

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y la Escuela de Posgraduados del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGÍSTER SCIENTIAE

FIRMANTES:

Vera Sánchez, Ph. D.
Consejero Principal

Francisco Jiménez, Ph. D.
Miembro del Comité Asesor

Reinhold Muschler, Ph. D.
Miembro del Comité Asesor

Eduardo Hidalgo, M. Sc.
Miembro del Comité Asesor

Glenn Galloway, Ph. D.
Director y Decano de la escuela de Posgraduados

William Salas Brenes
Candidato

DEDICATORIA

A mi madre que está en el cielo

A mi esposa Gisella y a mis hijas

Adriana
Gabriela

A mi hermana Daysi por apoyarme siempre

AGRADECIMIENTOS

Quiero dejar constancia de mi agradecimiento:

A la Dra. Vera Sánchez por guiar el desarrollo de esta investigación, pero principalmente por sus consejos y amistad.

A los miembros del comité de tesis: Dr. Francisco Jiménez, Dr. Reinhold Muschler y M. Sc. Eduardo Hidalgo por sus aportes a este trabajo.

A los señores Guillermo Campos y Gerardo Arias por permitirme realizar parte de la investigación en sus fincas.

Al personal del Laboratorio de Fitopatología: Manrique, Carmen y Aldo por su apoyo y colaboración.

A CONICIT por su apoyo económico para desarrollar parte de la investigación.

A mis compañeros de maestría, especialmente a mi amigo Guillermo, a Isis, Jorge, y María del Pilar.

A Gustavo López por el apoyo en el análisis de estadístico.

Al personal de la biblioteca conmemorativa ORTON.

A todas aquellas personas que de diferentes formas apoyaron la realización de este trabajo.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	iv
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ANEXOS.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Justificación e importancia	1
1.2 Objetivos	3
General	3
Específicos.....	3
1.3 Hipótesis de investigación.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Enfermedades más importantes en invernadero	4
2.1.1 <i>Botrytis cinerea</i>	4
2.1.2 <i>Phytophthora infestans</i>	5
2.3 Opciones no químicas para el manejo de enfermedades	6
2.3.1 Manejo de condiciones meteorológicas	6
2.3.2 Prácticas agrícolas.....	7
2.3.3. Control biológico	8
2.4 Metodologías desarrolladas para aislamiento y evaluación de hongos antagonistas	13
2.4.1 Aislamiento y tamizado de antagonistas	13
2.4.2. Uso de bioensayos	13
2.4.3 Pruebas de campo.....	14
3. METODOLOGÍA	15
3.1 Localización de las diferentes etapas del estudio	15
3.2 Aislamiento y multiplicación del patógeno	15
3.3 Recolección y aislamiento de microorganismos con potencial hiperparásito.....	16
3.4 Selección de antagonistas en placas precolonizadas	16
3.5 Bioensayos con hojas desprendidas	17

3.5.1	Diseño experimental	17
3.6	Evaluación de antagonistas en invernadero experimental	18
3.6.1	Diseño experimental	19
3.6.2	Análisis de los datos	19
3.7	Evaluación de antagonistas en invernadero comercial (San Antonio).....	20
3.8	Caracterización y documentación de la experiencia de manejo de enfermedades de tomate en una finca de producción orgánica.....	20
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1	Aislamiento del patógeno	21
4.2	Recolección y aislamiento de microorganismos con potencial antagonista	21
4.3	Bioensayos en placas precolonizadas por el patógeno	23
4.4	Bioensayos en hojas desprendidas	24
Antagonista	27	
4.5	Bioensayo en invernadero experimental (CATIE)	27
4.6	Bioensayo en invernadero comercial (San Antonio)	29
4.7	Análisis del efecto de factores climáticos sobre el desarrollo de la enfermedad.....	35
4.8	Caracterización del manejo de enfermedades en una finca orgánica	39
4.8.1	Aplicación de antagonistas	40
4.8.2	Evaluación de variedades resistentes	40
4.8.3	Uso de mezclas.....	41
4.8.4	Recuperación de suelo y fertilización	42
4.8.5	Labores culturales	42
4.8.5.1	Poda deshija y formación de plantas	42
4.8.5.2	Amarre	43
4.8.5.3	Alomillado	43
4.8.5.4	Rotación de cultivos.....	43
4.8.5.5	Manejo del riego.....	44
4.8.5.6	Cultivo bajo techo plástico.....	44
4.8.5.7	Secado de hojas	45
4.8.6	Principales observaciones realizadas	45
5.	CONCLUSIONES	47
6.	RECOMENDACIONES.....	48
7.	LITERATURA CITADA.....	49
8.	ANEXOS	56

Salas, W. 2003. Evaluación de control biológico y otras opciones de manejo de enfermedades de chile y tomate cultivados bajo techo, con énfasis en *Botrytis cinerea*.

Palabras claves: *Botrytis cinerea*, moho gris, control biológico, *Phytophthora infestans*, tizón tardío, manejo de enfermedades, producción orgánica.

RESUMEN

El chile dulce (*Capsicum annum*) y el tomate (*Lycopersicon esculentum*) son los productos hortícolas que más se cultivan en invernaderos en Costa Rica. Debido principalmente al riesgo de contaminación que representa el uso de fungicidas para el control de enfermedades, se consideró la necesidad de buscar opciones de manejo para sustituir estos productos tóxicos.

Se aislaron hongos con potencial antagonista sobre *B. cinerea*; uno de los patógenos más importantes de éstos y otros cultivos en invernadero. Estos hongos fueron evaluados en el laboratorio en cámaras húmedas, usando hojas desprendidas. Los mejores antagonistas se evaluaron tanto en invernadero experimental, como en invernadero comercial.

Plantas de chile de la variedad Trópico Irazú de ocho semanas de edad fueron inoculadas primero con una suspensión de esporas de los antagonistas (concentración 1×10^6 conidios por ml). A las 48 horas se realizó la inoculación con una suspensión de esporas del patógeno a la misma concentración. Se contó el número de flores infectadas por el patógeno cada semana, durante un periodo de cinco semanas. Al mismo tiempo que se tomaron datos de temperatura y humedad relativa dentro del invernadero, los datos meteorológicos se tomaron solamente en el invernadero experimental del CATIE.

Los antagonistas 0411 y 1411 (ambos del género *Trichoderma*) mostraron el mejor efecto y consistencia en su control sobre el patógeno, por eso se les consideró con potencial en el control biológico de *B. cinerea*. Además se encontró correlación entre la humedad relativa máxima y la humedad relativa mínima con la cantidad de flores infectadas por el patógeno. Esto revela la importancia del manejo del agua dentro del invernadero, como medida para el manejo de enfermedades.

Se caracterizó y documentó el manejo de enfermedades de tomate en una finca de producción orgánica. Se realizaron tres siembras del híbrido Montaña Fresca, presentándose como principales enfermedades tizón temprano (*Alternaria solani*) y tizón tardío (*Phytophthora infestans*), ésta última la más difícil de manejar; con niveles de infección hasta de 100%. Se evaluaron varias opciones de manejo, pero los mejores resultados se obtuvieron con la utilización de extractos de plantas y otros minerales como azufre, ceniza y cobre. Además de otras prácticas de cultivo que ayudan en el manejo de la enfermedad como poda, secado de las plantas mediante aplicación de aire, cultivo bajo techo plástico y manejo del riego.

Salas, W. 2003. Evaluation of biological control and others options of management of pepper and tomato diseases under greenhouse conditions, mainly *Botrytis cinerea*.

Key words: *Botrytis cinerea*, grey mould, biological control, *Phytophthora infestans*, late blight, diseases management, organic production.

SUMMARY

Sweet pepper (*Capsicum annum*) and tomato (*Lycopersicum esculentum*) are the most important vegetable products in Costa Rica. Because of the risk of contamination that using fungicides represents for the control of diseases, it was necessary to look for new options to substitute these toxic products.

Fungi with antagonist potential were isolated over *B. cinerea* which is one of the most important pathogen in these and other greenhouse plants. These fungi were evaluated in humid chambers by using detached leaves. The best ones were evaluated in an experimental greenhouse and in a commercial greenhouse.

Eigth weeks old sweet pepper plants from the variety Irazu Tropic were first inoculated with suspension of espores from the antagonists (concentration 1×10^6 conidia per ml), 48 hours later the plants was also inoculated with a suspension of espores of the pathogen using the same concentration. For a five week period, all the flowers infected with the pathogen were counted; at the same time data about temperature and relative humidity were taken inside the experimental greenhouse at CATIE.

The 0411 and 1411 antagonists (both from the genero *Trichoderma*) show the best results and consistency in their control of the pathogen that is why they were considered to have a great potential in the biological control of the *B. cinerea*.

Besides there was a correlation between the maximum relative humidity and the minimum relative humidity with regard to the amount of infected flowers by the pathogen. This reveals the importance of the management of the water inside the greenhouse as a way to control these and other diseases.

The management of tomato diseases was characterized and documented in an organic production farm. Three sowings of the hybrid Montaña Fresca were carried out. The main diseases presented in these cases were early blight (*Alternaria solani*) and late blight (*Phytophthora infestans*), the latter was the most difficult to control as it presented infection levels that reached 100%. Several control alternatives were evaluated, but the best results were obtained when using extracts from plants and other minerals such as sulfur, ashes and copper. Crop practices also proved to obtain good results such as cutting part of plants, foliar drying with air, cultivation under a plastic and management the irrigation.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Principales antagonistas de <i>B. cinerea</i> obtenidos en el bioensayo de placas precolonizadas.....	23
Cuadro 2. Mejores antagonistas de <i>B. cinerea</i> obtenidos en el bioensayo con hojas desprendidas	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Bioensayo de hojas desprendidas utilizando cuatro antagonistas de <i>B. cinerea</i>	24
Figura 2. Bioensayo de hojas desprendidas utilizando cuatro antagonistas de <i>B. cinerea</i>	25
Figura 3. Bioensayo de hojas desprendidas utilizando cuatro antagonistas de <i>B. cinerea</i> .	25
Figura 4. Bioensayo de hojas desprendidas utilizando cuatro antagonistas de <i>B. cinerea</i>	26
Figura 5. Número de flores enfermas (<i>B. cinerea</i>) por tratamiento en experimento realizado en el invernadero del CATIE.	28
Figura 6. Número de flores enfermas (<i>B. cinerea</i>) por semana en experimento realizado en el invernadero del CATIE (promedio de todos los tratamientos).	29
Figura 7. Número de flores enfermas (<i>B. cinerea</i>) por tratamiento en un experimento realizado en el invernadero en San Antonio.	30
Figura 8. Número de flores enfermas (<i>B. cinerea</i>) por semana en experimento realizado en el invernadero en San Antonio.	31
Figura 9. Número promedio de flores enfermas por <i>B. cinerea</i> en seis tratamientos experimentales realizados en invernadero del CATIE.	32
Figura 10. Número promedio de flores enfermas por <i>B. cinerea</i> en los tratamientos evaluados en el experimento realizado en invernadero de San Antonio.	33
Figura 11. Número de flores enfermas por <i>B. cinerea</i> (donde solo se usó el patógeno) y datos de humedad relativa máxima y mínima en el experimento realizado en el invernadero experimental (CATIE).	36
Figura 12. Relación entre la humedad relativa máxima de la misma semana y la cantidad de flores enfermas por <i>B. cinerea</i> en plantas de chile en invernadero experimental (CATIE).	36
Figura 13. Relación entre la humedad relativa mínima de la misma semana y la cantidad de flores enfermas por <i>B. cinerea</i> en plantas de chile en invernadero del CATIE.	37
Figura 14. Número de flores enfermas por <i>B. cinerea</i> (donde solo se usó el patógeno) y datos de temperatura máxima y mínima en el experimento realizado en el invernadero experimental (CATIE).	38
Figura 15. Relación entre la temperatura mínima de la misma semana y la cantidad de flores enfermas por <i>B. cinerea</i> en plantas de chile en invernadero experimental (CATIE).	39

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Lista de antagonistas de moho gris (<i>B. cinerea</i>), recolectados en el cantón de Turrialba	56
Anexo 2. ANDEVA del primer bioensayo en cámara húmeda utilizando hojas desprendidas	58
Anexo 3. ANDEVA del segundo bioensayo en cámara húmeda utilizando hojas desprendidas.....	59
Anexo 4. ANDEVA del tercer bioensayo en cámara húmeda utilizando hojas desprendidas.....	60
Anexo 5. ANDEVA del cuarto bioensayo en cámara húmeda utilizando hojas desprendidas.....	61
Anexo 6. ANDEVA del segundo bioensayo en cámara húmeda utilizando hojas desprendidas.....	62
Anexo 7. ANDEVA del ensayo con plantas de chile realizado en un invernadero comercial localizado en San Antonio	63
Anexo 8. Análisis de correlación entre humedad relativa y temperatura con incidencia de <i>B. cinerea</i> en cultivo de chile, en experimento realizado en el invernadero del CATIE	64
Anexo 9. Porcentaje de humedad relativa máxima registrada diariamente de 8a.m a 4p.m, durante las semanas de evaluación de la severidad de <i>B. cinerea</i> en cultivo de chile. Experimento realizado en el invernadero de CATIE *	65
Anexo 10. Porcentaje de humedad relativa mínima registrada diariamente de 8a.m a 4p.m, en cada una de las semanas de evaluación de la severidad de <i>B. cinerea</i> en cultivo de chile. Experimento realizado en el invernadero de CATIE *	66
Anexo 11. Temperatura máxima (°C) registrada diariamente de 8a.m a 4p.m, en cada una de las semanas de evaluación de la severidad de <i>B. cinerea</i> en cultivo de chile. Experimento realizado en el invernadero de CATIE *	67
Anexo 12. Temperatura mínima (°C) registrada diariamente de 8a.m a 4p.m, en cada una de las semanas de evaluación de la severidad de <i>B. cinerea</i> en cultivo de chile. Experimento realizado en el invernadero de CATIE *	68
Anexo 13. ANDEVA del experimento de variedades de tomate resistentes a <i>P. Infestans</i> , realizado en la finca de producción orgánica en San Juan Sur de Turrialba	69

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Justificación e importancia

El chile dulce (*Capsicum annum*) y el tomate (*Lycopersicum esculentum*) son considerados entre los productos hortícolas de mayor importancia en Costa Rica, tanto por la actividad económica asociada a su producción, como por su calidad nutritiva en vitaminas, minerales y carbohidratos, esenciales en la dieta del ser humano.

Según SEPSA (2002) en 1995 se plantaron 208 hectáreas de tomate que produjeron 8.319 toneladas, mientras que en 2001 se cosecharon 49.746 toneladas de 1413 hectáreas plantadas. Esto muestra no solamente un aumento en el área cultivada, sino también en la productividad. Además a pesar que los precios del chile dulce y tomate varían mucho en las diferentes épocas del año y no siguen un patrón, los promedios por año hacen que la actividad sea rentable. El precio promedio para el chile dulce en el periodo 1996- 2001 fue de \$0.20 la unidad y el costo de producción de \$0.14, mientras que para el tomate fue de \$0.65 el kg y el costo de producción fue de \$0.44 (Sandoval 2002).

En sistemas de producción a cielo abierto las condiciones meteorológicas no pueden manejarse, y cuando éstas son adversas para el cultivo, como ocurre en muchos lugares del trópico, la producción se hace difícil en ciertas épocas. El sistema de producción en invernadero permite aumentar la productividad mediante el control de la nutrición del cultivo, temperatura, luz y humedad principalmente (Salazar y Castro 1994; Pérez 1998).

Al igual que la mayoría de las hortalizas, el chile y tomates son afectados por varias plagas y enfermedades que conllevan a la utilización de gran cantidad de productos químicos para su combate. Entre las enfermedades más severas se encuentra el moho gris, que es producido por el hongo *Botrytis cinerea*, y es considerado de gran importancia en el cultivo de tomate y chile dentro de invernaderos en Costa Rica. Según Virgen *et al.* (1991), las enfermedades causadas por especies del género *Botrytis* son probablemente las más comunes, en hortalizas, frutales, plantas ornamentales y productos almacenados. Es frecuente observar a *B. cinerea* infectando flores, frutos y tallos de plantas de tomate

que se encuentran en invernadero, donde provoca serios daños al cultivo y consecuentemente pérdidas económicas a los productores (Eden *et al.* 1996).

El control de esta enfermedad se lleva a cabo fundamentalmente con productos químicos, principalmente del grupo de las carbixamidas (procimidona, vinclozolina e iprodiona). También se usan benzimidazoles (benomilo, carbendacina y metiltiofanato) y otros de amplio espectro como clorotalonil (Melgarejo *et al.* 2002). Sin embargo el uso continuo de estos productos ha provocado que la población del hongo sea cada vez más resistente (Melgarejo *et al.* 2002; Leroux *et al.* 1999; Elad *et al.* 1992). Además existe un gran riesgo de contaminación al usar estos productos en condiciones intensivas y ambientes cerrados, tanto para los trabajadores, así como por la presencia de residuos en aguas subterráneas y en las hortalizas que llegan al consumidor.

Por lo tanto, entre las opciones de manejo que se han considerado está el control biológico el cual, aunque puede ser de acción más lenta ofrece la posibilidad de ser más estable y duradero, y con menos daños al ambiente que el control químico (Borda y Arbeláez 1985). Entre los controladores de *B. cinerea* se mencionan hongos y bacterias, siendo el principal *Trichoderma harzianum*, además de otras especies de *Trichoderma* y *Cladosporium cladosporioides*, de los cuales varios aislamientos han resultado efectivos para el control del patógeno en cultivos dentro invernadero (Eden *et al.* 1996).

Debido a lo anterior y dada la importancia que están tomando los cultivos de tomate y chile en invernadero, se considera necesario realizar investigaciones que permitan encontrar controladores biológicos, así como estrategias eficientes y sostenibles para el manejo de enfermedades.

1.2 Objetivos

General

Evaluar antagonistas de *Botrytis cinerea* y otras opciones de manejo de enfermedades de chile y tomate cultivado bajo invernadero.

Específicos

- 1) Seleccionar antagonistas de *B. cinerea* obtenidos en diferentes localidades de la región de Turrialba.
- 2) Evaluar potenciales antagonistas de *B. cinerea* bajo condiciones de invernadero experimental y comercial.
- 3) Relacionar el desarrollo *B. cinerea* con las condiciones meteorológicas en un invernadero experimental.
- 4) Caracterizar y documentar la experiencia de manejo orgánico de enfermedades de tomate en una finca de producción orgánica (Guillermo Campos en San Juan Sur de Turrialba).

