propiedades antimicrobianas y que se producen y acumulan en plantas expuestas a microorganismos (Paxton 1981). Estos compuestos normalmente se encuentran en niveles basales muy bajos en las plantas sanas pero su acumulación se incrementa dramáticamente después del ataque de un patógeno. Las fitoalexinas se acumulan en grandes cantidades tanto en el sitio de penetración como en las células y tejidos adyacentes a las células que reaccionan con la HR (Hammerschmidt 1999). Entre las fitoalexinas más estudiadas se encuentran aquellas derivadas del metabolismo de los fenil propanoides que tienen como base el aminoácido fenilalanina. La producción de fitoalexinas se ha correlacionado con la resistencia a patógenos y se asocia con la inducción de una serie de genes que codifican para enzimas específicas responsables de su síntesis (Fig. 1). Entre ellas la fenilalanina amonio liasa (PAL), la chalcona sintasa (CHS) y la chalcona isomerasa (CHI). La síntesis de estas enzimas como respuesta a la infección se ha demostrado anteriormente (Cuypers *et al.* 1988).

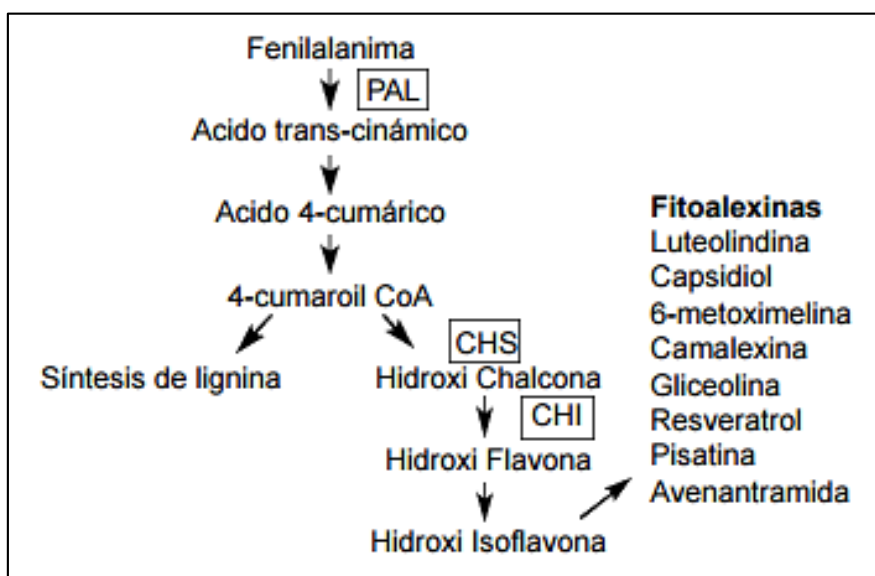


Figura N° 1 Vía biosintéticas de las fitoalexinas isoflavonoides.

Uno de los mecanismos de defensa más evidentes es la producción y acumulación de sustancias que actúan como barreras físicas evitando el avance de patógenos. La lignificación puede ser una característica constitutiva en algunas especies pero también puede ocurrir como un proceso de refuerzo de los tejidos cuando están sujetos a daño físico. La lignificación también se manifiesta durante la defensa a patógenos. La acumulación de lignina en grandes cantidades puede ocurrir de forma localizada en los tejidos atacados por patógenos. La lignina se produce por la unión enzimática de unidades de fenilpropanoides formando largos polímeros que confieren impermeabilidad y resistencia mecánica; además, la lignina es resistente a la degradación producida por muchos patógenos (Nicholson and Hammerschmidt 1992). La síntesis de lignina, al igual que la síntesis de ciertas fitoalexinas, se deriva del metabolismo de los fenilpropanoides en donde la enzima PAL juega un importante papel regulador. Sin embargo, la síntesis de *novo* de otras enzimas, como la cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) y algunas peroxidasas, también ocurre durante la activación de la defensa contra los patógenos. Ciertas peroxidasas son encargadas de la polimerización de las unidades de fenilpropanoides que da lugar a la lignina (Barber and Mitchell 1997).

Aparte del proceso de lignificación, las plantas producen y depositan otras sustancias que previenen el avance de ciertos patógenos. Entre ellas se puede mencionar las proteínas ricas en hidroxiprolina o HRGP "hydroxyproline-rich glycoproteins", las cuales se acumulan alrededor de los sitios de ataque del patógeno evitando su penetración (Benhamou *et al.* 1990).

Otro mecanismo estructural de defensa inducida es la formación de papilas. La papila es una estructura de resistencia que se produce por modificaciones de las células de la epidermis. Las papilas están compuestas principalmente de calosa (β -1,3-glucano) y se asocian a la resistencia porque evitan la penetración de los hongos (Skalamera *et al.* 1997).

Las proteínas relacionadas a la patogénesis o también llamadas proteínas PR, son un grupo variable que se acumulan en las plantas después y durante la infección con patógenos. Las proteínas PR se identificaron inicialmente en tabaco durante la interacción con el virus del mosaico del tabaco. Estas se caracterizan por su bajo peso molecular, resistencia a las proteasas, de localización extracelular y con valores de pH extremos (Van Loon and Van Kammen 1970). La clasificación más simple se basa en los cinco grupos originalmente

identificados para las proteínas PR de tabaco. Sin embargo, éstas han sido identificadas tanto en dicotiledóneas como en monocotiledóneas, lo que ha generado una nueva clasificación (Van Loon and Van Strien 1999). Algunas de las proteínas PR poseen actividades definidas tal como las PR-2 (b-1,3-glucanasas) y PR-3 (quitinasas). Esto sugiere que la alta expresión de las glucanasas y las quitinasas durante la patogénesis tiene una función importante en la defensa contra patógenos que contienen b-1,3-glucano y quitina. De hecho, plantas de trigo y arroz manipuladas genéticamente para expresar ciertas quitinasas demostraron ser más resistentes a los hongos *Erysiphe graminis* y *Magnaporthe grisea* respectivamente (Bliffeld *et al.* 1999, Nishizawa *et al.* 1999). A pesar de que algunas proteínas PR como las PR-2 y PR-3 poseen actividad antimicrobiana, aún se desconoce la función que tienen el resto de ellas durante la respuesta de defensa a patógenos y particularmente a patógenos virales.

2.4.2. Resistencia sistémica en las plantas

La resistencia sistémica es un “estado fisiológico de mejora en la capacidad defensiva de la planta” elicitado por un estímulo medioambiental específico, mediante el cual las defensas innatas de la planta son potenciadas contra cualquier cambio biótico (Van Loon *et al.* 1998). Este estado de resistencia es efectivo contra un gran rango de patógenos y parásitos, incluyendo hongos, bacterias, virus, nematodos, plantas parásitas y algunos insectos herbívoros (Benhamou and Nicole 1999). Las dos formas más claras que define la inducción de resistencia son la resistencia sistémica adquirida (SAR) y resistencia sistémica inducida (SIR), las cuales pueden ser diferenciadas en base a la naturaleza de los elicitores y en la regulación de la rutas envueltas (Knoester *et al.* 1999).

Resistencia Sistémica Adquirida está relacionado a la producción de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR proteínas), es inducido por elicitores bióticos y abióticos y es dependiente de la ruta del ácido salicílico. El SAR en las plantas es la que aparece después que las plantas han sido pre inoculadas con varios agentes bióticos o previamente tratado con varios agentes químicos o físicos. La resistencia adquirida es no específica, debido a que, sin importar el tipo de agente o patógeno utilizado como efector, el nivel de resistencia en la planta aumenta ante varios patógenos, así tenemos que la resistencia adquirida es dada en una amplia gama de plantas ante el ataque de hongos, bacterias, virus e incluso insectos. (Sticher *et al.* 1997)

La forma clásica de SAR puede ser disparada por la exposición de las plantas a patógenos virulentos, avirulentos y no patogénicos o artificialmente con químicos tales como el ácido salicílico, ácido 2,6 dicloro-isonicotínico (INA) o benzo (1, 2, 3) thiazole 7 carbotioico, ácido S-Metil éster (BTH) (Sticher *et al.* 1997). Dependiendo de la planta y el elicitor, se requiere de un periodo de tiempo para el establecimiento de la resistencia que corresponde al tiempo requerido para la acumulación de ácido salicílico y la formación coordinada de proteínas relacionadas PR con la patogenicidad en diversas partes de la planta (Cameron *et al.* 1994). Cualquier disrupción en la habilidad de las plantas para acumular ácido salicílico resulta en la pérdida de la expresión de genes relacionados con la patogenicidad y la atenuación de la respuesta (Gaffney *et al.* 1994).

La resistencia sistémica inducida (ISR) es elicitada por algunas cepas de rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPR) de las cuales sobresalen especies de género *Pseudomonas* y *Bacillus* sp (Pieterse *et al.* 1996). Las dos formas más claras de definir la resistencia sistémica inducida y resistencia sistémica adquirida es la diferencia en la base de la naturaleza de los elicitores y la vía reguladora involucrada, como se demuestra en los sistemas de plantas modelo (Figura 2) (Knoester *et al.* 1999).

En contraste, el SIR no está relacionado a la acumulación de proteínas PR, es inducida por elicitores bióticos y sigue la ruta del etileno y del ácido jasmónico (Knoester *et al.* 1999). Resultados de laboratorio y de campo demostraron que al igual que la resistencia sistémica adquirida, la resistencia sistémica inducida es efectiva contra un amplio rango de enfermedades causadas por virus, bacterias y hongos (Murphy *et al.* 2000).

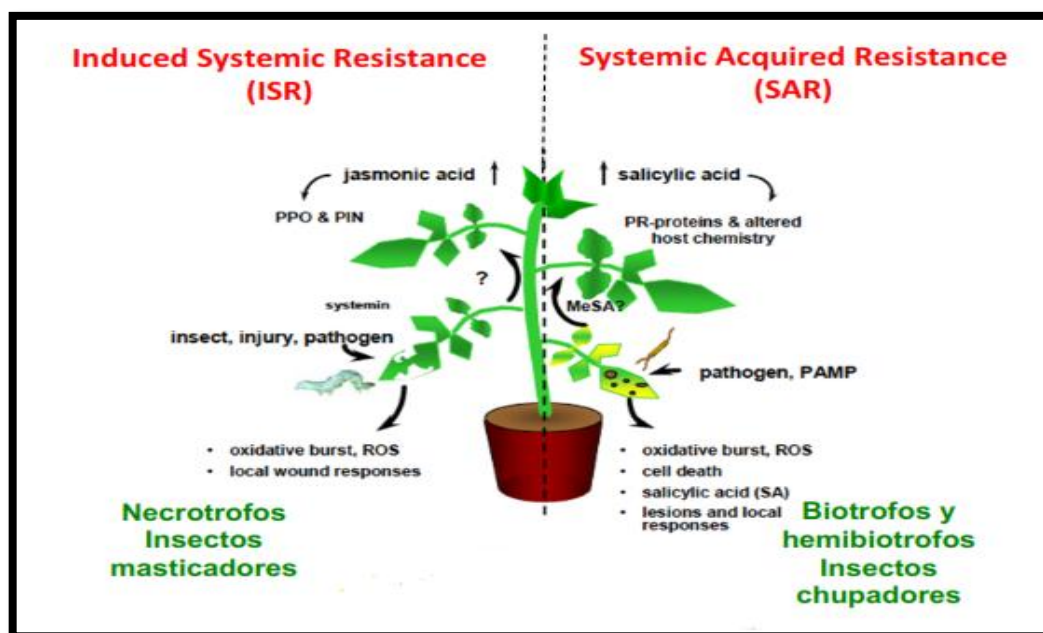


Figura N° 2 Comparación de rutas metabólicas de resistencia en plantas (Bostock 2005).

2.5. Descripción de los productos utilizados en el presente trabajo de investigación

2.5.1. Fosfitos

Esta clase de compuestos está representada por el Fosetil - Aluminio y el ácido fosforoso, poseen un modo de acción propiamente como la de un fungicida; una vez aplicado es rápidamente absorbido por el follaje y raíces, luego es transportado dentro de la planta en dirección ascendente y descendente. Su rápida penetración evita la inactivación del principio activo; mientras que, la eficiente sistemicidad permite la protección de diferentes lugares de la planta (por ejemplo el sistema radicular) desde un punto de aplicación (follaje). Luego de su absorción, el producto sufre un proceso de oxidación o conversión resultando una fuente continua de ácido fosforoso (H_3PO_3). Esto incrementa la producción natural de sustancias que activan las defensas dentro de la planta, en respuesta a un agente patogénico, como un ataque fungoso (Fenn and Coffey 1989).

Algunos resultados experimentales observados de la aplicación de fosfitos han demostrado que los tratamientos preventivos a la planta resultarían en un aumento del nivel de fitoalexinas seis veces más que en condiciones normales, previniendo e inhibiendo el ataque fungoso (Química Suiza 2001).

Los fosfitos poseen dos mecanismos de acción, una directa del ácido fosforoso obtenido en la célula que afecta directamente las esporas y el desarrollo del micelio (Schwinn and Margot 1991); la acción indirecta es la que, una vez dentro del tejido, los fosfitos inducen una mayor producción de sustancias que activan las defensas de la planta, siendo mayor que la inducida naturalmente por la planta, y activando de este modo un eficiente mecanismo natural de protección, este mecanismo de acción refuerza la defensa natural de la planta y no da lugar a la aparición de cepas resistentes (Fernández 1978). De igual manera, las aplicaciones individuales de fosfato a las hojas pueden inducir protección sistémica contra patógenos como el oídio en algunos cultivos anuales y perennes (Schwinn and Margot 1991).

2.5.2. Manano oligosacáridos

Los Oligosacáridos, particularmente los Mananos oligosacáridos (MOS), corresponden a azúcares complejos derivados de la pared celular externa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Dilley *et al.* 1997). Dichos productos pueden inducir resistencia en plantas. Ciertas peroxidasas están involucradas en la respuesta de defensa mediante el fortalecimiento de la pared mediante la polimerización de compuestos fenólicos durante la síntesis de lignina, un proceso que puede retrasar o prevenir la colonización del patógeno. (Van Loon and Van Strien 1999). Además estas peroxidasas han sido asociadas a procesos relacionados con las defensas, incluyendo reacciones de hipersensibilidad, y polimerización de la pared celular y posterior suberificación (Baysal *et al.* 2003).

2.5.3. Acibenzolar-S- methyl (ASM) y Fosfito de Potasio

El acibenzolar-S-metil (ASM) es un análogo del ácido salicílico, es una molécula sintética capaz de activar el SAR en cultivos perennes (Brisset *et al.* 2000). Aplicaciones exógenas de SA y sus análogos sintéticos tales como ácido β -aminobutárico, ácido nicotínico, Benzol [1,2,3] thiadiazol-7-carbótiico, ácido-S-metil ester (BTH), acibenzolar-S-Metil y ácido 2-6- dicloroisonicotínico (INA) han demostrado ser activadores de SAR en muchos cultivos dentro de 3 a 4 días, incluyendo plantas de tabaco (Bokshi *et al.* 2003). Estos productos usados como inductores o elicitores no tienen una actividad antimicrobiana de forma directa, si no que actúan como moléculas receptoras en plantas, y activan diferentes respuestas de defensa (Durrant and Dong 2004).

El fosfito de potasio, una sal de ácido fosforoso, es sistémicamente móvil, ha sido usado para manejos de enfermedades causadas por Oomycetos en muchas especies de plantas (Eshraghi *et al.* 2011). También hay reportes que muestran el potencial de fosfito de potasio para reducir la intensidad por enfermedades causadas por *Colletotrichum gloesporioides*, el virus del mosaico del caupi transmitido por áfidos, *Fusarium oxysporum*, *Oóidium mangiferae*, *Passion fruit woodiness virus*, *Sphaerotheca pannosa*, *Erysiphe necator*, *Venturia inaequalis* y *Xanthomonas axonopodis* (Araujo *et al.* 2008)

El fosfito de potasio es un producto registrado como suplemento de suelo y fertilizante foliar para cultivos perennes y anuales. El fosfito de potasio actúa de acuerdo a su concentración en el tejido en el hospedante. Cuando la concentración es baja, induce la síntesis de enzimas de defensa del hospedante, de fitoalexinas y de compuestos fenólicos; sin embargo, cuando la concentración es alta, actúa directamente para inhibir el crecimiento del patógeno (Araujo *et al.* 2008).

La inducción de síntesis de metabolitos secundarios en plantas mediante tratamiento previo con ASM y fosfito de potasio han sido investigados a un nivel químico y microscópico en muchos patosistemas tales como *Arabidopsis*, *Phytophthora palmivora* (Daniel and Guest 2006), *Pythium ultimum* en cucurbitáceas (Benhamou and Bélanger 1998) *Fusarium oxysporum* f sp. *radicis* – *Lycopersici* (Benhamou and Bélanger 1998) y *Blumeria graminis* en trigo (Stadnik and Buchenauer 2000). Los metabolitos secundarios son clasificados como alcaloides, fenoles, terpenoides conforme a su ruta biosintéticas (Freeman and Beattie 2008), son halladas en muchas plantas vasculares, los alcaloides son una clase grande de compuestos nitrogenados como actividad antimicrobial contra muchos patógenos (Freeman and Beattie 2008). Esta clase incluye cafeína (1,3,7- trimethylxanthine), cocaine, morfina, nicotina, teobromina (Freeman and Beattie 2008). Muchos compuestos fenólicos son sintetizados por la planta a través de la vía de fenilpropanol (Nicholson and Hammerschmidt 1992). Flavonoides (apigenina, catequina, epicatequina epigallocatequina, kaemferol, luteolina, miricetina, naringina, floridzina y quercetina) ácidos hidroxibenzóicos (ácido gálico, ácido P-hidroxibenzóico, ácido protocatechuico, ácido salicílico, ácido salicilhidroxámico, ácido siríngico y ácido vanílico) y ácidos hydroxicinnámicos (ácido coumárico, ácido cafeico, ácido felúrico, ácido p- coumárico y ácido sinapínico), son entre las más importantes fenoles producidos por la planta para hacer frente a infecciones por patógenos (Cushnie and Lamb 2005).

2.5.4. *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis*

Otra alternativa en el control de las enfermedades es el uso de microorganismos (bacterias y hongos) como inductores de resistencia. La especie *Bacillus subtilis* es una bacteria gram positiva comúnmente encontrada en los sistemas agrícolas y considerada como promotora del crecimiento en plantas (PGPB) (Kloepper and Schroth 1980). Otorga otros beneficios como son la inducción de mecanismo de resistencia en plantas. Estudios realizados en varios cultivos en donde las raíces fueron tratados con *B. subtilis* y, luego de cinco días, las hojas de estas plantas fueron infectadas con patógenos foliares como *P. infestans*, se observó que la severidad de la enfermedad causada fue reducida en un 50% (Kilian *et al.* 2001)

El género *B. subtilis* produce una variedad de proteasas y otras enzimas que le permiten degradar diferentes sustratos naturales y contribuye al ciclo de nutrición y tiene un efecto directo sobre algunos patógenos a través de antagonismo directo (antibiosis y competencia por recursos (Mont 2004)

Trichoderma harzianun es un hongo muy común en el suelo y usado como agente de biocontrol, produce enzimas fungitóxicas que degradan la pared celular de los patógenos, produce antibióticos que pueden matar a los patógenos, promueve el desarrollo de la planta e induce el mecanismo de defensa de éstas. Hasta hace poco se pensó que las especies de *Trichoderma* lograban el biocontrol solamente por efecto directo sobre patógenos, particularmente vía parasitismo, antibiosis y competencia; si bien es cierto que estos mecanismo son importantes, los efectos directos en la planta son sin duda igualmente importante (Mont 2004)

Análisis bioquímicos han revelado que las inoculaciones de plantas con *T. harzianun* inician un incremento en la actividad de peroxidasas y citoquinas a las 48 y 72 horas respectivamente después de la inoculación. Estos resultados fueron observados en raíces de plántulas de pepino cuando fueron tratadas con este hongo, evidenciado que puede inducir mecanismo de resistencia en plantas (Yediria *et al.* 1999).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización

El presente trabajo se realizó en el laboratorio y en el vivero de la empresa Los Viñedos ubicado en la Panamericana. Sur Km. 201, Fundo El Retiro Lote 75, Distrito de Chincha Baja Provincia de Chincha y departamento de Ica.

3.2. Recolección de muestra

Se escogieron plantas de vid de la variedad Red Globe con síntomas característicos de infecciones con *L. theobromae* de los campos de la empresa en mención. Los brotes de las plantas seleccionadas se cortaron con la ayuda de una tijera de podar y fueron colocadas en una bolsa de polipropileno y fueron llevadas inmediatamente al laboratorio de Los Viñedos para ser procesadas.

3.3. Aislamiento e identificación del patógeno

Para el aislamiento del patógeno se seleccionaron las partes necróticas de las ramas o brotes con su zona de avance (sin síntomas), se procedieron a lavarlas con agua potable y posteriormente se cortaron en porciones pequeñas de aprox. 5 mm de diámetro abarcando la zona de avance de la enfermedad, luego fueron llevadas a la cámara de flujo laminar para posteriormente proceder a la inmersión en una solución de alcohol al 96 % por 5 minutos con el propósito de eliminar los contaminantes y microorganismos superficiales.

Las porciones de tejido desinfectados fueron enjuagadas con agua estéril y puestas sobre papel absorbente estéril. Una vez secas, las porciones de tejido se sembraron en placas Petri conteniendo medio de cultivo Extracto de Malta Agar (MEA) disponiendo 5 porciones en forma de cruz (Figura 3 A y B). Las placas sembradas se colocaron por cuatro días en la incubadora a una temperatura de 25 °C para permitir el crecimiento del hongo patógeno.

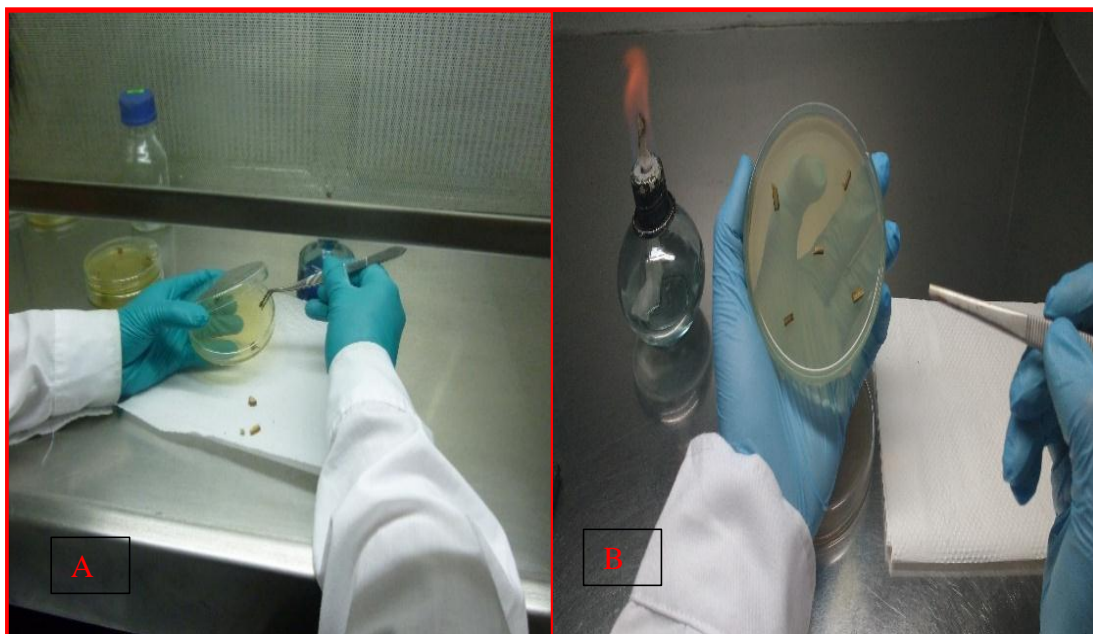


Figura N° 3 Aislamiento de *L. theobromae* en plantas de vid

Obtenidos los crecimientos de las colonias, éstas fueron purificadas mediante repiques sucesivos en placas Petri con medio MEA hasta la obtención de las colonias libres de contaminantes. Las placas con cultivo puro del hongo fueron incubadas a 25 °C por una semana y luego fueron colocadas bajo luz fluorescente blanca a temperatura ambiente durante una semana para que formen las estructuras reproductivas.

Transcurrido el tiempo se hicieron observaciones al microscopio estereoscópico para determinar la presencia de las esporulaciones del hongo. Se hicieron preparaciones microscópicas de las estructuras fructificantes formadas en las colonias en láminas porta y cubreobjetos las cuales fueron observadas al microscopio compuesto para la identificación correspondiente. La identificación se realizó utilizando las claves de Barnett & Hunter (1996) para identificar el género taxonómico; y la clave de Sutton (1980) y el descriptor de la Commonwealth Mycological Institute (CMI) para la identificación a nivel específico.

3.4 Prueba de patogenicidad

3.4.1. Material vegetal

Se emplearon estacas enraizadas de la variedad Red Globe injertadas sobre el patrón Harmony que fueron proporcionados por el vivero de Los Viñedos. Las estacas fueron plantadas en bolsas de polietileno con sustrato estéril compuesto por una mezcla de fibra de coco, humus y pajilla de arroz en las proporciones (1-1-1/2). Las estacas sembradas se dejaron crecer en las bolsas durante tres meses para poder obtener los plantones correspondientes. Transcurrido ese tiempo, se seleccionaron los plantones sanos y vigorosos, que no mostraban ningún síntoma primario ni secundario característico de las infecciones por hongos de madera, para la inoculación del hongo obtenido.

3.4.2. Preparación del inóculo

El hongo *L. theobromae*, purificado e identificado previamente, fueron repicados en placas Petri con medio MEA, se incubaron a 25 °C por siete días y después se expusieron a luz fluorescente blanca a temperatura ambiente hasta que formaron abundante esporulación.

3.4.3. Inoculación

Para la inoculación de *L. theobromae*, en cada plantón de vid se realizaron dos heridas circulares de 5 mm de diámetro en el tallo, una en la zona del patrón y la otra en la zona de la variedad injertada. Para esta labor se utilizó un sacabocado de 5 mm de diámetro previamente desinfectado, haciendo una presión leve en el tallo para extraer la porción de corteza. En la corteza expuesta se colocó una rodaja de 5 mm de medio MEA conteniendo el crecimiento esporulado de *L. theobromae*, se cubrió con un trozo pequeño de algodón humedecido con agua destilada estéril y finalmente se envolvió con cinta de parafilm. Los plantones inoculados se dejaron crecer hasta la observación de los síntomas secundarios y primarios; así como de la presencia de los signos correspondientes.

3.4.4. Evaluaciones

Transcurrido 40 días de la inoculación se realizó la evaluación de las pudriciones en los tallos, tanto en el patrón como en el injerto, y los signos presentes en la parte externa del tallo. Para evaluar el avance interno de la pudrición se efectuó un raspado cortical con la

ayuda de un bisturí y posteriormente corte longitudinal del tallo y se realizó la medición del avance del área necrótica en milímetro (mm).