1.3 Hipótesis de investigación

- 1) Existe una relación entre las condiciones meteorológicas y la incidencia de enfermedades en cultivos de chile y tomate en invernadero.
- 2) Prácticas de cultivo adecuadas permiten reducir la incidencia de enfermedades de tomate orgánico bajo techo.
- 3) El desarrollo de *Botrytis cinerea* y *Phytophthora infestans* en cultivos de tomate y chile es afectado por organismos antagonistas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Enfermedades más importantes en invernadero

2.1.1 *Botrytis cinerea*

El género *Botrytis* pertenece a la clase Hyphomycetes, orden Moniliales y fue uno de los primeros géneros de hongos descritos. Su nombre así como los síntomas de la enfermedad que produce (moho gris) son conocidos desde hace muchos años. El nombre de la especie *Botrytis cinerea* se remonta a 1771 mencionado por von Haller en su libro *Synopsis Methodica Fungorum*, publicada en Zurich, Suiza. Luego en 1866 de Bary descubrió la relación genética entre *B. cinerea* y *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, su estado sexual (Rosslénbroich 2000).

Las enfermedades causadas por este hongo son probablemente las más comunes y ampliamente distribuidas en el mundo, afectando principalmente hortalizas, frutales, plantas ornamentales y muchos productos almacenados (Agrios 1988); puede afectar casi todas las plantas y todas las partes de la planta (Rosslénbroich 2000; Elad 2000).

El hongo produce un micelio septado, con conidióforos de color café claro, largos, delgados y ramificados. Los ápices de las ramas son hinchados y de ellas nacen esterigmas cortos que producen conidios de color hialino, ceniza o gris; con frecuencia produce esclerios de color café oscuro, forma irregular y diferentes tamaños (Elizalde y Romero 1994).

En el campo, la incidencia de la enfermedad causada por *B. cinerea* aumenta cuando hay prolongados periodos de humedad y bajas temperaturas entre 15 y 20 °C, sobre todo durante floración o la maduración de frutos de tomate (Latorre *et al.* 1997). Las esporas que germinan sobre la planta rara vez penetran directamente en los tejidos que muestran crecimiento activo, si no lo hacen a través de heridas, o después que se han desarrollado durante cierto tiempo y han formado micelio, sobre los pétalos de flores senescentes y follaje moribundo de las plantas (INFOAGRO 2003)

Botrytis es fácilmente aislado del suelo donde crece como saprófito; por lo tanto su crecimiento en material en descomposición es posiblemente la principal fuente de inóculo.

Luego la enfermedad se desarrolla en sucesivos ciclos secundarios que siguen el mismo patrón que el primario, de tal forma que los ciclos se traslapan y se confunden (Sherf y Mac Nab, 1986). El hongo sobrevive el invierno en el suelo como micelio creciendo en plantas muertas y formando esclerosios que permanecen latentes. Aunque no puede infectar semillas, puede ser diseminado con semilla contaminada con esclerosios del tamaño de semillas o con trozos de plantas infectadas con el hongo. EL hongo requiere temperaturas de 18 a 23 °C para mejor crecimiento, esporulación, liberación de esporas, germinación y establecimiento de infección (Agrios 1988).

2.1.2 *Phytophthora infestans*

Phytophthora infestans fue clasificado originalmente como un hongo perteneciente a la clase Oomycetes, orden Peronosporales, y la familia Pythiaceae, pero recientemente fue clasificado como un chromista (un tipo de alga) (University of Florida 2003). Es encontrado en casi todas las partes del mundo, pero es conocido por su efecto destructivo en plantaciones de papa en Norteamérica y en el Noroeste de Europa, donde el clima frío y la humedad favorecen el desarrollo de la enfermedad. Tizón tardío como se le conoce también es muy destructivo para tomate y varias otras plantas de la familia solanaceae (Agrios 1988).

En cultivos de papa el patógeno sobrevive en el tubérculo, luego cuando éste es usado como semilla el patógeno desarrolla un micelio que produce esporangióforos ramificados de crecimiento indeterminado, los cuales producen en los extremos, esporangios que tienen forma semejante a un fruto de limón. Los esporangios liberan zoosporas a temperaturas entre 12 y 15 °C, mientras que a más de 15 °C los esporangios pueden germinar directamente produciendo un tubo germinativo. Este patógeno requiere dos tipos compañeros para la reproducción sexual, y cuando los dos tipos están presentes y crecen juntos la hifa femenina crece hacia el anteridio y produce un oogonio que es fertilizado por éste, lo cual da origen a una oospora. Luego la oospora germina por medio de un tubo, el cual produce un esporangio, aunque algunas veces el tubo crece directamente desde el micelio (Agrios 1988). Estas oosporas son importantes en zonas templadas porque permiten al patógeno permanecer latente incluso por varios años y causar infección cuando el terreno es cultivado de nuevo (Turkensteen *et al.* 2000).

En plantaciones de tomate la infección puede iniciarse por la introducción de plantas de almácigo infectadas, aunque en Costa Rica el inóculo está presente en todas las zonas productoras, por lo que la infección puede iniciarse en cualesquiera de las etapas fenológicas del tomate. Las oosporas producidas durante la fase sexual pueden transportarse a largas distancias y también permanecer latentes como una estructura de sobrevivencia importante (Sherf y MacNab 1986). La producción de esporangios es favorecida por temperaturas entre 18 y 21 °C y una humedad relativa cercana al 100%; condiciones que permiten que el esporangio pueda madurar en un periodo de 3 a 10 horas. Los esporangios son liberados de los esporangióforos y diseminados por el viento a grandes distancias o a cortas distancias por la lluvia. Sin embargo, pueden perder rápidamente su viabilidad cuando la humedad relativa se encuentra por debajo de 95%, y sobreviven solamente cinco horas cuando la humedad relativa es del 80% (Agris 1988; Sherf y MacNab 1986). Cuando los esporangios están en contacto con el tejido foliar es necesaria la presencia de una película de agua para que se produzca la infección (Sherf y MacNab 1986).

2.3 Opciones no químicas para el manejo de enfermedades

2.3.1 Manejo de condiciones meteorológicas

Varios autores consideran que es posible manejar las condiciones microclimáticas en los invernaderos dentro de ciertos rangos y con ello prevenir el desarrollo y controlar en cierta medida las plagas y enfermedades (van Lenteren 2000).

Pérez (1998) citó entre las principales condiciones meteorológicas a tomar en cuenta para el manejo de enfermedades en invernadero, la luminosidad, temperatura, ventilación y humedad relativa. Esta última es muy importante en el manejo de enfermedades fungosas como la producida por *B. cinerea*. La humedad relativa óptima para la producción dentro del invernadero debe ser entre 50 % y 60% debido a que a humedades superiores el cultivo es más susceptible al ataque de éste y otros patógenos.

En muchos invernaderos la excesiva humedad relativa es consecuencia principalmente de la pobre ventilación. Los agricultores deben prestar atención a este y otros factores que afectan esta condición, tales como usar distancias de siembra adecuadas y no usar riego por aspersión entre otras medidas (Averre 2002). Se debe tener suficiente ventilación

lateral que facilite la circulación del aire y permita su flujo constante para reducir la enfermedad (Pérez 1998; Morgan 1984).

Abreu *et al.* (2001) evaluaron diferentes estructuras de invernadero, su relación con condiciones meteorológicas y el desarrollo de moho gris. El experimento se realizó en la región Noroeste de Portugal con invierno templado, baja temperatura y alta humedad. Ellos observaron que un bitúnel con ventanas laterales y un monitor en la parte superior permite una mejor ventilación y por tanto reducción de la temperatura del aire. Esta condición a su vez favoreció una reducción en la humedad relativa entre el 5 y el 10% respecto al invernadero cuya estructura consistía de un solo túnel. Lo anterior permitió disminuir el número de aplicaciones de fungicidas de manera significativa con relación a la utilizada en un invernadero comercial, sin que los niveles de infección aumentaran. Salazar y Castro (1994) sugirieron la utilización de cortinas plásticas que pueden levantarse para permitir el paso del viento, y controlar la temperatura y humedad relativa.

El conocimiento de las condiciones meteorológicas en los invernaderos también permite tomar decisiones en cuanto a la aplicación de productos. Un sistema de advertencia permite predecir el desarrollo de las enfermedades, utilizando el pronóstico del tiempo, generalmente de los cuatro días siguientes. Este sistema de advertencia se puede combinar con la utilización de fungicidas químicos y de controladores biológicos (Baptista *et al.* 2000, Moyano *et al.* 2003; Shtienberg y Elad 1997).

2.3.2 Prácticas agrícolas

Las labores culturales son efectivas para reducir el daño de las enfermedades. Entre estas, la siembra de barreras vivas como por ejemplo de plantas de maíz sembrado 20 días antes del trasplante y cada tres surcos de tomate pueden reducir la incidencia y severidad de *P. infestans* (Ayala *et al.* 1991). La planta de maíz funciona como una barrera viva que impide la diseminación de esporas de los patógenos manteniendo baja la incidencia y severidad de estos en el cultivo de tomate.

Pérez (1998) recomendó para el manejo de *P. infestans* y otras enfermedades fungosas dentro de invernaderos, eliminar hojas y brotes bajos de manera constante, para lograr buena ventilación en los doseles inferiores de la planta, así como establecer densidades

de siembra adecuadas; además la eliminación de tejido enfermo reduce la presión de inóculo. Se recomienda una distancia de siembra de 1 m entre hileras y 0.25 m entre plantas y podar dejando solamente un tallo, condiciones que favorecen tanto la calidad de los frutos como el control de enfermedades (Miguel Brenes com. pers. 2002).

El uso de variedades resistentes o tolerantes es otra de las prácticas que se recomiendan para el manejo general de las enfermedades. Sánchez *et al.* (1999) evaluaron 55 genotipos de tomate del cultivar Peraline, de los cuales 27 mostraron tolerancia a *P. infestans*, ya que menos del 5% del área foliar fue afectada cuando el patógeno fue inoculado en plántulas. A pesar de que la mayoría de estos materiales no presentan frutos con buenas características comerciales, se pueden usar como un recurso genético en programas de fitomejoramiento.

Se ha observado que el uso de la manguera de riego por goteo enterrada evita que el agua superficial se evapore y promueva humedades relativas altas, lo que disminuye la incidencia de enfermedades fungosas. Además para el control de *P. infestans* en tomate se recomienda aplicar aire con una bomba de motor para eliminar la humedad de las hojas, ya que este patógeno requiere la presencia de una película de agua sobre la superficie de la hoja durante 16 horas continuas, para que se desarrolle y penetre el tubo germinativo, de lo contrario se deseca, muere y no hay infección (Vera Sánchez com. pers. 2002).

2.3.3. Control biológico

El control biológico se define como la reducción de la densidad de inóculo o de sus estructuras productoras de la enfermedad de un organismo o parásitos en su estado activo o de dormancia, por uno o más organismos que ocurren naturalmente, o a través de la manipulación del medio ambiente, hospedante o antagonistas, o por introducción masiva de uno o más antagonistas (Baker y Cook 1982).

Para el control biológico de moho gris (*B. cinerea*) se han descrito diversos hongos y bacterias. En un bioensayo utilizando partes de tallo de tomate colocados en cámaras húmedas Eden *et al.* (1996) encontraron una reducción de la infección hasta de 100% utilizando *Cladosporium cladosporioides* y *Trichoderma harzianum*. Partes terminales de

tallo de tomate de 40 mm de longitud fueron introducidos en una solución de esporas del *B. cinerea* (2×10^3 esporas / ml) y luego secados con aire durante 1 hora y sumergidos en una suspensión de esporas del antagonista. El mejor nivel de protección se obtuvo con una concentración de 10^8 unidades formadoras de colonias (cfu) / ml de agua, aplicados dos horas después de inocular el patógeno. Similares resultados obtuvieron utilizando plantas en invernadero, que habían sido podadas y a las que se les aplicó las mismas concentraciones de patógeno y antagonistas.

Elad y Zimand (1993) encontraron que *B. cinerea* en plantas de pepino se redujo por la aplicación de *T. harzianum*, bajo condiciones de invernadero. El antagonista incrementó su capacidad para el control de moho gris cuando la temperatura fue superior a 20 °C y la humedad relativa alrededor de 80%, mientras que humedad relativa cercana al 100% no permitió el control de moho gris por parte de *T. harzianum*. Los antagonistas fueron asperjados con bomba de motor calculando un volumen de 1000 litros/ ha. Las aplicaciones variaron en número y frecuencia, pero la mayor intensidad fueron 6 veces distanciadas cada 7 días, utilizando 0.5 g/l de Trichodex 25WP (c. 10^{10} (cfu) / g). Similares resultados encontraron Latorre *et al.* (1997) y van Lenteren (2000) quienes recomendaron además que los tratamientos con este hongo sean complementados con fungicidas convencionales cuando las condiciones ambientales son altamente favorables para el desarrollo de la enfermedad.

Sin embargo, Tronsmo (1989) mencionó que algunas cepas de *T. harzianum* y *T. viride* mostraron susceptibilidad a algunos fungicidas evaluados, tales como mancozeb y propineb mientras que tuvieron diferentes grados de tolerancia a fungicidas utilizados en el control de *Botrytis cinerea*, por ejemplo Benomyl, Iprodione y Vinclosolín. Estos hongos además mostraron resistencia cruzada ya que también fueron tolerantes a otros fungicidas de composición química muy diferente.

Mari *et al.* (1996) identificaron 13 cepas de *Bacillus amyloliquefasciens* que fueron activas contra *B. cinerea*. El experimento se realizó con frutos de tomate en almacenamiento y los tratamientos así como *B. cinerea* (10^6 esporas por ml) fueron asperjados sobre los frutos antes de almacenarlos a 20 °C. El número de tomates infectados se redujo en más de 50% y los tratamientos fueron efectivos al menos durante 7 días.

Dick y Elad, citados por Van Leteren (2000), encontraron 16 aislamientos de levaduras, hongos filamentosos y bacterias que controlaron *B. cinerea* en tomate y pepino en invernaderos. Entre los hongos se mencionó a *Trichoderma harzianum* y *Aureobasidium pullulans*. El resultado del control fue similar o mejor que el que se obtiene con fungicidas corrientemente usados.

Pythium radiosum ha sido identificado como un agresivo micoparásito de *Botrytis cinerea*. El hongo micoparásito entra en el micelio del hospedero, coagula su protoplasma, vacía su contenido y finalmente sale produciendo numerosas ramificaciones y estructuras sexuales. La aplicación de estructuras reproductivas de *P. radiosum* aplicado a las hojas de uva hace que los síntomas característicos del moho gris dejan de aparecer rápidamente sobre las hojas del cultivo. Además se ha comprobado que este antagonista no causa daño a la uva, por lo tanto es una opción efectiva en el control biológico de *B. cinerea* (Paul 2002).

Una reducción de la esporulación de *B. cinerea* fue observada en fragmentos necróticos de hojas de fresa cuando *Ullocladium atrum* fue aplicado en un bioensayo donde las hojas de fresa habían sido previamente asperjadas con una solución de *B. cinerea* a una concentración de 10^4 esporas por ml (Berto *et al.* 2001). Kohl *et al.* (1998) encontraron resultado similar al aplicar una suspensión de conidios de *U. atrum* o *Gliocladium roseum* (10^6 y 2×10^6 conidios por ml) respectivamente, para el control de *B. cinerea* en plantas de ciclamen (*Cyclamen persicum* L.). El ensayo fue realizado en condiciones de invernadero.

Además Berto *et al.* (2001) identificaron nueve clases de enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular del patógeno, las cuales fueron encontradas en extractos homogenizados de tejidos necróticos colonizados por *U. atrum*. Se sugiere que algunas de estas enzimas como la B 1,3 glucanasa participan en la degradación de la pared celular de *B. cinerea*. En estos casos existe la posibilidad de aumentar el efecto de control de los antagonistas adicionando sustancias como carbohidratos (Haissam *et al.* 1999). Sin embargo debido a que otros mecanismos como la interferencia en el metabolismo, competencia por espacio y secreción de toxinas pueden ser utilizados por los antagonistas, se debe tener cuidado porque si el modo de acción es competencia por

nutrientes y espacio, el adicionar este tipo de sustancias hace que se pierda el efecto de competencia y por lo tanto el control es menor (Utkhede y Mathur 2002).

Según Zimand *et al.* (1996) *T. harzianum* T 39 inhibe la germinación de los conidios y la elongación del tubo germinativo de *B. cinerea*, utilizando como principal mecanismo la competencia por nutrientes y espacios y en menor proporción secreciones de enzimas que degradan la pared celular. Silva *et al.* (2001) describieron el efecto de *Trichoderma spp.* sobre el moho gris tanto como fungicida como fungistático, ya que en algunos casos se desarrollaron síntomas tardíos de la enfermedad. Ellos determinaron que los mecanismos responsables por los cuales este hongo ejerce control sobre el patógeno son enzimas degradadoras de la pared celular de *B. cinerea*, además de antibióticos. Sugirieron la caracterización de tales compuestos.

Otros mecanismos de control pueden ser utilizados por algunos antagonistas. Utkhede y Mathur (2002) encontraron que repetidas aplicaciones de Root Shield (*T. harzianum*) y *Rhodosporidium diobovatum* S33 asperjados en post inoculación fueron efectivos para controlar el chancro del tallo de tomate, causado por *B. cinerea*. El modo de acción en este caso ha sido atribuido a competencia por nutrientes y colonización de espacios, y funciona si se aplica cuando la enfermedad ya está presente similar a como lo hacen los fungicidas curativos.

En cuanto al control biológico de *P. infestans*, Bonilla *et al.* (1997) evaluaron el efecto de los extractos de *Equisetum giganteum*, Papaya (*Carica papaya*), cebolla (*Allium cepa*), y un producto botánico a base de diferentes plantas, llamado Fungeli. El mejor control se obtuvo con tres aplicaciones semanales del extracto de *E. giganteum*; en este caso el porcentaje de severidad fue de 59%, el cual fue mejor que el resto de los productos botánicos pero inferior al testigo químico a base de metalaxil y mancoceb, con el que se tuvo un 40 % de severidad. La enfermedad se manifestó 35 días después del trasplante, pero los tratamientos se aplicaron desde la siembra hasta los 75 días.

Jindal *et al.* (1988) observaron un efecto antagonista de *Penicillium aurantiogiseum* y *Fusarium equiseti* sobre *P. infestans* en pruebas *in vitro*. De la misma forma observaron una disminución de la enfermedad al aplicar esporas de dichos hongos en plantas de

papa en invernadero. En este caso el mejor control se obtuvo cuando la aplicación de esporas de *P. aurantiogriseum* se realizó 12 horas antes de la inoculación con *P. infestans*.

Sánchez *et al.* (1998) evaluaron 83 bacterias y 75 hongos de los cuales 32 fueron eficientes en la reducción de la severidad del tizón tardío en folíolos desprendidos, destacaron once aislamientos del género *Fusarium*, tres del género *Penicillium* y una especie de *Trichoderma*. No se observó una relación evidente entre el origen del antagonista y su actividad como tal en la superficie de los folíolos. Por ejemplo *Serratia sp.* (054), obtenido de rizosfera de tomate comercial mostró un efecto antagónico sobre *P. infestans* cuando fue aplicado tanto endofítica como epifíticamente. Otros buenos antagonistas fueron obtenidos de la filosfera de tomate comercial, y de la filosfera y rizosfera de *Lycopersicon pimpinellifolium*.

Similares resultados encontraron Pérez y Sánchez (2000) quienes utilizaron plantas de tomate de los cultivares Hayslip y Perialine sembradas bajo techo para evaluar los mejores antagonistas de este experimento. Corroboraron que los antagonistas evaluados disminuyeron la severidad de la enfermedad en más de un 200% con respecto al testigo, y concluyeron que *Penicillium sp.* cepa 067 fue el mejor antagonista. Debido a que algunos de estos antagonistas tienen la capacidad de hidrolizar celulosa y glucano (Sánchez *et al.* 1998), se evaluaron tratamientos donde se aplicaron estos sustratos con el fin de mejorar la capacidad del hongo de multiplicarse y colonizar la superficie foliar. Sin embargo solamente celulosa 2 g/l mostró algún efecto positivo principalmente sobre *Penicillium* (cepa 071) y *Fusarium* (cepa 108).

Asimismo, Jongebloed *et al.* (1993) seleccionaron dos bacterias antagonistas: *Pseudomonas fluorescens* (aislamiento C148) y *Bacillus sp.* (aislamiento C39), los cuales mostraron ser altamente supresivos contra *P. infestans* en plantas desarrolladas en una cámara de clima controlado. Sin embargo cuando el aislamiento C148 fue probado en el campo no fue exitoso, posiblemente debido a que el número de células antagonistas retenidas en la filosfera fue bajo.

2.4 Metodologías desarrolladas para aislamiento y evaluación de hongos antagonistas

2.4.1 Aislamiento y tamizado de antagonistas

Los micoparasitos son hongos (antagonistas) los cuales parasitan otros hongos (patógenos); ambos pueden ser fácilmente aislados de inóculo en el campo. En el laboratorio se utilizan pruebas *in vitro*, entre ellas la técnica de placas precolonizadas para evaluar la capacidad antagonista de los micoparásitos. Para ello en platos con agar uniformemente colonizados por el patógeno, se coloca el inóculo del microorganismo con potencial antagonista. Este es colocado como suspensión de estructuras de reproducción o trozos de medio con el microorganismo creciendo activamente, también se puede colocar sobre el patógeno extractos de hojas, suelo, raíces, entre otros. Aquellos que tienen la capacidad de invadir el micelio del patógeno son considerados micoparásitos o competidores excepcionalmente fuertes (Krauss y Bustamante 1999).

El aislamiento de un gran número de biocontroladores potenciales es relativamente fácil, no obstante, es necesario realizar un proceso de tamizado en el laboratorio o invernadero para las cepas más promisorias. La importancia del tamizado radica en que reduce el número de aislamientos o cepas a evaluar, ya que las evaluaciones de campo son más confiables, pero más caras por lo que deben probarse en el campo solo un número de antagonistas preseleccionados. Como regla se debe ser muy estricto en la selección y descartar aquellos de baja capacidad, ya que en la naturaleza existen suficientes antagonistas como para realizar la mejor selección (Krauss 1999).

2.4.2. Uso de bioensayos

Los bioensayos son llevados a cabo en el laboratorio o invernadero y por eso normalmente no toman en cuenta las variaciones climáticas que ocurren en el campo, las cuales son importantes. Dependiendo del propósito, los bioensayos pueden usar plantas producidas a partir de cultivo de tejidos, plántulas o varias partes extraídas de la planta (frutos desprendidos, hojas, discos de cáscara, discos de hojas o raíces) (Krauss 1999).

Aunque partes separadas de plantas, plántulas o tejido vegetal producido *in vitro* difieren de las condiciones naturales, los bioensayos correctamente empleados e interpretados son una buena opción para el tamizado de agentes de control biológico (Krauss 1999).

2.4.3 Pruebas de campo

Las pruebas de campo reproducen las condiciones más similares al ambiente donde el antagonista debe realizar su labor. Con frecuencia el desempeño de *Trichoderma spp.* como agente de biocontrol de patógenos es deficiente, debido a una pobre sobrevivencia en la filosfera bajo condiciones de campo. McKenzie *et al* (1991) observaron que esta capacidad de sobrevivencia de *Trichoderma spp.* medida en unidades formadoras de colonias por cm², disminuyó con el paso del tiempo. Aunque cada cepa mostró una tasa de sobrevivencia constante para cada repetición, hubo una gran diferencia entre cepas, siendo generalmente mejores aquellos que fueron colectados en el campo y no los que se tuvieron por mucho tiempo en medio de cultivo. También los patógenos experimentan este comportamiento. Por ejemplo *Phytophthora spp.* tiende a perder su patogenicidad en el laboratorio cuando es subcultivado repetidas veces, lo cual es un efecto del crecimiento del hongo en un medio artificial. Se recomienda no realizar más de 10 subcultivos (Bharath *et al.* 1999).

3. METODOLOGÍA

3.1 Localización de las diferentes etapas del estudio

El presente estudio incluyó cinco etapas:

- 1) Aislamiento y multiplicación de *B. cinerea*.
- 2) Aislamiento y evaluación de antagonistas.
- 3) Evaluación de antagonistas en invernadero experimental.
- 4) Evaluación de antagonistas en invernadero comercial.
- 5) Caracterización de manejo de enfermedades de tomate en una finca de producción orgánica

Las etapas 1, 2 y 3 se realizaron en el laboratorio e invernadero de Fitopatología de la Unidad de Fitoprotección, en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), en Turrialba, Costa Rica, localizado a 9° 52' Latitud Norte y 83° 38' Longitud Oeste y 602 msnm. La cuarta etapa se realizó en un invernadero comercial ubicado en San Antonio de Santa Cruz de Turrialba, propiedad del señor Gerardo Arias, a 9° 58' Latitud Norte y 83° 43' Longitud Oeste y 1400 msnm. La quinta etapa en una finca orgánica, localizada en San Juan Sur de Turrialba, propiedad del señor Guillermo Campos, a 9° 53' Latitud Norte y 83° 42' Longitud Oeste y 960 msnm. La investigación se realizó entre diciembre de 2002 y agosto de 2003.

3.2 Aislamiento y multiplicación del patógeno

Se recolectaron tallos infectados con *B. cinerea* en invernaderos comerciales de Chile y tomate y se llevaron al laboratorio de Fitopatología. Las muestras se lavaron con agua para eliminar las posibles impurezas tales como microorganismos, suciedad y otros. Luego se colocó el tejido vegetal en una cámara húmeda para estimular el crecimiento del hongo. Cuando se observó esporulación del patógeno, se trasladó a platos petri con medio de cultivo papa- dextrosa- agar (PDA), a 4, 20 y 15 g, respectivamente por litro. Los platos petri con el medio de cultivo e inóculo del hongo fueron colocados en incubación a 22 °C y luz fluorescente alterna cada 12 horas, para estimular el desarrollo del patógeno.

Se probó primero el crecimiento en PDA y posteriormente en un medio de cultivo más nutritivo que contiene caldo Czapek- dox, recomendado para la esporulación de *B.*

cinerea. Sin embargo este último no fue más eficiente que el primero, por lo que se optó por cultivar *B. cinerea* en PDA.

3.3 Recolección y aislamiento de microorganismos con potencial hiperparásito

Para obtener los antagonistas se tomaron muestras de plantas sanas que se encontraban creciendo en cultivos donde la enfermedad estaba presente, para garantizar una alta presión de inóculo y la presencia de enemigos naturales. Este procedimiento, además garantiza una buena adaptación al hábitat de los antagonistas, y por ende, su supervivencia y actividad fisiológica requerida para el control biológico (Krauss y Bustamante 1999).

El método utilizado es una modificación del propuesto por Krauss y Bustamante (1999) ya que en este experimento se realizó una preselección de antagonistas cultivando los microorganismos en medio de cultivo PDA. Para obtener organismos epifíticos de hojas y raíces, se colocaron fragmentos de tejido en agua destilada y se agitaron durante 20 minutos. El extracto obtenido se cultivó a 22 °C en papa- dextrosa- agar (PDA). Cada crecimiento microbial se cultivó hasta obtener cultivos puros de hongos, los cuales fueron utilizados en la investigación. Se seleccionaron principalmente hongos que la literatura reporta con potencial antagonista, la mayoría del género *Trichoderma sp.*, los cuales junto con algunos aislamientos de la colección del CATIE fueron evaluados en el bioensayo de placas precolonizadas.

3.4 Selección de antagonistas en placas precolonizadas

Se realizaron cultivos puros del patógeno, los cuales se incubaron hasta que cubrieron totalmente el medio artificial. Sobre el crecimiento del patógeno se colocó una gota de 25 microlitros de suspensión de esporas de cada uno de los hongos previamente seleccionados. Esta gota fue lo suficientemente pequeña para evitar que las esporas bajaran hasta el medio de cultivo y se alimentaran de él, de tal forma que la metodología pretendió seleccionar únicamente los hongos capaces de alimentarse de patógeno y por lo tanto asegurar su actividad como hiperparásito. De todos los aislamientos de antagonistas evaluados se prepararon cultivos en viales con papa, dextrosa, agar (PDA) y aceite mineral para su conservación a largo plazo.

Debido a la cantidad de potenciales antagonistas y a que el crecimiento de *B. cinerea* no siempre fue totalmente uniforme sobre los platos, se optó por aplicar un antagonista por plato y hacer una selección visual utilizando como criterio su crecimiento y uniformidad sobre el patógeno. Se seleccionaron los que mostraron mayor crecimiento y uniformidad.

3.5 Bioensayos con hojas desprendidas

Las 16 cepas que mostraron efecto como hiperparásitos, obtenidos en la etapa anterior fueron evaluadas en hojas desprendidas de tomate. Se colocó una hoja de tomate, cada hoja con cinco folíolos en una cámara húmeda que consistió en una caja plástica donde se colocó papel absorbente que permaneció mojado. La caja se tapó con plástico transparente para conservar una alta humedad relativa y al mismo tiempo permitir la entrada de luz y asegurar que las hojas continuaran la fotosíntesis y así permanecieran vivas. En cada uno de los folíolos se colocó una gota de suspensión de esporas de *B. cinerea*, con una concentración de 1×10^6 conidios por ml. A las 24 horas se inocularon las hojas con la suspensión de esporas del antagonista (1×10^6 conidios por ml) que se evaluaría, y un control (agua). Cada cámara fue una repetición y se realizaron cuatro repeticiones para cada tratamiento.

3.5.1 Diseño experimental

Los 16 aislamientos se evaluaron en cuatro bioensayos con cuatro aislamientos cada uno. En cada bioensayo el diseño estadístico utilizado fue irrestricto al azar, con cinco tratamientos (cuatro aislamientos y un testigo) y cuatro repeticiones. Las unidades experimentales fueron las cámaras que se colocaron en el laboratorio, de forma que todas las unidades experimentales se evaluaron en condiciones homogéneas de temperatura, luminosidad y humedad.

El modelo estadístico contempló como fuente de variación a los tratamientos.

$$Y_{ij} = u + t_i + \epsilon_{ij}$$

Donde;

Y_{ij} = variable de respuesta del i ésimo tratamiento en la j ésima repetición

u = media general

t_i = efecto del i ésimo tratamiento desde $i= 1$ hasta 0

ϵ_{ij} = error experimental asociado a en el i ésimo tratamiento en la j ésima repetición desde $i=1$ hasta 20

Como variable de respuesta se evaluaron los síntomas característicos de la enfermedad y se evaluó el porcentaje de folíolos que desarrollaron la enfermedad en el punto donde se colocó la gota con la suspensión de esporas del patógeno, a 12 días de la inoculación. El análisis estadístico se realizó a través de un ANDEVA y agrupación de medias mediante una prueba Duncan al 5%, para escoger los mejores antagonistas de cada uno de los cuatro experimentos.

3.6 Evaluación de antagonistas en invernadero experimental

Con los hongos más promisorios obtenidos en los cuatro bioensayos de hojas desprendidas, se realizaron pruebas en el invernadero experimental del CATIE. En un primer intento se inoculó el patógeno en plantas de tomate, pero el ataque de otras enfermedades como *Oidium sp.* y de *Pseudomonas solanacearum* interfirió en la evaluación de *B. cinerea*, ya que varias plantas se dañaron cuando apenas iniciaba la recolección de datos. Por tanto se sustituyeron las plantas de tomate por plantas de chile de la variedad Trópico Irazú.

A cada planta de 12 semanas de edad se le dobló una rama para favorecer el inicio de la infección y se asperjó una suspensión de esporas del antagonista a toda la planta, a una concentración de 1×10^6 conidios por ml. A las 48 horas se le asperjó una suspensión de esporas del patógeno a toda la planta a la misma concentración. La infección se desarrolló en ramas, frutos y flores, siendo este último órgano el que presentó mayor incidencia, y sobre el que se realizaron las mediciones.

Se utilizaron cuatro tratamientos que fueron suspensiones de los aislamientos seleccionados, un testigo al que solo se le aplicó agua y otro al que solo se le aplicó *B. cinerea*. Se evaluaron cuatro plantas por tratamiento en un diseño irrestricto al azar y se midió como variable de respuesta el número de flores enfermas por semana, a partir de los 10 días del momento de la inoculación del patógeno. Esta etapa, también incluyó la recolección de datos de temperatura y humedad relativa dentro del invernadero

3.6.1 Diseño experimental

El diseño estadístico utilizado fue un irrestricto al azar, con cuatro tratamientos (aislamientos), un testigo absoluto (solamente agua) y uno relativo (solamente *B. cinerea*) y cuatro repeticiones.

El modelo estadístico contempló como fuente de variación a los tratamientos.

$$Y_{ij} = u + t_i + \epsilon_{ij}$$

Donde;

Y_{ij} = variable de respuesta del i ésimo tratamiento en la j ésima repetición

u = media general

t_i = efecto del i ésimo tratamiento desde $i= 1$ hasta 0

ϵ_{ij} = error experimental asociado a en el i ésimo tratamiento en la j ésima repetición desde $i=1$ hasta 20

3.6.2 Análisis de los datos

Se realizó un análisis multivariado (prueba de esfericidad) para comprobar la independencia de las unidades experimentales. Luego se realizó un análisis de varianza como parcelas divididas en el tiempo, para comprobar la diferencia entre tratamientos y la diferencia entre las mediciones en el tiempo.

Se realizaron pruebas de correlación con datos meteorológicos de la misma semana, una semana antes, y dos semanas antes de la medición. Esto para establecer la relación entre el desarrollo de la enfermedad y cada una de estas variables meteorológicas.

3.7 Evaluación de antagonistas en invernadero comercial (San Antonio)

Los mismos tratamientos evaluados en el acápite 3.3 fueron evaluados en un invernadero comercial. El diseño experimental y análisis fueron los mismos que en el experimento en invernadero experimental, excepto la prueba de correlación ya que no se tomaron datos de temperatura y humedad relativa.

3.8 Caracterización y documentación de la experiencia de manejo de enfermedades de tomate en una finca de producción orgánica

Se documentó el manejo de enfermedades en una plantación comercial de tomate orgánico, según las etapas fenológicas del cultivo, y su relación con algunas condiciones meteorológicas. Se evaluaron prácticas promisorias para el manejo de enfermedades tales como la eliminación de tejido enfermo. Además antagonistas que ya han sido probados en el laboratorio fueron evaluados en el campo como alternativa para el manejo de *P. infestans*.

Aunque también se presentó infección por *Alternaria solani*, solamente se evaluó sobre *P. infestans* debido a que fue la de mayor incidencia y severidad. La incidencia se evaluó sobre el número de plantas infectadas, mientras la severidad se hizo sobre el porcentaje de área foliar infectada. Ambas se evaluaron utilizando una escala libre que registra el porcentaje total observado.

Las variedades de tomate comercial son muy susceptibles a las principales enfermedades que afectan este cultivo, sin embargo se han identificado algunas que son tolerantes pero que no presentan las características que el mercado convencional exige (Sánchez *et al.* 1999). Por este motivo se evaluó la tolerancia de los cultivares Roma y Peraline al ataque de *P. infestans*. No se evaluó la aceptación de estos frutos en el mercado de productos orgánicos.

Lo anterior como parte del establecimiento de una serie de medidas para facilitar la producción de tomate y chile orgánico en la región de Turrialba, donde las condiciones meteorológicas generalmente favorecen el desarrollo de estas enfermedades.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento del patógeno

La investigación se realizó para encontrar antagonistas de *Botrytis cinerea*, debido a que mediante una encuesta se determinó que este es el patógeno que provoca la enfermedad más importante en los viveros de la región. La encuesta se realizó entre los productores de chile y tomate dentro de invernaderos en la región de Cervantes y Turrialba.

El patógeno (*B. cinerea*) fue aislado a partir de tallos de chile y tomate infectados, los cuales fueron recolectados en las localidades de Cervantes, La Urieta y San Antonio. Posteriormente fue cultivado en PDA durante un periodo de 10 días, donde su comportamiento fue errático y muchas veces el crecimiento fue principalmente micelial. También se probó un medio que contiene caldo Czapeck- dox, el cual no dio buenos resultados y por lo tanto se continuó con PDA, medio de cultivo que aunque fue poco eficiente, debido a que en algunos platos solamente creció micelio y debieron ser desechados, permitió realizar la investigación. Se obtuvo una cepa de cada localidad mencionada, las cuales se mezclaron y con esta mezcla se evaluaron los potenciales antagonistas.

4.2 Recolección y aislamiento de microorganismos con potencial antagonista

La recolección de microorganismos para ser evaluados como antagonistas realizada en las hojas de chile y tomate indicó una población muy grande, principalmente de *Trichoderma sp.* Muchas investigaciones de control biológico se han realizado con antagonistas de este género debido a su abundancia, rápido crecimiento y a su color oscuro, que proporciona resistencia a la luz solar. De las diferentes especies de *Trichoderma spp.*, Leiner (2003); van Lenteren (2000) mencionaron a *T. harzianum* como el hongo que ha mostrado mayor potencial para el control de *B. cinerea* e indicaron que es efectivo si se aplica de manera preventiva, utilizando una solución de esporas en agua, la cual es asperjada sobre los tejidos de la planta para que el antagonista se establezca antes que el patógeno.