3.4.5. Reaislamiento de *L. theobromae*.

Se seleccionaron algunos de los plantones inoculados, se obtuvieron muestras de los tallos y éstos fueron enviados al laboratorio para proceder con el reaislamiento del patógeno inoculado (*L. theobromae*). La metodología que se siguió fue la misma utilizada en proceso inicial de aislamiento e identificación del patógeno anteriormente descrita.

3.5. Prueba de efectividad de los productos químicos y biológicos ‘in vitro’

Los productos que se utilizaron en los tratamientos en el presente trabajo de investigación fueron ocho en total, seis de naturaleza química y dos de naturaleza biológica, los cuales se presentan en el cuadro 1.

Cuadro N° 1: Tratamientos con los correspondientes productos químicos y biológicos utilizados en la prueba *in vitro* para el control de *L. theobromae*.

Trat.	Ingrediente activo	Nombre comercial	Dosis /100ml Comercial	Concentración 100 ppm
T1	Acido fosforoso	No aplica	0.5 ml/100ml	10.00 mg
T2	Fosetil de Aluminio	Alliette	0.25gr/100ml	20.00 mg
T3	Fosfito de potasio	Cunebforte	0.25 ml/100ml	14.28 µL
T4	Sulfato de cobre pentahidratado	Phyton	0,2ml/100 ml	40.40 µL
T5	Manano oligosacáridos	Agromoss	0.25ml/100ml	33.30 µL
T6	Acibenzolar S-methyl	Actigard	0.005g/100ml	20.00 µL
T7	<i>Trichoderma harzianum</i>	Tricho-D	0.5g/100ml	
T8	<i>Bacillus subtilis</i> (0.2%)	Bio-splent	0.5g/100ml	
T9	Testigo			

Para probar la efectividad de estos productos como antagonicos al crecimiento y desarrollo de *L. theobromae*, se utilizó la metodología de medio envenenado para los productos químicos y biológicos, y adicionalmente la prueba de enfrentamiento para los productos biológicos.

3.5.1. Prueba de efectividad de los productos químicos ‘in vitro’

Para la técnica de alimento envenenado se preparó el medio extracto malta de agar (MEA) y se distribuyó en Erlenmeyers de 250 ml y se esterilizaron al autoclave. Una vez esterilizados y licuados y a una temperatura aproximada de 38 °C, se adicionaron los productos químicos, uno por cada erlenmeyer y se procedió a distribuirlos en placa Petri de 10 cm de diámetro. Las concentraciones empleadas por cada producto químico se muestran en el cuadro 2.

Cuadro N° 2: Tratamientos con los productos químicos utilizados en la prueba *in vitro* para el control de *L. theobromae*.

Trat.	Ingrediente activo	Nombre comercial	Concentración 100 ppm
T1	Acido fosforoso	No aplica	10.00 mg
T2	Fosetil de Aluminio	Alliette	20.00 mg
T3	Fosfito de potasio	Cunebforte	14.28 µL
T4	Sulfato de cobre pentahidratado	Phyton	40.40 µL
T5	Manano oligosacáridos	Agromoss	33.30 µL
T6	Acibenzolar S-methyl	Actigard	20.00 µL
T9	Testigo		

Una vez solidificado y enfriado el medio en las placas Petri, se sembró en el centro de cada una un disco de medio MEA de 5 mm de radio conteniendo micelio del patógeno (*L. theobromae*) en activo crecimiento. Las placas se incubaron a 25 °C y diariamente se midió el crecimiento radial de la colonia. Para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento de la colonia, que mide la eficacia de los productos evaluados, se empleó la siguiente fórmula:

$$PI = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Dónde:

PI: Porcentaje de inhibición (%)

C: Crecimiento del radio de la colonia del testigo (mm)

T: Crecimiento de radio de la colonia del tratamiento (mm)

Para este ensayo se empleó el diseño completamente al azar con 5 repeticiones (placas) por cada tratamiento (productos químicos más el testigo). Se realizó el análisis de variancia y la prueba de comparación de medias de Tukey para establecer la significación de las variaciones de crecimiento entre los tratamientos.

3.5.2. Prueba de control biológico in vitro

Para esta prueba se utilizó dos metodologías, la técnica del alimento envenenado y la prueba del enfrentamiento.

a) Técnica del alimento envenenado

Igual que en el ensayo de los productos químicos, previo a verter el medio estéril MEA a la placa Petri, se adicionó el controlador biológico según la dosis del tratamiento. Una vez solidificado el medio se colocó un disco de agar de 5 mm de radio conteniendo micelio del patógeno en el centro de la placa. En el cuadro N° 3, se observa los tratamientos de control biológico utilizados en esta prueba.

Cuadro N° 3: Tratamientos con los correspondientes productos biológicos utilizados en la prueba “in vitro” para el control de *L. theobromae*.

Trat.	Ingrediente activo	Nombre comercial	Dosis /100ml Comercial
T7	<i>Trichoderma harzianum</i>	Tricho-D	0.5g/100ml
T8	<i>Bacillus subtilis</i> (0.2%)	Bio-splent	0.25g/100ml
T9	Testigo		

Las placas se incubaron a 25 °C y diariamente se midió el crecimiento radial de la colonia. Para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento de la colonia, se empleó la misma fórmula que se empleó en el ensayo del alimento envenenado con los productos químicos.

En este ensayo se empleó también el diseño completamente al azar con 5 repeticiones (placas) por cada tratamiento (controladores biológicos más el testigo). Se realizó el análisis de variancia y la prueba de comparación de medias de Tukey para establecer la significación de las variaciones de crecimiento entre los tratamientos.

b) Prueba de enfrentamiento

La prueba de enfrentamiento entre los controladores biológicos y el patógeno se realizó en medio MEA previamente distribuido en placas de Petri.

Se prepararon dos suspensiones, una por cada controlador biológico, en agua estéril en dos erlenmeyer, según las dosis indicadas en el cuadro N° 4. En cada una de estas suspensiones se colocaron discos de papel filtro estéril de 5 mm hasta su completa inmersión por un minuto, después los discos fueron ubicados en el borde del erlenmeyer y se dejó escurrir durante otro minuto. Una vez escurridos los discos, se colocó un disco en un extremo de una placa Petri con el medio MEA y en el otro extremo se sembró un disco de medio MEA con crecimiento fresco del hongo *L. theobromae*.

Cuadro N° 4: Dosis de los biocontroladores utilizados en la suspensión para impregnar los discos de papel filtro para utilizar en la prueba de enfrentamiento con *L. Theobromae*.

N°	TRATAMIENTO	NOMBRE COMERCIAL	DOSIS
1	<i>Bacillus subtilis</i>	Bio-splent	0.5g/100ml de agua
2	<i>Trichoderma harzianum</i>	Tricho-D	0.25g/100ml de agua

Las placas sembradas se incubaron a 25 °C y diariamente se evaluó el crecimiento del avance radial hacia el centro de ambas colonias en cada placa. Los tratamientos que se emplearon en esta prueba se detallan en el cuadro N° 5.

Cuadro N° 5: Prueba de enfrentamiento in vitro entre *L. theobromae* y los biocontroladores.

N°	TRATAMIENTO
1	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> vs. <i>Bacillus subtilis</i>
2	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> vs. <i>Trichoderma harzianum</i>
3	Testigo: <i>Lasiodiplodia theobromae</i>
4	Testigo: <i>Trichoderma harzianum</i>
5	Testigo: <i>Bacillus subtilis</i>

En este ensayo se empleó también el diseño completamente al azar con 5 repeticiones (placas) por cada tratamiento (enfrentamientos más los testigos). Se realizó el análisis de variancia y la prueba de comparación de medias de Tukey para establecer la significación de las variaciones de crecimiento entre los tratamientos.

3.5.3. Prueba de control químicos y biológicos en vivero

a) Material vegetal

Se utilizaron plantones sanos de la variedad Red Globe injertadas sobre patrón Harmony que fueron proporcionados por el vivero de Los Viñedos. Los plantones fueron obtenidos a partir de esquejes (de patrón y variedad) tratados previamente por un proceso de termoterapia (50 °C x 30 minutos), injertadas y puestas en una cama dentro de la cámara de forzadura con el fin de ayudar a formar los primordios radiculares y el súber en la zona de injerto. Luego fueron trasplantadas en bandejas de polipropileno de 12 compartimientos de 500 cc cada uno, conteniendo sustrato, previamente esterilizado (100 °C x 4 horas) conformado por fibra de coco, humus, pajilla de arroz, en proporciones de (1-1-1/2), donde estuvieron por un periodo de 3 meses, para luego ser usadas en los tratamientos correspondientes.

Se sembraron 20 bandejas, con 12 plantones en cada una, lo que hicieron un total de 240 plantones. Se usaron 10 bandejas para las aplicaciones de los productos con la metodología curativa y 10 bandejas para la metodología preventiva.

b) Tratamientos:

Todos los productos químicos y biológicos que fueron utilizados en la fase de laboratorio se utilizaron también en la fase de vivero, tanto para las aplicaciones curativas como para las preventivas. Los tratamientos fueron diez para los curativos y otros diez para los preventivos, las cuales fueron un total de 20 tratamientos (Cuadro 6).

Cuadro N° 6: Tratamientos de productos químicos y biológicos contra *L. theobromae*, en fase de vivero.

	Tratamiento	Ingrediente activo	N. comercial	Dosis	Aplicación
CURATIVO	T1	Acido fosforoso	No aplica	1,0 L/200	Drench
	T2	Fosetil de Aluminio	Alliette	0,5 kg/200 L	Foliar
	T3	Fosfito de potasio	Cunebforte	0,5 L/ 200 L	Foliar
	T4	Sulfato de cobre pentahidratado	Phyton	0,4 L/200 L	Foliar
	T5	Manano oligosacáridos	Agromoss	0,5 L/200 L	Foliar
	T6	Acibenzolar S-methyl	Actigard	10,0 g/200 L	Foliar
	T7	<i>Trichoderma harzianum</i>	Tricho-D	5g/L	Foliar
	T8	<i>Bacillus subtilis</i> (0.2%)	Bio-splent	5g/L	Foliar
	T9	Testigo sin inocular		Agua sola	Foliar
	T10	Testigo inoculado			
PREVENTIVO	T11	Acido fosforoso	No aplica	1,0 L/200	Drench
	T12	Fosetil de Aluminio	Alliette	0,5 kg/200 L	Foliar
	T13	Fosfito de potasio	Cunebforte	0,5 L/ 200 L	Foliar
	T14	Sulfato de cobre pentahidratado	Phyton	0,4 L/200 L	Foliar
	T15	Manano oligosacáridos	Agromoss	0,5 L/200 L	Foliar
	T16	Acibenzolar S-methyl	Actigard	10,0 g/200 L	Foliar
	T17	<i>Trichoderma harzianum</i>	Tricho-D	5g/L	Foliar
	T18	<i>Bacillus subtilis</i> (0.2%)	Bio-splent	5g/L	Foliar
	T19	Testigo sin inocular		Agua sola	Foliar
	T20	Testigo inoculado			

Para implementar los diferentes tratamientos, tanto en las estrategias curativas como en las preventivas, se elaboró el esquema de inoculación y de aplicaciones de los productos, en donde se consideró que el día cero, el día a partir de los tres meses transcurrido del trasplante del material vegetal de la cámara de forzada a las bandejas de polipropileno (Cuadro 7).

c) Preparación de los productos químicos y biológicos para las aplicaciones:

Los productos, tanto químicos como biológicos, fueron pesados en la cantidad requerida equivalente a la dosis comercial y mezclados con agua en una cantidad de 360 ml por tratamiento. Los productos comerciales fueron aplicados vía foliar mediante aspersión, empleando asperjadores manuales y se utilizó 30 ml de la solución o suspensión por plantón. Solamente para los tratamientos con ácido fosforoso las aplicaciones fueron realizadas vía drench al sustrato. En los tratamientos testigos se aplicó solo agua.

d) Aplicaciones curativas:

Para esta metodología se inocularon los plantones con *L. theobromae* antes de iniciar las aplicaciones, de acuerdo a la metodología que se empleó en la inoculación de los plantones en la Prueba de Patogenicidad (página 23). Cinco días después de la inoculación se realizaron tres aplicaciones consecutivas en intervalos de diez días entre aplicaciones de los diferentes tratamientos a cada grupo de plantas (Cuadro 7). Para las plantas testigos solo fueron regadas con agua.

e) Aplicaciones preventivas

Las aplicaciones de los productos químicos y biológicos en forma preventiva fueron realizadas en tres oportunidades en intervalos de diez días entre aplicaciones. Cinco días después de la última aplicación se inocularon las plantas de cada tratamiento con *L. theobromae* siguiendo la misma metodología que se empleó en la inoculación de los plantones en la Prueba de Patogenicidad (página 23)

Cuadro N° 7: Momento de la inoculación de *L. theobromae* en los plantones de vid y las aplicaciones de los productos químicos y biológicos con las estrategias curativas y preventivas.

		INOCULACION							
	TRAT.	INOCUL.	1	2	3	INOCUL.	EVALUA.	EVALUA.	
		25 Febrero	1 Marzo	11 Marzo	21 Marzo	26 Marzo	5 Abril	5 Mayo	
		Día 0	Día 5	Día 15	Día 25	Día 30	Día 40	Día 70	
CURATIVO	T1	SI	SI	SI	SI	NO	SI	-	
	T2	SI	SI	SI	SI	NO	SI	-	
	T3	SI	SI	SI	SI	NO	SI	-	
	T4	SI	SI	SI	SI	NO	SI	-	
	T5	SI	SI	SI	SI	NO	SI	-	
	T6	SI	SI	SI	SI	NO	SI	-	
	T7	SI	SI	SI	SI	NO	SI	-	
	T8	SI	SI	SI	SI	NO	SI	-	
	T9	SI	SI	SI	SI	NO	SI	-	
	T10	SI	SI	SI	SI	NO	SI	-	
PREVENTIVO	T11	NO	SI	SI	SI	SI	NO	SI	
	T12	NO	SI	SI	SI	SI	NO	SI	
	T13	NO	SI	SI	SI	SI	NO	SI	
	T14	NO	SI	SI	SI	SI	NO	SI	
	T15	NO	SI	SI	SI	SI	NO	SI	
	T16	NO	SI	SI	SI	SI	NO	SI	
	T17	NO	SI	SI	SI	SI	NO	SI	
	T18	NO	SI	SI	SI	SI	NO	SI	
	T19	NO	SI	SI	SI	SI	NO	SI	
	T20	NO	SI	SI	SI	SI	NO	SI	

f) Evaluaciones:

Transcurridos 40 días después de la inoculación en todos los tratamientos (tanto curativos así como en los preventivos) se realizaron las evaluaciones de los plantones. Los parámetros que se evaluaron fueron:

Incidencia: En cada tratamiento se contó el número de plantas que mostraron síntoma visual de pudrición externa en avance en los tallos que fueron ocasionados directamente por el patógeno inoculado.

Severidad de los síntomas secundarios: Los síntomas de la parte aérea de cada tratamiento fueron evaluados en base a una escala descriptiva en grados de elaboración propia para esta investigación, el cual se presenta en el Cuadro 8.

Cuadro N° 8: Escala de evaluación de síntomas secundarios en plantones de vid afectados por *L. theobromae*.

GRADO	ASPECTO EXTERNO FOLLAJE
0	Sin síntomas de enfermedad
1	Amarillamiento general de hojas
2	Acortamiento de entrenudos y paralización de emisión de yemas nuevas y/o amarillamiento
3	Marchitez de hojas y brotación por debajo del punto de inoculación
4	Necrosis de hojas y defoliación
5	Muerte regresiva de brotes

Fuente: (Elaboración propia).

Severidad de la pudrición externa en los tallos: Para esta evaluación se efectuó un raspado de la superficie de los tallos desde los puntos de inoculación hacia los lados (superior, inferior, izquierda y derecha) exponiendo el tejido cortical afectado, tanto de la zona del patrón como la del injerto. Se dibujó el área afectada calcándolo en papel celofán y para hallar el área infectada estos dibujos fueron llevadas al gabinete donde se utilizó el programa de análisis de imagen para la cuantificación de la enfermedad en plantas (ASSESS).

Pudrición interna de los tallos: Después del raspado superficial de los tallos, se realizaron cortes longitudinales para medir el avance de la necrosis en los haces vasculares tanto hacia arriba como hacia abajo del punto de inoculación con una regla calibrada en milímetros (mm).

g) Reaislamiento de *L. theobromae* de las plantas inoculadas en los tratamientos:

Se realizó el reaislamiento de seis plantas, escogidas al azar, de cada repetición por tratamiento. La metodología fue la misma descrita en la prueba de patogenicidad.

h) Diseño experimental en la prueba de productos químicos y biológicos en vivero:

Para la prueba en vivero se utilizó el Diseño completamente al azar (DCA), con 20 tratamientos en total y 12 repeticiones por cada uno. Haciendo un total de 240 plantones. Para las variables evaluadas se realizaron Análisis de homogeneidad de variancia y normalidad y la Prueba de comparación de medias de Tukey, considerando un nivel de confianza del 95% ($\alpha= 0.05$), para el que se utilizó el software estadístico SAS (SAS Institute, 2004), versión 9.1.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento e identificación del patógeno

El hongo según la clave de Barnett & Hunter (1996) y la clave de Sutton (1980), fue identificado como *Lasiodiplodia theobromae*.

Las colonias de *L. theobromae* obtenidas formaron un micelio denso que fueron inicialmente de color blanco que se iba tornando gris a gris oscuro (Fig. 4,a). En las colonias se podía observar la formación de masas estromáticas grises (Fig. 4.b) que al ser posteriormente observadas al microscopio se evidenció que contenían varias picnidias de paredes marrón oscuras a negras (Fig. 4 c). Las células conidiogénicas fueron hialinas, de paredes lisas y delgadas (Fig. 4 d). Entre las células conidiogénicas se observaron parafisis también de coloración hialina y de forma cilíndrica. La conidia es de formación acrógena, la forma va de subovoide a elipsoidal, con ápice redondeado en la base truncada (algo plano), inicialmente son hialinas, aseptadas y después se vuelven marrón oscuro, resultado del depósito de melanina, con una septa al medio y cuando madura se observan estrías longitudinales en la superficie (Fig. 4 e). El tamaño de las conidias fueron de 17- 23 x 10- 13 μm (Fig. 4, f) (Anexo 1).

Para la identificación del género taxonómico en base a sus características morfológicas según la Clave de Barnett & Hunter (1996) se siguió la secuencia siguiente: Sphaeropsidales: 1a. Conidia globosa a oblonga o elipsoidal, no filiforme, 2b. Conidia 2-celula, 49b. Conidia pigmentada, 56b. Picnidias grupo en estroma; y se llegó al género *Botryodiplodia*.

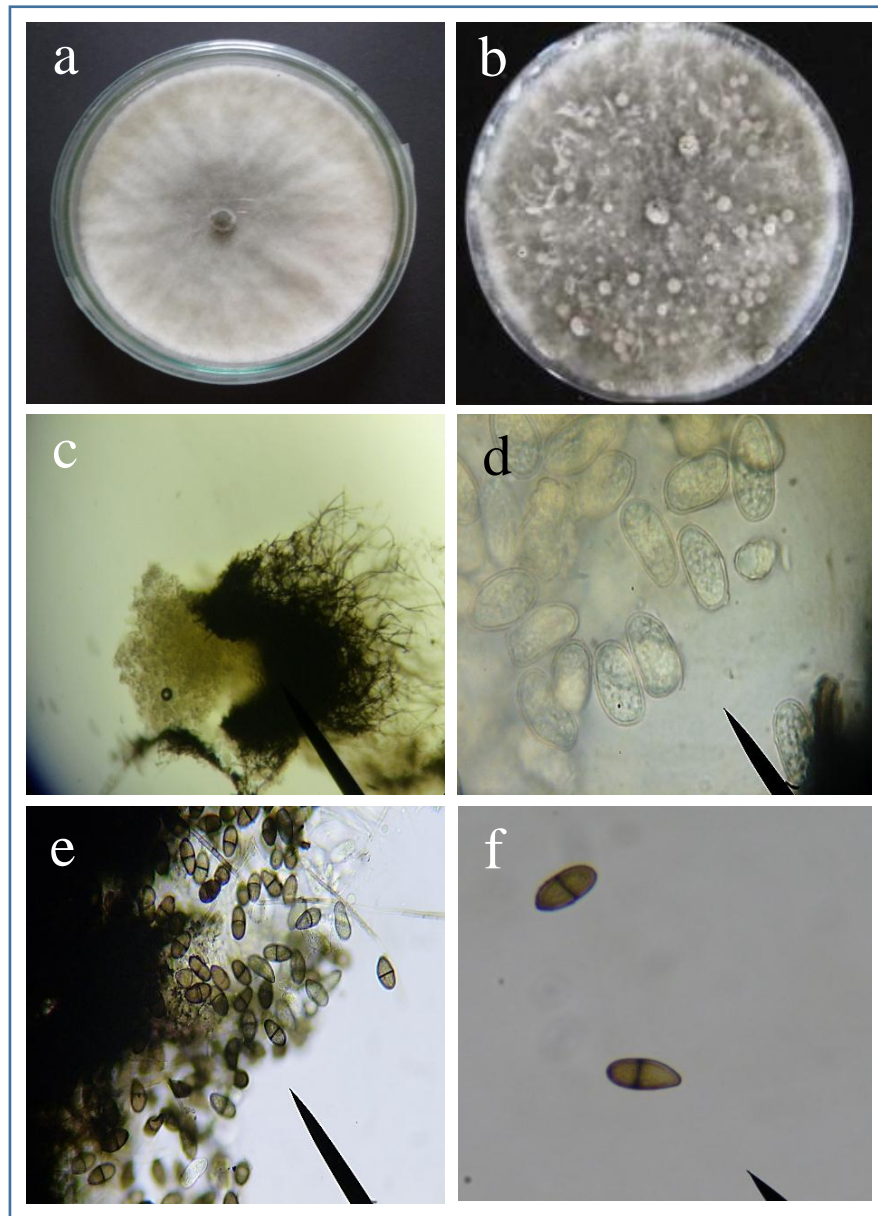


Figura N° 4 Identificación del hongo **a.** Crecimiento de *L. theobromae* en placa (3 días después de la siembra) sin formación de picnidias. **b.** Placas con *L. theobromae* con formación de picnidias (15 días después de la siembra). **c** esporulación de conidias inmaduras **d.** Conidias inmaduras de coloración hialina. **e y f.** Conidias maduras de coloración oscura con estrías y una septa.

La identificación del género taxonómico según la Clave de Sutton (1980):
 1b. Conidiogénesis blástica, 3a. Conidiogénesis holoblástica, 4b. Conidiomata estromático.
 Blastostromatineae p. 129, 1d. Conidia ninguna de las anteriores, 10d. Conidia septada

muriforme marrón, 23a. conidia 1 septa, 24a. Conidimata eustromático, uni o multilocular; conidia pigmentada marrón con estrías longitudinales: *Lasiodiplodia theobromae*.

Las características obtenidas coinciden con las descritas en el CMI (Commonwealth Mycological Institute) para *Botryodiplodia theobromae*, sinónimo de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl.

En base a las características morfológicas, el hongo aislado de las ramas de vid con síntomas de necrosis, de acuerdo a sus características macroscópicas y microscópicas fue identificado como *Lasiodiplodia theobromae*. Esta especie de hongo es frecuente en regiones tropicales y subtropicales, es un patógeno conocido que ha sido reportado causando canchales, muerte regresiva y pudrición radicular en más de 500 hospedantes (Punithalingam 1980). Este importante patógeno ha sido previamente reportado en Perú causando pudrición y muerte regresiva en mango (*Mangifera indica* L.) (Rodriguez *et al.* 1999) y en Palto (*Persea americana* Mill) (Alama *et al.* 2006) y (*V. vinifera* L.) (Huamán 2015)

4.2. Prueba de patogenicidad

Después de tres semanas de la inoculación, las plantas de vid desarrollaron lesiones necróticas en el tallo, síntomas característicos causados por las infecciones por *L. theobromae*. En los brotes, después de 21 días de la inoculación, se observaron las picnidias inmersas con esporulaciones negras tanto en el punto de inoculación como en el tejido cortical (Fig. 5, a y b). Se hicieron observaciones de avance de la enfermedad tanto hacia arriba como hacia abajo desde el punto de inoculación (Fig. 5 c-f) la longitud de las lesiones estuvo en un rango 40 mm y 37 mm respectivamente.

Los síntomas y signos observados en las plantas inoculadas fueron similares a los observados en las plantas inicialmente recolectadas de donde se aisló a *L. theobromae*.

Según las características morfológicas, el hongo que fue reaislado de las plantas inoculadas, fue identificado como *Lasiodiplodia theobromae*, comprobándose con esto que es el causante de la muerte regresiva de la vid.



Figura N° 5 Prueba de patogenicidad. **a y b.** Signos de la enfermedad en plantas de vid (20 días después de la inoculación) en bolsas instaladas en vivero. Formación de estructuras de propagación en la superficie del parénquima cortical. **c - f.** Área necrótica ocasionada por *L. theobromae* en la prueba de patogenicidad.

En este estudio se demuestra también que esta enfermedad se puede presentar tanto en plantas jóvenes como en adultas en el cultivo de vid, ya que el aislamiento inicial fue obtenido de plantas sintomáticas adultas y fue inoculado en plantas jóvenes, lo cual coincide también con los resultados obtenidos en los trabajos realizados por Urbez-Torres *et al.* (2008).

4.3. Prueba de control químico in vitro

Los resultados de esta prueba se muestran en el cuadro 9. El tratamiento con ácido fosforoso fue el único que tuvo un porcentaje de inhibición de 100%, los tratamientos con Mananos oligosacáridos, Fosetil de aluminio, Sulfato de cobre pentahidratado y Acibenzolar S-Methyl tuvieron un porcentaje de inhibición de 94.31%, 72.71%, 41.74% y 38.30% respectivamente, mientras que los tratamientos con Fosfito de potasio y el Testigo tuvieron un porcentaje de inhibición de 0.23 y 0.00% respectivamente.

Cuadro N° 9: Radio de crecimiento y porcentaje de inhibición de *L. theobromae* en la prueba de control químico in vitro a los 3 días después de la siembra.

TRAT.	INGREDIENTE ACTIVO	PRODUCTO COMERCIAL	RADIO (mm)	INHIBICION (%)
T1	Acido fosforoso	No aplica	0.00	100.00
T2	Fosetil de Aluminio	Alliette	11.90	72.71
T3	Fosfito de potasio	Cunebforte	43.50	0.23
T4	Sulfato de cobre pentahidratado	Phyton	25.40	41.74
T5	Manano oligosacáridos	Agromoss	2.48	94.31
T6	Acibenzolar S-methyl	Actigard	26.90	38.30
T9	Testigo		43.60	0.00

En la figura 6 se observan diferencias en el crecimiento radial de *L. theobromae* en cada uno de los tratamientos. El tratamiento del ácido fosforoso inhibió totalmente el crecimiento del hongo. Los tratamientos de mananos oligosacáridos registraron un crecimiento de 2.48 mm; el fosetil de aluminio 11.90 mm; el sulfato de cobre pentahidratado 25.40 mm; el acibenzolar S-Methyl 26.90 y el fosfito de potasio 43.50 mm. El testigo tuvo un crecimiento promedio de 43.60 mm. (Anexo 2).