De más de 200 microorganismos aislados se seleccionaron 60 (anexo 1), todos ellos recolectados en diferentes fincas del cantón de Turrialba y de la colección del CATIE. Se seleccionaron principalmente hongos que la literatura reporta con potencial como hiperparásitos, que crecieron bien en PDA, y se rechazaron bacterias y otros microorganismos de manejo más difícil.

4.3 Bioensayos en placas precolonizadas por el patógeno

La selección de antagonistas potenciales se realizó de acuerdo a su crecimiento sobre el patógeno, así como la uniformidad de su cobertura sobre el crecimiento del mismo. Se consideraron mejores los de mayor crecimiento y uniformidad de la cobertura.

De los 60 que se evaluaron en el bioensayo de placas precolonizadas, se obtuvieron 16 que mostraron mejor crecimiento (hiperparásitos) sobre *B. cinerea*. Los géneros, así como su origen y procedencia se muestran en el cuadro 1. Se observa que al menos un 37.5 % de los aislamientos provienen de suelo, del cual es posible aislar una gran cantidad de microorganismos, especialmente del género *Trichoderma sp.*, entre los cuales es posible encontrar organismos con potencial antagonista hacia *B. cinerea* (Haissam *et al.* 1999).

Cuadro 1: Principales antagonistas de *B. cinerea* obtenidos en el bioensayo de placas precolonizadas.

Antagonista	Género	Origen	Procedencia *
1414	<i>Trichoderma sp</i>	Hoja de tomate	Torito
1413	<i>Trichoderma sp.</i>	Tallo de tomate	CATIE
1411	<i>Trichoderma sp.</i>	Suelo	CATIE
1119	<i>Fusarium sp.</i>	Tallo de tomate	La Urieta
2602	<i>Trichoderma sp.</i>	Suelo	Colorado
0408	<i>Trichoderma sp.</i>	Suelo	San Antonio
0412	<i>Trichoderma sp.</i>	Tallo de chile	San Ramón
0403	<i>Trichoderma sp.</i>	Tallo de tomate	Torito
APP160	<i>Trichoderma sp.</i>	No disponible	CATIE
1107	<i>Trichoderma sp.</i>	Hoja de Chile	CATIE
0411	<i>Trichoderma sp.</i>	Tallo de Chile	San Antonio
1411	<i>Trichoderma sp.</i>	Suelo	CATIE
1407	<i>Trichoderma sp.</i>	Suelo	Torito
0406	<i>Trichoderma sp.</i>	Suelo	San Ramón
1102	<i>Trichoderma sp.</i>	Tallo de chile	Urieta
1105	<i>Trichoderma sp.</i>	No disponible	CATIE

*CATIE = Colección, todos los demás sitios están dentro del cantón de Turrialba

4.4 Bioensayos en hojas desprendidas

Los bioensayos en hojas desprendidas se realizaron en grupos de cuatro antagonistas para facilitar su evaluación. Los primeros síntomas de moho gris se observaron cuatro días después que los folíolos fueron inoculados con el patógeno, y la evaluación se hizo a los 12 días de la inoculación. En el primer grupo, de cuatro antagonistas (1119, 1411, 1413 y 1414) evaluados, solamente el aislamiento 1411 fue significativamente mejor que el testigo con un 40% de infección ($p < F 0.05$) (Figura 1, Anexo 2). Mientras que los otros tres aislamientos aún cuando presentaron porcentajes de infección menores que el testigo; no mostraron diferencias significativas. Se observa que el único *Fusarium sp.* (1119) evaluado no presentó un buen control sobre *B. cinerea*, aunque al inicio se consideró en el estudio porque han sido citados miembros de este género con potencial antagonista sobre *B. cinerea* (Haissam *et al.* 1999; Paulitz y Bélanger 2001; Sánchez *et al.* 1998).

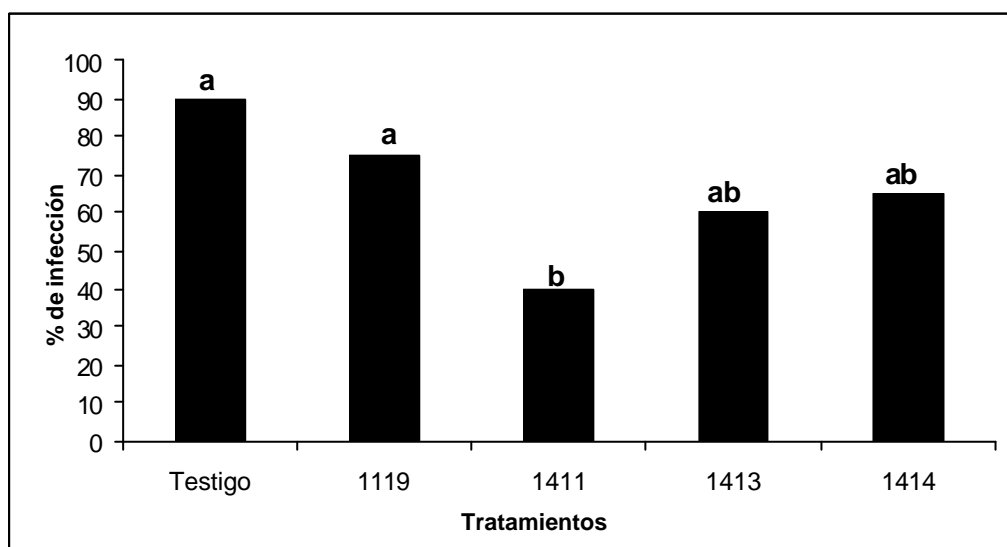


Figura 1. Bioensayo de hojas desprendidas utilizando cuatro antagonistas de *B. cinerea*.

La figura 2 muestra el segundo grupo de cuatro antagonistas (todos *Trichoderma sp.*) evaluados en hojas desprendidas, así como los porcentajes de infección. Se observa que los aislamientos APP160, 1107 y 0411 presentaron porcentajes de infección muy bajos con relación al testigo que no tuvo aplicación de antagonistas. El aislamiento 0411 solamente permitió un 10% de infección, siendo el mejor antagonista de todos los bioensayos de hojas desprendidas ($Pr < F 0.05$) (Anexo 3).

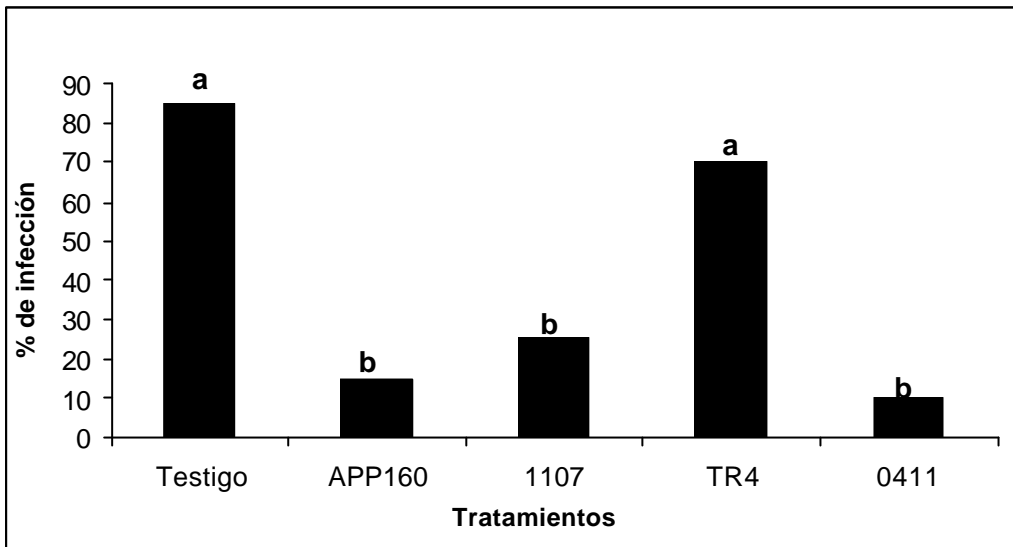


Figura 2. Bioensayo de hojas desprendidas utilizando cuatro antagonistas de *B. cinerea*.

Los resultados del tercer bioensayo se muestran en la figura 3 (anexo 4), ninguno de los antagonistas evaluados en este experimento presentó diferencias significativas con el testigo ($P < F 0.05$). Los mejores de ellos fueron los aislamientos 2602 y 0403, sin embargo tuvieron un 65% de infección cada uno y por lo tanto no se consideraron con efecto potencial en el control biológico de *B. cinerea* en este estudio.

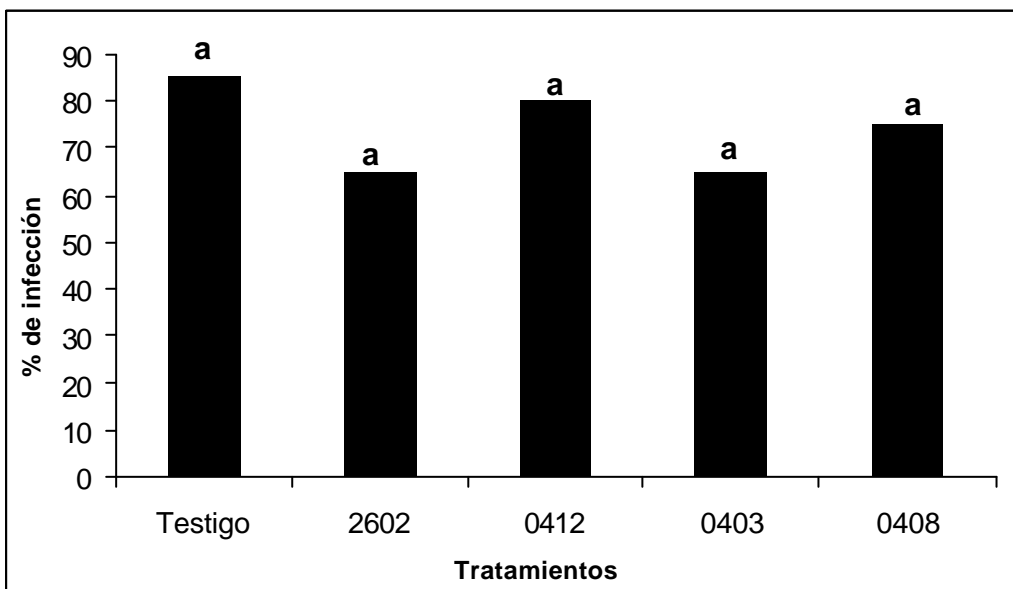


Figura3. Bioensayo de hojas desprendidas utilizando cuatro antagonistas de *B. cinerea*.

En la figura 4 se presentan los porcentajes de infección de los cuatro antagonistas evaluados en el último bioensayo con hojas desprendidas. Se observa que el mejor aislamiento fue 1102, y no presentó diferencias significativas ($P < F 0.05$) (Anexo 5), permitió 50% de infección lo cual es muy alto para el manejo de la enfermedad, principalmente porque tal nivel de infección produce una cantidad muy alta de inóculo disponible para la infección de otras plantas u órganos de la planta. Debido a esto no se le consideró con potencial para el control de *B. cinerea* y por lo tanto, no se evaluó en la siguiente prueba de invernadero.

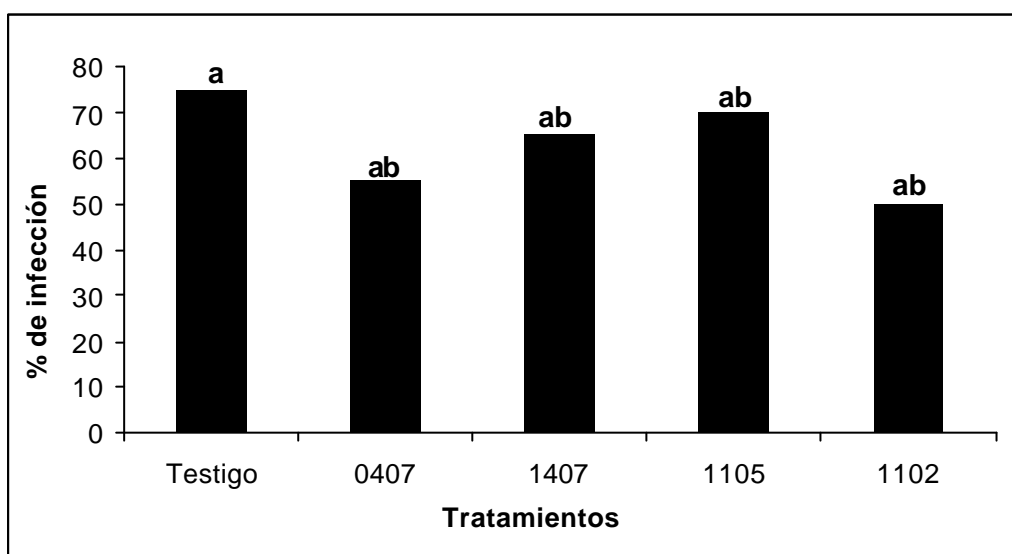


Figura 4. Bioensayo de hojas desprendidas utilizando cuatro antagonistas de *B. cinerea*.

El cuadro 2 resume los resultados de los mejores antagonistas obtenidos en las cuatro pruebas de hojas desprendidas, los cuales fueron: 0411, 1411, APP160, 1107, 1102 y 0407. De éstos seis (todos del género *Trichoderma sp.*), se escogieron los cuatro primeros y fueron evaluados tanto en las pruebas en invernadero experimental, como en invernadero comercial. La selección se hizo tomando en cuenta los menores porcentajes de infección observados.

Cuadro 2. Mejores antagonistas de *B. cinerea* obtenidos en el bioensayo con hojas desprendidas

Antagonista	Género	Incidencia (%) *
0411	<i>Trichoderma sp.</i>	10
APP 160	<i>Trichoderma sp.</i>	15
1107	<i>Trichoderma sp.</i>	25
1411	<i>Trichoderma sp.</i>	40
1102	<i>Trichoderma sp.</i>	50
0407	<i>Trichoderma sp.</i>	55

*% de foliolos que presentan infección

4.5 Biensayo en invernadero experimental (CATIE)

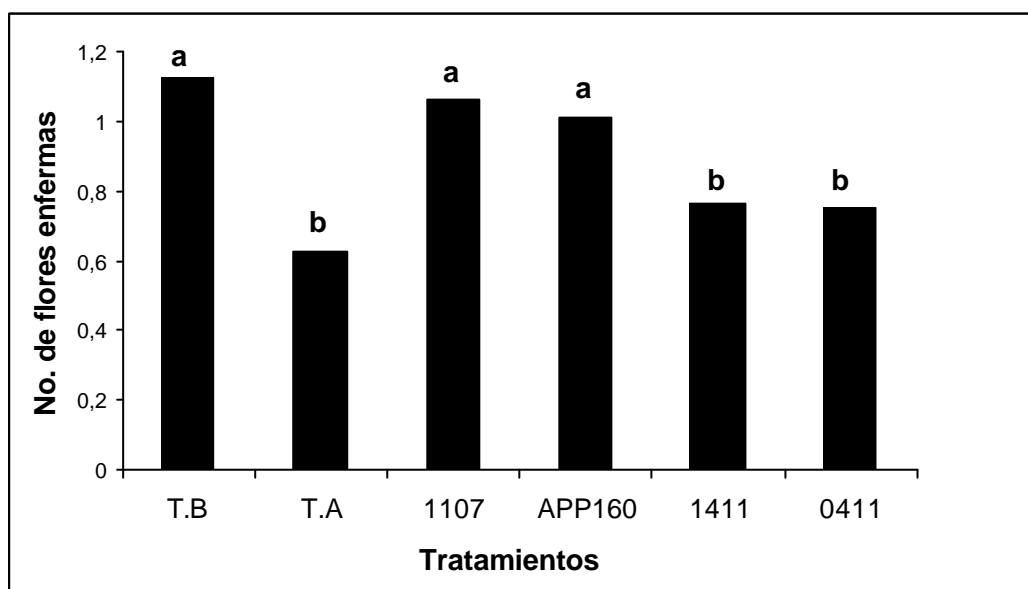
Durante el periodo seco no hubo desarrollo de la infección cuando *B. cinerea* fue inoculada artificialmente en las plantas de tomate cultivado en invernadero. Después de múltiples aplicaciones con inóculo del patógeno se observó que el moho gris se desarrolló y esporuló muy bien en ramas dobladas que presentan lesión pero donde parte del tejido aún está adherido, resultado que coincide con lo observado por (Kohl *et al.* 1998).

Según Utkhede y Mathur (2002); Leiner (2003) *B. cinerea* se desarrolla como saprófito en hojas y flores senescentes de las plantas de tomate y chile, y en condiciones adecuadas de nutrientes produce el micelio que invade partes sanas de la planta. Este es un aspecto de manejo que los productores deben tomar en cuenta, ya que durante las labores de cultivo dentro del invernadero se producen heridas a las plantas, principalmente tallos doblados, que posteriormente son atacados por el hongo, ocasionando incluso la pérdida de frutos en toda rama y se convierte en tejido ideal para la esporulación del hongo que se dispersa e infecta otras plantas.

Como se observa en la figura 5, la cual presenta los resultados del experimento en el invernadero del CATIE, la menor cantidad de flores enfermas correspondió al tratamiento donde se aplicó únicamente agua (testigo absoluto); lo cual refleja cantidades muy bajas de inóculo natural; y a los tratamientos 0411 y 1411. El hecho que plantas testigo desarrollaron la enfermedad se debió al movimiento de esporas por efecto del viento y de

la cercanía de las plantas tal como sucede en las plantaciones comerciales, donde plantas con inóculo inicial infectan otras plantas. Las diferencias observadas con los tratamientos 0411 y 1411 fueron estadísticamente significativas con el testigo de *B. cinerea*, mientras tanto los otros dos antagonistas aunque también fueron menores que el testigo de *B. cinerea* no mostraron diferencias significativas con éste ($Pr < F 0.05$), (Anexo 8).

La diferencia que muestran los dos mejores antagonistas (1411 y 0411) con el testigo del patógeno es de 37 y 38%, respectivamente. El aislamiento 0411 fue a su vez uno de los tratamientos que mostró un porcentaje de incidencia menor en el bioensayo con hojas desprendidas.



TB. Testigo (Se aplicó únicamente el patógeno)

TA. Testigo (Se aplicó únicamente agua)

Figura 5. Número de flores enfermas (*B. cinerea*) por tratamiento en experimento realizado en el invernadero del CATIE.

La figura 6 muestra el número promedio de flores enfermas por planta, por semana, obtenido al sumar todos los tratamientos evaluados. Se observa que la enfermedad aumentó a partir de la primer semana de medición (que correspondió a los 10 días de haber aplicado el patógeno), continuó aumentando durante la segunda y tercera semana, a partir de la cual disminuyó y permaneció estable en la cuarta y quinta semana de

medición. Además hubo diferencias estadísticamente significativas de la cuarta y quinta semana respecto a las otras tres (figura 6, anexo 6). Esto muestra un comportamiento que está relacionado con las condiciones meteorológicas dentro del invernadero, principalmente con la temperatura y la humedad relativa, tal como se muestra y discute en la figura 11.

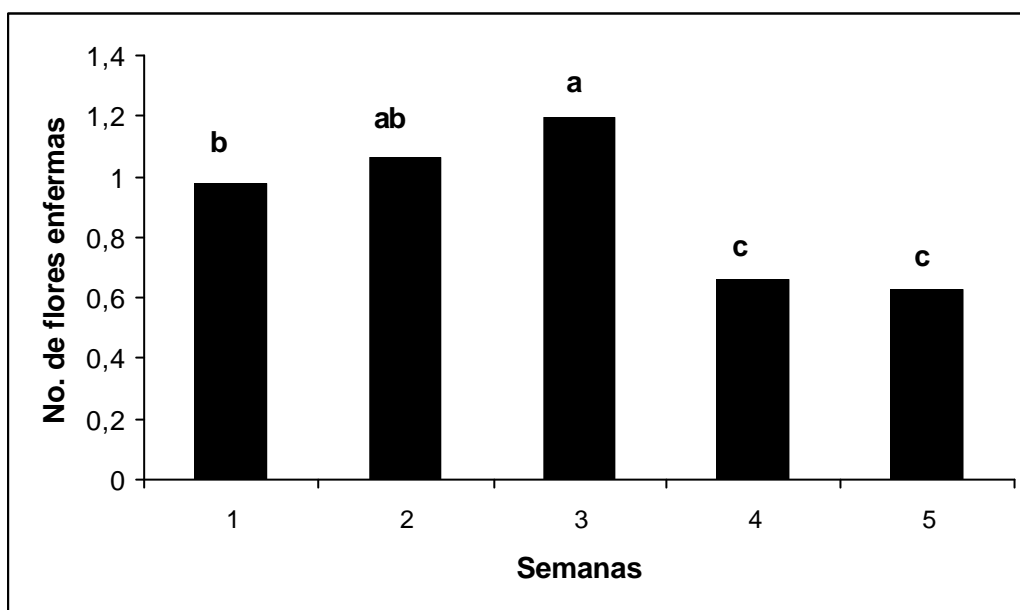


Figura 6. Número de flores enfermas (*B. cinerea*) por semana en experimento realizado en el invernadero del CATIE (promedio de todos los tratamientos).

4.6 Bioensayo en invernadero comercial (San Antonio)

En este ensayo al igual que en el anterior el desarrollo de la enfermedad fue bajo, a pesar que se hizo inoculación artificial lo que conduce a suponer que las condiciones meteorológicas no favorecieron al patógeno. Se observa que el mayor daño fue de 1.5 flores por planta de 13 flores que la planta tenía en total, lo que representa un 11%. Es posible que la humedad relativa fue inferior a 95% y la temperatura superior a 20 °C, en periodos largos. El menor número de flores enfermas observadas en el experimento en invernadero de San Antonio se obtuvo con el testigo de agua y con los tratamientos 0411 y 1411 (figura 7), diferencias que fueron significativas con el testigo donde se aplicó únicamente *B. cinerea* (anexo 7). Mientras tanto los otros dos antagonistas evaluados aunque también presentaron menor cantidad de flores enfermas que el testigo donde solo se aplicó el patógeno (TB) no mostraron diferencias significativas con éste. En este

experimento el mejor antagonista fue el 1411, con el cual se redujo la cantidad de flores enfermas en 29%, seguido de 0411 que mostró 23% de reducción de la enfermedad.

Al igual que en el experimento realizado en el invernadero del CATIE el porcentaje de reducción de la enfermedad fue inferior a 40%, utilizando como antagonistas hongos del género *Trichoderma sp.*. Elad y Zimand (1993) encontraron que cuando *Trichoderma harzianum* se mezcló con carbendacina proporcionó hasta un 90% de reducción del moho gris en tallos y frutos en plantas de pepino cultivadas en invernadero. Mientras Elad (1994) reportó una reducción de 68% en la infección del mismo patógeno en plantas de uva cultivadas en invernadero en un experimento desarrollado en Israel.

Estos resultados sugieren que aunque los porcentajes de reducción encontrados en este bioensayo fueron bajos, (lo mismo que la incidencia de *B. cinerea* en flores), podrían aumentar incluso con niveles de incidencia altos, sí el *Trichoderma sp.* es aplicado junto con un tratamiento químico. Se cree que el control biológico por sí solo es insuficiente para el combate de *B. cinerea* y que debe ser usado junto con otras prácticas como parte de un manejo integrado de plagas (Eden *et al.* 1996; Latorre 1997). Aunque *B. cinerea* ha sido muy estudiado no se sabe con exactitud cual es el nivel crítico de infección para Chile y tomate, posiblemente porque es difícil cuantificar el daño de la enfermedad.

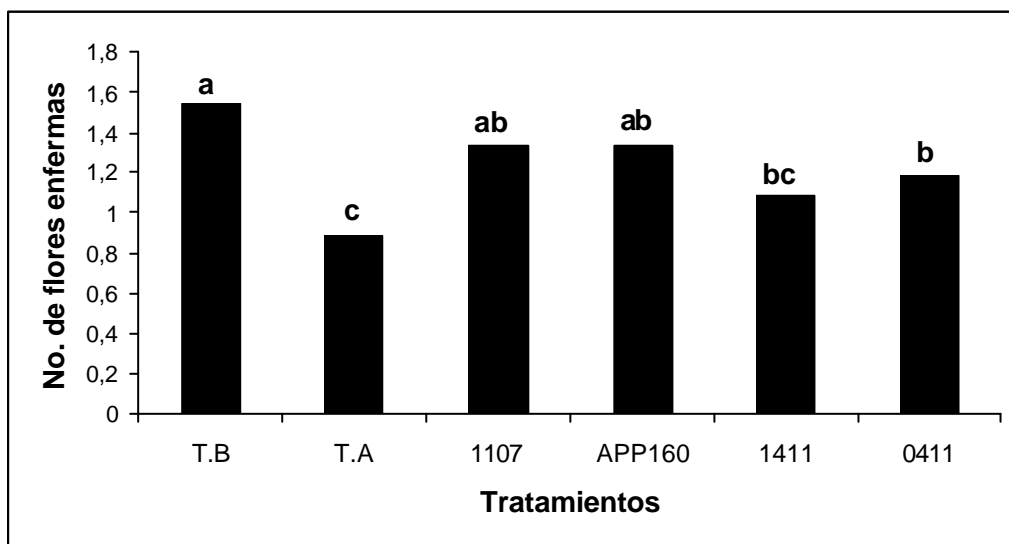


Figura 7. Número de flores enfermas (*B. cinerea*) por tratamiento en un experimento realizado en el invernadero en San Antonio.

En la figura 8 se muestra el desarrollo de la enfermedad durante cinco semanas al sumar las flores enfermas de todos los tratamientos. Se observa que la enfermedad creció a partir de la primer semana de medición, que correspondió a los 10 días de aplicado el patógeno, aumentó durante la segunda semana y se estabilizó durante las siguientes. Se observa que hay diferencias estadísticamente significativas entre la primera semana y el resto. A diferencia del experimento en el invernadero del CATIE, aquí la enfermedad se mantuvo a partir de la segunda semana; esto obedece a mejores condiciones de humedad y temperatura para el desarrollo del patógeno, ya que las plantas en ambos invernaderos tenían las mismas condiciones de edad, manejo y tratamientos.

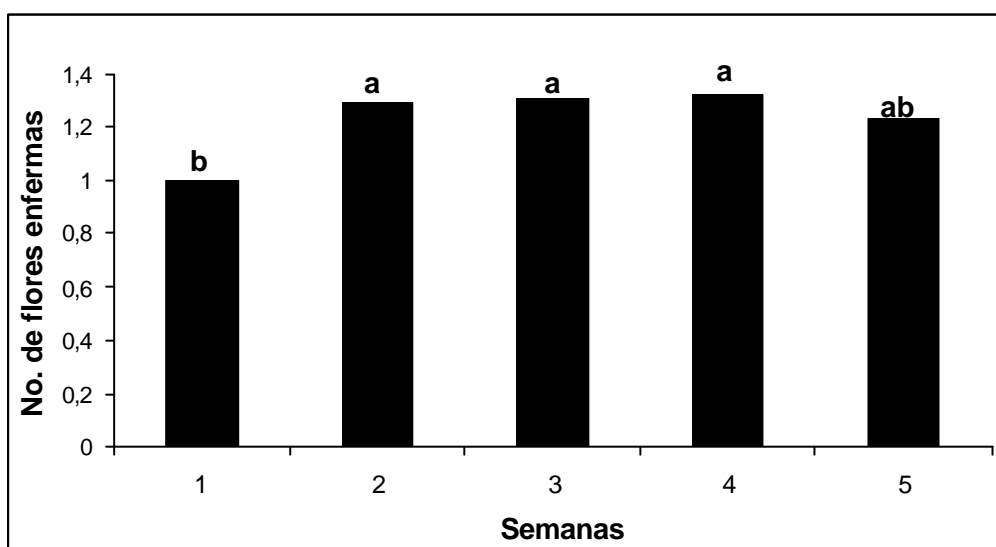


Figura 8. Número de flores enfermas (*B. cinerea*) por semana en experimento realizado en el invernadero en San Antonio.

Según la figura 9 el tratamiento de mayor daño de flores fue el testigo de *B. cinerea*, mientras que el menor daño lo presentó el testigo con agua, lo cual confirma que el inóculo natural fue muy bajo. Los antagonistas 1411 y 0411 presentaron un nivel de daño intermedio. Sin embargo la diferencia se mantuvo durante tres semanas, a partir de la cual ya no hubo diferencias entre tratamientos. Además se observa que la enfermedad bajó completamente, lo cual está directamente correlacionado con la reducción de la humedad relativa de 97% a 91% (anexo 8).

Si se comparan estos resultados con los obtenidos en los bioensayos de hojas desprendidas se puede observar que el aislamiento 0411 que presentó las incidencias

más bajas en las hojas (cuadro 2), también presentó los números más bajos de flores enfermas en las pruebas de invernadero. Este resultado permite suponer que tiene potencial como antagonista (posiblemente hiperparásito). Además demuestra que es factible encontrar antagonistas de *B. cinerea* por el método propuesto.

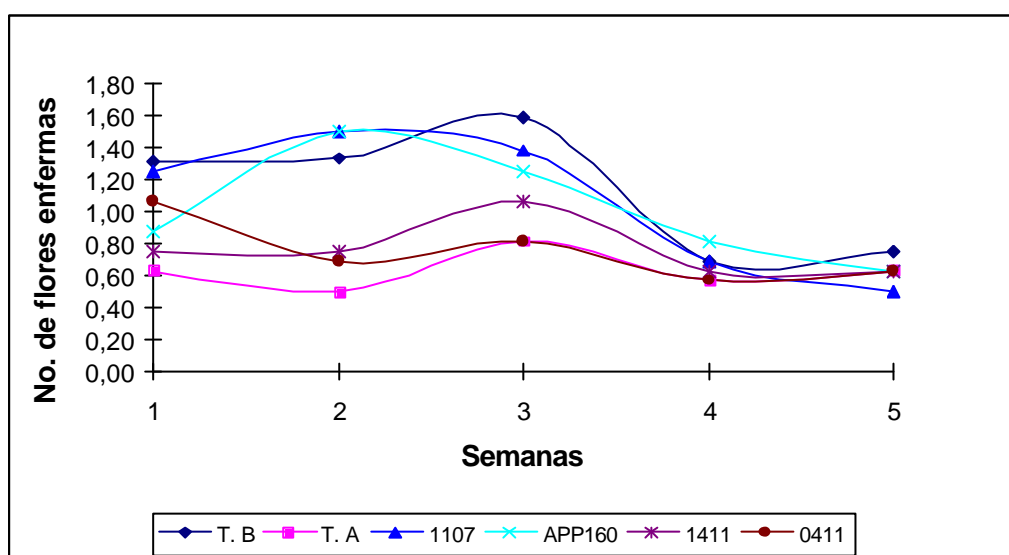


Figura 9. Número promedio de flores enfermas por *B. cinerea* en seis tratamientos experimentales realizados en invernadero del CATIE.

En el experimento en San Antonio, la enfermedad aumentó a partir de la primera semana y se mantuvo estable en las semanas finales de evaluación (figura 10). El antagonista 1411 fue el mejor, con menor cantidad de flores enfermas. El efecto fue más marcado durante las primeras dos semanas y se redujo a partir de la tercera. El tratamiento 0411 solamente mostró diferencia en la cuarta semana.

La persistencia del efecto antagonista por tres semanas en el invernadero experimental del CATIE y por dos semanas en el invernadero comercial en San Antonio sugiere que estos controladores deben ser aplicados repetidas veces tal como ocurre con los fungicidas comerciales. Su sobrevivencia en la superficie de las hojas depende de su capacidad y de las condiciones ambientales y de manejo. Moyano *et al.* (2003) hicieron aplicaciones de un producto a base de *T. harzianum* T 39 en hojas de tomate, y encontraron que la población fue alta en los primeros días después de cada aplicación, pero luego decreció a tal punto que 20 días después de la aplicación solamente quedó un 6%. Se sabe que hongos endofíticos pueden permanecer por mayor tiempo pero el modo

de aislarlos, así como su mecanismo de acción son diferentes. Sutton *et al.* (2002) observaron que *Clonostachys rosea* persiste y suprime la esporulación de *B. cinerea* en tallos deshojados de tomate por al menos 11 semanas después de la aplicación.

En este contexto es importante considerar el modo de acción del antagonista, dado que no todos utilizan los mismos mecanismos. Por ejemplo algunas levaduras como *Rhodosporidium diobovatum* utilizada para combatir a *B. cinerea* son efectivas aplicadas incluso cuando la enfermedad está establecida, debido a que son buenos competidores por nutrientes y colonizadores de espacios (Utkhede y Mathur 2002). Alguno de los antagonistas evaluados, como el 0411 podría presentar tales características.

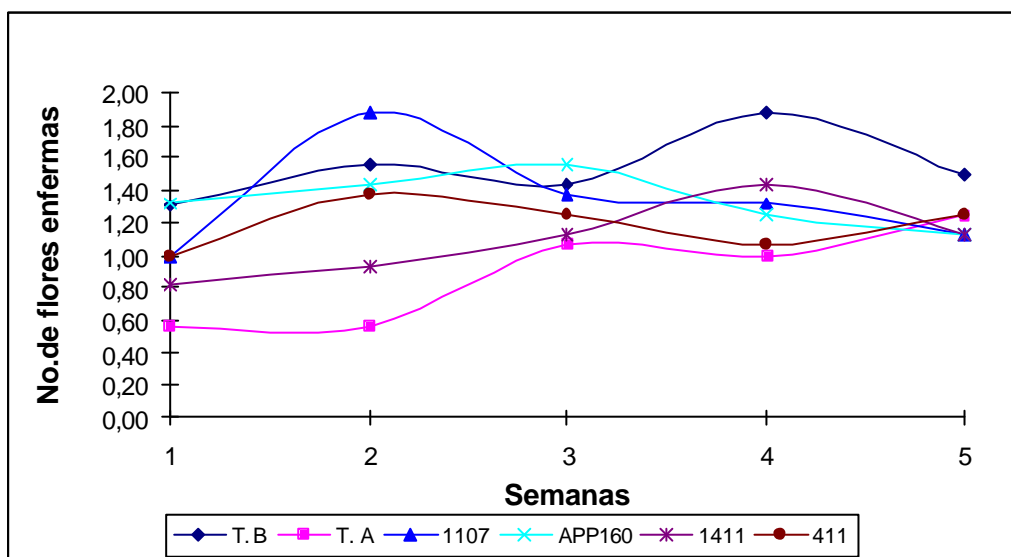


Fig 10. Número promedio de flores enfermas por *B. cinerea* en los tratamientos evaluados en el experimento realizado en invernadero de San Antonio.

Debido a que la enfermedad fue mayor en el invernadero en San Antonio que en el CATIE, especialmente en las semanas finales (figuras 9 y 10), es posible que la mayor presión de inóculo también redujo el efecto de los antagonistas a dos semanas, en comparación con las tres semanas que tuvieron en el CATIE. Aunque la mayoría de los experimentos con antagonistas para *B. cinerea* se han realizado utilizando concentración de 1×10^6 esporas por ml, que fue la que dio mejor control en las pruebas preliminares, es posible que a una mayor concentración de los antagonistas el efecto contra el patógeno podría haber aumentado, y el periodo de control podría haber sido mayor.

Kohl *et al.* (1998) encontraron que utilizando *Ullocladium atrum* a una concentración de 1×10^6 conidios por ml, aplicado cada dos o tres semanas durante el periodo de producción fue efectivo en la reducción de infecciones naturales en hojas de *Cyclamen sp.* Aplicando una concentración de 1×10^7 conidios por ml en el programa regular de control de la enfermedad en este cultivo, colonizó hojas senescentes y evitó el desarrollo de la enfermedad en estos tejidos que son los puntos de entrada del patógeno.

Sutton *et al.* (2002) también encontraron una correlación negativa entre la concentración de *Clonostachys rosea* y la esporulación de *B. cinerea* en tallos de tomate en cultivo hidropónico en invernadero. Aún cuando esta opinión de aumentar la dosis del antagonista a nivel experimental contrasta con lo propuesto por algunos autores, quienes consideran que los experimentos para selección de antagonistas deben ser muy rigurosos en favor del patógeno, para que los antagonistas seleccionados sean los mejores. Krauss *et al.* (1999) consideran que los buenos antagonistas deben dar una protección significativa a niveles de inóculo similares a los del patógeno (50:50), lo cual es una prueba suficiente de selección como para eliminar candidatos mediocres.

Se observa de las figuras 9 y 10 que el grado de control de algunos antagonistas evaluados varía de una semana a otra y no se mantienen los rangos de diferencia entre ellos. Esto puede atribuirse a que cada antagonista posee requerimientos ecológicos diferentes, y permite suponer que algunos antagonistas evaluados tienen requerimientos ecológicos similares a los del patógeno en estudio. Shtienberg y Elad (1997) encontraron que *T. harzianum* sobrevive mejor y realiza un buen control cuando la temperatura es alta y la humedad relativa entre 80 y 97% (condiciones desfavorables para *B. cinerea*). Pero el control no es bueno cuando la temperatura es baja y existe rocío que se deposita sobre el follaje. Mientras que *Ullocladium atrum* es más efectivo a temperaturas bajo 20 °C, similares a las óptimas para *B. cinerea* (Moyano *et al.* 2003). Los antagonistas 1411 y 0411 presentaron menor número de flores dañadas que el testigo de *B. cinerea* en cada una de las evaluaciones en los dos invernaderos, lo cual podría indicar que sobreviven mejor en un rango más amplio de condiciones meteorológicas y por eso tienen mayor potencial para el control de la enfermedad.