En la figura 7 se observa la curva de crecimiento promedio de las colonias de *L. theobromae* en la prueba in vitro con productos químicos. El tratamiento con ácido fosforoso la colonia no tuvo ningún crecimiento. El tratamiento con Fosfito de potasio mostró un crecimiento igual al testigo, no hubo ningún efecto en la inhibición de manera directa contra el hongo. Los tratamientos con Acibenzolar S - Methyl y Sulfato de cobre pentahidratado mostraron un crecimiento parecido en distancia en radio (mm) pero fueron diferentes en el tipo de colonia. El tratamiento con Mananos oligosacáridos tuvo un crecimiento bajo que solo alcanzó 2.47 mm. casi solo toco la superficie del medio de cultivo y no continuó con su crecimiento

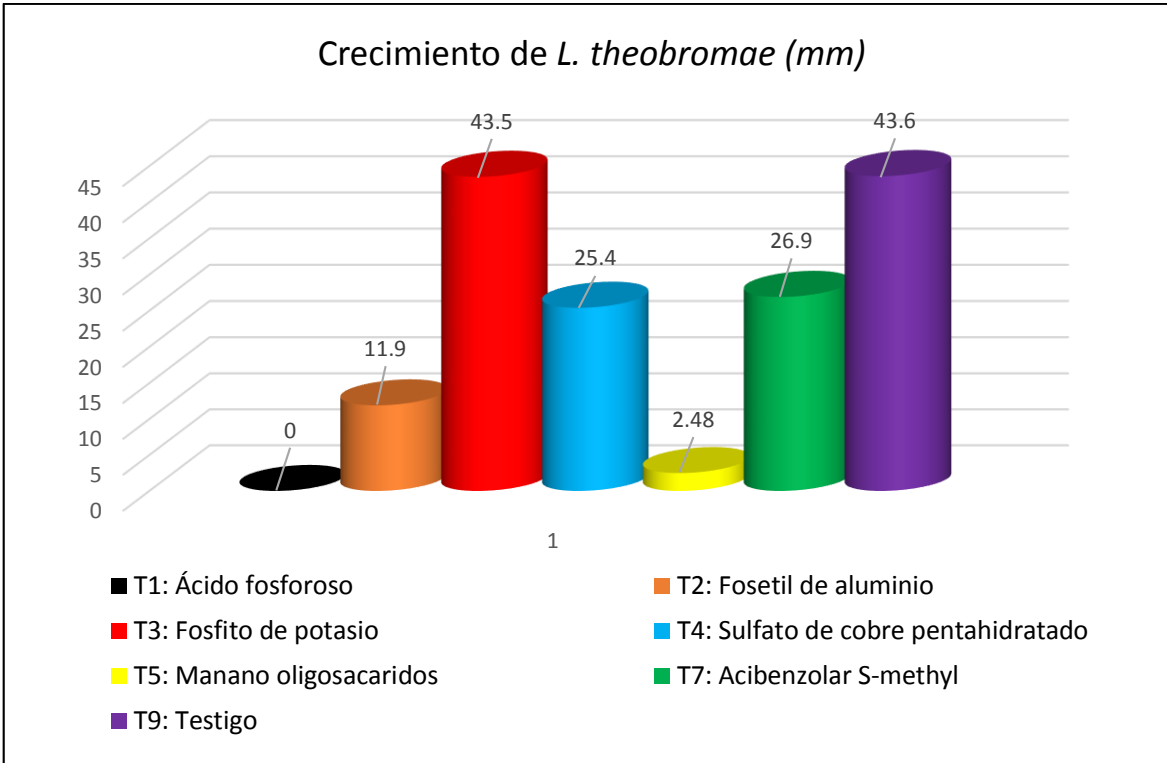


Figura N° 6 Crecimiento de *L. theobromae* en la prueba de control químico in vitro a los 3 días después de la siembra.

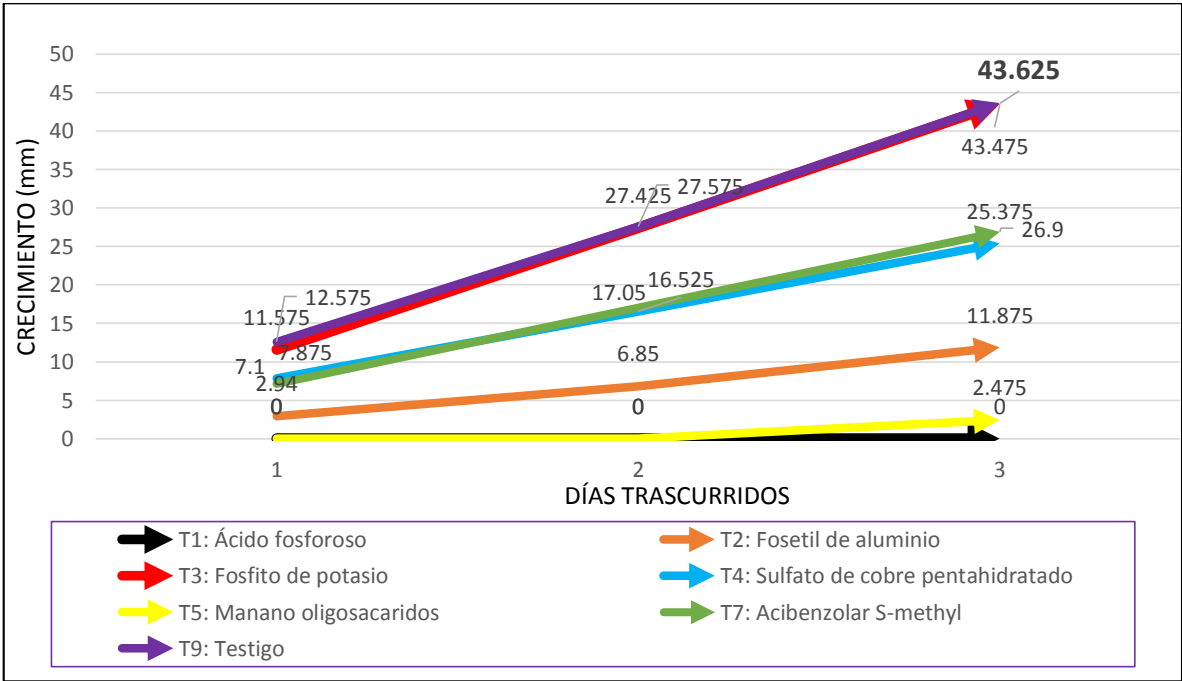


Figura N° 7 Curva de crecimiento promedio de *L. theobromae* en la prueba de control químico in vitro.

En la figura 8 se observa los diferentes crecimientos de *L. theobromae* en las placas Petri en cada uno de los tratamientos.

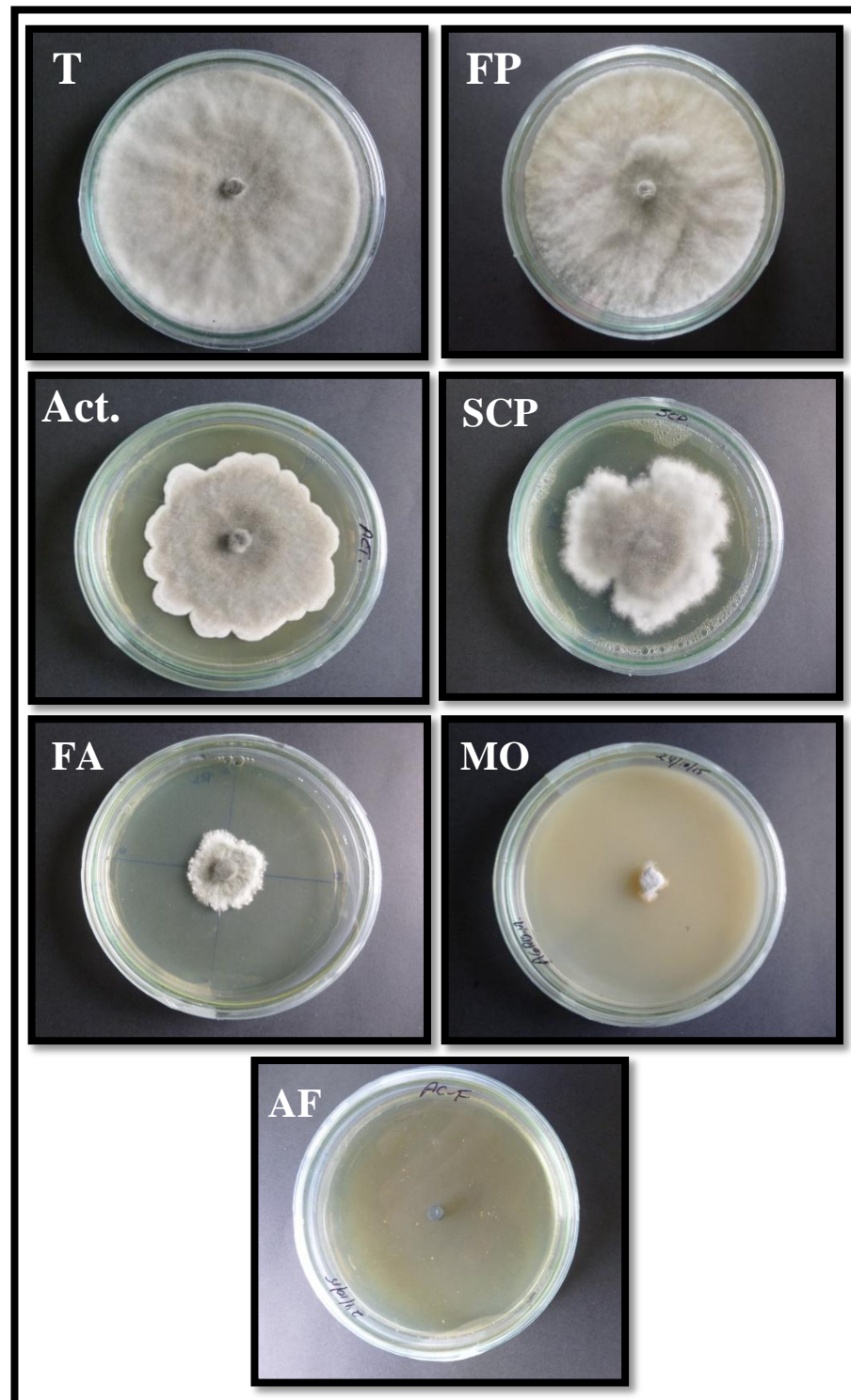


Figura N° 8 Crecimiento de las colonias de *L. theobromae* en los diferentes tratamientos: Testigo (T), Fosfito de potasio (FP), Acibenzolar-S-Methyl “Actigard” (Act.), Sulfato de cobre pentahidratado (SCP), Fosetil de aluminio (FA), Mananos oligosacáridos (MO), Acido fosforoso (AF).

Los resultados de análisis de variancia (Cuadro 10) indican que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos.

Cuadro N° 10 Cuadro de Análisis de variancia de la prueba in vitro de la prueba de enfrentamiento

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Value
Tratamientos	6	190.874	31.812	3507.42
Error	28	0.253	0.00907	
Total	34	191.128		

CV: 2.33%

La prueba de Tukey (Cuadro 11) muestra el crecimiento (mm) radial final de las colonias de *L. theobromae* con los tratamientos propuestos. No hubo crecimiento de patógeno con ácido fosforoso (cero), y los menores crecimientos los registró los tratamientos con mananos oligosacáridos (1.58) y fosetil de aluminio (3.45), mostrando aun diferencias entre estos tratamientos. Los tratamientos con sulfato de cobre pentahidratado, acibenzolar S-Methyl, y fosfito de potasio mostraron un mayor crecimiento de la colonia con respecto a los tratamientos anteriores, no mostrando diferencias estadísticas entre los dos primeros, pero si en relación al fosfito de potasio

El ácido fosforoso muestra un modo de acción dual, actúa directamente sobre el patógeno e indirectamente en la planta estimulando las respuestas de defensa de los hospedantes para inhibir el crecimiento del patógeno (Guest & Grant 1991). En el medio de cultivo, la acción de este fungicida fue inhibir al 100 % el crecimiento de *L. theobromae*, se debió a su acción directa como fungicida.

Fosetil de aluminio debe ser hidrolizado para convertirse en ácido fosforoso para tener la acción directa e indirecta, pero esta hidrólisis no ocurre eficientemente en el medio de cultivo sino se realiza en las células vegetales, por eso no se observa una inhibición al 100 % de *L. theobromae* en la prueba de envenenamiento. Además que no se ha trabajado con

Cuadro N° 11: Prueba de Tukey para el crecimiento radial promedio de *L. theobromae* en tratamientos con productos químicos.

Tratamientos	Días después de la siembra								
	1DDS			2DDS			3DDS		
T1: Ácido fosforoso	0 ^x	0.01 ^y	d ^z	0 ^x	0.01 ^y	d ^z	0 ^x	0.01 ^y	e ^z
T2: Fosetil de aluminio	2.94	1.72	c	6.85	2.62	c	11.9	3.45	c
T3: Fosfito de potasio	11.6	3.41	a	27.4	5.24	a	43.5	6.60	a
T4: Sulfato de cobre pentahidratado	7.88	2.80	b	16.5	4.07	b	25.4	5.04	b
T5: Manano oligosacáridos	0	0.01	d	0	0.01	d	2.48	1.58	d
T6: Acibenzolar S- methyl	7.1	2.68	b	17.1	4.13	b	26.9	5.19	b
T9: Testigo	12.6	3.55	a	27.6	5.26	a	43.6	6.61	a
Promedio	6.01	2.02		13.63	3.048		21.9	4.068	
Coefficiente de variabilidad		4.91			3.69			2.33	

^x cada valor es el promedio radial de cada tratamiento. ^y Datos convertidos a ($\sqrt{\%+0.01}$). ^z Números en columnas seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey. DDS (Días después de la siembra)

la dosis del producto comercial recomendado sino con la concentración del ingrediente activo de 100 ppm, el cual resulta ser mucho menor que lo recomendado para aplicar en las plantas.

El producto Acibenzlar S-Methyl es un análogo sintético del ácido acetil salicílico y este no tiene un efecto directo sobre el patógeno sino que es utilizado por la planta como un mensajero secundario para activar los mecanismos de resistencia sistémica.

Los tratamientos con mananos oligosacáridos no mostraron una efectividad de manera directa contra *L. theobromae* debido a que este producto corresponde a azúcares complejos derivados de la pared celular externa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* de manera que la defensa contra los patógenos es por el aumento de la concentración de compuestos antimicrobiano, por reconocimiento de los elicitores con los receptores de la planta.

4.4. Prueba de control biológico in vitro

4.4.1. Técnica del medio envenado

En el cuadro 12 se muestra el porcentaje de inhibición y crecimiento radial promedio de *L. theobromae* en medio de cultivo MEA contiendo productos biológicos. En las figuras 9 y 10 se muestra el crecimiento de *L. theobromae* conteniendo los productos biológicos, donde se observa el poco crecimiento radial de *L. theobromae* en ambos tratamientos.

Cuadro N° 12: Prueba in vitro con productos biológicos.

TRAT.	INGREDIENTE ACTIVO	PRODUCTO COMERCIAL	RADIO PROMEDIO (mm)	INHIBICION (%)
T7	<i>Trichoderma harzianum</i>	Tricho-D	8.42	79.94
T8	<i>Bacillus subtilis</i>	Bio-splent	4.74	88.71
T9	Testigo	-----	42.40	0.00

En el cuadro 13 se muestra la prueba de Tukey para el crecimiento radial promedio de *L. theobromae* y los productos biológicos ensayados. El menor crecimiento de la colonia del patógeno se produjo en medio con *B. subtilis* (4.74 mm) comparado con el tratamiento con Trichoderma (8.42 mm), habiendo diferencia significativa entre ambos tratamientos y con el testigo, el cual tuvo un crecimiento de 42.40 mm. (Anexo 3).

Cuadro N° 13: Prueba de Tukey para el crecimiento radial promedio de *L. theobromae* en tratamientos con productos biológicos.

Tratamientos	MEDIO ENVENEDADO	
	CRECIMIENTO PROMEDIO (mm)	SIGNIFICACIÓN
T9: Testigo	42.40	A
T7: <i>Trichoderma harzianum</i>	8.42	B
T8: <i>Bacillus subtilis</i>	4.74	C
Coefficiente de variabilidad	-----	2.87

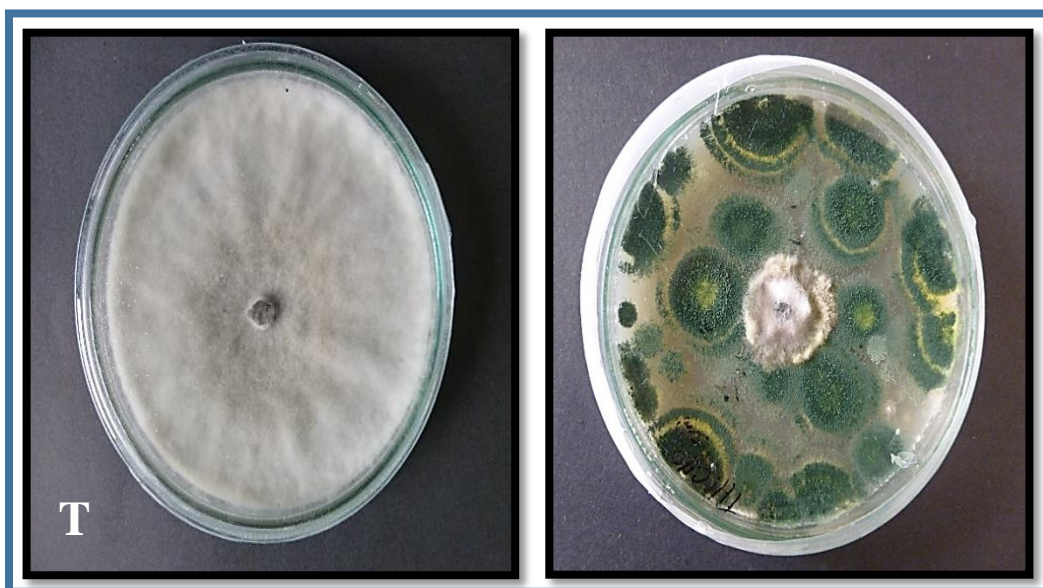


Figura N° 9 Comparación del testigo (T) y del tratamiento de medio MEA conteniendo *T. harzianum* (T.h).

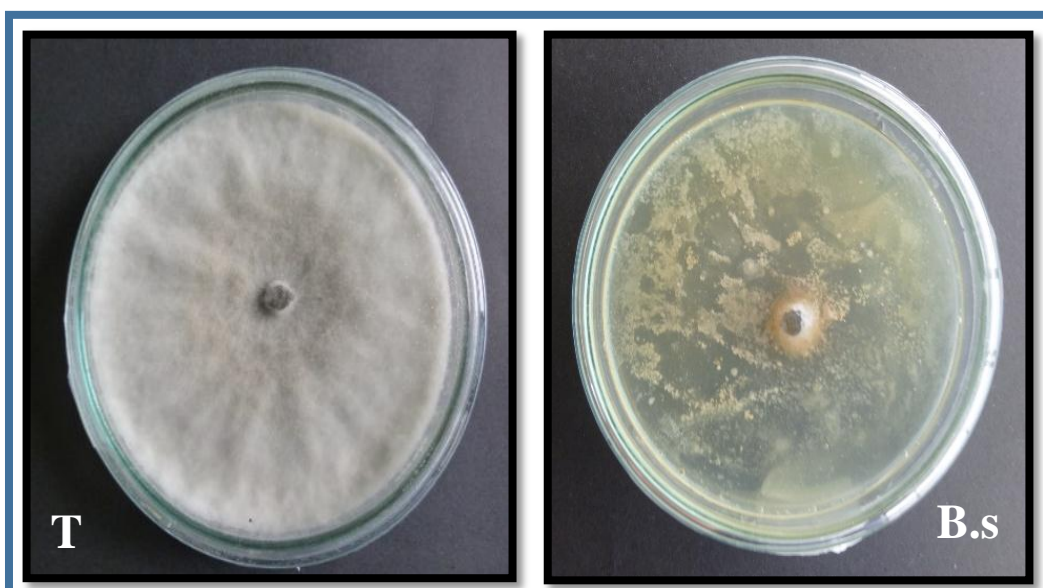


Figura N° 10 Comparación del testigo (T) y del tratamiento de medio MEA conteniendo *B. subtilis* (B.s).

4.4.2. Prueba de enfrentamiento

- *T. harzianum* vs *L. theobromae*

Al enfrentar *T. harzianum* con *L. theobromae* se observó un crecimiento algo lento del biocontrolador en comparación al patógeno, en el encuentro de ambos se produjo a los tres días después de la siembra. En la figura 11 se observa el contacto entre el patógeno y el controlador, se nota claramente el efecto conocido como “línea de muerte” en cual consiste en el micoparasitismo del controlador biológico hacia el patógeno. La razón para que el controlador haya tenido un menor crecimiento posiblemente se debió al crecimiento acelerado de *L. theobromae* y la temperatura más favorable para este. El porcentaje de inhibición del crecimiento de *L. theobromae* fue 35.33% (Cuadro 13).

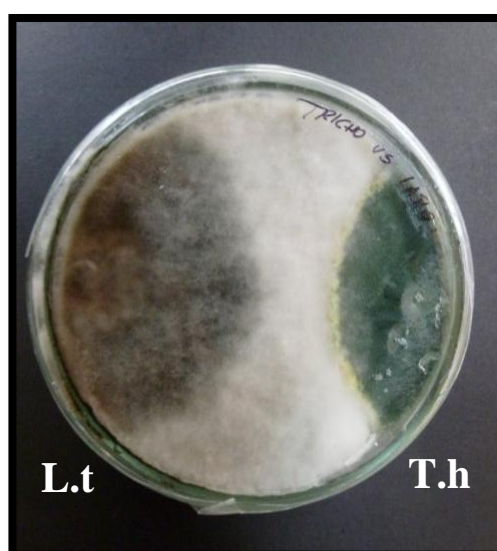


Figura N°11 Enfrentamiento in vitro de *L. theobromae* (L.t.) con *T. harzianum* (T.h.).

- *L. theobromae* vs *Bacillus subtilis*

La colonia de *Bacillus* tuvo un menor crecimiento radial que *L. theobromae* (Figura 12), el contacto se produjo a los 3 días después de la siembra. La inhibición de *L. theobromae* fue de 41.08 %. En el cuadro 14 se muestra el crecimiento del biocontrolador y patógeno. (Anexo 4)

Los mecanismos que utilizan los biocontroladores para el control de patógenos son diversos, para este caso se notó un halo alrededor de la colonia de *B. subtilis* donde ya no

llegó a desarrollar la colonia de *L. theobromae*, lo que indica la presencia de antibióticos que fueron segregados por la bacteria utilizando el mecanismo de antibiosis. Este mecanismo no permitió que el micelio de *L. theobromae* se encuentre físicamente con la colonia de *B. subtilis*. Este modo de acción mencionado en la prueba de enfrentamiento son explicados por la teoría mencionada por Mont (2004).

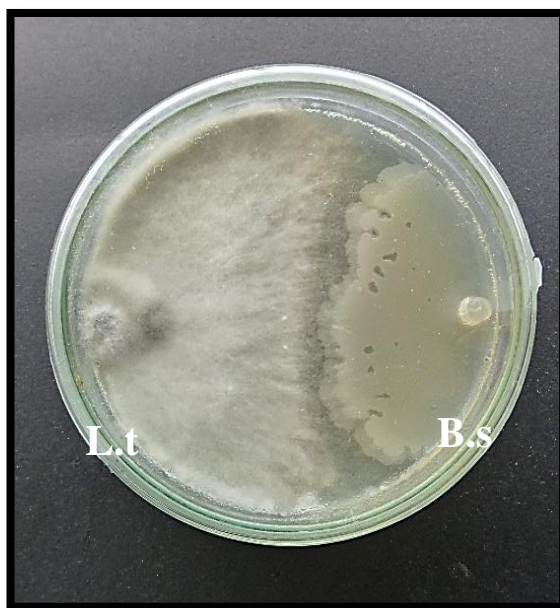


Figura N° 12 Enfrentamiento in vitro de *L. theobromae* (L.t.) con *B. subtilis* (B.s.).

Cuadro N° 14: Tratamientos de la prueba de enfrentamiento y crecimiento de los hongos evaluados.

TRATAMIENTO	HONGO	CRECIMIENTO PROMEDIO (mm.)	INHIBICION DE <i>L. theobromae</i> (mm.)
<i>Trichoderma</i> vs. <i>L. theobromae</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	24.5	35.33
	<i>L. theobromae</i>	48.5	
	Testigo <i>L. theobromae</i>	75.0	
<i>Bacillus</i> vs. <i>L. theobromae</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	30.5	41.08
	<i>L. theobromae</i>	43.3	
	Testigo <i>L. theobromae</i>	73.5	

4.5. Pruebas de control en invernadero

4.5.1. Tratamiento de control curativo

Durante el desarrollo de las plantas en la metodología curativa, en los meses de Febrero a Abril, se presentaron condiciones de temperatura muy favorables para el desarrollo de la enfermedad, siendo las temperaturas promedios durante el día de 25.9 °C. (Anexo 5)

Los síntomas característicos ocasionados por la infección de *L. theobromae* en vid se observaron en varios de los tratamientos curativos. Los síntomas secundarios al finalizar el ensayo fueron: amarillamiento parcial y general de las hojas, acortamientos de entrenudos, brotación por debajo del punto de inoculación, defoliación y marchitez de hojas (Figura 13 a-c). También se observó necrosis en hojas en forma descendente o muerte regresiva de los brotes, estos síntomas mencionados son comparados con los que describe Rodríguez *et al.* (2015).

Los síntomas primarios que se observaron desde el punto de inoculación hacia los alrededores fueron: necrosis del tallo con presencia de esporulaciones, y al rasparlos y cortarlos, se observó necrosis de los tejidos corticales y vasculares (Figura 13: d, e y f); presentándose avances de la infección en todas las direcciones desde el punto de inoculación, estos síntomas son los mismos que describe Úrbez-Torres (2008), en su ensayo. Los signos observados fueron abundantes esporulaciones negras que cubrían la superficie de los tallos (figura 13: d y e) y al observarlos con ayuda de los microscopios estereoscópico y compuesto, se observaron claramente las picnidias (Figura 13: g y h).

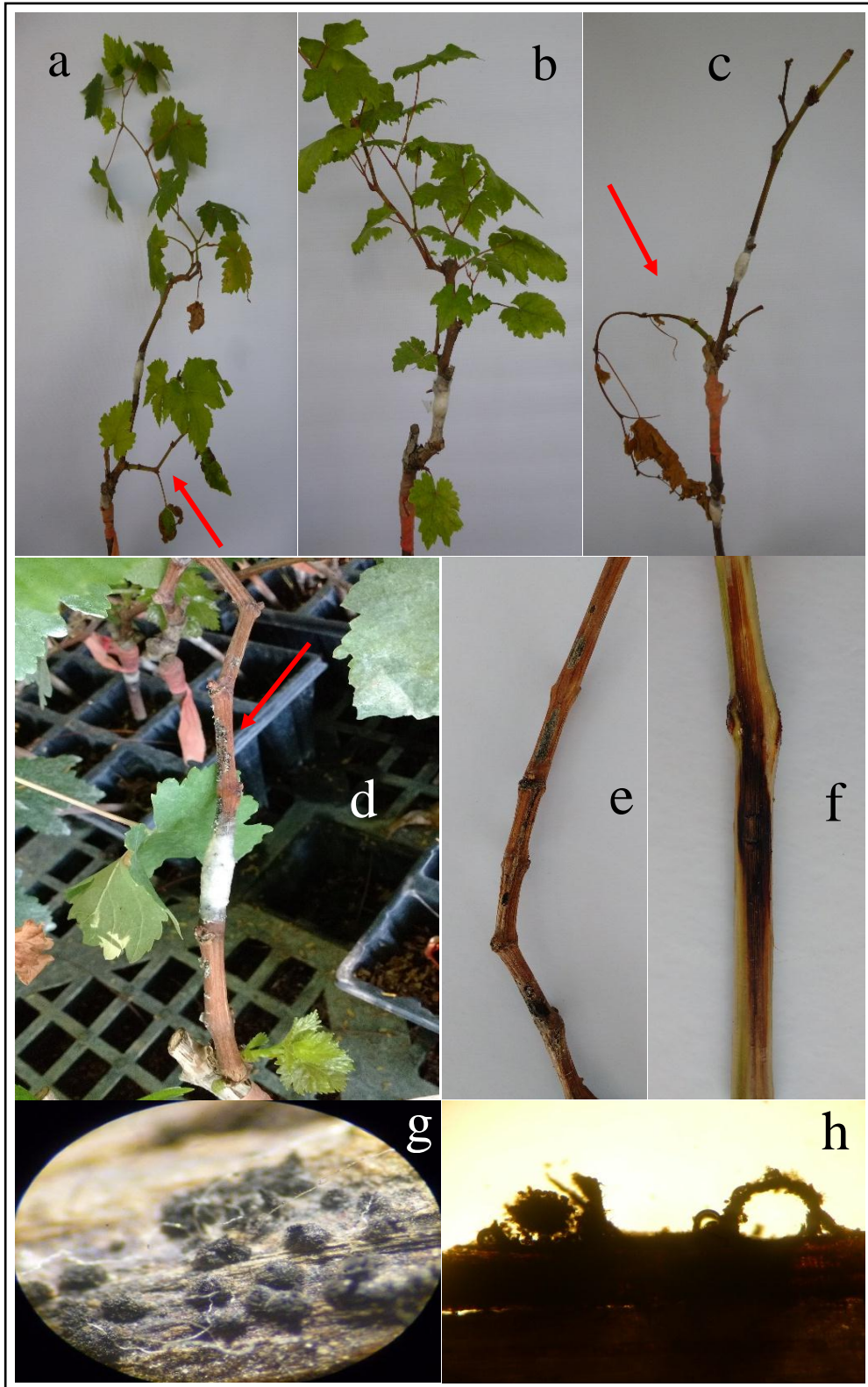


Figura N° 13. Síntomas secundarios y signos de la enfermedad presentados en la metodología curativa (a-h). a) Plantas infectadas con *Lasiodiplodia* muestra de síntomas secundarios como marchitez. b) Acortamiento de entre nudos y amarillamiento leve. c) Muerte de planta por necrosis de tejidos. d y e) Plantas con presencia de signos a nivel de injerto. f) presencia de necrosis en la zona patrón con raspado cortical. g) presencia de picnidios con vista en el microscopio estereoscópico. h) Presencia de picnidios en los tallos con vista microscópica.

a) Incidencia de la enfermedad

Los resultados de las evaluaciones de incidencia de la enfermedad, tanto en los injertos como en los patrones, se presentan en el cuadro 15, donde se observa que los tratamientos: testigo inoculado (T10), con fosfito de potasio (T3), con sulfato de cobre pentahidratado (T4), con ácido fosforoso (T1), con *B. subtilis* (T8), con fosetil de aluminio (T2) y con *T. harzianum* (T7), presentaron un 100 % de incidencia de la enfermedad tanto en el patrón como en el injerto. En el tratamiento con mananos oligosacáridos (T5) se observaron cuatro plantas con infecciones solamente en el patrón mas no en injerto; y en el tratamiento con acibenzolar-S-methyl (T6) se observó una planta con infección tanto en la zona del patrón como en el injerto y siete plantas infectadas solamente en la zona del patrón.

Cuadro N°15 Números y porcentajes de plantas infectadas con *L. theobromae* por cada tratamiento, tanto en los patrones como en los injertos.

N°	TRATAMIENTO	DESCRIPCION	N° DE PLANTAS AFECTADAS	INCIDENCIA %
10	Testigo inoculado	Injerto	12/12	100.0
		Patrón	12/12	100.0
3	Fosfito de potasio	Injerto	12/12	100.0
		Patrón	12/12	100.0
8	<i>Bacillus subtilis</i>	Injerto	12/12	100.0
		Patrón	12/12	100.0
1	Ac. fosforoso	Injerto	12/12	100.0
		Patrón	12/12	100.0
7	<i>T. harzianum</i>	Injerto	12/12	100.0
		Patrón	12/12	100.0
4	Sulfato de cobre Pent.	Injerto	12/12	100.0
		Patrón	12/12	100.0
2	Fosetil de aluminio	Injerto	12/12	100.0
		Patrón	12/12	100.0
5	Mananos oligosacáridos	Injerto	0/12	0.0
		Patrón	4/12	33.3
6	Acibenzolar-S-Methyl	Injerto	1/12	8.3
		Patrón	7/12	58.3
9	Testigo sin inocular	Injerto	0/12	0.0
		Patrón	0/12	0.0

Las aplicaciones de los productos fueron a la zona foliar, por lo tanto, las primeras reacciones de defensa se desarrollarían en las hojas, luego en las zonas cerca al injerto y posteriormente las defensas se desarrollarían en forma sistémica hacia el patrón. Esto explicaría el por qué algunos tratamientos mostraron tener infecciones en la zona del patrón a pesar que sus injertos no lo tenían, posiblemente se deba a que existe una zona de injertación donde el paso del señalizador (MeSa) para la activación de la resistencia en toda la planta es obstruida y/o retardada, lo cual permite el avance de la infección antes de que se produzca la reacción de defensa, pudiendo darse resultados como los obtenidos en estos tratamientos.

b) Severidad de los síntomas secundarios

Las plantas tratadas con la metodología curativa las cuales fueron 12 por tratamientos, mostraron tener diversos niveles de síntomas secundarios como consecuencia de las infecciones. Todas ellas mostraron síntomas que van desde amarillamiento general de las hojas, acortamientos de entrenudos, marchitez de hojas, brotación por debajo del punto de inoculación, defoliación y muerte plantas. Los resultados se muestran en el cuadro 16, donde se observa las severidades de las plantas en relación a los grados de evaluación.

Cuadro N° 16: Evaluación de síntomas secundarios en los diferentes tratamientos por infecciones por *L. theobromae* representado en grados de infección.

N°	TRATAMIENTOS	GRADO											
		0		1		2		3		4		5	
		N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
1	Ácido fosforoso	0	0	0	0	3	25	9	75	0	0	0	0
2	Fosetil de aluminio	0	0	0	0	6	50	6	50	0	0	0	0
3	Fosfito de potasio	0	0	0	0	0	0	0	0	6	50	6	50
4	Sulfato de cobre pent.	0	0	0	0	0	0	2	17	9	75	1	8
5	Mananos oligosacáridos	12	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	Acibenzolar-S-Methyl	12	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	Trichoderma harzianun	0	0	0	0	3	25	9	75	0	0	0	0
8	Bacillus subtilis	0	0	2	17	6	50	4	33	0	0	0	0
9	Testigo sin inocular	12	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	Testigo inoculado	0	0	0	0	0	0	0	0	4	33	8	67

N°. Número total de plantas afectadas para cada grado, %. Porcentaje de plantas afectadas para cada grado.

Los tratamientos que tuvieron grado 0 en el 100 % de las plantas fueron aquellos tratadas con mananos oligosacáridos (T5) y acibenzolar-S-Methyl (T6), así como también el testigo sin inocular (T9); estas no presentaron síntomas secundarios por infecciones con *L. theobromae*.

Para el grado 1, el tratamiento con *B. subtilis* (T7) presentó dos plantas con amarillamiento general de hojas, siendo el único tratamiento donde se presentaron plantas con este grado de severidad.

Para el grado 2, los tratamientos T1 (ácido fosforoso), T2 (fosetil de aluminio), T7 (*T. harzianum*) y T8 (*B. subtilis*), tuvieron 3, 6, 3 y 6 plantas respectivamente con este grado de severidad, el cual es caracterizado por síntomas de acortamiento de entrenudos y paralización de emisión de yemas nuevas.

Para el grado 3, los tratamientos T1 (ácido fosforoso), T2 (fosetil de aluminio), T4 (sulfato de cobre), T7 (*T. harzianum*) y T8 (*B. subtilis*) tuvieron, 9, 6, 2, 9, y 4 plantas respectivamente, lo cual se caracterizaron por síntomas de marchitez de hojas y brotación por debajo del punto de avance de la infección.

Para el grado 4, los tratamientos T3 (fosfito de potasio), T4 (sulfato de cobre pentahidratado) y T10 (testigo inocular) tuvieron, 6, 9 y 4 plantas respectivamente, caracterizados por la presencia de necrosis de hojas y defoliación.

Finalmente para el grado 5, los tratamientos T3 (fosfito de potasio), T4 (sulfato de cobre pentahidratado) y T10 (testigo inocular) tuvieron, 6, 1 y 8 plantas respectivamente con síntomas de muerte completa de ellas.

Los síntomas secundarios de los diversos tratamientos se muestran las figuras 14 y 15, donde se observa diferencias entre cada una de ellas.

Los síntomas observados fueron clorosis foliar, necrosis en los márgenes de las hojas, acortamiento de entrenudos todos ellos como consecuencia de los daños en los brotes ocasionado por inoculación de *L. theobromae*; las variaciones en las severidades de los síntomas secundarios estuvieron en relación a la intensidad de infección a partir de la

inoculación, estos síntomas son similares a los obtenidos por Urbez-Torres (2008) en sus ensayos. Las emisiones de los brotes nuevos por debajo del punto de avance de la infección se dan porque se producen la pudrición de las células del parénquima y posteriormente el daño de los tejidos vasculares, esto reduce y/o obstruye el paso del agua hacia la parte superior de la planta, lo que produce fallos en la brotación de las yemas ubicadas en las zonas superiores a la infección y, por lo tanto, paralización en la formación de nuevos brotes por encima del avance de la infección a partir del punto de inoculación.

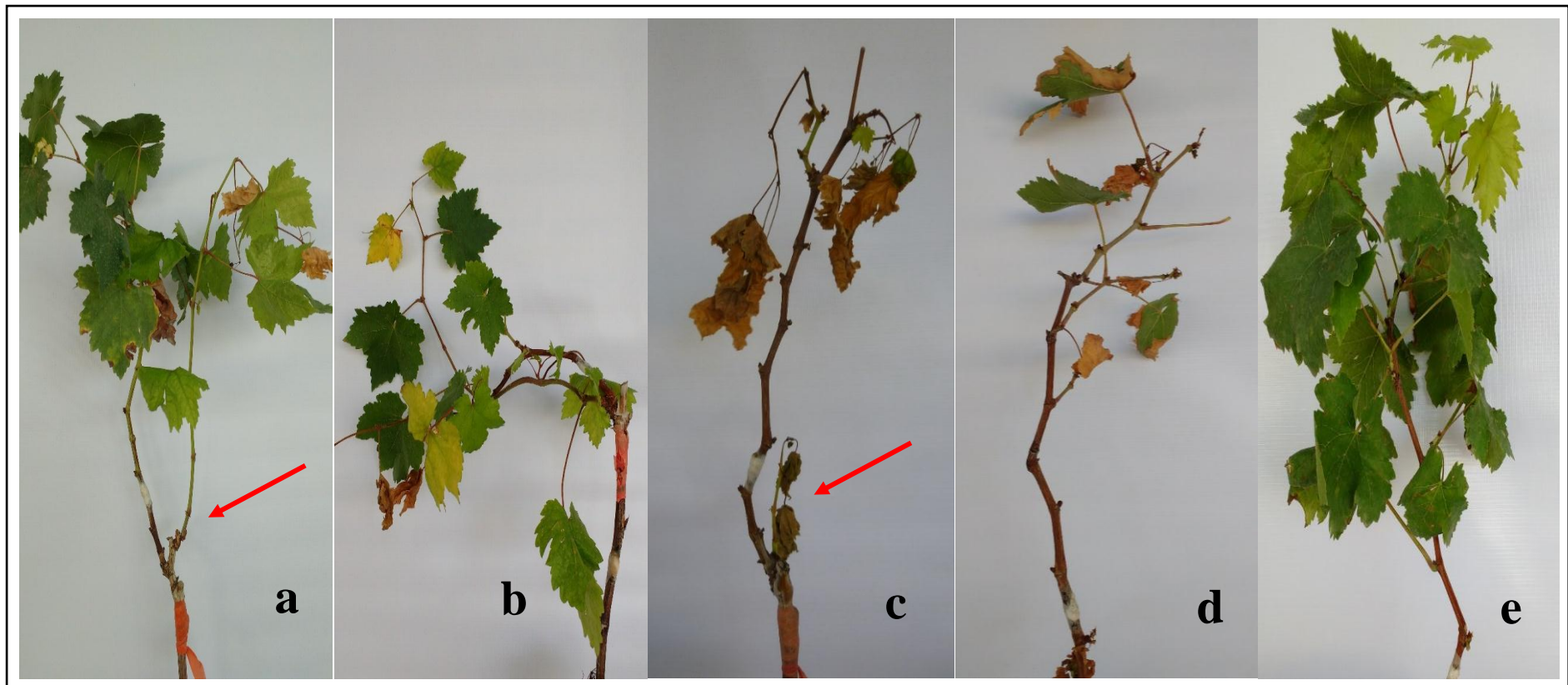


Figura N° 14 Comparación visual de síntomas secundarios en diferentes tratamientos en la metodología curativa (a-e). (a) Inicio de clorosis en hojas y emisión de brotes por debajo del punto de inoculación (T1: Ac. fosforoso), (b) Clorosis pronunciada en hojas y emisión de brotes por debajo del punto de inoculación (T2: Fosetil de aluminio), (c) Muerte de planta (T3: Fosfito de potasio), (d) Defoliación de hojas (T4: Sulfato de cobre pentahidratado), (e) Planta sin síntomas (T5: Mananos oligosacáridos).

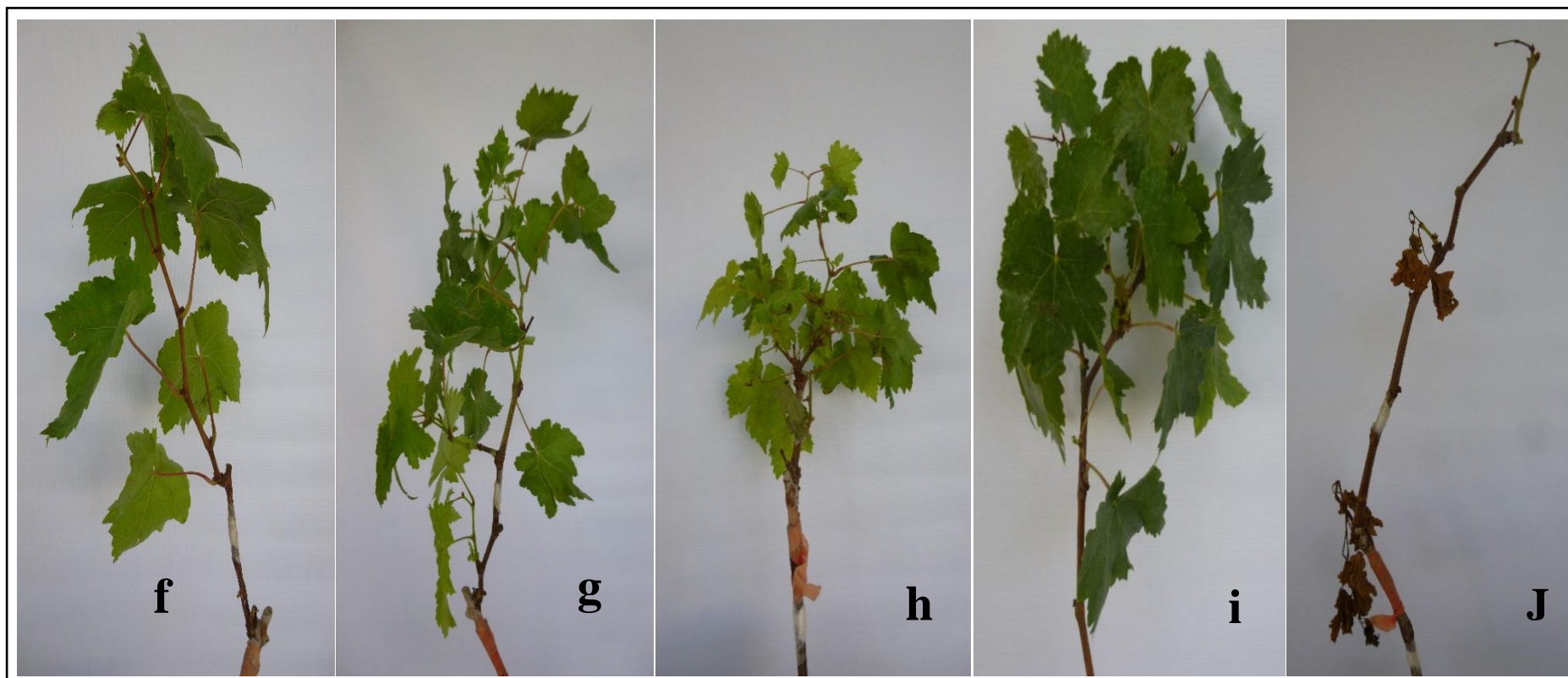


Figura N° 15 Comparación visual de síntomas secundarios de los diferentes tratamientos en la metodología curativa (f-j). (f) Plantas sin síntomas de la enfermedad (T6: Acibenzolar-S-Metil), (g) Plantas con presencia de entrenudos cortos leve (T7: *Trichoderma harzianum*), (h) Plantas con presencia de entrenudos severos (T8: *Bacillus subtilis*), (i) Plantas sin síntomas (T9: Testigo sin inocular), (j) Plantas con muerte de brotes (T10: Testigo inoculado).

c) Severidad de pudriciones en los tallos

Los resultados del área de avance de las infecciones por *L. theobromae* en los diversos tratamientos, tanto para los injertos como para los patrones se muestran en las figuras 16 y 17 respectivamente y se observa que hay diferencias en el área de infección entre los tratamientos.

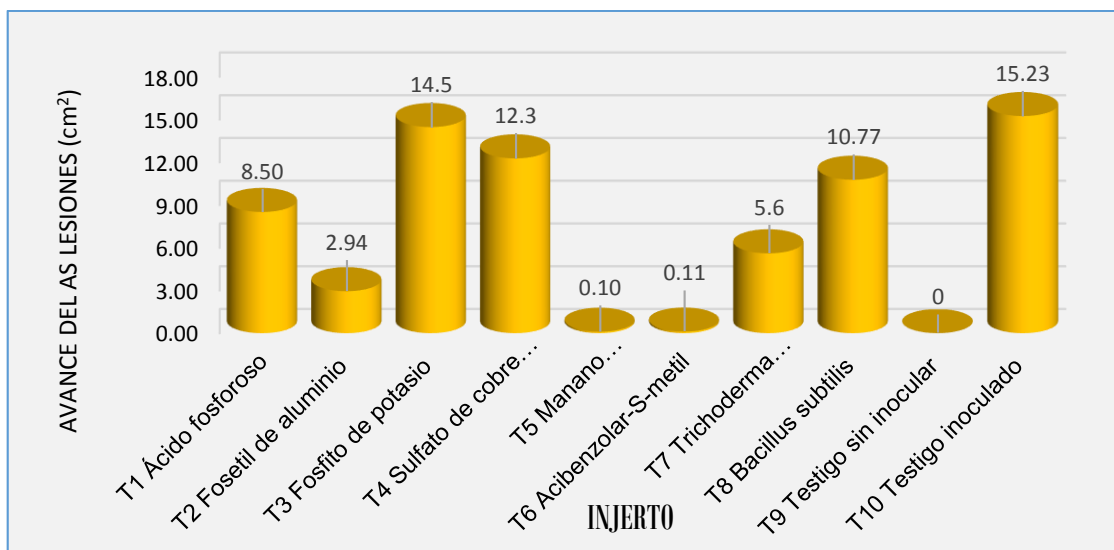


Figura N° 16 Comparaciones de áreas de las infecciones por *L. theobromae* en los injertos en la metodología curativa.

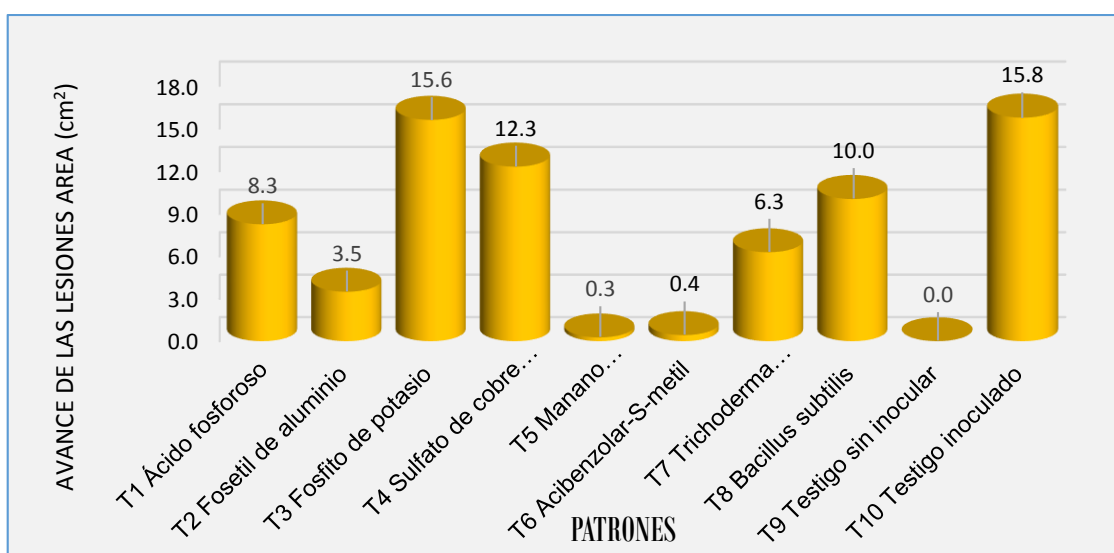


Figura N° 17 Comparaciones de áreas de infecciones por *L. theobromae* en patrones en la metodología curativa.

Las comparaciones de las áreas de las infecciones por *L. theobromae* entre patrón e injerto en los diversos tratamientos se presenta en la figura 18 (Anexo 6 y 7). Se observa que hay diferencias en las áreas de infecciones entre los injertos y los patrones. Las áreas de infecciones en los injertos son menores al de los patrones en la mayoría de los tratamientos para la metodología curativa.

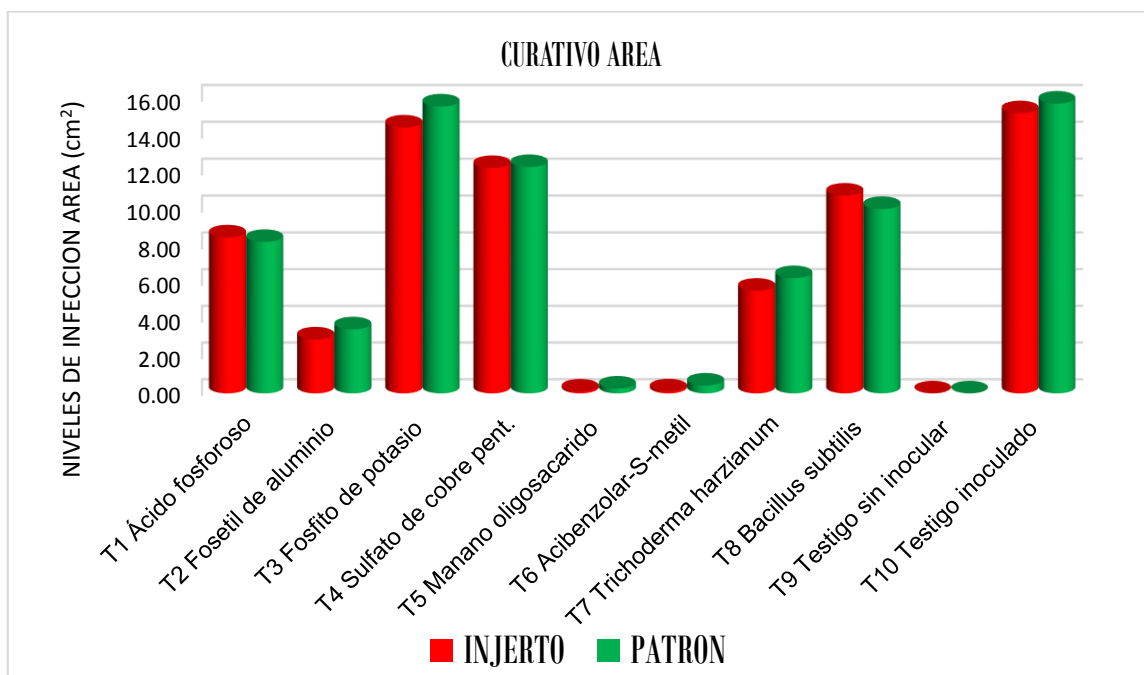


Figura N° 18 Comparaciones de áreas de las infecciones por *L. theobromae* entre los injertos y patrones de la metodología curativa.

En la figura 19 se observan los síntomas de las pudriciones de tallos que se presentaron en los injertos de los diversos tratamientos, y en la figura 20 se observan los síntomas de las pudriciones de tallos que se presentaron en los patrones de los diversos tratamientos. En ambos casos los tallos fueron previamente raspados para eliminar los signos o esporulaciones y apreciar mejor las pudriciones en el tejido cortical. Las infecciones en los tallos de los plantones a partir del punto de inoculación tanto en los injertos como en los patrones se pudieron notar que estos son algo mayores hacia la parte de abajo que las de arriba, esto concuerda con otros datos obtenidos como los de Urbez-Torres (2008).