4.7 Análisis del efecto de factores climáticos sobre el desarrollo de la enfermedad

Se midió la temperatura y la humedad relativa en el experimento realizado en el invernadero del CATE, y se observó una correlación entre la humedad relativa máxima y mínima de la misma semana (corresponde a un promedio de los siete días anteriores al día de la medición de la enfermedad) con la cantidad de flores enfermas ($Pr < |r| 0.05$), la cual presentó coeficientes de correlación 0.89 y 0.88 respectivamente (anexo 8), de tal forma que al aumentar la humedad relativa aumenta el número de flores afectadas (figura 11). Esta relación también se calculó mediante una regresión lineal que se muestra en las figuras 12 y 13. Latorre (1977) considera que la temperatura y la humedad relativa son los factores climáticos que más influyen en el desarrollo de *B. cinerea* en invernadero. En trabajos realizados acerca de la pudrición de los racimos de uva (*Vitis vinifera*) en Chile observó que la humedad cercana a 100% junto con la temperatura entre 15 y 20 °C fue óptima para el crecimiento del hongo.

Se observa que fue mayor la disminución de la enfermedad que la disminución en la humedad relativa máxima y mínima. Sin embargo debido a que las condiciones óptimas para *B. cinerea* son entre 96 y 100% de humedad relativa, cambios en ese rango provocan reducciones grandes en la severidad de la enfermedad. Moyano *et al.* 2002 consideran que la humedad relativa inferior a 96% y temperatura superior a 26 °C son condiciones subóptimas para *B. cinerea* y mencionaron que en estos casos, el progreso de la enfermedad es lento o totalmente nulo. Por eso se observa una caída drástica de la enfermedad en las últimas dos semanas.

Si se compara el número total de flores dañadas en los invernaderos evaluados, se observa que la enfermedad fue proporcionalmente más alta en las semanas finales en el invernadero de San Antonio que el del CATIE, lo cual puede ser un efecto de la temperatura en ambos sitios. En el invernadero en CATIE la temperatura nunca bajó de 17 °C, mientras que en el invernadero de San Antonio por efecto de la altitud la temperatura es más baja (alrededor de 15 °C) y seguramente estuvo en el rango descrito en más ocasiones, en periodos más prolongados, favoreciendo una mayor incidencia de la enfermedad. Es posible que la temperatura alta en el invernadero del CATIE desfavorece al mismo tiempo la producción de flores y la enfermedad. Según Santiago *et al.* (1998) la temperatura y la luz son los factores que más afectan la floración, se ha visto

que la temperatura entre 15 y 20 °C la producción de flores es mayor comparado con plantas que se desarrollan entre 25 y 30 °C.

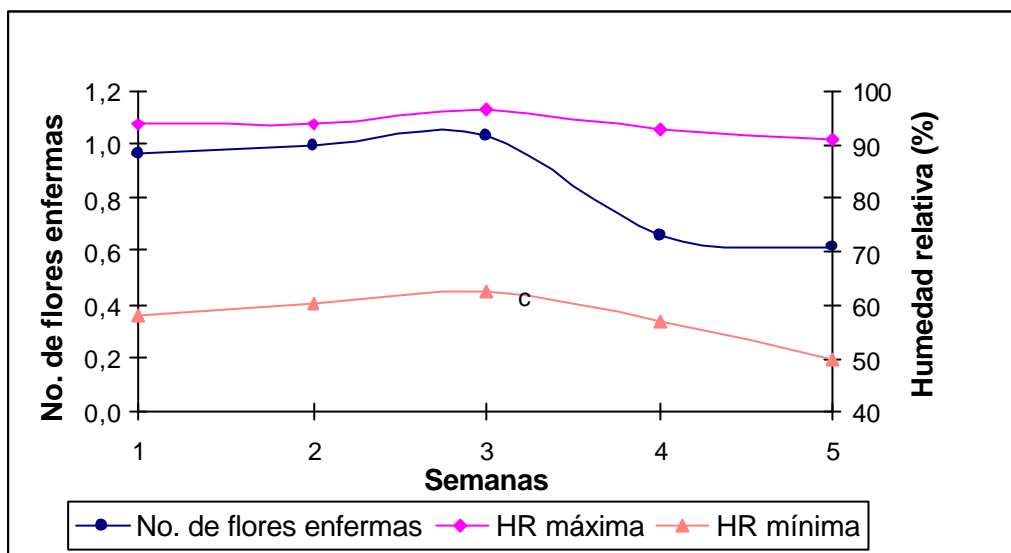


Figura 11. Número de flores enfermas por *B. cinerea* (donde solo se usó el patógeno) y datos de humedad relativa máxima y mínima en el experimento realizado en el invernadero experimental (CATIE).

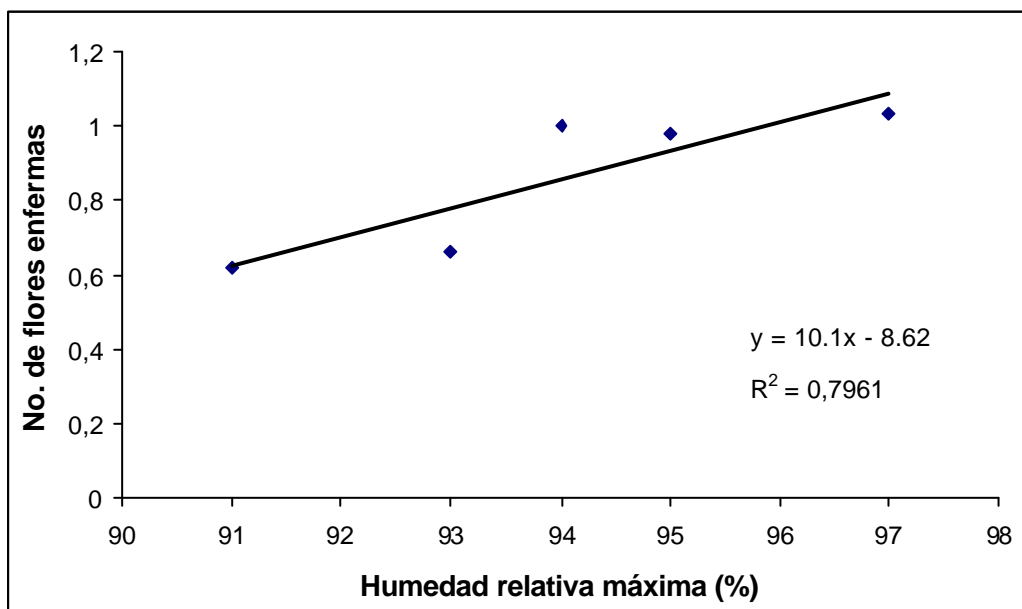


Figura 12. Relación entre la humedad relativa máxima de la misma semana y la cantidad de flores enfermas por *B. cinerea* en plantas de chile en invernadero experimental (CATIE).

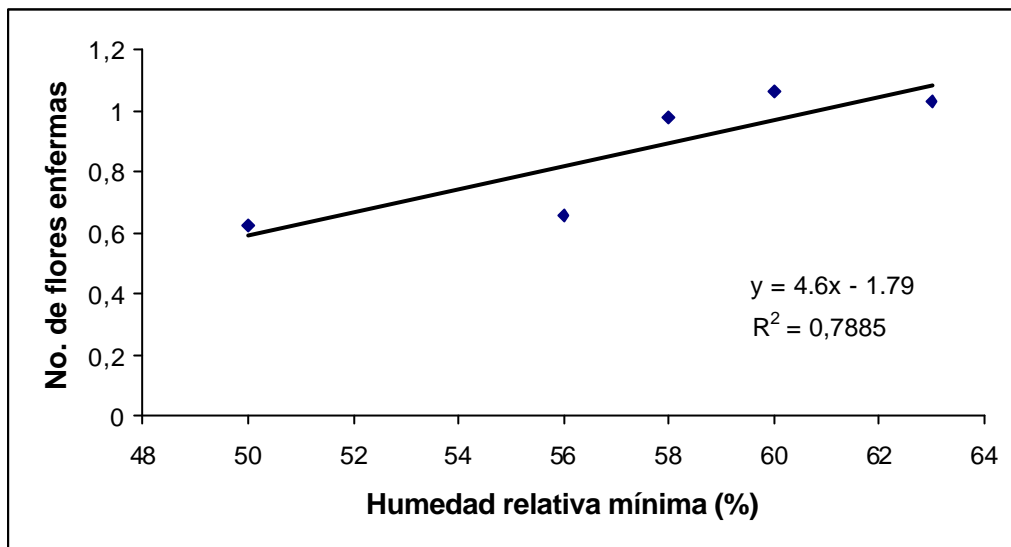


Figura 13. Relación entre la humedad relativa mínima de la misma semana y la cantidad de flores enfermas por *B. cinerea* en plantas de chile en invernadero del CATIE.

Aunque se encontró correlación entre la temperatura mínima de la misma semana (corresponde a un promedio de los siete días anteriores al día de la medición de la enfermedad), y el número de flores enfermas, ($Pr < |r| 0.05$), con coeficiente de correlación 0.92 (anexo 8, figura 14), en los rangos en que varió la temperatura los cambios no son importantes para el desarrollo de la enfermedad. El resultado obtenido es contrario a lo observado por Moyano *et al.* (2003) quienes mencionaron que en los rangos entre 15 y 30 °C la relación entre temperatura e incidencia de la enfermedad debería ser inversa. Esta relación también se calculó mediante una regresión lineal que se muestra en la figura 15.

La humedad relativa y la temperatura tienen una relación inversa de manera que en aquellas semanas en que la severidad de la enfermedad es alta, al igual que la humedad relativa, la temperatura es baja aunque la correlación no fue significativa. Según Jarvis (1992) la baja humedad relativa durante el día se explica por el rápido aumento de la temperatura en la mañana sin que el aire absorba humedad con la misma velocidad. Por la noche ocurre lo contrario.

Jarvis (1992) encontró que la temperatura de las hojas, flores y frutos, puede diferir significativamente de la temperatura del aire ambiental, y cuando la temperatura de estas partes de la planta es baja pueden ser afectadas por los patógenos. Los cambios de

temperatura también juegan un papel importante en la condensación sobre flores y frutos y por lo tanto en el desarrollo de enfermedades como las provocadas por *B. cinerea*. De Vis (1999) mencionó que los botones florales y los frutos de chile y tomate son cuerpos fríos sobre los cuales se condensa agua cuando baja la temperatura, condición que es óptima para la germinación de esporas de *B. cinerea*. Ninguno de estos factores fue medido en este experimento.

Tanto la temperatura como la humedad relativa variaron siguiendo un patrón durante las cinco semanas de evaluación. La temperatura fue máxima en el día y bajó durante la tarde, la noche y hasta las primeras horas de la mañana, pero su promedio fue 25 °C, lo cual no favorece el desarrollo de la enfermedad. Mientras que el promedio de humedad relativa fue de 70%, obteniendo el mínimo en un solo momento alrededor de medio día, y las máximas abarcaron periodos largos durante la noche hasta las primeras horas de la mañana y variaron entre 91 y 97%. Por eso se considera que la variación en la enfermedad fue consecuencia principalmente de la humedad relativa.

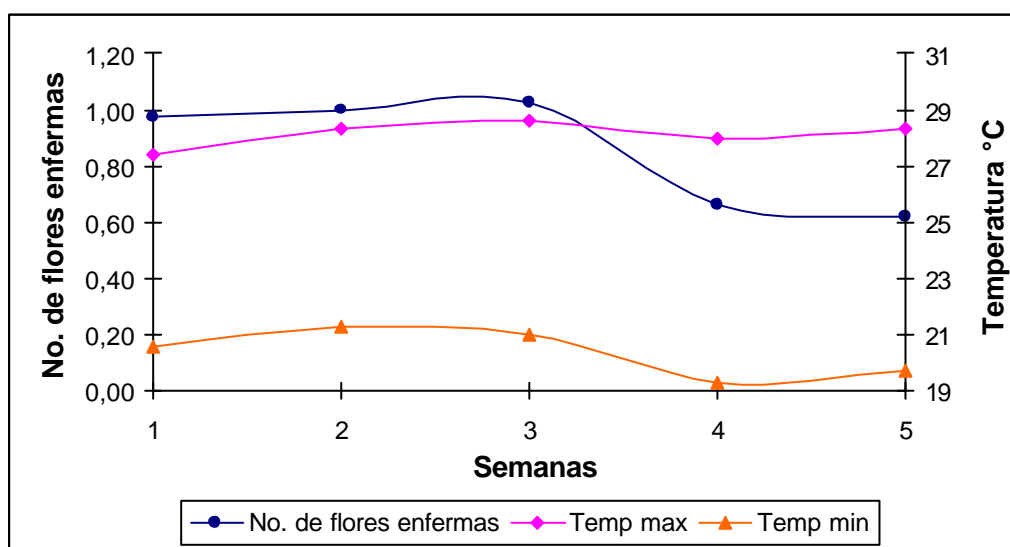


Figura 14. Número de flores enfermas por *B. cinerea* (donde solo se usó el patógeno) y datos de temperatura máxima y mínima en el experimento realizado en el invernadero experimental (CATIE).

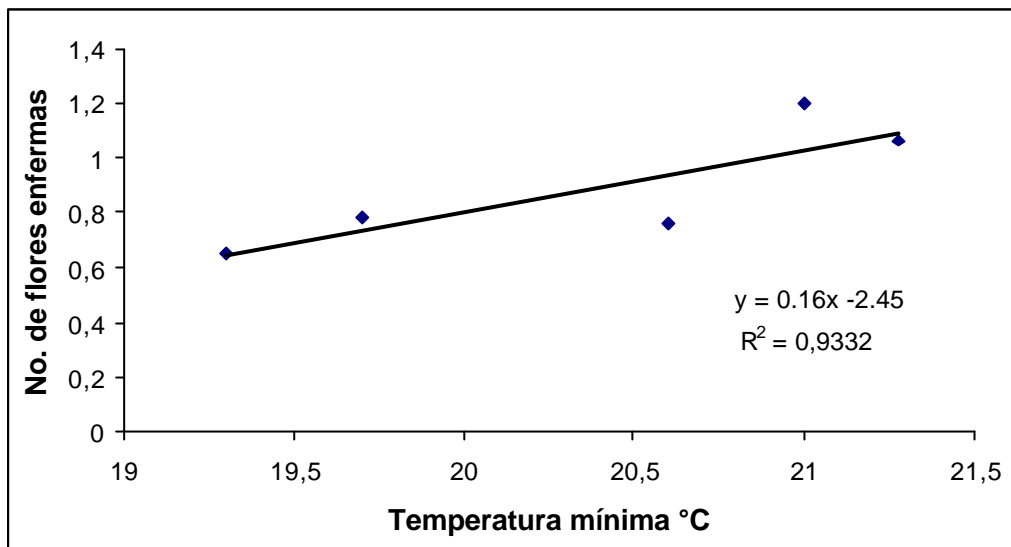


Figura 15. Relación entre la temperatura mínima de la misma semana y la cantidad de flores enfermas por *B. cinerea* en plantas de chile en invernadero experimental (CATIE).

4.8 Caracterización del manejo de enfermedades en una finca orgánica

Como se describe en la metodología (acápito 3.8) se dio seguimiento al cultivo de tomate orgánico, el cual se llevó a cabo de diciembre del 2002 a agosto del 2003. Durante este periodo se realizaron tres siembras de tomate del híbrido Montaña Fresca, todas ellas en el sistema de techo en bandas de plástico de 1.2 m de ancho, a una altura de 1.8 m. Las dos enfermedades más importantes que se presentaron fueron tizón temprano (*Alternaria solani*) y tizón tardío (*Phytophthora infestans*), siendo esta última la más perjudicial para el cultivo, con niveles de infección hasta de 100%, mientras que el daño por tizón temprano fue menor y se controló con poda de las hojas bajas de las plantas afectadas. No se observó *B. cinerea* dado que es una enfermedad que se desarrolla principalmente en invernadero.

Para el manejo de estas enfermedades el productor utilizó las siguientes medidas:

- ☞☞ Aplicación de antagonistas
- ☞☞ Evaluación de variedades resistentes
- ☞☞ Uso de mezclas
- ☞☞ Recuperación de suelo y fertilización
- ☞☞ Labores culturales

4.8.1 Aplicación de antagonistas

Durante el seguimiento se aplicó el antagonista *Trichoderma sp.* 069, que ya había sido evaluado a nivel de laboratorio para el control de *P. infestans* (Sánchez *et al.* 1999). Sin embargo no hubo un efecto cuando se utilizó el antagonista debido probablemente a que siempre se utilizó cuando ya la enfermedad estaba presente y éste debe aplicarse de manera preventiva. Además la experiencia fue en cultivo bajo bandas plásticas, pero es necesario probarlo en invernadero donde las condiciones son más controladas.

4.8.2 Evaluación de variedades resistentes

Además se evaluaron dos cultivares que mostraron resistencia a la enfermedad, pero produjeron frutos muy pequeños. Según la figura 15 la variedad Roma presentó un 42% de infección frente a un 56 % del testigo que fue la variedad HaySlip. Mientras tanto el Pieraline mostró solamente un 5% de daño por *P. infestans*, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre éste y el control (figura 15, anexo 9). Sin embargo los frutos de esta última fueron de acuerdo a su tamaño (5 cm de diámetro) como los de tercera de variedades comerciales, mientras que los de Roma son pequeños, alargados y con cáscara de consistencia dura semejante a la del chile dulce. También se observó que la cosecha promedio en Pieraline fue de 1kg y la de Roma fue de 0.5 kg. Por lo tanto estas variedades son de potencial limitado para la producción comercial orgánica.