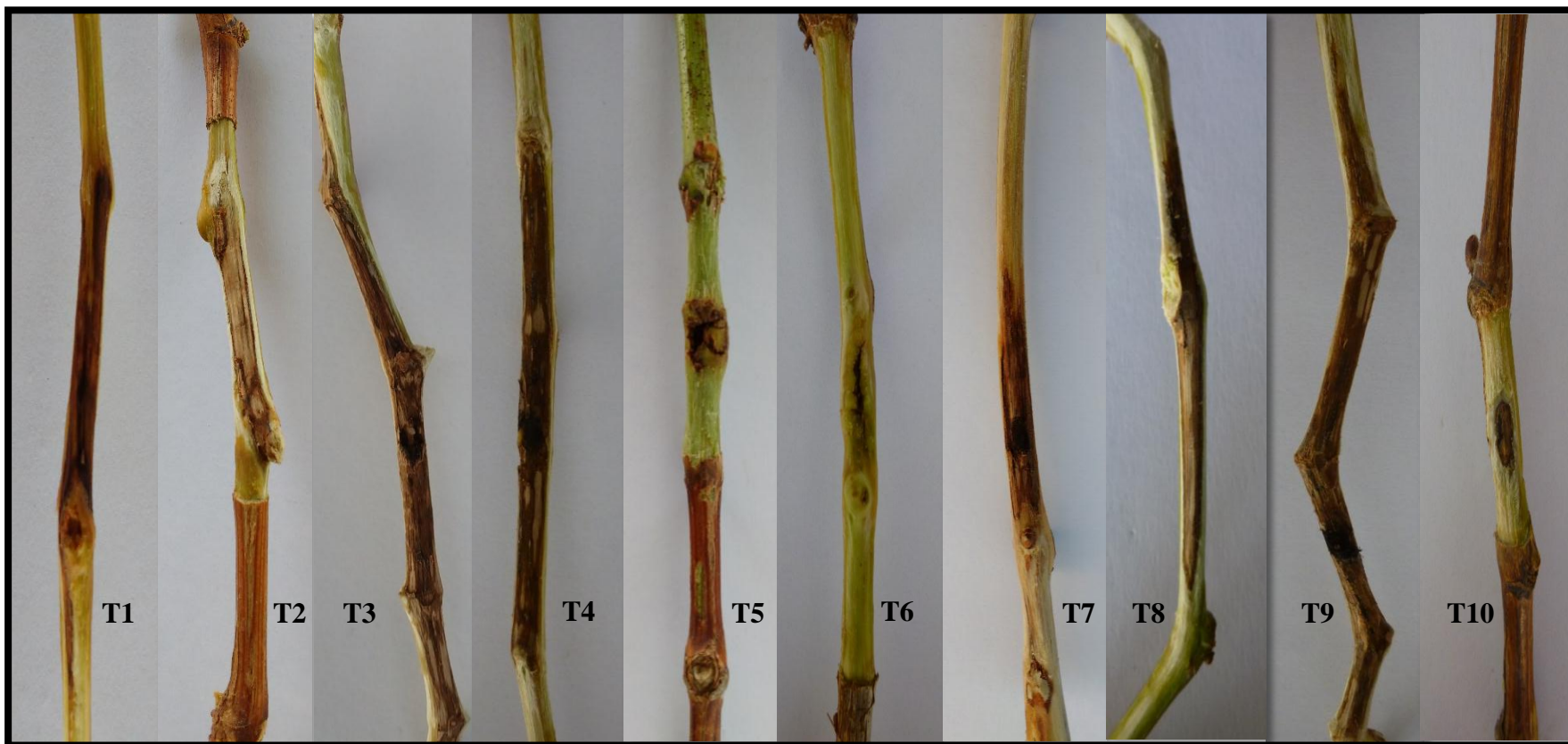


Figura N° 19 Comparación de los injertos en los diferentes tratamientos en la metodología curativa T1 (Ac. fosforoso), T2 (Fosetil de aluminio), T3 (Fosfito de potasio), T4 (Sulfato de cobre pentahidratado), T5 (Mananos oligosacáridos), T6 (Acibenzolar-S-Methyl), T7 (*Trichoderma harzianun*), T8 (*Bacillus subtilis*), T9 (Testigo sin inocular), T10 (Testigo inculado).

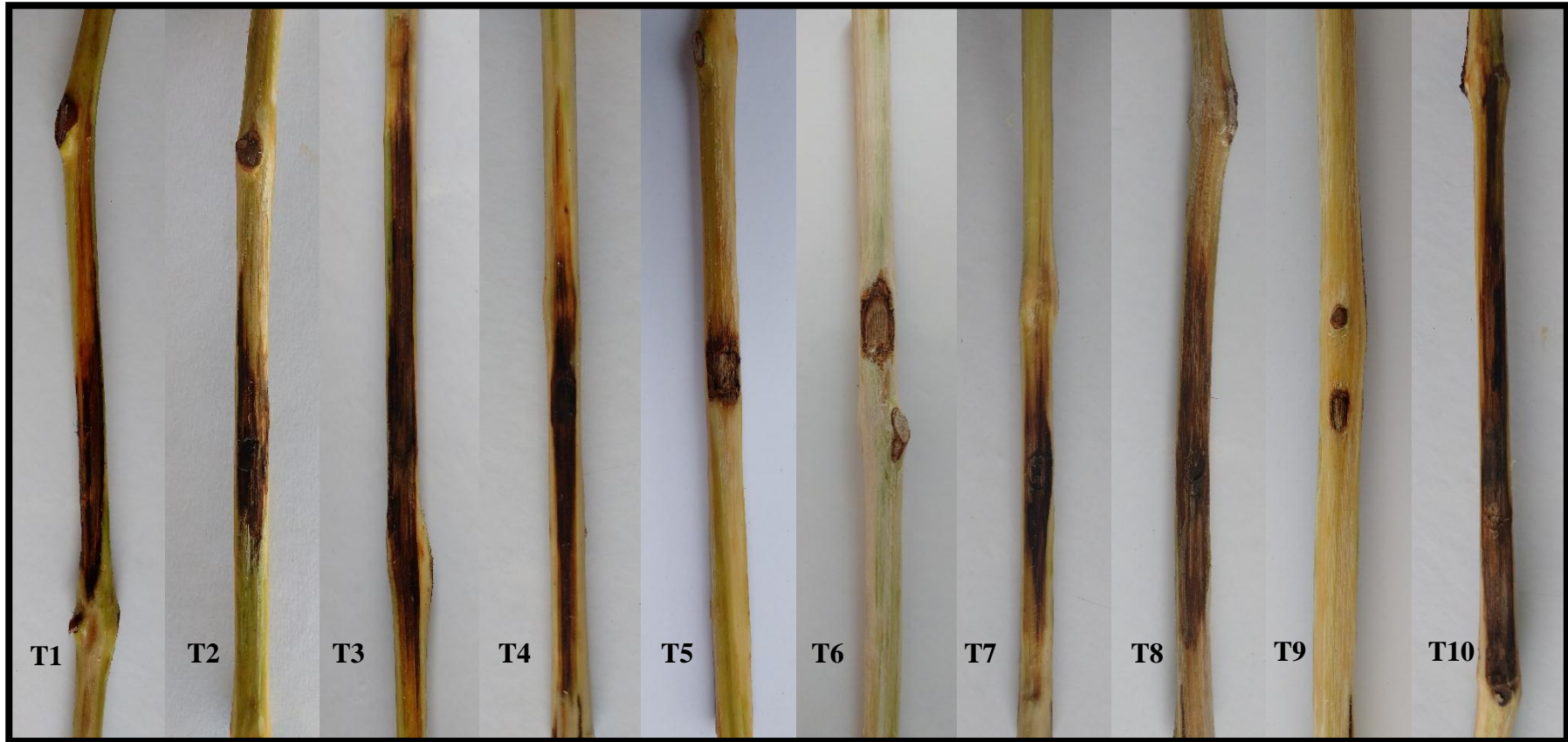


Figura N° 20 Comparación de los patrones en los diferentes tratamientos en la metodología curativa T1 (Ac. fosforoso), T2 (Fosetil de aluminio), T3 (Fosfito de potasio), T4 (Sulfato de cobre pentahidratado), T5 (Mananos oligosacáridos), T6 (Acibenzolar-S-Methyl), T7 (*Trichoderma harzianun*), T8 (*Bacillus subtilis*), T9 (Testigo sin inocular), T10 (Testigo inoculado).

Los resultados de las mediciones del avance longitudinal de las infecciones en los tallos por *L. theobromae* de los diversos tratamientos, tanto en los injertos como en los patrones se muestran en las figuras 21 y 22 respectivamente; se observa que, hubo diferencias en la longitud de las lesiones entre los tratamientos.

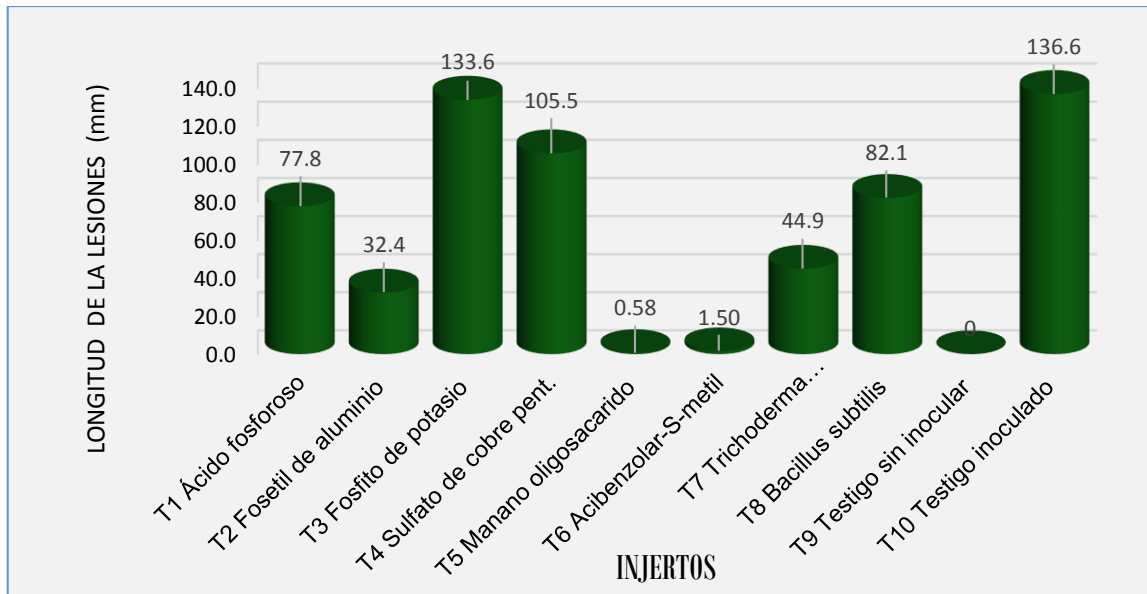


Figura N° 21 Comparación de longitudes de las infecciones por *L theobromae* en los injertos en la metodología curativa.

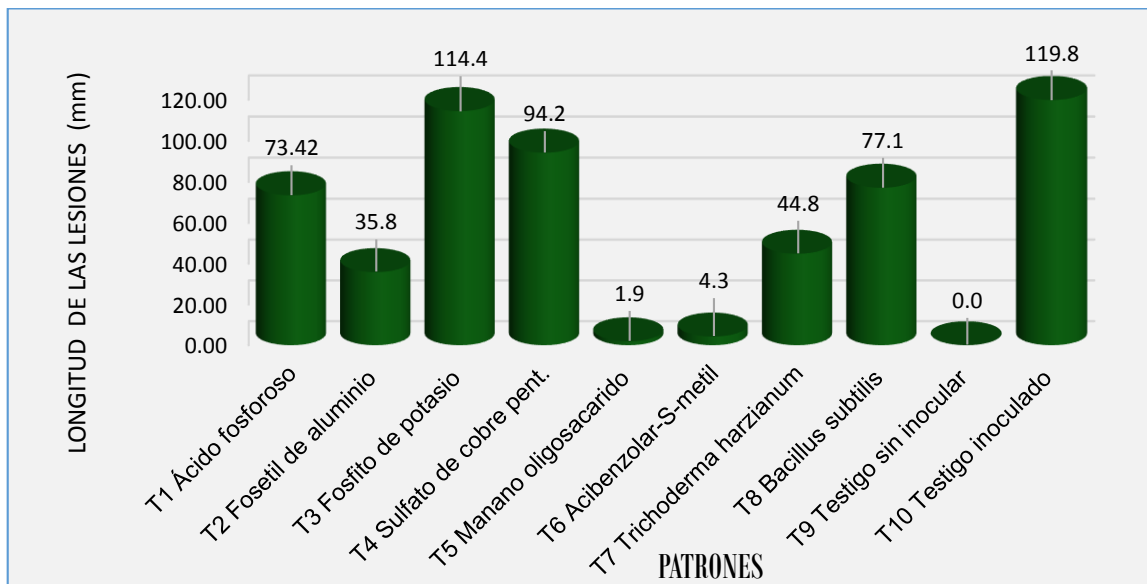


Figura N° 22 Comparación de longitudes de las infecciones por *L theobromae* en los patrones en la metodología curativa.

Las comparaciones del avance longitudinal de las infecciones por *L. theobromae* entre patrón e injerto en los diversos tratamientos se presentan en la figura 23. Se observa que hay diferencias en las longitudes de infección entre los injertos y los patrones. El avance longitudinal en los injertos es mayor a los de los patrones en la mayoría de los tratamientos para la metodología curativa.

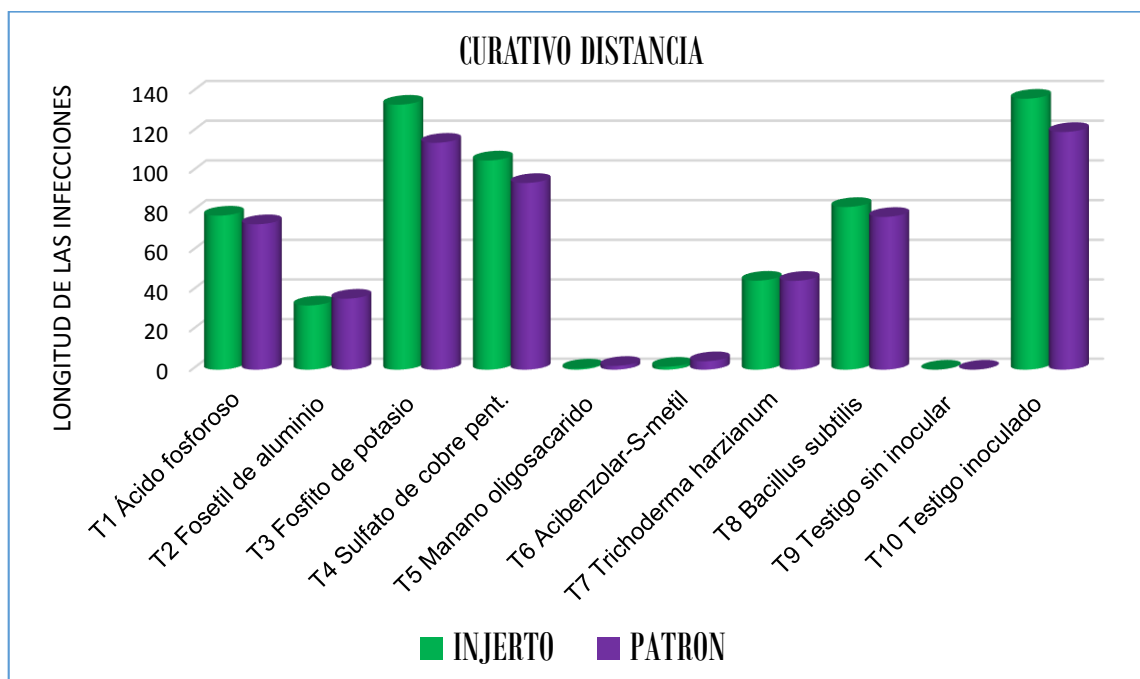


Figura N° 23 Comparaciones de longitudes de las infecciones por *L. theobromae* entre los injertos y los patrones en la metodología curativa.

En esta metodología se hicieron las aplicaciones drench solo al tratamiento con ácido fosforoso y foliar a todos los restantes, cinco días después de las inoculaciones, con el objetivo de permitir el establecimiento del patógeno. Según Al-Saadoon *et al.* (2012) a los pocos días después de la inoculación en sus ensayos mostraron que, a nivel histológico, se vio una degeneración de la epidermis y células parenquimáticas de la corteza en plantas de vid inoculadas con *L. theobromae*, lo cual para este trabajo aseguró evaluar la acción de los productos probados pos infección ya que se esperó cinco días para la aplicación de los productos de manera curativa y ver su efecto como inductor de defensa pos infección.

En los tratamientos que mostraron infección se observaron diferencias en las mediciones de avance longitudinal y lateral de la necrosis en los tejidos de las variedades con respecto a los patrones. Se pudo notar que las distancias de avance longitudinal a partir

del punto de inoculación fueron mayores en los injertos con respecto al avance en los patrones. Mientras que el avance lateral fue mayor en los patrones comparados con el avance lateral en las variedades. Por otro lado, cuando se evaluaron las áreas de avance de las infecciones ocasionado por *L. theobromae* en los tejidos, las mediciones mostraron que las áreas de infecciones de los patrones fueron mayores que en la variedad injertada. Comentado lo anterior se considera que las áreas de infección son un parámetro de medición más adecuado ya que considera tanto la longitud así como el ancho en comparación a mediciones de longitud, en donde solo se considera hasta donde en dirección recta se ve la necrosis.

Los avances longitudinales de las infecciones en los injertos fueron bastante mayores en comparación a los patrones, esto pudo haberse debido a que los injertos son brotes tiernos de tres meses de edad con rápido crecimiento longitudinal comparados con los patrones que son material vegetal de mayor edad y con mayor lignificación. Rodriguez *et al* (2015) comenta que plantas jóvenes no lignificadas infectadas con *L. theobromae* también tuvieron un avance rápido de infección.

Los tratamientos con mananos oligosacáridos (T5) y con acibenzolar-s-metil (T6) mostraron tener eficacia en el control curativo de las infecciones por *L. theobromae*, estos productos no solo activaron los mecanismos de defensa sistémica, sino que lo hicieron en tiempo rápido, ya que las infecciones fueron bloqueadas a pesar de haber transcurrido cinco días después de la inoculación. En comparación, el tratamiento con (T2) fosetil de aluminio, que a pesar de tener cierto efecto positivo en el control, la velocidad de infección fue mayor al de la inducción de defensa, por lo cual no existió el bloqueo total de la misma.

Los resultados de análisis de variancia de las áreas de las lesiones en los injertos (Cuadro 17) indican que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos, habiéndose obtenido un coeficiente de variación de 4.47% lo que indica que los datos fueron confiables.

Cuadro N° 17. Cuadro de análisis de variancia de las áreas de infecciones por *L. theobromae* de los injertos en la metodología curativa

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. Value
Tratamientos	9	89.887	9.987	495.6
Error	30	0.604	0.020	
Total	39	90.49		

CV: 4.47%

La prueba de comparación de medias de Tukey de la áreas de avance en los injertos de los tratamientos de la metodología curativa se presentan en el Cuadro 18 y, nos indica que los mejores resultados se obtuvieron con los tratamiento T5 (Mananos oligosacáridos) y T6 (Acibenzolar-S-Methyl), cuya severidad de infección representada con áreas en cm² fueron 0.09 y 0.10 respectivamente en promedio, y que fueron estadísticamente iguales a lo obtenido en el (T9) testigo sin inocular. El T2 (Fosetil de aluminio) tuvo un promedio de 2.94 cm², existiendo diferencias significativa con estos tres últimos mencionados y representando un porcentaje de control mayor al 80 % por lo que estos tres tratamientos si mostraron tener un efecto inductor. Los tratamientos T7 (*Trichoderma harzianun*) y T1 (Ácido fosforoso), tuvieron una severidad media de 5.60 y 8.50 cm² respectivamente, con porcentajes bajos de control con respecto al testigo, lo cual indica que el *T. harzianun* y Ac. fosforoso tienen un efecto poco importante en el manejo de la enfermedad para esta metodología.

Los tratamientos T8 (*Bacillus subtilis*), T4 (Sulfato de cobre pentahidratado), tuvieron una severidad media de infección de 10.75 y 12.27 cm² respectivamente, no existiendo diferencias entre estos tratamientos.

Los tratamientos T3 (Fosfito de potasio) y T10 (Testigo inoculado) tuvieron una severidad media de infección de 14.45 y 15.25 cm² respectivamente (Cuadro 18), no existiendo diferencias estadísticas entre estos tratamientos con un efecto poco importante en el manejo de la enfermedad ya existente, representando con porcentaje de control menor a 30 % para el mejor caso.

Cuadro N° 18: Prueba de Tukey de los resultados obtenidos en el área de las infecciones por *L. theobromae* en el injerto en la metodología curativa según los tratamientos utilizados para el control de la enfermedad.

Tratamientos	CURATIVO		
	MEDIA DEL	MEDIA	AGRUPAMIENTO
	AREA DE INFECCION REAL	TRANSFORMADA DE AREA DE INFECCION	
T10: Testigo inoculado	15.25 ^x	4.90 ^y	A^z
T3: Fosfito de potasio	14.45	4.79	AB
T4: Sulfato de cobre pentahidratado	12.27	4.49	B
T8: Bacillus subtilis	10.75	4.27	B
T1: Ácido fosforoso	8.50	3.91	C
T7: Trichoderma harzianun	5.60	3.36	D
T2: Fosetil de aluminio	2.94	2.69	E
T6: Acibenzolar-S-Methyl	0.10	1.17	F
T5: Mananos oligosacáridos	0.09	1.09	F
T9: Testigo sin inocular	0.00	1.00	F
Coefficiente de variabilidad	4.47 %		

^X cada valor real de cada tratamiento. ^Y Datos convertidos a $(\sqrt{\%+1})$. ^Z Números en columnas seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey.

Los resultados de análisis de variancia de las áreas de las lesiones de los patrones (Cuadro 19) indican que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos, habiéndose obtenido un coeficiente de variación de 3.5% lo que indica que nuestros datos fueron confiables.

Cuadro N°19 Cuadro de análisis de variancia de las áreas de infecciones por *L. theobromae* de los patrones en la metodología curativa.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. Value
Tratamientos	9	83.210	9.246	713.63
Error	30	0.388	0.012	
Total	39	83.6		

CV: 3.5 %

La prueba de comparación de las medias de Tukey de las áreas en los patrones de los tratamientos de la metodología curativa se presentan en el cuadro 20, e indica que los mejores resultados se obtuvieron con los tratamiento T5 (Mananos oligosacáridos), T6 (Acibenzolar-S- Methyl), cuya severidad de ataque representada con áreas de avance de infección fueron de 0.26 y 0.42 cm² respectivamente, no mostrando diferencias significativas entre los tratamientos, pero si con el tratamiento testigo.

El tratamiento T2 (Fosetil de aluminio) tuvo un promedio de 3.37 existiendo diferencias significativa con los tres últimos mencionados y representando un porcentaje de control mayor al 75 % por lo que estos tres tratamientos mostraron un buen efecto positivo en la inducción de defensa natural.

Los tratamientos T7 (*Trichoderma harzianun*) y T1 (Ácido fosforoso), tuvieron una severidad media de infección de 6.28 y 3.49 cm² respectivamente, con porcentajes bajos de control con respecto al testigo, lo cual nos indica que el *T. harzianun* y Ac. fosforoso tienen un efecto poco importante en el manejo de la enfermedad en dicha metodología.

Los tratamientos T8 (*Bacillus subtilis*), T4 (Sulfato de cobre pentahidratado), T3 (Fosfito de potasio) y T10 (Testigo inoculado) tuvieron un severidad media de avance 10.04, 12.31, 15.6 y 15.75 cm² respectivamente (Cuadro 20). Existiendo diferencias estadísticas entre los tratamientos mencionados, incluyendo a estos tratamientos con un efecto poco importante en el manejo de la enfermedad, representando con porcentaje de control menor a 37 % para el mejor caso.

Cuadro N° 20: Prueba de Tukey de los resultados obtenidos en el área de las infecciones por *L. theobromae* en los patrones en la metodología curativa según los tratamientos utilizados para el control de la enfermedad.

Tratamientos	CURATIVO		
	MEDIA DEL	MEDIA	AGRUPAMIENTO
	AREA DE INFECCION REAL	TRANSFORMADA DE AREA DE INFECCION	
T10: Testigo inoculado	15.75 ^x	4.96 ^y	A^z
T3: Fosfito de potasio	15.60	4.93	A
T4: Sulfato de cobre pentahidratado	12.31	4.50	B
T8: Bacillus subtilis	10.04	4.15	C
T1: Ácido fosforoso	8.25	3.86	D
T7: Trichoderma harzianun	6.28	3.49	E
T2: Fosetil de aluminio	3.37	2.81	F
T6: Acibenzolar-S-Methyl	0.42	1.48	G
T5: Mananos oligosacáridos	0.26	1.29	G
T9: Testigo sin inocular	0.00	1.00	H
Coficiente de variabilidad	3.5 %		

^x cada valor real de cada tratamiento. ^y Datos convertidos a $(\sqrt{\%+1})$. ^z Números en columnas seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey.

d) Reaislamiento del patógeno

Después de las evaluaciones las muestras fueron llevadas al laboratorio para el reaislamiento correspondiente, los resultados se muestran en el cuadro 21.

En los tratamientos T1 (ácido fosforoso), T2 (Fosetil de aluminio), T3 (Fosfito de potasio), T4 (Sulfato de cobre pentahidratado) se pudo reaislar *L. theobromae* tanto de los injertos como de los patrones representado con un 100 % de plantas infectadas, para estos tratamientos.

El tratamiento T5 (Manano oligosacáridos), de los injertos no se reaisló *L. theobromae*, aunque si en el patrón con dos plantas, representado con un 15 % y, T6

(Acibenzolar-S-methyl) se reaisló *L. theobromae* en una planta en la zona injerto y tres para la zona del patrón.

Los tratamientos con T7 (*T. harzianum*), T8 (*B. subtilis*) y T10 (testigo inoculado) tuvieron un 100% de reaislamiento del hongo tanto de los patrones como de los injertos. En el testigo sin inocular no se reaisló *L. theobromae* en ninguno de las muestras escogidas.

Cuadro N°21 Porcentajes de plantas con reaislamiento de *L. theobromae*.

TRAT.	DESCRIPCIÓN	INJERTO	%	PATRÓN	%
1	Acido fosforoso	+	100	+	100
2	Fosetil de Aluminio	+	100	+	100
3	Fosfito de potasio	+	100	+	100
4	Sulfato de cobre pentahidratado	+	100	+	100
5	Manano oligosácaridos	-	0	+	33
6	Acibenzolar S-methyl	-	0	+	66
7	<i>Trichoderma harzianum</i>	+	100	+	100
8	<i>Bacillus subtilis</i>	+	100	+	100
9	Testigo sin inocular	-	0	-	0
10	Testigo inoculado	+	100	+	100

+ positivo para reaislamiento de *L. theobromae* - Negativo para reaislamiento de *L. theobromae*

4.5.2. Tratamientos de control preventivo

Durante el desarrollo de las plantas, con la metodología preventiva, en los meses de Marzo a Mayo, se presentaron condiciones de temperatura favorables para el desarrollo de la enfermedad, siendo las temperaturas promedios durante el día de 24 °C. (Anexo 5).

Los síntomas característicos ocasionados por la infección de *L. theobromae* en vid se observaron en varios de los tratamientos preventivos. Los síntomas secundarios al finalizar el ensayo fueron: amarillamiento parcial y general de las hojas, acortamientos de entrenudos, brotación por debajo del punto de inoculación, defoliación y marchitez de hojas (Figura 24 a-d). También se observaron necrosis en hojas en forma descendente o muerte regresiva de los brotes, estos síntomas mencionados son comparados con los que describe Rodriguez *et al.* (2015).

Los síntomas primarios que se observaron desde el punto de inoculación hacia los alrededores fueron: necrosis del tallo con presencia de esporulaciones, y al rasparlos y cortarlos, se observaron necrosis de los tejidos corticales y vasculares (Figura 24: e, f y g); presentándose avances de la infección en todas las direcciones desde el punto de inoculación, estos síntomas son los mismos que describe Úrbez-Torres (2008), en su ensayo. Los signos observados fueron abundantes esporulaciones negras que cubrían la superficie de los tallos (figura 24 e y f) y al observarlos con ayuda de los microscopios estereoscópico y compuesto, se observaron claramente las picnidias (Figura 24: h y i).

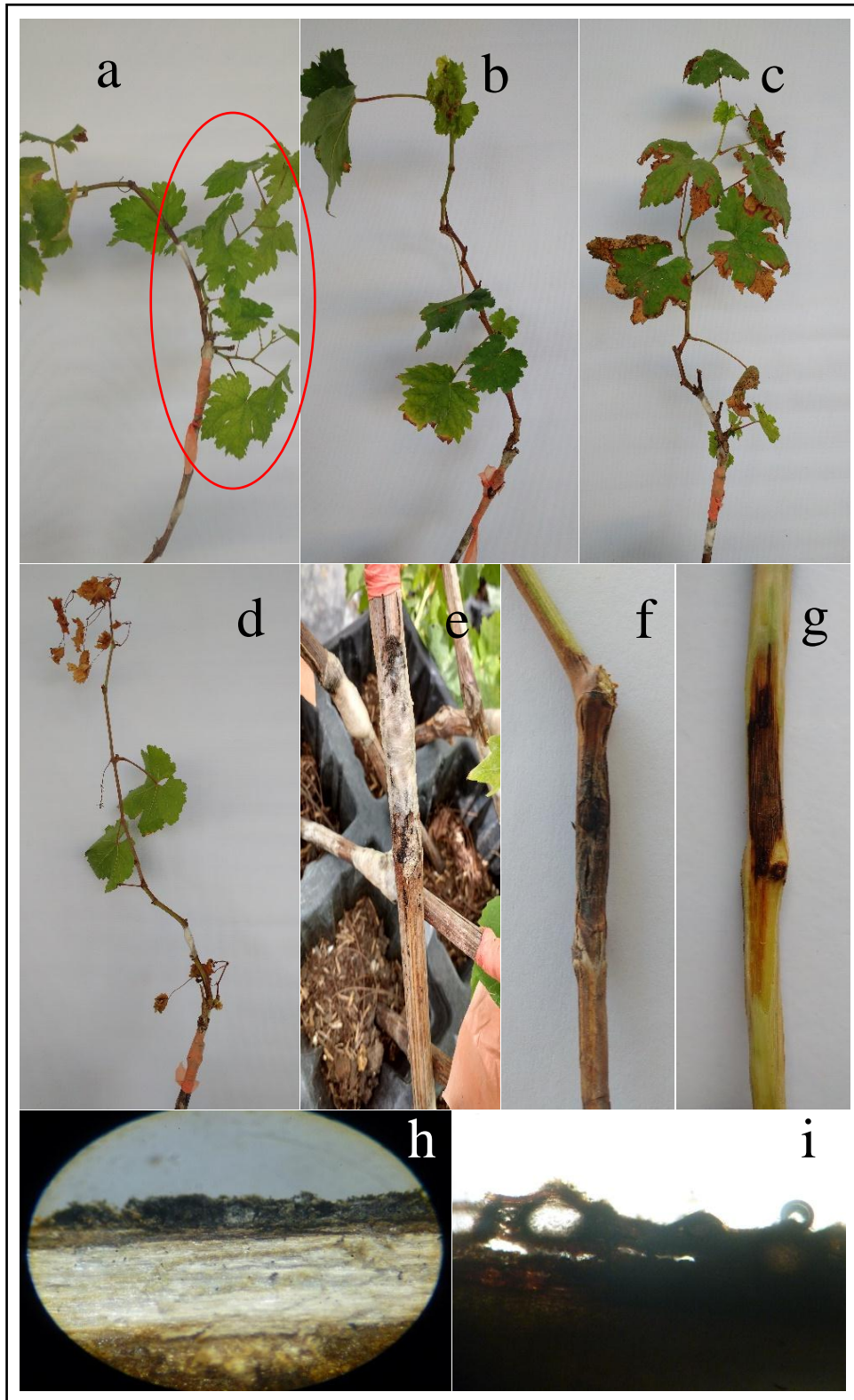


Figura N° 24. Síntomas secundarios y signos de la enfermedad presentados en la metodología preventiva (a-i). a) Plantas infectadas con *Lasiodiplodia* muestra de síntomas secundarios como amarillamiento y brotación por debajo del avance de la infección. b) Paralización de emisión de brotes nuevos c y d) Necrosis y defoliación de hojas. e) Plantas con presencia de signos a nivel de patrón. f y g) Avance de la infección. h) Presencia de picnidios con vista en el microscopio estereoscópico. i) Presencia de picnidios en los tallos con vista microscópica.

a) Incidencia de la enfermedad:

Los resultados de las evaluaciones de incidencia de la enfermedad, tanto en los injertos como en los patrones, se presentan en el cuadro 22, donde se observa que, en los tratamientos: testigo inoculado (T20), con fosfito de potasio (T13), con *B. subtilis* (T18), con ácido fosforoso (T11), y con *T. harzianum* (T17); presentaron un 100 % de incidencia de la enfermedad tanto en el patrón como en el injerto y el tratamiento con sulfato de cobre pentahidratado (T14) se observó una planta sin infección solamente en el injerto mas no en los patrones. En el tratamiento con fosetil de aluminio (T12) solo en dos plantas en la zona injerto no tuvieron infecciones. Para los tratamientos con mananos oligosacáridos (T15) y testigo sin inocular (T19) no se observaron infecciones aparentes ni en la zona injerto ni el patrón, y, por último, el tratamiento con Acibenzolar-S-Methyl (T16) solo se evidenció una planta con infección en la zona patrón.

Cuadro N° 22: Números y porcentajes de plantas infectadas con *L. theobromae* por cada tratamiento, tanto en los patrones como en los injertos.

N°	TRATAMIENTO	DESCRIPCION	N° DE PLANTAS AFECTADAS	INCIDENCIA %
20	Testigo inoculado	Injerto	12/12	100.0
		Patrón	12/12	100.0
13	Fosfito de potasio	Injerto	12/12	100.0
		Patrón	12/12	100.0
18	<i>Bacillus subtilis</i>	Injerto	12/12	100.0
		Patrón	12/12	100.0
11	Ac. fosforoso	Injerto	12/12	100.0
		Patrón	12/12	100.0
17	<i>T. harzianum</i>	Injerto	12/12	100.0
		Patrón	12/12	100.0
14	Sulfato de cobre Pent.	Injerto	11/12	100.0
		Patrón	12/12	100.0
12	Fosetil de aluminio	Injerto	10/12	100.0
		Patrón	12/12	100.0
15	Mananos oligosacáridos	Injerto	0/12	0.0
		Patrón	0/12	0.0
16	Acibenzolar-S-Methyl	Injerto	0/12	0.0
		Patrón	1/12	8.3
19	Testigo sin inocular	Injerto	0/12	0.0
		Patrón	0/12	0.0

Dentro de esta metodología preventiva, los niveles de incidencia fueron menores que la metodología curativa, esto puede atribuirse a que algunos de los tratamientos pueden funcionar mejor de manera preventiva, en donde antes que se dé la inoculación por *L. theobromae*, la planta ya tiene su mecanismo de defensa sistémico activo, en donde se muestra que los patrones de algunos plantones tuvieron menor número de incidencia.

b) Severidad de los síntomas secundarios

Las plantas tratadas con la metodología preventiva las cuales fueron 12 por tratamientos mostraron tener diversos niveles de síntomas secundarios como consecuencia de las infecciones. Todas ellas mostraron síntomas que van desde amarillamiento general de las hojas, acortamientos de entrenudos, marchitez de hojas, brotación por debajo del punto de inoculación, defoliación y muerte plantas. Los resultados se muestran en el cuadro 23, donde se observa las severidades de las plantas en relación a los grados de evaluación

Cuadro N° 23: Evaluación de síntomas secundarios en los diferentes tratamientos por infecciones por *L. theobromae* representado en grados de infección.

N°	TRATAMIENTOS	GRADO											
		0		1		2		3		4		5	
		N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
11	Ácido fosforoso	0	0	2	17	3	25	7	58	0	0	0	0
12	Fosetil de aluminio	9	75	3	25	0	0	0	0	0	0	0	0
13	Fosfito de potasio	0	0	1	8	0	0	0	0	10	84	1	8
14	Sulfato de cobre pent.	0	0	0	0	1	8	9	75	2	17	0	0
15	Mananos oligosacáridos	12	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	Acibenzolar-S-Methyl	12	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	Trichoderma harzianun	0	0	1	8	2	17	9	75	0	0	0	0
18	Bacillus subtilis	0	0	0	0	9	75	3	25	0	0	0	0
19	Testigo sin inocular	12	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	Testigo inoculado	0	0	0	0	0	0	0	0	10	83	2	17

N°. Número total de plantas afectadas para cada grado, %. Porcentaje de plantas afectadas para cada grado.

Los tratamientos que tuvieron grado 0 en el 100 % de las plantas fueron aquellos con mananos oligosacáridos (T15) y acibenzolar-S-Methyl (T16), así como también el testigo sin inocular (T19); éstas no presentaron síntomas secundarios por infecciones con *L. theobromae*. El tratamiento con Fosetil de aluminio (T12) presentó nueve plantas con este grado.

Para el grado 1, los tratamientos T11 (ácido fosforoso), T12 (fosetil de aluminio), T13 (fosfito de potasio) y T17 (*T. harzianum*) tuvieron 2, 3, 1 y 1 plantas con este grado respectivamente, lo cuales fueron síntomas de amarillamiento de hojas.

Para el grado 2, los tratamientos T11 (ácido fosforoso), T12 (fosetil de aluminio), T17 (*T. harzianum*) y T18 (*B. subtilis*) tuvieron, 3, 1, 2, y 9 plantas respectivamente con este grado de severidad, el cual es caracterizado por síntomas de acortamiento de entrenudos y paralización de emisión de yemas nuevas.

Para el grado 3, los tratamientos T11 (ácido fosforoso), T12 (fosetil de aluminio), T17 (*T. harzianum*) y T18 (*B. subtilis*) tuvieron 7, 9, 9 y 3 plantas respectivamente, lo cual se caracterizaron por síntomas de marchitez de hojas y brotación por debajo del punto de avance de la infección.

Para el grado 4, los tratamientos T13 (fosfito de potasio), T14 (sulfato de cobre pentahidratado) y T20 (testigo inoculado) tuvieron, 10, 2 y 10 plantas respectivamente, caracterizados por la presencia de necrosis de hojas y defoliación.

Para el grado 5, los tratamientos T13 (fosfito de potasio) y T20 (testigo inoculado) tuvieron, 1 y 2 plantas respectivamente con síntomas de muerte completa de ellas.

Los síntomas secundarios de los diversos tratamientos se muestran las figuras 25 y 26, donde se observa diferencias entre cada una de ellas.

Dentro de esta metodología los síntomas secundarios fueron algo menores en los grados de severidad con respecto a los resultados obtenidos en la evaluación de la metodología curativa. Esto pudo deberse a que el avance de las infecciones también fueron algo menores en comparación al de la metodología curativa. También hay que mencionar que las temperaturas fueron bajando en los últimos días que se desarrolló el ensayo de la metodología preventiva en comparación con las temperaturas que se registraron durante el ensayo de la metodología curativa, lo que pudo influir en el avance de las infecciones por *L. theobromae* en los tejidos haciéndose más lento (Anexo 5).

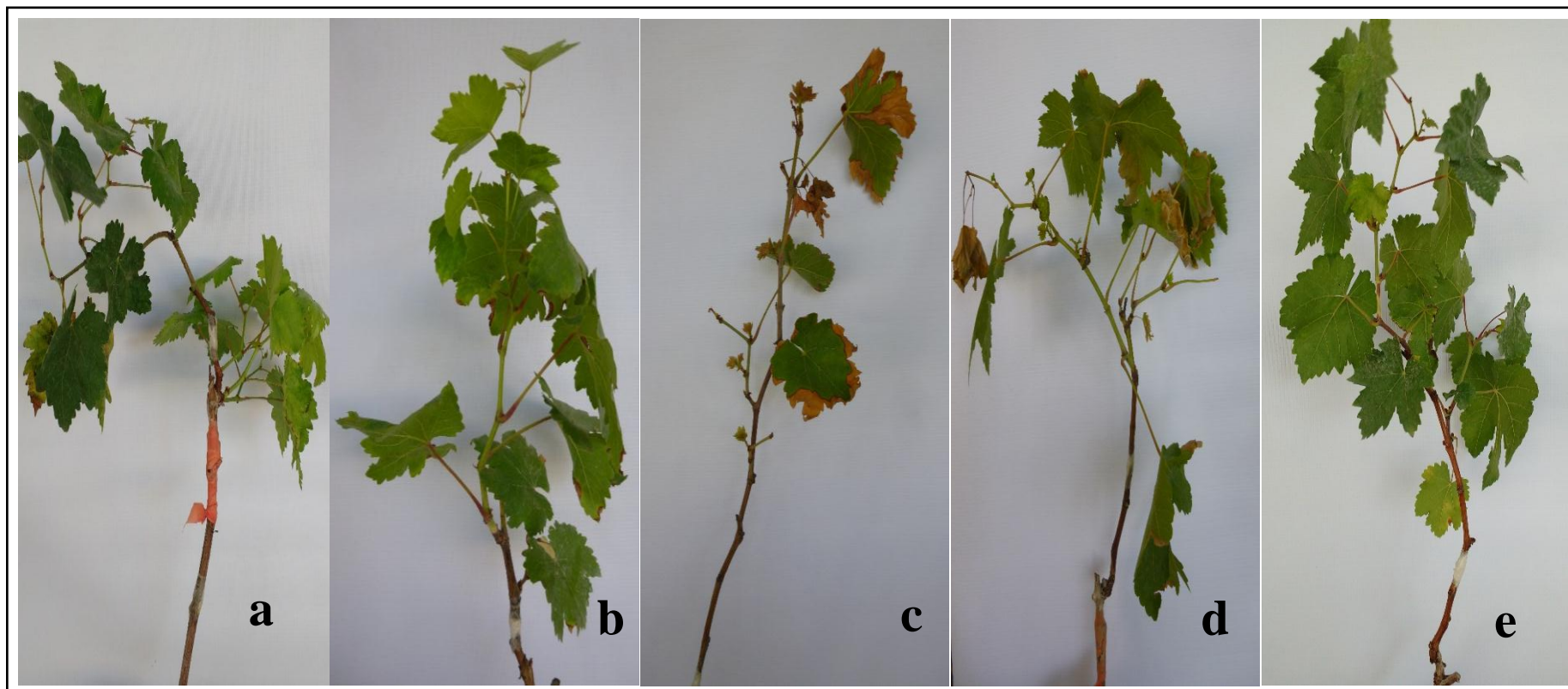


Figura N° 25 Comparación visual de síntomas secundarios en diferentes tratamientos en la metodología preventiva (a-e). (a) Inicio de clorosis en hojas y emisión de brotes por debajo del punto de inoculación (T11: Ac. fosforoso), (b) Plantas sin síntomas aparente (T12: Fosetil de aluminio), (c) Necrosis en hojas y defoliación (T13: Fosfito de potasio), (d) Marchitez de hoja e inicios de defoliación (T14: Sulfato de cobre pentahidratado), (e) Planta sin síntomas de la enfermedad (T15: Mananos oligosacáridos).

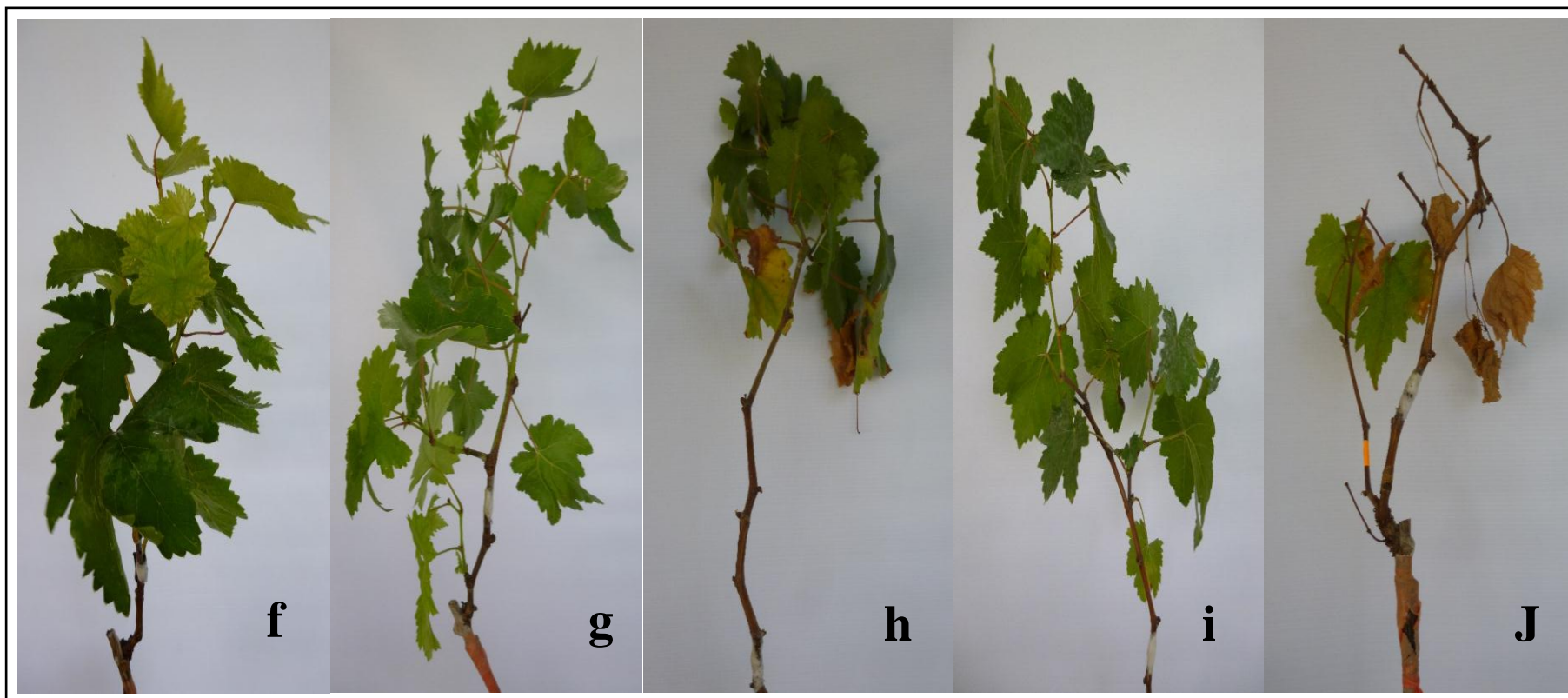


Figura N° 26 Comparación visual de síntomas secundarios en diferentes tratamientos en la metodología preventiva (f-j). (f) Planta sin síntoma de la enfermedad, (T16: acibenzolar-S-methyl), (g) Acortamiento y emisión de brotes por debajo del punto de inoculación (T17: *T. harzianum*), (h) Acortamiento de entre nudos (T18: *B. subtilis*), (i) Plantas sin síntomas (T19: testigo sin inocular), (j) defoliación y muerte de planta (T20: testigo inoculado).

c) Severidad de pudriciones en los tallos

Los resultados del área de avance de las infecciones por *L. theobromae* en los diversos tratamientos de la metodología preventiva, tanto para los injertos como para los patrones, se muestran en las figuras 27 y 28 respectivamente y se observa que hay diferencias en el área de avance entre los tratamientos.

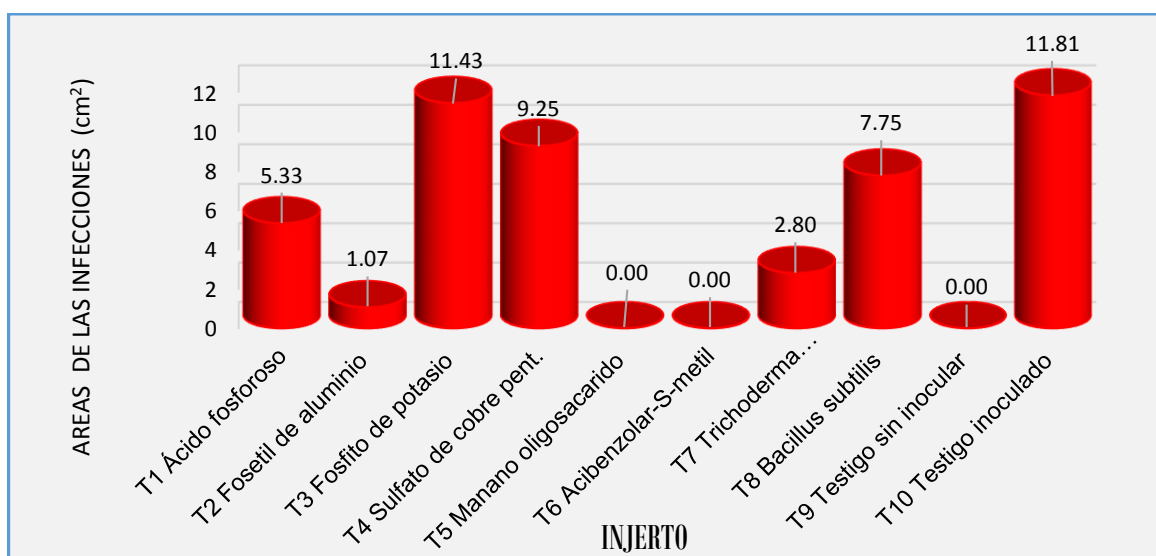


Figura N° 27 Comparación de áreas de la infección por *L. theobromae* en los injertos de la metodología preventiva.

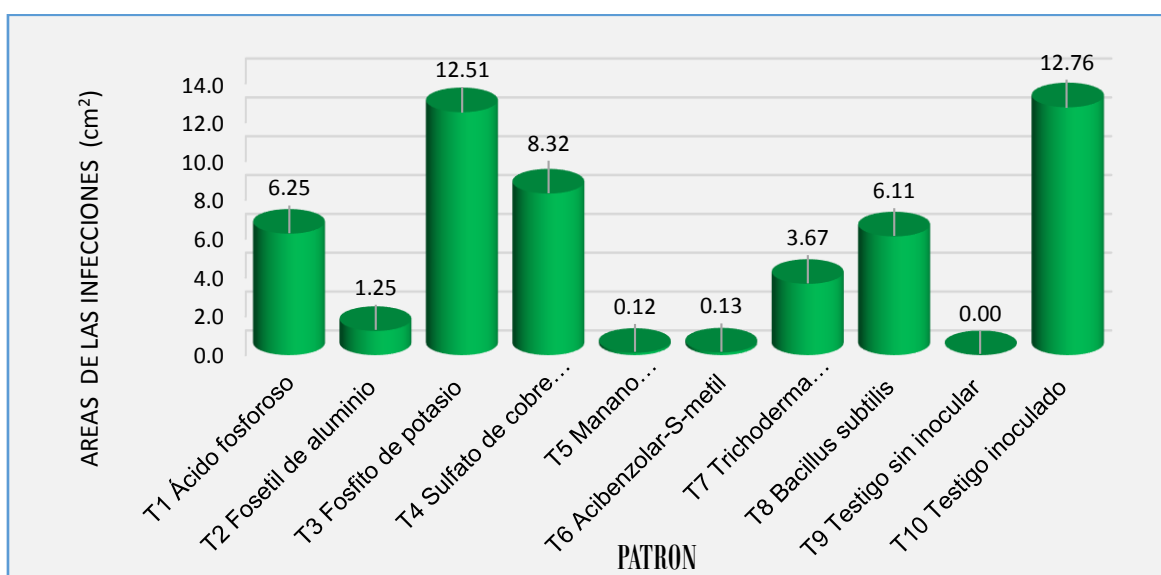


Figura N° 28 Comparación de áreas de la infección por *L. theobromae* en los patrones de la metodología preventiva.

Las comparaciones de las áreas de las infecciones por *L. theobromae* entre patrón e injerto en los diversos tratamientos de la metodología preventiva se presentan en la figura 29. Se observa que hay diferencias en el área de avance entre los injertos y los patrones. El avance en área en los injertos es menor al de los patrones en la mayoría de los tratamientos para la metodología preventiva.

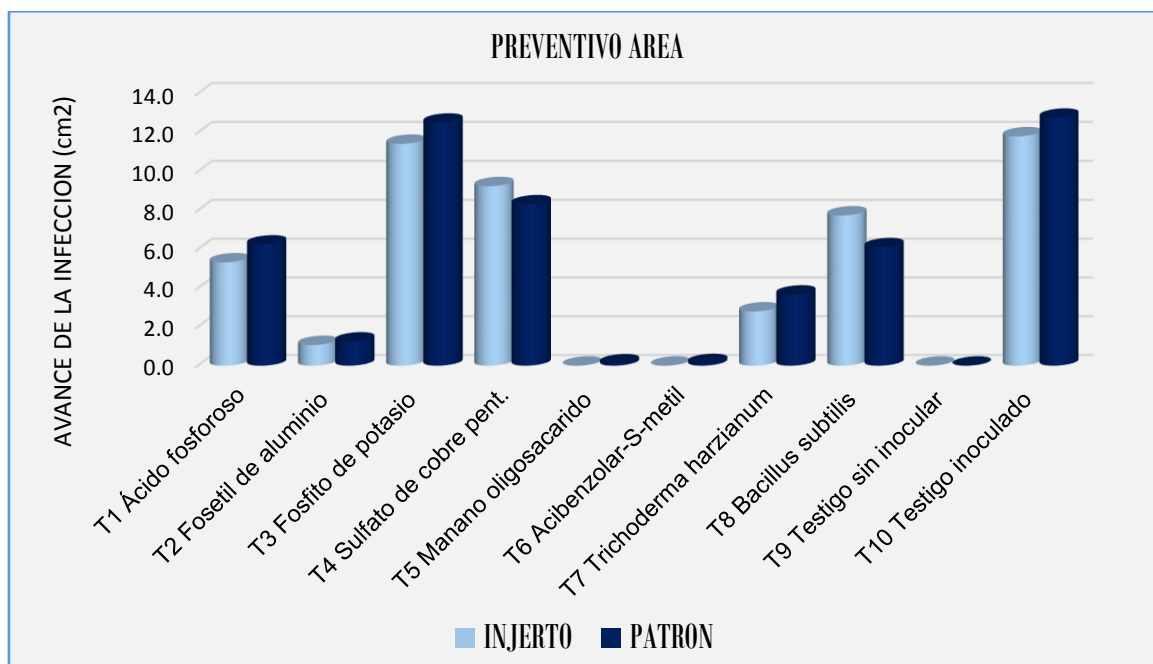


Figura N° 29 Comparaciones de las áreas de las infecciones por *L. theobromae* entre los injertos y patrones de la metodología preventiva.