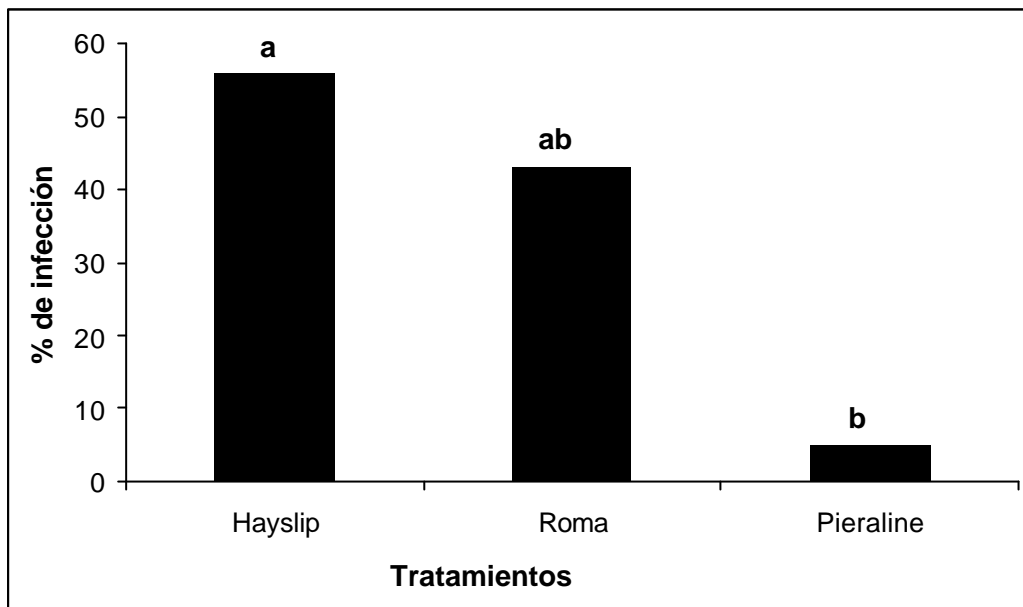


Figura 15. Prueba de variedades resistentes a *Phytophthora infestans* bajo condiciones de campo.

4.8.3 Uso de mezclas

Por las regulaciones existentes en producción orgánica, el productor solamente utiliza productos provenientes de minería, en mezcla con diferentes extractos de plantas. La utilización de estas mezclas, junto con las otras prácticas descritas permiten un buen control de las enfermedades y tienen un costo aproximado de un 25% del valor de los productos comerciales sintéticos que se utilizan en agricultura no orgánica. Se realizó una aplicación por semana, alternando cada una de las siguientes mezclas:

- ☞ Se mezclaron 250 g de ceniza más 80 g de carbonato de calcio diluidos en 18 litros de agua. También se puede usar hidróxido de calcio en lugar de carbonato de calcio. Esta mezcla se hace el día anterior y se filtra.
- ☞ Se aplicaron 240g de caldo bordelés por bomba de 18 litros, el cual se logró mezclando partes iguales de sulfato de cobre y cal viva.
- ☞ Caldo sulfocálcico que se preparó mezclando 30 g de azufre más 30 g de cal viva y se hirvió durante 1 hora hasta que el caldo tomó una coloración de teja (este caldo se puede almacenar).

☞ También se utilizó una mezcla de azufre y Biocto, o Quilol en partes iguales por 18 litros de agua.

4.8.4 Recuperación de suelo y fertilización

Para el cultivo orgánico el productor inició un proceso de recuperación del suelo, el cual inició con aplicaciones de abono orgánico desde que la finca adoptó este sistema. Sin embargo ya para la siembra de tomate se aplicó compost en cada hueco de siembra, dos semanas antes del trasplante.

La aplicación de materiales orgánicos tiene una serie de ventajas para el cultivo. Desde el punto de vista del manejo de enfermedades estimula el crecimiento de las plantas, mejora la textura y la estructura del suelo, ayuda a la actividad biológica del suelo y a su vez incrementa la fertilidad natural del mismo y por lo tanto mejora la tolerancia a las enfermedades. Se ha visto por ejemplo que el daño de bacterias que afectan la raíz disminuye por la aplicación de diferentes materiales orgánicos como la broza de café y el compost. Las plantas bien nutridas soportan mejor el ataque de enfermedades (Elzakker 1995).

Para el cultivo de tomate la fertilización utilizada fue:

☞ Se aplicó 0.5 kg de bocashi enriquecido con roca fosfórica (un kg de roca por 46 kg de bocashi) por planta, para la siembra. Este se colocó al fondo del surco.

☞ A los 15 días se fertilizó de nuevo con bocashi, enterrado o espolvoreado y tapado, y a los 22 días se aplicó K- Mg a razón de 40 g por planta y 250 g de harina de sangre.

☞ Cada semana se aplicó foliarmente el biofertilizante Super Magro que contiene todas las sales minerales, melaza y leche. Además se fumigó con boro y zinc orgánicos en dosis de 90 g por bomba de 18 litros, cada 15 días.

4.8.5 Labores culturales

Se realizaron varias labores de cultivo como medida para reducir la incidencia de enfermedades en el cultivo de tomate:

4.8.5.1 Poda deshija y formación de plantas

Inmediatamente después de que la planta inició la producción de hijos se seleccionaron los dos o tres mejores tallos de cada planta y se cortó el resto de los hijos. También se eliminaron las hojas que estaban en contacto con el suelo, lo cual permitió manejar el tizón temprano. También se eliminó tejido enfermo y frutos dañados, con cuidado de no dejar la planta sin el follaje necesario para el llenado de frutos, (se dejaron al menos tres hojas completas por racimo de frutos). La deshija se hizo varias veces hasta que la planta con suficientes frutos en desarrollo detuvo parcialmente el crecimiento vegetativo. Pérez (1998) consideraron estas prácticas muy útiles ya que evitan que se genere un microambiente de alta humedad en el dosel inferior de las plantas, que por un lado propicia un ambiente favorable para el desarrollo de algunos patógenos y por otro disminuye la penetración de luz, y por lo tanto la calidad de los frutos.

4.8.5.2 Amarre

Esto evitó que las ramas tocaran el suelo o que se rompieran por el viento o exceso de carga, con lo cual propiciaría la entrada de algunos organismos que producen enfermedades.

4.8.5.3 Alomillado

Las plantas se sembraron sobre lomillos de altura variable, según fue el riesgo de agua estancada en el suelo. Los más altos de alrededor de 35 cm permitieron evacuar mayor cantidad de agua. Los lomillos permiten que el exceso de humedad drene hacia afuera del cultivo y desfavorecen el desarrollo de enfermedades. Estos se hicieron antes del trasplante para no cortar raíces de las plantas.

4.8.5.4 Rotación de cultivos

El tomate pertenece a la familia de las solanáceas por eso es conveniente que al terminar un ciclo de cultivo de estas plantas, se siembre en el mismo terreno plantas de otra familia muy diferente, tal es el caso de las leguminosas, por ejemplo frijol o vainica ya que estas no son afectadas por los mismos hongos que el tomate (CATIE 1990). La rotación con frijol y pepino ayudó a disminuir la cantidad de microorganismos que pueden causar enfermedad en futuras siembras.

4.8.5.5 Manejo del riego

El riego por aspersión favorece el desarrollo de enfermedades del cultivo ya que el salpique del agua en el suelo lleva los microorganismos patógenos hasta las hojas, además el agua en exceso puede favorecer el ataque de enfermedades.

Por eso se realizó un riego controlado mediante una manguera con boquillas en donde el agua se depositó por goteo en la raíz de cada planta. La manguera se enterró 10 cm para que no quedara agua superficial que por evaporación iba a favorecer humedades relativas altas.

4.8.5.6 Cultivo bajo techo plástico

En sistemas de producción a cielo abierto las condiciones meteorológicas no pueden manejarse, mientras que en invernaderos es posible manejar algunas de estas condiciones hasta cierto rango. Entre los aspectos que es posible manejar y que inciden sobre las enfermedades están la fertilización, temperatura, luz y humedad principalmente. En estructuras totalmente techadas es importante la ubicación con relación a la dirección del viento. El techo debe estar colocado de forma que permita el ingreso del viento sin ofrecer resistencia y que este pase por la plantación y salga por el otro extremo, llevándose humedad del cultivo.

Este es un sistema que es efectivo en tanto protege a la planta de la humedad en el follaje. Durante la segunda siembra una fila quedo sin techar y cuando hubo lluvia continua durante cinco días las plantas se dañaron completamente por efecto de tizón tardío, mientras que las estaban techadas sobrevivieron y produjeron cosecha.

En esta finca se utilizaron bandas de plástico de 1.2 m de ancho a 1.8 m de altura sobre la fila de siembra de tomate. Este sistema aunque permitió menos control que un invernadero total, resultó muy barato. El costo para proteger cada planta es de \$0.36 mientras que en el invernadero es de \$3.95.

4.8.5.7 Secado de hojas

Se utilizó una bomba de motor para aplicar una corriente de aire sobre el follaje. Esta labor se realizó por la mañana y se repitió en la tarde, de esta manera se interrumpe la continuidad de la película de agua sobre el follaje y por lo tanto no se da el alargamiento y penetración del tubo germinativo de *P. infestans*. El costo de realizar dos aplicaciones para 100 plantas fue de \$0.25.

4.8.6 Principales observaciones realizadas

- ☞☞ La aplicación de aire con la bomba de motor ayudó a disminuir el daño por *P. infestans* debido a que se elimina la película de agua necesaria para que las esporas del hongo germinen y extiendan el tubo germinativo, que penetra el tejido de la planta y causa la infección.
- ☞☞ Se observó que cuando había mucho inóculo en el campo, después de haber realizado tres siembras en la finca, las lesiones se produjeron directamente en los tallos de plantas jóvenes lo cual es todavía más destructivo.
- ☞☞ Contrario a lo que ocurre en plantaciones comerciales convencionales, en las cuales la severidad de más de 10% es motivo de abandono del cultivo, en este caso la severidad siempre alcanzó niveles más altos y aún así se recolectó hasta 4 kg por planta en uno de los cultivos.
- ☞☞ La enfermedad se mantuvo en niveles bajos mientras hubo poca lluvia, pero cuando se presentaron periodos de varios días con precipitación y nubosidad, la severidad aumentó rápidamente. En este caso se eliminó y se retiró parte del tejido afectado para disminuir la cantidad de inóculo, práctica que fue muy efectiva cuando siguieron condiciones más secas después de realizarla.
- ☞☞ Se notó que la planta es muy susceptible durante las primeras 8 semanas, pero luego se vuelve tolerante y produce cosecha incluso con infección de 20%.
- ☞☞ Aún dentro del invernadero se presentó infección por *P. infestans* pero la temperaturas superiores a 30 °C durante el día favorecieron que muchas de las esporas se murieran, por eso la infección se mantuvo alrededor de 20%.
- ☞☞ Debido a que el suministro de agua es por gravedad se observó que en el invernadero la mayor severidad es en las partes bajas donde la manguera deposita la mayor cantidad de agua.

4.8.7 Recomendaciones al productor

- ✍✍ Preparar el sitio de cultivo aplicando materia orgánica y haciendo drenajes adecuados.
- ✍✍ Utilizar algún tipo de techo ya sea bandas plásticas o invernadero.
- ✍✍ Preparar su propio almácigo para evitar la introducción de enfermedades como *Pseudomonas solanasearum* o *P. infestans*.
- ✍✍ Seleccionar dentro de la plantación aquellas plantas que muestren resistencia a las principales enfermedades, con el fin de reproducirlas para futuras siembras, esto no se puede hacer con híbridos porque no conservan las características.
- ✍✍ Utilizar y evaluar los extractos de plantas y minerales para el control de enfermedades.
- ✍✍ No aplicar durante la floración mezclas que contengan cobre ya que provoca aborto de flores.
- ✍✍ Aplicar cuidadosamente el riego de tal forma que no se produzcan derrames de agua que aumentan la humedad relativa y favorecen el desarrollo de las enfermedades.
- ✍✍ Prácticas agrícolas que tiendan a favorecer la sanidad de la planta. Por ejemplo deshija, deshoja, eliminación de tejido enfermo, manejo de malezas entre otros.

5. CONCLUSIONES

1. La metodología utilizada en este experimento es efectiva para la selección y evaluación de antagonistas de *B. cinerea*, principalmente hiperparásitos aislados de las hojas de la planta.
2. El aislamiento 1411 fue el más consistente en su efecto sobre *B. cinerea* tanto en el bioensayo con hojas desprendidas como en los experimentos en invernaderos, por lo tanto tiene potencial en el control biológico del patógeno bajo condiciones de invernadero.
3. Bajo condiciones de invernadero el efecto de los antagonistas evaluados fue de tres semanas, lo cual sugiere que se deben repetir las aplicaciones para mantener el control biológico.
4. La severidad de *B. cinerea* está correlacionada con la humedad relativa en los días anteriores a la medición. Humedad relativa cercana a 100% favorece el desarrollo de la enfermedad, mientras que humedad relativa menor de 80% la desfavorece. Esto da una pauta sobre lo que debe ser el manejo del agua dentro del invernadero como una de las formas más importantes de control de la enfermedad.
5. Una forma de infección de *B. cinerea* es a través de lesiones en la planta. Este es un aspecto de manejo muy importante, ya que durante las labores de cultivo se producen esas lesiones.
6. En cultivo de tomate orgánico la enfermedad que mayor daño causó fue *P. infestans*, mientras que en cultivos convencionales en invernadero fue *B. cinerea*. Esto está relacionado con el tipo de estructura utilizado en cada caso, así como con los productos utilizados y las prácticas de cultivo.
7. La utilización de invernaderos y prácticas de cultivo permiten un control aceptable de *P. infestans* en cultivo de tomate y facilitan la producción orgánica de este cultivo en regiones de alta precipitación, como Turrialba.

6. RECOMENDACIONES

1. Evaluar diferentes concentraciones y mezclas, así como aplicaciones sucesivas de los mejores antagonistas encontrados (0411 y 1411). Así como investigar sobre formulación, diferentes sustratos y otros aspectos que conduzcan a la utilización de estos antagonistas.
2. En producción convencional a veces es conveniente integrar el control biológico con otros métodos de manejo, incluyendo la utilización de productos químicos. Por eso se recomienda probar la resistencia de los antagonistas 0411 y 1411 frente a fungicidas químicos de uso frecuente en el combate de *B. cinerea*.
3. Repetir los bioensayos en invernadero en diferentes épocas del año para evaluar la eficacia de los antagonistas bajo condiciones óptimas para el patógeno tanto en chile como en tomate.
4. Dado que el efecto de la enfermedad es sobre flores y por lo tanto incide directamente sobre la producción se recomienda en futuras evaluaciones incluir datos de producción.
5. Continuar las investigaciones en invernaderos para conocer más acerca de las condiciones meteorológicas que favorecen el desarrollo de *B. cinerea* y del efecto de los antagonistas 0411 y 1411 en el control del patógeno.
6. Valorar de manera científica el efecto de los diferentes extractos de plantas y mezclas de productos que se utilizan para el control de *P. infestans* en cultivo de tomate orgánico.
7. Hacer una selección de las variedades más resistentes a *P. infestans* que reúnen requisitos de mercado y que pueden ser usadas en un manejo integrado de la enfermedad por parte de productores orgánicos.

7. LITERATURA CITADA

- Abreu, MJ; Ferreira, VC; Sottomayor, A, Vargues, AC; Meneses, JF; Fernández, JA; Martínez, PF; Castilla, N. 2001. Evaluation of greenhouse structures for tomato spring crops in the entre douro e minho region of Portugal. *Hacta Horticulturae* 559: 169- 171.
- Agrios, GN. 1988. *Plant Pathology*. 3 ed., San Diego, California, USA, 803 p. Academic Press
- Averre, C. 2002. *Botrytis* blight in vegetable greenhouses and plant beds. North Carolina, USA. Consultado 29 de noviembre de 2002.
Disponible en: <http://www.ces.ncsu.edu/depts/pp/notes/oldnotes/no118.htm>
- Ayala, JE; Godínez, R; De Doñan, M. 1991. Efecto del asocio tomate - maíz para el control de *Alternaria solani* y *Phytophthora infestans* en el valle de Zapotitlán. In Reunión anual PCCMCA (1991, Panamá). p.112- 118.
- Baker, FK; Cook, JR. 1982. *Biological control of plant pathogens*. St. Paul, Minnesota, American Phytopatological Society. 433 p.
- Baptista, FJ; Navas, LM; Bayley, BJ; Meneses, JF. 2000. Validation of a dynamic greenhouse climatic model in Portugal. *Acta Horticulturae* 534: 163- 170.
- Berto, P; Haissam, M; Lepoivre, P. 2001. Possible role of colonization and cell wall-degrading enzymes in the differential ability of three *Ullocladium atrum* strains to control *Botrytis cinerea* on necrotic strawberry leaves. *Phytopathology* 91 (11): 1030- 1036.
- Bharath, S; Phillips, W; Krauss, U. 1999. Practical notes on work with *Phytophthora* species. In *Workshop manual. Research Methodology in Biocontrol of Plant Diseases: with Special Reference to Fungal Diseases of Cocoa*. Eds. U Krauss; P Hebbbar. Turrialba, CR, CATIE, USDA, CABI Bioscience. p. 123- 133.

- Bonilla Alarcón, CR; Alvarez, G; Hernández Ola, F. 1997. Efecto de cuatro extractos vegetales en el control del tizón tardío (*Phytophthora infestans*) en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*) en la aldea Poza Verde, Jalapa. In Manejo ecológico de enfermedades agrícolas. Proceso de capacitación para profesionales, Guatemala, ALTERTEC. p 122- 138.
- Borda, F; Arbeláez, G. 1985. Control del marchitamiento vascular del pepino ocasionado por *Fusarium oxysporum* Schl. Con el aislamiento T-95 de *Trichoderma harzianum* Rifai. Fitopatología Colombiana 11 (2): 10- 15.
- CATIE. 1990. Guía para el Manejo Integrado de Cultivo de Tomate. Serie Técnica. Informe Técnico no. 151. Turrialba, Costa Rica. 138 p.
- De Vis, R. 1999. Factores en el control de clima en invernaderos. In Clima, Fisiología y Producción de Cultivos Bajo Invernadero. Centro de Investigaciones y Asesorías Agroindustriales CIAA, Universidad de Bogotá. Eds. R Lee. p. 9-17.
- Eden, MA; Hill, RA; Steward, A. 1996. Biological control of *Botrytis* stem infection of greenhouse tomatoes. Plant Pathology 45: 276- 284.
- Elad, Y. 2000. *Trichoderma harzianum* T39 preparation for biocontrol of plant diseases control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. Biocontrol Science and Technology 10: 499- 507.
- Elad, Y; Zimand, G. 1993. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under comercial greenhouse conditions. Plant Pathology 42: 324- 332.
- Elad, T; Yunis, H; Katan, T. 1992. Multiple fungicide resistance to benzimidazoles dicarboximides and diethofencarb in field isoletes of *B.cinerea* in Israel. Plant Pathology 41: 41- 46.
- Elad, Y. 1994. Biological control of grape grey mould by *Trichoderma harzianum*. Crop Protection 13 (1): 35- 38.