En la figura 30 se observa los síntomas de las pudriciones de tallos que se presentaron en los injertos de los diversos tratamientos, y en la figura 31 se observan los síntomas de las pudriciones de tallos que se presentaron en los patrones de los diversos tratamientos (Anexo 8 y 9).



Figura N° 30 Comparación de injertos de los diferentes tratamientos con raspado cortical en la metodología preventiva. T11 (Ac. fosforoso), T12 (Fosetil de aluminio), T13 (Fosfito de potasio), T14 (Sulfato de cobre pentahidratado), T15 (Mananos oligosacáridos), T16 (Acibenzolar-S-Methyl), T17 (*Trichoderma harzianun*), T18 (*Bacillus subtilis*), T19 (Testigo sin inocular), T20 (Testigo inoculado).

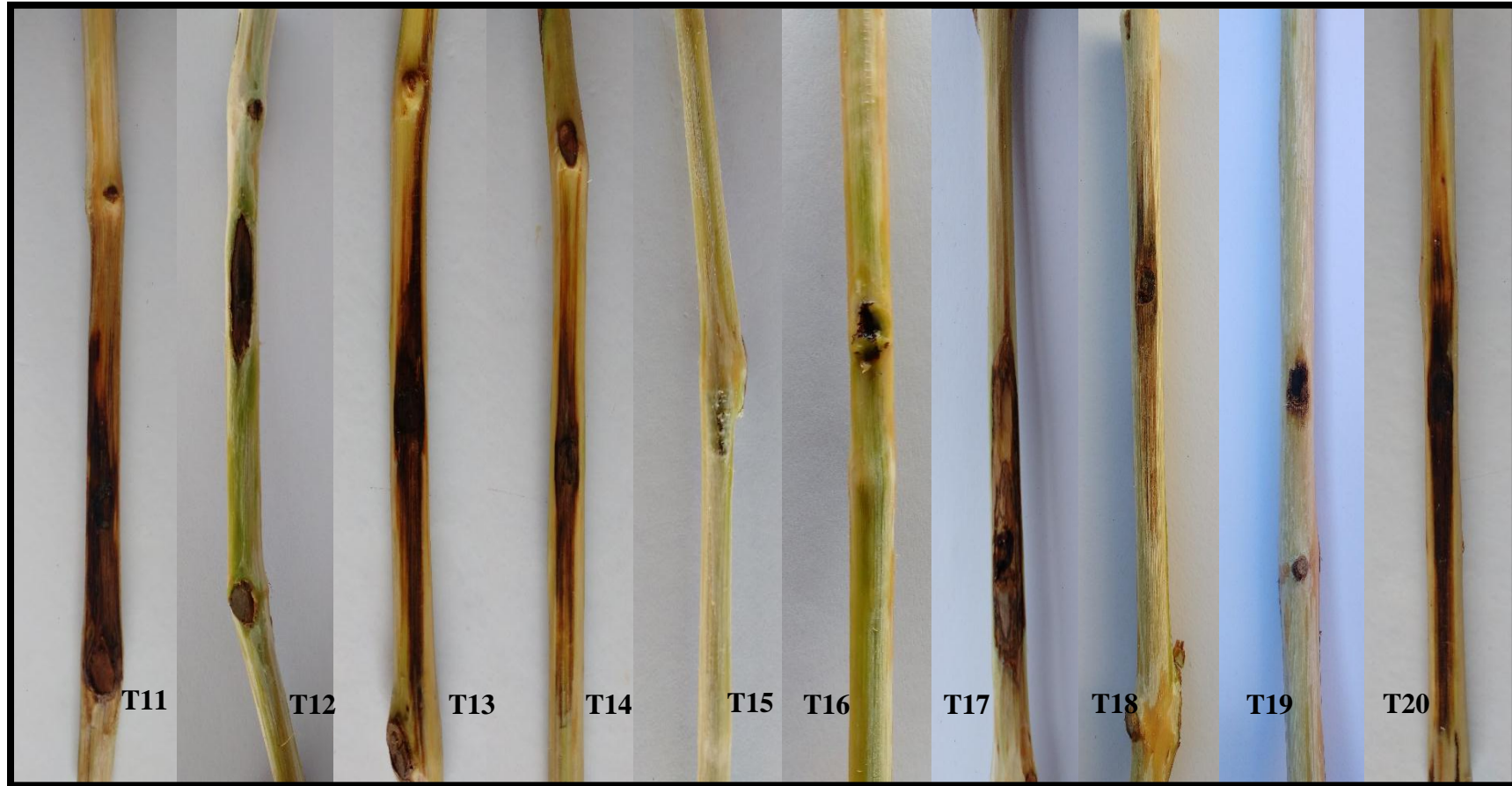


Figura N° 31: Comparación de patrones de los diferentes tratamientos con raspado cortical en la metodología preventiva. T11 (Ac. fosforoso), T12 (Fosetil de aluminio), T13 (Fosfito de potasio), T14 (Sulfato de cobre pentahidratado), T15 (Mananos oligosacáridos), T16 (Acibenzolar-S-Methyl), T17 (*Trichoderma harzianum*), T18 (*Bacillus subtilis*), T19 (Testigo sin inocular), T20 (Testigo inocular).

Los resultados de las mediciones del avance longitudinal de las infecciones en los tallos por *L. theobromae* de los diversos tratamientos de la metodología preventiva, tanto en los injertos como en los patrones se muestran en las figuras 32 y 33 respectivamente, y se observa que existió diferencias en la longitud de lesiones entre los tratamientos.

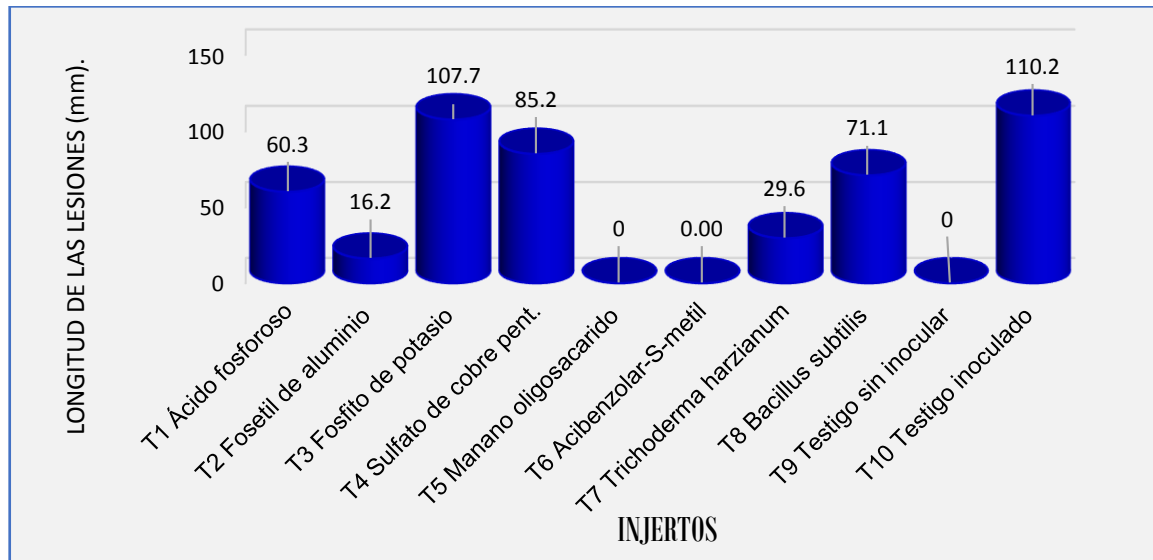


Figura N° 32 Comparación de longitudes de la infección por *L. theobromae* en los injertos en la metodología curativa.

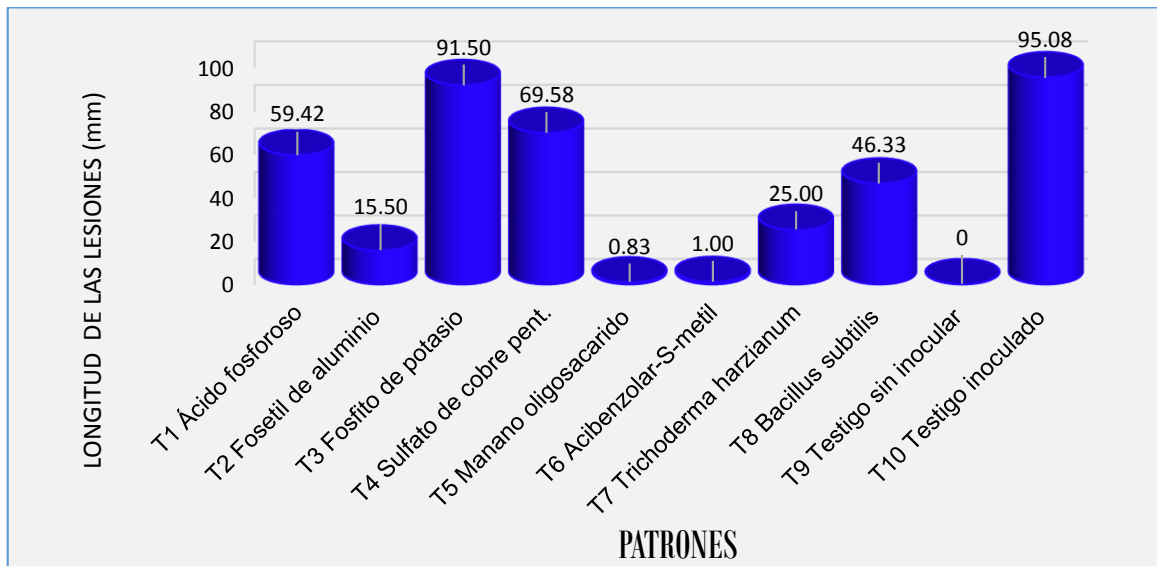


Figura N° 33 Comparaciones de longitudes de la infección por *L. theobromae* en los patrones de la metodología preventiva.

Las comparaciones de la distancia longitudinal de las infecciones por *L. theobromae* entre patrón e injerto en los diversos tratamientos de la metodología preventiva se presenta en la figura 34. Se observa que hay diferencias de las longitudes de las lesiones entre los injertos y los patrones. El avance longitudinal en los injertos es mayor al de los patrones en la mayoría de los tratamientos para la metodología preventiva.

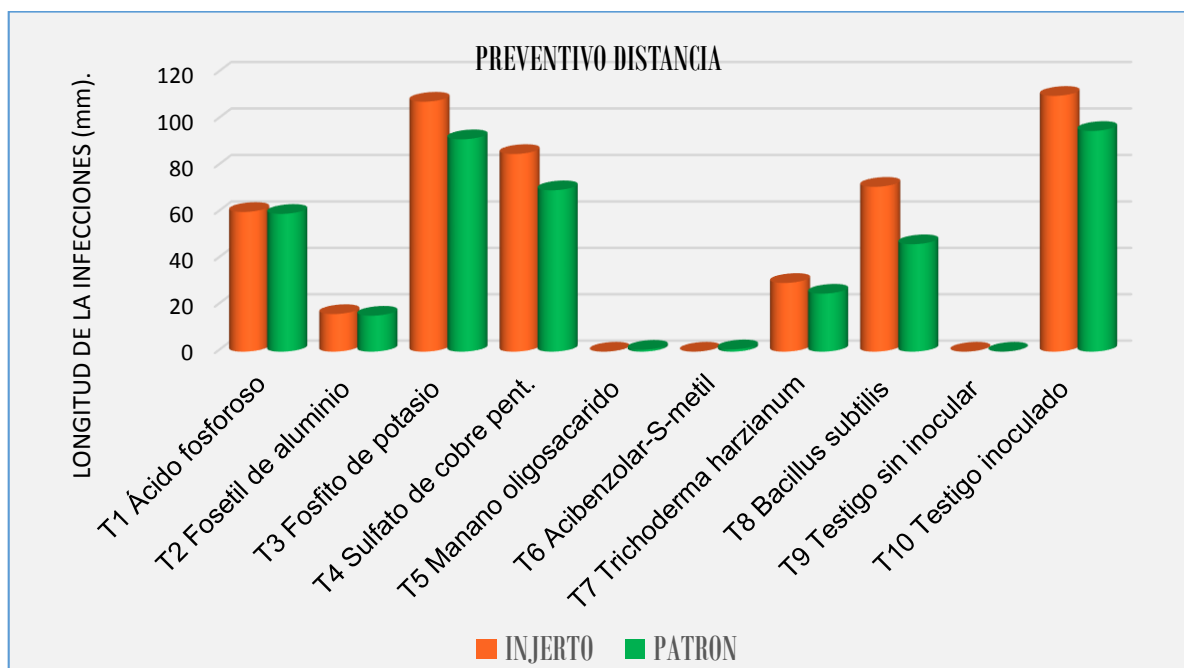


Figura N° 34 Comparaciones de las longitudes por infecciones por *L. theobromae* entre los injertos y patrones de la metodología preventiva.

Las evaluaciones de los tratamientos en relación a las distancias (mm) de infección fueron en su mayoría superiores en la variedad que en los patrones, estas diferencias podrían deberse a factores como tipo de tejido inoculado, edad del hospedante y/o diferencias en la susceptibilidad del cultivar, entre otros factores que influyan en el avance del patógeno (Van Niekerk, J. *et al.* 2004), aunque, esta relación es contraria, ya que los patrones a pesar de tener distancias algo menores en comparación a las variedades, en varios tratamientos las áreas (cm²) fueron mayores en los patrones que en la variedad.

Los productos a base de fósforo como el caso de ácido fosforoso y fosfito de potasio no mostraron tener ningún efecto positivo en el control de la infección por *L. theobromae*, aun cuando éstas alcanzaron niveles casi igual a las del testigo inoculado; aunque existe reportes con estos productos para otros cultivos con diferente patógeno, donde si mostraron

tener cierta eficacia en el control. Su poca eficacia en el control puede ser explicado que no hay fundamentos en que estos productos activen la resistencia de manera sistémica; pero los mecanismos de defensas no son solamente de forma sistémica, siendo también mediante la producción de compuestos microbicidas como las fitoalexinas, de ser así, no necesariamente pueden producirse fitoalexinas en cantidades elevadas como para inhibir el avance del patógeno. Esto quizá pudiera ser manejado por la dosis del producto a aplicar, ya que en el presente trabajo de investigación las cantidades de los productos que se aplicaron fueron en relación a la dosis comercial recomendada y no necesariamente a una dosis que pueda funcionar como inductor de defensas en cantidades suficientes.

Para el caso de Fosetil de aluminio se obtuvieron buenos resultados con respecto a la metodología preventiva, con avances de las pudriciones muy bajas para este tratamiento, con porcentaje de inhibición mayor al 80%. Hay muchas evidencias en investigaciones que muestran que la aplicación de Fosetil de aluminio participa en la producción de fitoalexinas y otros compuestos fenólicos, aunque también hay otros estudios que demuestran que la acumulación de fitoalexinas en plantas tratadas con Fosetil de aluminio fueron iguales que en las plantas no tratadas. Por lo tanto, no se puede asociar únicamente a las fitoalexinas las respuestas relacionadas con la resistencia en el hospedante (Guest 1986).

Entre los procesos de defensa de la planta se incluyen las muertes programadas de las células, y no solo existe una muerte como tal, sino que se forman y acumulan otros compuestos que son tóxicos para el patógeno y las células hospedantes (Heath 2000).

Los resultados de la metodología preventiva mostraron ser mejores en algunos tratamientos en comparación con la metodología curativa, y en otros tratamientos hubieron pocas diferencias, resultando que los productos que son eficaces en la metodología curativa, muestran ser mejores cuando se aplicó en forma preventiva a la infección con *L. theobromae*.

Los productos Manamos oligosacáridos y Acibenzolar-S-methyl mostraron ser los mejores en el control de *L. theobromae* controlando en un 100% de la enfermedad en los injertos y cerca al 100 % en los patrones. Estos resultados son similares a los obtenidos en estudios previos con dichos productos, donde se muestran su poder activador de defensa en plantas, donde se usaron ácido salicílico aplicados exógenamente para *Botrytis cinerea* (Renault *et al.* 1996) y aplicaciones de manamos oligosacáridos contra *Plasmopara vitícola*

en vid, donde mostraron tener buena eficacia como activadores de defensa contra patógenos en plantas (Kedma *et al.* 2012).

En los tratamientos con mananos oligosacáridos y con acibenzolar-s-metil, se produjo un bloqueo en el avance del patógeno por la formación de una cicatriz en forma de “labio”, lo que indica la acumulación de sustancias de refuerzos como enzimas ricas en hidroxiprolina y la formación de suberina (Ryals *et al.* 1996). La activación de estos mecanismos pueden variar dependiendo el cultivar e inclusive la especie, donde el tiempo de activación pueden ser variables.

Los resultados de análisis de variancia de las lesiones de las áreas en los injertos (Cuadro 24) indican que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos

Cuadro N° 24 Cuadro de análisis de variancia de las áreas de infecciones por *L. theobromae* en los injertos en la metodología preventiva.

Fuentes de variación	Grados de libertad	sumas de cuadrados	Cuadrado medio	F. Value
Tratamientos	9	73.110	8.124	1749.38
Error	30	0.139	0.004	
Total	39	73.25		

C.V: 2.47%

La prueba de comparación de las medias de Tukey de las áreas de avance en los injertos de los tratamientos de la metodología preventiva se presentan en el Cuadro 25, indica que los mejores resultados se obtuvieron con los tratamientos T15 (Mananos oligosacáridos) y T16 (Acibenzolar- S- Metil), debido a la menor severidad en el área de avance de *L. theobromae* y que fueron estadísticamente iguales a lo obtenido en el Testigo sin inocular (T19), lo cual representa un 100% de control de la enfermedad para estos tratamientos (T16 y T15). El tratamiento T12 (Fosetil de aluminio), tuvo un promedio de área de avance de infección de 1.06 cm², pero fue estadísticamente diferente a los tratamientos anteriormente mencionados y representó un 92.3 % de control con respecto al testigo inoculado (T20). Por lo que se considera que estos tratamientos (T15, T16 y T12) mostraron tener un buen efecto inductor de defensa contra *L. theobromae* para la metodología preventiva.

Los tratamientos T17 (*Trichoderma harzianum*), T11 (ácido fosforoso), T18 (*Bacillus subtilis*), T14 (sulfato de cobre pentahidratado) tuvieron un área de avance media de 2.80, 5.33, 7.75 y 9.25 cm² respectivamente, siendo todos estos tratamientos estadísticamente diferentes entre sí y entre los otros. Estos tratamientos tuvieron un efecto poco importante en el control del avance de la enfermedad, representando un porcentaje de control menor a 35 % en el mejor de los casos (T17).

Los tratamientos T13 (fosfito de potasio) y T20 (testigo inoculado) tuvieron un área de avance media de 11.42 y 11.81 cm² respectivamente, no existiendo diferencias estadísticas entre estos tratamientos lo que indica que el fosfito de potasio no tuvo ningún efecto de control.

Cuadro N° 25: Prueba de Tukey de los resultados obtenidos en el área de las infecciones por *L. theobromae* en el injerto en la metodología preventiva según los tratamientos utilizados para el control de la enfermedad.

Tratamientos	PREVENTIVO		
	MEDIA DEL AREA DE INFECCION REAL	MEDIA TRANSFORMADA DE AREA DE INFECCION	AGRUPAMIENTO
T20: Testigo inoculado	11.81 ^x	4.43 ^y	A^z
T13: Fosfito de potasio	11.42	4.37	A
T14: Sulfato de cobre pentahidratado	9.25	4.03	B
T18: <i>Bacillus subtilis</i>	7.75	3.78	C
T11: Ácido fosforoso	5.33	3.29	D
T17: <i>Trichoderma harzianum</i>	2.80	2.66	E
T12: Fosetil de aluminio	1.06	1.98	F
T15: Mananos oligosacáridos	0.00	1.00	G
T16: Acibenzolar-S-Methyl	0.00	1.00	G
T19: Testigo sin inocular	0.00	1.00	G
Coficiente de variabilidad	2.47 %		

^x valor real de tratamiento. ^y Datos convertidos a ($\sqrt{\%+1}$). ^z Números en columnas seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey.

Los resultados de análisis de variancia de las áreas de las lesiones en los patrones (Cuadro 26) indican que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos, habiéndose obtenido un coeficiente de variación de 7.6% lo que indica que los datos fueron confiables.

Cuadro N° 26. Cuadro de análisis de variancia de las áreas de infecciones por *L. theobromae* en los injertos en la metodología preventiva.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. Value
Tratamientos	9	69.65	7.738	298.51
Error	30	0.777	0.259	
Total	39	70.42		

CV: 5.7 %

La prueba de comparación de las medias de Tukey de las áreas de avance en los patrones de los tratamientos de la metodología preventiva se presentan en el Cuadro 27, indica que los mejores resultados se obtuvieron con los tratamientos T15 (Mananos oligosacáridos) y T16 (Acibenzolar-S-Metil) debido a la menor severidad en el área de avance de *L. theobromae* y fueron estadísticamente iguales a los obtenidos por el testigo sin inocular (T19). La severidad del área de avance de los tratamientos 15 y 16 fueron de 0.11 y 0.13 cm² en promedio respectivamente, no mostrando diferencias estadísticas entre si y representando un porcentaje de control con respecto al testigo sin inocular de 96.15 y 98.24 respectivamente. El tratamiento T12 (Fosetil de aluminio) tuvo un promedio de área de infección de 1.24 cm² pero fue estadísticamente diferente a los tratamientos anteriormente mencionados y representó un 90.2 % de control con respecto al testigo inoculado (T20). Por lo que estos tres tratamientos muestran tener efectos positivos en la inducción de defensa para infecciones por *L. theobromae*.

El tratamiento T17 (*Trichoderma harzianum*) tuvo un área de avance de infección de 3.66 cm² siendo estadísticamente diferente a los tratamientos anteriormente mencionados. Los tratamientos T18 (*Bacillus subtilis*), T11 (Ac. fosforoso), T14 (Sulfato de cobre pentahidratado) tuvieron un área de avance medio de 6.11, 6.25 y 8.32 cm² respectivamente, no existiendo diferencias estadísticas entre ellos.

Los tratamientos T13 (fosfito de potasio) y T20 (testigo sin inocular) tuvieron un área de avance medio de 12.50 y 12.76 cm² respectivamente, no existiendo diferencias estadísticas entre ellos indicando que no hubo control alguno de la infección.

Estos estudios corroboran con los obtenidos por Kedma (2012) quien reportó la eficiencia de estos elicitors en el control del mildiú (*Plasmopara vitícola*) en la vid. En el control de la enfermedad. Los tratamientos con mananos oligosacáridos y con acibenzolar, mencionados anteriormente, formaron una especie de callo o labio formando una barrera que evita el establecimiento a otras células circundantes de la planta.

Cuadro N° 27 Prueba de Tukey de los resultados obtenidos en el área de las infecciones por *L. theobromae* en el patrón en la metodología preventiva según los tratamiento utilizados para el control de la enfermedad.

Tratamientos	PREVENTIVO		
	MEDIA DEL	MEDIA	AGRUPAMIENTO
	AREA DE INFECCION REAL	TRANSFORMADA DE AREA DE INFECCION	
T10': Testigo inoculado	12.76 ^x	4.57 ^y	A ^z
T3': Fosfito de potasio	12.50	4.53	A
T4': Sulfato de cobre pentahidratado	8.32	3.80	B
T1': Ácido fosforoso	6.25	3.49	B
T8': <i>Bacillus subtilis</i>	6.11	3.46	B
T7': <i>Trichoderma harzianum</i>	3.66	2.91	C
T2': Fosetil de aluminio	1.24	2.11	D
T6': Acibenzolar-S-Methyl	0.13	1.15	E
T5': Manano oligosacáridos	0.11	1.09	E
T9': Testigo sin inocular	0.00	1.00	E
Coefficiente de variabilidad	5.07 %		

^x valor real de cada tratamiento. ^y Datos convertidos a ($\sqrt{\%+1}$). ^z Números en columnas seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey.

Todos los patrones de los tratamientos mostraron tener distancias (mm) y áreas (cm²) de avance diferentes, En esta metodología mostraron áreas necrosadas algo atenuadas en

relación a la metodología curativa, según, cuando se producen la inducción de defensa sistémica en las plantas, están son trastocadas hacia todas las partes de la planta, tomando un tiempo en que se producen estas defensas distales y entendiéndose que se trata de una planta injertada, los señalizadores son parcialmente obstruidos por la gran cicatriz formada en el injerto, dando respuestas a patrones con mayores áreas de lesiones.

d) Reaislamiento de *L. theobromae*

Después de las evaluaciones las muestras fueron llevadas al laboratorio para el reaislamiento correspondiente, los resultados se muestran en el cuadro 28.

Cuadro N° 28 Porcentaje de plantas con reaislamiento de *L. theobromae*.

TRAT.	DESCRIPCIÓN	INJERTO	%	PATRÓN	%
11	Acido fosforoso	+	100	+	100
12	Fosetil de Aluminio	+	100	+	100
13	Fosfito de potasio	+	100	+	100
14	Sulfato de cobre pentahidratado	+	100	+	100
15	Manano oligosacáridos	-	0	-	0
16	Acibenzolar S-methyl	-	0	+	17
17	<i>Trichoderma harzianum</i>	+	100	+	100
18	<i>Bacillus subtilis</i>	+	100	+	100
19	Testigo sin inocular	-	0	-	0
20	Testigo inoculado	+	100	+	100

+ positivo para reaislamiento de *L. theobromae* - Negativo para reaislamiento de *L. theobromae*

En los tratamientos T11 (ácido fosforoso), T12 (Fosetil de aluminio), T13 (Fosfito de potasio), T14 (Sulfato de cobre pentahidratado) se pudo reaislar *L. theobromae* tanto de los injertos como de los patrones representado con un 100 % de plantas infectadas, para estos tratamientos.