- Elizalde Miranda, G; Romero Cova, S. 1994. Plagas y enfermedades de la Begonia Tuberosa. Editorial Universitario. Universidad Autónoma de Chapingo. 34p.
- Elzakker, Bo van. 1995. Principios y Prácticas de la Agricultura Orgánica en el Trópico. Editorial Fundación Guilombé, San José, CR. 128 p.
- Haissam, M; Lepoivre, P; Grevesse, C. 1999. Yeast species for biocontrol of apple postharvest diseases: An encouraging case study for practical use. Biotechnological Approaches in Biocontrol of Plant Pathogens. New York. Kluwer Academic/ Plenum Publishers.
- Jongebloed, PH; Kessel, GJ; Van der Plans, CH; Molhoek, WM; Fokkema, NJ. 1993. Biological control of *Phytophthora infestans* with selected bacterial antagonists. In Proceedings ICPP 6 Montreal (Abstract).
- INFOAGRO. 2003. *Botrytis cinerea*, agente causal de la podredumbre gris. Técnicas para el control. Consultado el 30 de setiembre de 2003.
Disponible en: <http://www.infoagro.com/abonos/botrytis.asp>
- Jarvis, WR. 1992. Managing diseases in greenhouse crops. American Phytopathological Society, ST Paul, MN. 228p.
- Jindal, KK; Sing, H; Madhu, M; Meeta, M. 1988. Biological control of *Phytophthora infestans* on potato. Indian Journal of Plant Pathology 6 (1): 59- 62.
- Kohl, J; Gerlagh, M; De Haas, B; Krijger, M. 1998. Biological control of *Botrytis cinerea* in cyclamen with *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* under commercial growing conditions. Phytopathology 88 (6): 568- 575.
- Krauss, U. 1999. Pre-screening of biocontrol agents. In Workshop manual. Research methodology in biocontrol of plant diseases: with special reference to fungal diseases of cocoa. Eds. U Krauss; P Hebbar. Turrialba, CR, CATIE, USDA, CABI Bioscience. p. 55-62.

- Krauss, U; Bustamante, E. 1999. Isolation of native fungal and bacterial antagonists against plant diseases. *In* Workshop manual. Research methodology in biocontrol of plant diseases: with special reference to fungal diseases of cocoa. Eds. U Krauss, P Hebra. Turrialba, CR, CATIE, USDA, Cabi bioscience. p. 38-43.
- Leroux, P; Chapeland, F; Desbrosses, D, Gredt, M. 1999. Patterns of cross – resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection* 18: 687- 697.
- Latorre, BA; Agostín, E; San Martín, R; Vázquez, GS. 1997. Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against *Botrytis* bunch rot of table grape in Chile. *Crop Protection* 16 (3): 209- 214.
- Leiner, R. 2003. IPM de Alaska. El problema: *Botrytis* sp.(molde gris). Consultado el 30 de setiembre de 2003.
Disponible en: <http://www.ipmofalaska.com>
- Lenteren, J van. 2000. A greenhouse without pesticides: fact or fantasy ?. *Crop Protection* 19: 375- 384.
- Mari, M; Guizzardi, M; Brunelli, M; Folchi, A. 1996. Postharvest biological control of grey mould (*Botrytis cinerea* pers. : Fr.) on fresh – market tomatoes with *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Protection* 15 (8): 699- 705.
- McKenzie, L; Binzi, D; Dellavalle, D; Gullino, M. 1991 Survival on the phylloplane of strains of *Trichoderma* spp. antagonistic to *Botrytis cinerea*. *Petria (Italy)* 1 (2): 133- 134.
- Melgarejo, P; Raposo, R; Moyano, C; Gómez, V. 2002. Control integrado de *Botrytis cinerea* en cultivos hortícolas de invernadero. *Phytoma (España)* 135: 125- 127.
- Morgan, VM. 1984. The effect of night temperature and glasshouse ventilation on the incidence of *Botrytis cinerea* in a late- planted tomato crop. *Crop Protection* 3:243 - 251.

- Moyano, C; Raposo, R; Gómez, V; Melgarejo, P. 2003. Integrated *Botrytis cinerea* Management in Southeastern Spanish Greenhouses. *Journal of Phytopathology* 151: 80- 85.
- Paulitz, TC; Bélanger, RR. 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annual of Review of Phytopathology* 39: 103- 133.
- Paul, B. 2002. Suppression of *Botrytis cinerea* causing the grey mould of grapevine by an aggressive mycoparasite, *Pythium prolatum*. Consultado el 29 de noviembre de 2002.
Disponible en: <http://www.u-bourgogne.fr/IUVV/FEMS99.html>
- Pérez Grajales, M. 1998. Producción de hortalizas en invernadero con énfasis en el cultivo de jitomate. In *Temas selectos en Fitosanidad y Producción de Hortalizas*. Eds. N Bautista; A Suárez; O Morales. Chapingo, Méjico. Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma Chapingo, p. 151-168.
- Pérez Mancía, JE; Sánchez Garita, V. 2000. Efecto de los sustratos celulosa y glucano sobre antagonistas de *Phytophthora infestans* en tomate. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 58: 45- 53.
- Rosslenbroich, HJ; Stuebler, D. 2000. *Botrytis cinerea* – history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* 19: 557- 561.
- Salazar, H; Castro, R 1994. Evaluación y manejo de enfermedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) bajo invernadero. *Agronomía (Col)* 6 (3): 29- 34.
- Sánchez Garita, V; Bustamante, E; Shattock, R. 1998. Control microbiológico de *Phytophthora infestans* en tomate. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 51: 47- 58.
- Sánchez Garita, V; Bustamante, E; Shattock, R. 1998. Selección de antagonistas para el control biológico de *Phytophthora infestans* en tomate. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 48: 25- 32.

- Sandoval Vázquez, JF. 2002. Precios reales para productos agrícolas Servicio de Información de Mercados, Consejo Nacional de Producción (CNP). 6 p.
- Santiago, J; Mendoza, M; Borrego, F. 1998. Evaluación de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) en invernadero: Criterios fenológicos y fisiológicos. *Agronomía Mesoamericana* (Méjico) 9 (1): 59 – 65.
- Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria (SEPSA). 2002. Estadísticas agropecuarias. Boletín Estadístico no. 12: Estudios económicos e información. 30 p.
- Sherb, A; MacNab, A. 1986. *Vegetable diseases and their control*. 2 ed. New Cork. John Wiley & Son, Inc. 728 p.
- Silva- Ribeiro, R; Termignoni, C; Dillon, A; Henriques, J. 2001. Efeito letal de cinco linhagens de *Trichoderma spp.* sobre o fitopatógeno *Botrytis cinerea*. *Summa Phytopatologica* 27 (4): 364- 369.
- Shtienberg, D; Elad, Y. 1997. Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of *Botrytis cinerea*. *Phytopatology* 87 (3): 332-340.
- Sutton, JC; Liu, W; Huang, R; Owen-Going, N 2002. Ability of *Clonostachys rosea* to establish and suppress sporulation potencial of *Botrytis cinerea* in deleafed stems of hydroponic greenhouse tomatoes. *Biocontrol Science and Tecnology* 12: 413-425.
- Tronsmo, A. 1989. Effect of fungicides and insecticidas on growth of *Botrytis cinerea*, *Trichoderma viride* and *T. harzianum*. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences* 3 (2): 151- 156.
- Turkensteen, WG; Flier, R; Wanningen, R; Mulder, A. 2000. Production, survival and infectivity of oospores of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* 49: 688- 696.

University of Florida. 2003. The Phylogeny of Life. Consultado el 29 de noviembre de 2002.

Disponible en: <http://www.UCMPPhytogeny>

Utkhede, RS; Manthur, S. 2002. Biological control of stem canker of greenhouse tomatoes caused by *Botrytis cinerea*. Canadian Journal of Microbiology 48: 550- 554.

Virgen, G; Vázquez, M; López, JM; Salas, MR. 1991. Inhibición de la germinación de *Botrytis sp.* y *Phragmadium sp.* con extractos acuosos de meliáceas y liliáceas. In Memorias del II Simposio y I Reunión Nacional de Agricultura Sostenible. Un enfoque agroecológico, socioeconómico y de desarrollo. Guadalajara, Méjico. Comisión de Estudios Ambientales, CP. IICA. p. 151-153.

Zimand, G; Elad, Y; Chet, I. 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. Phytopathology 85: 1255- 1260.

8. ANEXOS

Anexo 1. Lista de antagonistas de moho gris (*B. cinerea*), recolectados en el cantón de Turrialba

CODIGO	SITIO	DISTRITO *	FINCA
1101	CATIE	Primero	Montaña
1102	Orieta	Santa Cruz	Eduardo Castillo
1103	Orieta	Santa Cruz	Eduardo Castillo
1104	Colorado	Primero	Francisco Salas
1105	CATIE	Primero	Montaña
1106	CATIE	Primero	Colección
1107	CATIE	Primero	Colección
1108	CATIE	Primero	CATIE
1109	San Antonio	Santa Cruz	Oscar Mazza
1110	San Antonio	Santa Cruz	Oscar Mazza
1111	San Antonio	Santa Cruz	Oscar Mazza
1112	San Juan	Primero	Guillermo Campos
1113	San Juan	Primero	Guillermo Campos
1114	San Antonio	Santa Cruz	Oscar Mazza
1115	San Antonio	Santa Cruz	Oscar Mazza
1116	San Juan	Primero	Guillermo Campos
1117	CATIE	Primero	Colección
1118	San Juan	Primero	Guillermo Campos
1119	Orieta	Santa Cruz	Eduardo Castillo
1401	Santa Cruz	El Carmen	Mauricio Solano
1402	Santa Cruz	El Carmen	Mauricio Solano
1403	Santa Cruz	El Carmen	Mauricio Solano
1404	Santa Cruz	El Carmen	Mauricio Solano
1405	Santa Cruz	El Carmen	Mauricio Solano
1406	Santa Cruz	El Carmen	Mauricio Solano
1407	Torito	Santa Cruz	Gerardo Arias
1408	Torito	Santa Cruz	Gerardo Arias
1409	Torito	Santa Cruz	Gerardo Arias

1410	San Antonio	Santa Cruz	Gerardo Arias
1411	CATIE	Primero	Montaña
1412	CATIE	Primero	Montaña
1413	CATIE	Primero	Montaña
1414	Torito	Santa Cruz	Gerardo Arias
1415	CATIE	Primero	Montaña
2101	San Martín	Primero	Martín Hernández
2102	San Martín	Primero	Martín Hernández
2103	San Martín	Primero	Martín Hernández
2104	San Martín	Primero	Martín Hernández
2105	Alto Varas	Primero	Juan Molina
2106	Alto Varas	Primero	Juan Molina
2107	Alto Varas	Primero	Juan Molina
2108	Alto Varas	Primero	Juan Molina
2601	Colorado	Primero	Francisco Salas
2602	Colorado	Primero	Francisco Salas
APP160	CATIE	Primero	Colección
T04	CATIE	Primero	Colección
0401	San Antonio	Santa Cruz	Oscar Mazza
0402	San Antonio	Santa Cruz	Oscar Mazza
0403	Torito	Santa Cruz	Gerardo Arias
0404	San Antonio	Santa Cruz	José Arias
0405	San Antonio	Santa Cruz	José Arias
0406	San Ramón	Santa Teresita	Carlos Solano
0407	San Ramón	Santa Teresita	Carlos Solano
0408	San Antonio	Santa Cruz	Greivin Brenes
0409	San Antonio	Santa Cruz	Greivin Brenes
0410	San Ramón	Santa Teresita	Alvaro Calderón
0411	San Antonio	Santa Cruz	José Pereira
0412	San Ramón	Santa Teresita	Alvaro Calderón

*Todos los lugares están ubicados en el cantón de Turrialba, provincia de Cartago
Los nombres propios corresponden a los dueños de las fincas

Anexo 2. ANDEVA del primer bioensayo en cámara húmeda utilizando hojas desprendidas

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr ? F
Tratamiento	4	5480	1370	3.54	0.0316
Error	15	5800	386.67		
Total	19	11280	1756.67		

R CUADRADO 0.48 COEF DE VARIACIÓN 29.7

RAÍZ DE CUAD MEDIO DEL ERROR 19.66 MEDIA 66

Anexo 3. ANDEVA del segundo bioensayo en cámara húmeda utilizando hojas desprendidas.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr ? F
Tratamiento	4	18680	4670	41.21	? 0.0001
Error	15	1700	113.33		
Total	19	20380	4783.33		

R CUADRADO 0.91 COEF DE VARIACIÓN 25.97

RAÍZ DE CUAD MEDIO DEL ERROR 10.64 MEDIA 41

Anexo 4. ANDEVA del tercer bioensayo en cámara húmeda utilizando hojas desprendidas.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr ? F
Tratamiento	4	1280	320	1.71	0.1991
Error	15	2800	186.67		
Total	19	4080	506.67		

R CUADRADO 0.31 COEF DE VARIACIÓN 18.4

RAÍZ DE CUAD MEDIO DEL ERROR 13.67 MEDIA 74

Anexo 5. ANDEVA del cuarto bioensayo en cámara húmeda utilizando hojas desprendidas.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr ? F
Tratamiento	4	1720	430	1.95	0.1535
Error	15	3300	220		
Total	19	5020	650		

R CUADRADO 0.34 COEF DE VARIACIÓN 23.54

RAÍZ DE CUAD MEDIO DEL ERROR 14.83 MEDIA 63

Anexo 6. ANDEVA del segundo bioensayo en cámara húmeda utilizando hojas desprendidas.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr ? F
Tratamiento	5	5.07291667	1.01458333	9.55	< 0.0001
Rep (tratam)	18	2.47500000	0.13750000	1.29	0.2179
Medición	4	6.15312500	1.53828125	14.48	< 0.0001
Inter Trat. Med	20	4.29687500	0.21484375	2.02	0.0159
Error	72	7.65000000	0.10625000		
Total	119	25.64791667			

R CUADRADO 0.70 COEF DE VARIACIÓN 36

RAÍZ DE CUAD MEDIO DEL ERROR 0.32 MEDIA 0.90

Anexo 7. ANDEVA del ensayo con plantas de chile realizado en un invernadero comercial localizado en San Antonio

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr ? F
Tratamiento	5	5.14166667	1.02833333	5.74	0.0002
Rep (tratam)	18	3.13125000	0.17395833	0.97	0.5014
Medición	4	1.69270833	0.42317708	2.36	0.0611
Inter Trat. Med	20	4.08229167	0.20411458	1.14	0.3320
Error	72	12.90000000	0.17916667		
Total	119	26.94791667			

R CUADRADO 0.52 COEF DE VARIACIÓN 34

RAÍZ DE CUAD MEDIO DEL ERROR 0.42 MEDIA 1.23

Anexo 8. Análisis de correlación entre humedad relativa y temperatura con incidencia de *B. cinerea* en cultivo de chile, en experimento realizado en el invernadero del CATIE

Variable	Pr ? Ir l	Valor de Rho
Temp Max en la semana	0.73	0.21
Temp Min en la semana	0.02	0.92
Temp Max en la semana anterior	0.30	0.58
Temp Min en la semana anterior	0.62	0.30
Temp Max en la semana trasanterior	0.76	-0.19
Temp Min en la semana trasanterior	0.65	0.28
Hum Rel Max en la semana	0.04	0.89
Hum Rel Min en la semana	0.04	0.88
Hum Rel Max en la semana anterior	0.45	0.45
Hum Rel Min en la semana anterior	0.70	-0.24
Hum Rel Max en la semana trasanterior	0.48	-0.42
Hum Rel Min en la semana trasanterior	0.48	-0.42

Anexo 9. Porcentaje de humedad relativa máxima registrada diariamente de 8a.m a 4p.m, durante las semanas de evaluación de la severidad de *B. cinerea* en cultivo de chile. Experimento realizado en el invernadero de CATIE *

DÍAS	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5
S	93	96	100	95	91
D	96	98	88	96	90
L	96	89	100	96	92
M	100	89	100	91	88
M	94	94	98	91	92
J	94	93	98	90	92
V	93	97	94	91	92
TOTAL	666	656	678	650	637
PROMEDIO	95.1	93.8	96.9	92.9	91

* Para el cálculo de correlaciones se utilizaron los promedios semanales

Anexo 10. Porcentaje de humedad relativa mínima registrada diariamente de 8a.m a 4p.m, en cada una de las semanas de evaluación de la severidad de *B. cinerea* en cultivo de Chile. Experimento realizado en el invernadero de CATIE *

DÍAS	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5
S	57	62	52	83	57
D	58	66	48	52	43
L	60	54	64	52	50
M	54	54	65	54	52
M	71	65	85	51	55
J	48	60	60	52	45
V	57	62	64	52	48
TOTAL	405	423	438	396	350
PROMEDIO	57.9	60.4	62.6	56.6	50

* Para el cálculo de correlaciones se utilizaron los promedios semanales

Anexo 11. Temperatura máxima (°C) registrada diariamente de 8a.m a 4p.m, en cada una de las semanas de evaluación de la severidad de *B. cinerea* en cultivo de chile. Experimento realizado en el invernadero de CATIE *

DÍAS/SEMAN	1	2	3	4	5
A					
S	30	28	28	24	27
D	28	27	31	30	27
L	27	31	29	29	26
M	30	29	29	30	30
M	21	28	25	29	29
J	28	28	30	28	30
V	28	27	28	26	29
TOTAL	192	198	200	196	198
PROMEDIO	27.4	28.3	28.6	28	28.3

* Para el cálculo de correlaciones se utilizaron los promedios semanales

Anexo 12. Temperatura mínima (°C) registrada diariamente de 8a.m a 4p.m, en cada una de las semanas de evaluación de la severidad de *B. cinerea* en cultivo de chile. Experimento realizado en el invernadero de CATIE *

DÍAS/SEMAN	1	2	3	4	5
A					
S	18	20	21	21	18
D	19	22	21	18	18
L	21	22	21	20	17
M	21	21	21	19	26
M	22	22	22	20	22
J	21	21	20	19	19
V	22	21	21	18	18
TOTAL	144	149	147	135	138
PROMEDIO	20.6	21.28	21	19.3	19.7

* Para el cálculo de correlaciones se utilizaron los promedios semanales

Anexo 13. ANDEVA del experimento de variedades de tomate resistentes a *P. Infestans*, realizado en la finca de producción orgánica en San Juan Sur de Turrialba

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr ? F
Tratamiento	2	8254.17	4127.08	7.4	0.024
Bloques	3	172.92	57.64	0.1	0.9551
Error	6	3345.83	557.64		
Total	11	11772.92			

* Para el cálculo de correlaciones se utilizaron los promedios semanales

R CUADRADO	0.72	COEF DE VARIACIÓN	47
RAÍZ DE CUAD MEDIO DEL ERROR	18	MEDIA	37.9