El tratamiento T15 (Manano oligosacáridos), de los injertos ni en los patrones se reaisló *L. theobromae*, el T16 (Acibenzolar-S-methyl) se reaisló *L. theobromae* solo en una planta en la zona patrón mas no en el injerto.

Los tratamientos con T17 (*T. harzianum*), T18 (*B. subtilis*) y T20 (testigo inoculado) tuvieron un 100% de reislamiento del hongo tanto de los patrones como de los injertos. En el testigo sin inocular no se reisló *L. theobromae* en ninguno de las muestras escogidas.

V. CONCLUSIONES

En las pruebas in vitro se estableció que el producto químico más eficaz fue ácido fosforoso, inhibiendo en su totalidad el crecimiento de *L. theobromae*; por otra parte, dentro los productos biológicos el más eficaz fue *Bacillus subtilis*.

Se determinó que los productos de origen químico: acibenzolar-S-metil, mananos oligosacáridos y fosetil de aluminio, inducen la defensa ante *L. theobromae* en plantas de vid, siendo los dos primero los más eficaces, tanto en la estrategia de prevención como en la estrategia de control de la muerte regresiva.

Los productos como ácido fosforoso, fosfito de potasio y sulfato de cobre pentahidratado tuvieron una eficacia limitada.

Por otra parte, los productos de origen biológicos no fueron eficaces en la inducción a la de defensa de las plantas de vid ante el ataque de *L. theobromae*, en ningunas de las dos estrategias.

VI. RECOMENDACIONES

1. Utilizar los productos químicos en base a su dosis comercial para la prueba de laboratorio.
2. Utilizar dosis más altas en aquellos productos donde no mostraron un efecto inductor.
3. Utilizar dosis más bajas en aquellos productos donde mostraron un efecto inductor.
4. Llevar el uso de estos productos a nivel de campo comercial de vid en plantaciones con mayor edad.
5. Realizar ensayos de efectividad de estos productos tanto los de naturaleza química como las biológicas en otras enfermedades de madera en el cultivo de la vid.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Al-Saadoon, A. H., Ameen, M. K., Hameed, M. A., Al-Badran, A. I. 2012. Histopathology of grapevine inoculated with *Lasiodiplodia theobromae*. Basrah J. Agric. Sci. 2012, 25(1): 1-12.

Alama, I., Maldonado, E., & Rodríguez Gálvez, E. (2006). *Lasiodiplodia theobromae* afectando el Cultivo de Palto (*Persea americana*) en las condiciones de Piura-Perú. *Universalia*, 11(2). 4–13.

Almeida, G., Klibansky, M., Altuna, B., Eng, F., Legra, S. and Armenteros, M. 2000. Some considerations about the using of carbon sources in the production of jasmonic acid. *Journal Iberoamérica Micology*. 16: 166-169.

Araujo, L., Borsato, L. C., Valdebenito-Sanhueza, R. M., and Stadnik, M. J. 2008. Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. *Trop. Plant Pathol*. 33: 74-80.

Barber, M. and Mitchell, H. 1997. Regulation of phenylpropanoid metabolism in relation to lignin biosynthesis in plants. *International Review Of Cytology - A Survey Of Cell Biology* 172: 243-293

Barnett, H. and Hunter, B. 1996. *Illustrated general of imperfect fungi*. The American Phytopathological Society. U.S.A. 218 p.

Baysal, Ö., Soylu, E. and Soylu, S. 2003. Induction of defense-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedling against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Plant Pathol*. 52(6): 747-753.

Benhamou, N., Mazau, D. and Esquerré -Tugayé, M. T. 1990. Immunocytochemical localization of hydroxyproline-rich glycoproteins in tomato root – cells infected by

Fusarium oxysporum f. sp. *radicis-lycopersici* - study of a compatible interaction. *Phytopathology* 80: 163-173.

Benhamou, N., and Bélanger, R. 1998. Induction of systemic resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *The Plant J.* 14: 13-21

Benhamou, N., and Nicole M. 1999. Cell biology of plant immunization against microbial infection: The potential of induced in controlling plant disease. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 703-719.

Bliffeld, M., Mundy, J., Potrykus, I., Futterer, J. 1999. Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1079-1086.

Bokshi, I., Morris, S. and Deverall, B. 2003. Efecto benzothiadiazole and acetylsalicylic acid on β -1.3-glucanase activity and disease resistance in potato. *Plant Pathol.* 52: 22-27.

Bostock, R. 2005. Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. *Annual Review of Phytopathology* 43: 545-580.

Brisset, M. N., Cesbron, S., Thomson, S. V., and Paulin, J. P. 2000. Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *Eur. J. Plant Pathol.* 106: 529-536.

Cameron, R. K., Dioxo R. A., and Lamb C. J. 1994. Biologically induced systemic acquired Resistance in *arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 5: 715-725.

Cedeño, L., Carrero, C., Mohali, S., Palacios, E. y Quintero, K. 1995. Muerte regresiva en Parchita causada por *Lasiodiplodia theobromae* en Venezuela. *Revista Venezolana de Fitopatología* 8 (1): 11-14.

Collinge, D., Gregersen, P., Thordal - Christensen, H. 1994. The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. In *Mechanisms of plant growth and*

improved productivity, Modern approaches. Basra, AS. Ed. New York, Marcel Dekker. p. 391-433.

Croquist, A. and Takhtajan, A. 1980. Classification of flowering plants. New York: Culumbia Univ. 1980. p. 225 - 359

Cuypers, B., Schmelzer, E. and Hahlbrock, K. 1988. In situ localization of rapidly accumulated phynylalanine ammonia-lyase mRNA around penetration sites of *Phytophthora infestans* in potato leaves. Molecular Plant Microbe Interactions 1: 157-160.

Cushnie, T. and Lamb, A. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. Int. J. Antimicrob. Agents 26: 343-356.

Daniel, R. and Guest, D. 2006. Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 67: 194-201.

Darvill, A. and Albersheim, P. 1984. Phytoalexins and their elicitors - A defence against microbial infection in plants. Annual Review of Plant Physiology 35: 243-275.

Dildey, D., Sellars, K., Burrill, M., Tree, J., Newman, K. y Jacques, K. 1997. Effect of mannan oligosaccharide supplementation on performance and health of Holstein calves. Journal of Dairy Science 80 (Suppl. 1): 188.

Durrant, W. and Dong, X. 2004. Systemic acquired resistance. Ann. Rev. Phytopatology, 42(1). p. 185-209

Eshraghi, L., Anderson, J., Aryamaneshd, N., Shearer, B., McComba, J., Hardya, G. E. St. J., and O'Brien, P. A. 2011. Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. Plant Pathol. 60: 1086-1095.

Fernandez, M. 1978. Introducción a la Fisiopatología, Hongos Tercera Edición. Colección científica del Intu. Buenos Aires, Argentina. V. III, 125p.

Fenn, M. and Coffey, M. 1989. Quantification of phosphonate and ethyl phosphonate in tobacco and tomato tissues and significance for the mode of action of two phosphonate fungicides. *Phytopathology* 79: 76- 82.

Freeman, B. and Beattie, G. 2008. An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *The Plant Health Instructor*. doi:10.1094/PHI-I-2008-0226-01.

Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann H. and Ryals, J. 1994. Requirement of salicylic of the induction of systemic acquired Resistance. *Science* 261: 754-756.

Gilchrist, D. 1998. Programmed cell death in plant disease: The purpose and promise of cellular suicide. *Annual Review of Phytopathology* 36: 393-414.

Guest, D, I. 1986. Evidence from light microscopy of living tissue that fosetyl-al modifies the defense response in tobacco seedlings following inoculations by *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 29: 251-261.

Guest, D. & Grant, B. 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biology Review*, 66, 159-187.

Hammond-Kosack, K. and Jones, J. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* 8: 1773- 1791.

Hammerschmidt, R. 1999. Phytoalexins: What have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology* 37:285-306.

Heath, M. C. 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44:321–334.

Hidalgo, J. 2002. *Tratado de Viticultura General*. Tercera Edición. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 1213 p.

Holiday, P. 1995. *Fungus Diseases of tropical Crops*. Cambridge University Press. p. 42-44.

Huamán, R. A. 2015. Etiología y control de la pudrición del tallo de la vid, en la localidad de Chincha. Tesis Ing. Agr. Lima, Perú. 90 p.

Hutcheson, S. 1998. Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology* 36: 59-90.

Kedma, M., Pinto, S. & Cordeiro do Nascimento L. 2012. Efficiency of resistance elicitors in the management of grapevine downy mildew *Plasmopara viticola*: epidemiological, biochemical and economic aspect. Brazil. *Eur J Plant Pathol* 134: 745-754.

Kilian, M., Steiner, B., Krebs, H., Junge, G., Schmiedeknecht, R. 2001. FZB24. *Bacillus subtilis* – mode of action a microbial agent enhancing plant vitality. p 72-93. Consultado el 16/01/2006. Ministerio de Agricultura, 2013. Boletín Informativo “Cultivos de exportación en el Perú

Kloepper, J. and Schroth, M. 1980. Plant Growth- Promoting Rhizobacteria and plant growth under Gnotobiotic conditions. *Phytopathology* 71: 642-644.

Knoester, M., Pieterse, C., Bol, J. and Van Loon, L. 1999. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12:720-727.

Leavitt, G. and Munnecke, D. 1987. The occurrence, distribution, and control of *Botryodiplodia theobromae* on grapes (*Vitis vinifera*) in California. (Abstr.) *Phytopathology* 77:1690.

Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and Lamb, C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583-593.

Macías, H. 1993. Manual práctico de viticultura. Primera edición. Editorial Trillas. México. p. 153.

Michelena, G., Carrera, E., Bell, A., Altuna, B. y Almeida, G. 2001. Proceso de separación y decoloración del ácido jasmónico a partir de *Botryodiplodia theobromae* cepa 715.

División de biotecnología, instituto cubano de derivados de la caña (ICIDCA). IMIQ. 16: 12-19.

Mont, R. 1993. Principios del control de enfermedades de las plantas. Edit. Talleres del Centro Pre-universitario. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú p. 287.

Mont, R. 2004. El control biológico como componente del manejo integrado de enfermedades de las plantas. Lima, Perú. 145 p.

Mugnai, L., Graniti, A. & Surico, G. 1999. Esca (black measles) and Brown Word-streaking: two old and elusive disease of grapevines. *Plant Diseases* 83(5): 404-416.

Murphy, J., Zehnder, G., Schuster, D, Sikora, E., Polston J. and Kloepper. J. 2000. Plant growth-promoting rhizobacteria mediated protection in tomato against *tomato mottle virus*. *Plant Diseases*. 84: 779-784.

Navia, O., Trujillo, G., Gandarillas, A. and Fernández-Northcote, E. 2000. Utilización de un activador de resistencia en estrategias de control químico del tizón tardío de la papa (*Phytophthora infestans*) en cultivar susceptible y resistente. p. 505-517.

Nicholson, R. and Hammerschmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30:369-389.

Nishizawa, Y., Nishio, Z., Nakazono, K., Soma, M., Nakajima, E., Ugaki, M., Hibi, T. 1999. Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic Japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. *Theoretical and Applied Genetics* 99:383-390

Oliveira, H., Rego, M. and Nascimento, T. 2004. Decline of Young grapevines caused by fungi. *Acta Horticulturae* 652: 295-304

Orozco-Cárdenas, M. L., Narváez-Vásquez, J. and Ryan, C. A. 2001. Hydrogen Peroxide Acts as a Second Messenger for the Induction of Defense Genes in Tomato Plants in Response to Wounding, Systemin, and Methyl Jasmonate. *The Plant Cell* 13:179-191.

- Osbourn, A. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The Plant Cell* 8: 1821-1831
- Paxton, J. D. 1981. Phytoalexins: a working redefinition. *Phytopathology* Z.101:106-109.
- Pearson, R. 2011. *Plagas y enfermedades de la vid*. Ediciones Mundi prensa. Madrid. 11 p.
- Phillips, A. J. L., Crous, P. W. and Alves, A. 2007. *Diplodia seriata*. The anamorph of *Botryosphaeria obtusa*. *Fungal Div.* 25: 141-155.
- Piesterse, C., Van Wees S., Hoffland E., Van Pelt J. A. and Van Loon L. C. 1996. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* 8: 1225-1237.
- Poscoe, I. & Cottral, E. 2000. Development in grapevine trunk diseases research in Australia. *Phytopathologia Mediterránea* 39: 68-75.
- Punithalingan, E. 1976. *Botryodiplodia theobromae*. Description of Pathogenic Fungi and Bacteria 519. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Punithalingan, E. 1980 Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae*. In *Biblioteca Mycologica* J. Cramer. Berlin
- Química Suiza S.A. 2001. Kalex Información Técnica Departamento Técnico de Agro Veterinaria 4 p.
- Raff, M. 1998. Cell suicide for beginners. *Nature* 396: 119-122.
- Renault, A., Deloire A., and Bierne J. 1996 Pathogenesis-related proteins in grapevines induced by salicylic acid and *Botrytis cinerea*. *Francia Vitis* 35(1), 49-52.
- Reynier, A. 1989. *Manual de Viticultura*. Sexta Edición. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. p. 382.

Reynier, A. 2002. Manual de Viticultura. Sexta Edición. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 18 p.

Rodríguez-Gálvez, E., Maldonado, D. E., & Díaz, M. A. 1999. Incidencia de la muerte apical descendente del mango causada por *Lasiodiplodia theobromae* en Piura, Perú. *Fitopatología*, 34(2), 90–95.

Rodríguez-Gálvez, E., Maldonado, E., Alves, A. 2015. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* causing dieback of table grapes in Perú. *Eur J plant pathol.* 141: 447-489.

Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y. and Hunt, M. D. 1996. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8:1009-1819.

SAS Institute. 2004. SAS/STAT. User's Guide. Version 9. Vol. 1-5. SAS Publishing. Cary. N.C. USA.

Schwinn, F. J. and Margot, P. 1991. Control with Chemicals In advances in plant Pathology Vol. 7. London. p. 225- 265.

Skalamera, D., Jibodh, S., Heath, M. C. 1997. Callose deposition during the interaction between cowpea (*Vigna unguiculata*) and the monokaryotic stage of the cowpea rust fungus (*Uromyces vignae*). *New Phytologist* 136: 511-524.

Sticher, L., B, Mauch-Mani and J. P, Metraux. 1997. Systemic adquired resistance Annual Review of Phytopathology. 35: 235-270.

Stadnik, M. J. and Buchenauer, H. 2000. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57: 25-34.

Sutton, B. 1980. The Coelomycetes. Commonwealth Mycological Institute, kew, Surrey, England 696 p.

Surico, G. 2000. The grapevine and wine production through the ages. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 3-10.

Sticher, L., B. Mauch-Mani, and J. Mettraux. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 35: 235-270.

Taylor, A., Hardy, G., Wood, P. and Burgess, T. 2005. Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. *Aust Plant Pathol*. 34:187-195.

Urbez-Torres J. R., Leavitt G. M., Guerrero, J. C., Guevara, J. and Gubler W. D. 2008. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the agents causal of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant diseases*, 92: 519-529

Van Loon L. C., Bakker P. A. and Pietrese C. M. J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev. Phytopathol* 36: 453-483.

Van Loon, L. C. and Van Kammen, R. T. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var "Samsun NN". Changes in proteins constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40:199-211.

Van Loon, L. C. and Van Strien, E. A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85-97

Van Niekerk, J. M., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Fourie, P. H., and Halleen, F. 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96: 781-798.

Wood, P. and Wood, C. E. 2005. Cane dieback of Dawn seedless table grapevines (*Vitis vinifera*) in western Australia caused by *Botryosphaeria rhodina*. *Aust plant pathol*, 34:393-395.

Yediria, I., Benhamou, N. and Chet, I. 1999. Induction of defense Responses in Cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1061- 1070.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Rango de tamaño de las conidias de *L. theobromae* en micras (μm).

Tamaño de las conidias		
	Ancho	Largo
R1	22 μm	13 μm
R2	23 μm	11 μm
R3	22 μm	13 μm
R4	20 μm	13 μm
R5	18 μm	12 μm
R6	22 μm	13 μm
R7	23 μm	10 μm
R8	18 μm	12 μm
R9	22 μm	13 μm
R10	23 μm	13 μm
R11	20 μm	13 μm
R12	22 μm	13 μm
R13	23 μm	12 μm
R14	23 μm	12 μm
R15	22 μm	13 μm
R16	20 μm	13 μm
R17	20 μm	12 μm
R18	23 μm	12 μm
R19	17 μm	13 μm
R20	22 μm	12 μm

Anexo 2. Datos obtenidos de la evaluaciones del crecimiento radial de *L. theobromae* en la prueba de medio envenenado con los productos químicos.

		1DDS				2DDS				3DDS			
		A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
Ac. Fosforoso	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fosetil de aluminio	R1	2.5	1.5	3.3	4	6.5	5.5	7	8	11.5	10.5	12	13
	R2	4	3	2.5	4	8.5	7	6.5	8	13	12	11.5	13
	R3	3.5	2.5	2.5	4	7.5	6.5	6.5	8.5	12.5	11.5	11.5	13
	R4	2	2.5	2	2	6	6	5.5	5	10	11	10.5	11
	R5	4	3	2.5	3.5	7.5	7	6.5	7.5	14	12	11.5	12.5
Fosfito de potasio	R1	12	13	11	12	28	29	27	28	44	45	43	42
	R2	12	11.5	11	13	28	27.5	26	28	44	43.5	43	42
	R3	12	11	12	12	28	27	28	29	44	43	44	45
	R4	12	11	11	10	27	27	27	26	44	43	43	42
	R5	12	12	10	11	27	28	26	27	45	44	43	43
Sulfato de cobre pentahidratado	R1	6	7	8	3	13	16	16	10	22	25	25	19
	R2	5	10	7	8.5	12	19	16	17.5	22	28	25	26.5
	R3	10	8	7	8	19	17	16	17	28	26	25	26
	R4	9	8	8	8	18	17	19	18	27	26	26	26
	R5	10	9	8	10	17	18	16	19	25	27	25	28
Mananos oligosacáridos	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	2	3.5
	R2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	3	3
	R3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	2	0
	R4	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	3
	R5	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	2	3
Mananos-S-oligosacáridos	R1	5	6	8	7	15	16	18	17	25	26	28	27
	R2	4	6	8	7	13	16	18	17	23	26	28	27
	R3	9	10	10	8	19	20	19	18	28	30	30	28
	R4	6	10	5	4	16	21	15	14	26	30	24	24
	R5	7	7	9	6	17	18	19	15	27	27	29	25
Testigo	R1	11.5	13	12	14	26.5	28	27	29	42.5	44	43	45
	R2	14	12	12	12	29	27	27	27	45	43	43	43
	R3	14	11	12	12	29	26	27	27	45	42	43	43
	R4	14	12	12	13	29	27	27	28	45	43	43	45
	R5	14	12	11	14	29	27	26	29	45	43	42	45

Anexo 3. Datos obtenidos de las evaluaciones de la prueba de medio envenenado con los productos biológicos

		1DDS				2DDS				3DDS			
		A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
<i>L. theobromae</i> vs <i>T. harzianum</i>	R1	8	7.5	8	8.5	*	*	*	*	*	*	*	*
	R2	8	9	8	8	*	*	*	*	*	*	*	*
	R3	8.3	9	8	9	*	*	*	*	*	*	*	*
	R4	9	8	9	9	*	*	*	*	*	*	*	*
	R5	9	8.2	9	8	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. theobromae</i> vs <i>B. subtilis</i>	R1	5	4.5	5	5	*	*	*	*	*	*	*	*
	R2	5	4	4.5	4	*	*	*	*	*	*	*	*
	R3	5	4	5	4	*	*	*	*	*	*	*	*
	R4	5	4	5.5	5	*	*	*	*	*	*	*	*
	R5	4.8	5	5.5	5	*	*	*	*	*	*	*	*
Testigo	R1	12	12	12	14	27	29	27	29	41.5	42	42	43.5
	R2	15	12	13	13	29	27	26	27	43	41	40	40
	R3	16	11	13	14	28	26	26	27	45	43	40	42
	R4	15	12	12	13	27	27	27	28	42	43	43	45
	R5	13	12	12	15	30	27	27	29	43	39	41	40

Anexo 4. Datos obtenidos de las evaluaciones en la prueba de enfrentamiento con los productos biológicos.

TRAT	REP.	VS.	1 d.d.s	2 d.d.s	3 d.d.s	4 d.d.s	5 d.d.s
T1	I	<i>L. theobromae</i>	15	31	48	*	*
		<i>T. harzianum</i>	6	16	25	*	*
	II	<i>L. theobromae</i>	13	28	46	*	*
		<i>T. harzianum</i>	7	16	28	*	*
	III	<i>L. theobromae</i>	13	29	47.5	*	*
		<i>T. harzianum</i>	6	14	23	*	*
	IV	<i>L. theobromae</i>	16	32	49	*	*
		<i>T. harzianum</i>	5	14	24	*	*
	V	<i>L. theobromae</i>	17	34	52	*	*
		<i>T. harzianum</i>	6	12	22.5	*	*
T2	I	<i>L. theobromae</i>	15	29	44	*	*
		<i>B. subtilis</i>	8	21	30	*	*
	II	<i>L. theobromae</i>	14	31	45.5	*	*
		<i>B. subtilis</i>	9	18	29	*	*
	III	<i>L. theobromae</i>	15	30	43.5	*	*
		<i>B. subtilis</i>	7	17	31.5	*	*
	IV	<i>L. theobromae</i>	12	24	40	*	*
		<i>B. subtilis</i>	8	22	33	*	*
	V	<i>L. theobromae</i>	14	29	43	*	*
		<i>B. subtilis</i>	8	19	28.5	*	*
TESTIGO	I	<i>L. theobromae</i>	13	32	47	62	76
	II	<i>L. theobromae</i>	13	33	49	63	78
	III	<i>L. theobromae</i>	14	31	45	60	74
	IV	<i>L. theobromae</i>	12	33	50	66	73
	V	<i>L. theobromae</i>	15	31	46	60	74

d.d.s. días después de la siembra

* Se produjo el enfrentamiento

Anexo 5. Temperatura promedio de los meses Enero a Junio- estación metrológica FONAGRO- (Senamhi)- Chincha Baja- Chincha. Ica.

2016	T. Prom. (°C)	T. Max.(°C)	T. Min.(°C)	H.R. Prom. (%)	H.R. Max. (%)	H.R. Min. (%)
Enero	24.4	28.0	20.0	79	95	67
Febrero	26.0	29.9	21.8	76	96	63
Marzo	28.0	30.6	20.9	74	96	60
Abril	23.9	28.0	18.9	79	97	65
Mayo	21.0	25.5	16.0	83	98	68
Junio	19.0	21.4	17.0	85	93	77

Anexo 6. Datos obtenidos de la evaluación de las áreas de infección en milímetros (cm²) en el injerto de la metodología curativa.

TRAT./ REP	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12
T1	10	8	9	7.9	8.2	6.5	9.53	6.9	8.4	10	9	8.6
T2	3	5	3.5	2.9	3.1	2	3.5	2.8	2	1.8	3	2.7
T3	13	14.3	15.32	15.8	13.4	15.4	12.5	16.5	14.9	13.2	16.8	12.4
T4	13.5	14.9	14.5	11.5	12.16	10.2	13.7	11.8	10.5	10	12.8	11.6
T5	0	0	0	1.2	0	0	0	0	0	0	0	0
T6	0	0	0	0	0	0.43	0	0	0	0.58	0	0.3
T7	6.5	4.8	4.8	6.2	5.6	6	5.7	6	4.8	4.8	7.2	4.8
T8	10.8	10	7.5	11	10.8	10.5	12.8	10.9	10	10.7	14.7	9.5
T9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T10	14.5	17.8	16.5	15.2	15	15.8	14.6	16	14.6	14.3	14.5	14

Anexo 7. Datos obtenidos de la evaluación de las áreas de infección en milímetros (cm²) en el patrón de la metodología curativa.

TRAT./ REP	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12
T1	10.5	9	6.8	6	8.3	7.24	9.5	7.6	8.8	6.94	9.4	9
T2	4.2	3.54	4.4	2.58	4.8	2.8	4.84	2.4	2.4	3.15	3.3	2.1
T3	12.5	16.2	18.5	14.6	16.5	16.7	10.2	17.9	17.2	16.8	17.5	12.6
T4	13.5	14.9	12	10.8	12.5	9.5	13.5	11.8	13	13.5	12.5	10.3
T5	0	1.2	0	0.8	0	0	0	0.53	0	0	0	0.63
T6	0	1.2	0	0	1.33	0.21	0	0.54	0.6	0.65	0	0.6
T7	6.7	7.8	6.5	7.2	5.9	7.4	5.4	7.3	4.2	5.6	7.4	4
T8	10.9	9	8.2	13	11.9	6.8	11.1	11.2	9.4	8	11.2	9.8
T9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T10	16.7	16.3	18.7	13.8	16	14.1	12.4	15.82	16.6	16.8	16	15.86

Anexo 8. Datos obtenidos de la evaluación de las áreas de infección en milímetros (cm²) en el injerto de la metodología preventiva.

TRAT./ REP	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12
T1	6	6.5	6.2	5.8	5.5	6.8	7.2	5.8	6	6.5	6.5	6.24
T2	1.42	1.25	1.82	1.21	1.23	1.26	1.1	1.2	1.2	1.27	1	0.98
T3	13	13.5	12.2	11.4	13.2	14.2	14.5	12.9	11.7	12.5	11.5	9.5
T4	9.4	9.12	8.3	9.5	8.9	7.46	8.9	9.6	0.32	9.26	9.8	9.3
T5	0	0	0	0	0	1.4	0	0	0	0	0	0
T6	0	0	0	0	0.8	0	0	0	0.8	0	0	0
T7	3.9	3.2	4.32	3.5	3.74	4.12	2.9	3.65	4.2	3.4	3.12	3.98
T8	7.1	6.45	6.32	5.28	6.2	7.23	6.14	5.34	5	6.5	4.9	6.9
T9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T10	12.3	13.8	10.8	11.5	13.6	13.1	11.65	12.4	14.5	13.5	12.4	13.6

Anexo 9. Datos obtenidos de la evaluación de las áreas de infección en milímetros (cm²) en el patrón de la metodología preventiva.

TRAT./ REP	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12
T1	5.5	6	4	7.5	4	5	5	6.5	6	4	5.5	5
T2	0.84	1.3	1	1.5	1.5	0	1.5	0.8	1.4	1	0.85	1.1
T3	11.4	13.4	10.8	8.7	10.5	12.3	10.4	12.8	12.3	13.1	10.4	11
T4	9.8	8.8	8	10.2	9.75	9	8.5	9	9.38	10.6	8.7	9
T5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T7	2.2	2.9	3.6	3.4	2.5	3.2	2.3	3.2	1.9	2.6	3	2.8
T8	7.8	7.35	8.6	7.5	7.2	7.64	8	7.8	7.7	8.7	6.9	7.83
T9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T10	12.8	12	9.5	10.8	12.54	12.9	10.4	11	13.2	12.7	11.5	12.4