

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION
ESCUELA DE POSTGRADO

**EFFECTO DE SUSTRATOS, CELULOSA Y GLUCANO,
SOBRE ANTAGONISTAS DE *Phytophthora infestans* EN TOMATE**

POR

JUANA ELIZABETH PEREZ MANCIA



CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA (CATIE)
PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACIÓN
ESCUELA DE POSTGRADO

EFFECTO DE SUSTRATOS, CELULOSA Y GLUCANO, SOBRE ANTAGONISTAS DE
Phytophthora infestans EN TOMATE

Tesis sometida a la consideración de la Escuela de Postgrado del Programa de Enseñanza para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza para optar al grado de :

Magister Scientiae

por

JUANA ELIZABETH PÉREZ MANCÍA

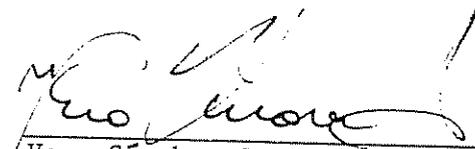
TURRIALBA, COSTA RICA

1998

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Dirección de la Escuela de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:



Vera Sánchez Garita, Ph.D.
Profesor Consejero

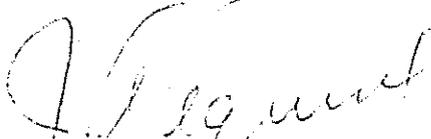


Ana Cecilia Tapia, M.Sc.
Miembro Comité Asesor

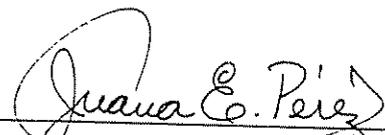


Elkin Bustamante, Ph.D.
Miembro Comité Asesor

Miembro Comité Asesor



Juan Antonio Aguirre, Ph.D.
Director y Decano de la Escuela de Postgrado



Juana Elizabeth Pérez Mabeía
Candidato

DEDICATORIA

A mis padres

Gregorio Alberto Pérez

Gloria Irma Mancía de Pérez

A mi hermano

Eduardo Alberto Pérez Mancía

Por su amor, apoyo y sobre todo por su sacrificio.

AGRADECIMIENTOS

Mis más profundos agradecimientos :

A DIOS TODOPODEROSO, por haberme dado la fortaleza necesaria para concluir mis estudios de maestría.

- A la Dra. Vera Sánchez Garita, por su amistad y apoyo incondicional durante la conducción de la presente investigación.
- Al Dr. Elkin Bustamante, por sus oportunas orientaciones y sugerencias tanto durante la fase de campo como en la elaboración del documento final.
- A la MSc. Ana Cecilia Tapia, por sus observaciones y correcciones en el documento final.
- A mis amigos Ing. Christian Zúñiga, Manrique González, Arturo Gamboa, y Mario Cervantes por su apoyo incondicional y desinteresado, sugerencias y sobre todo por su amistad.
- A Franklin López, y Johnny Pérez por su valiosa colaboración durante el desarrollo de este trabajo.
- A Guadalupe Valenzuela, Ana María Domínguez, Ivette Girón, Emelda Yah y Joaquín Durán por su constante apoyo y en especial por su sincera amistad.
- A "grupo".
- Al Servicio Alemán de Intercambio Académico, DAAD, por haber financiado mis estudios de maestría.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....		iii
# AGRADECIMIENTOS.....		iv
RESUMEN.....		viii
SUMMARY.....		x
LISTA DE CUADROS.....		xii
LISTA DE FIGURAS.....		xiv
LISTA DE ANEXOS.....		xv
1. INTRODUCCION.....		1
1.1 Objetivos.....		2
1.1.1 General.....		2
1.1.2 Específicos.....		2
1.2 Hipótesis.....		3
2. REVISION DE LITERATURA.....		4
2.1. Generalidades de <i>P. infestans</i>		4
2.2. Origen y distribución de <i>P. infestans</i>		5
2.3. Desarrollo de la enfermedad.....		7
2.4. Síntomas observados en tomate.....		9
2.5. Relaciones entre hospederos y <i>P. infestans</i>		10
2.6. Manejo de la enfermedad.....		11
2.6.1. Resistencia genética.....		11
2.6.2. Control Químico.....		12
2.6.3. Control Biológico.....		13
2.6.3.1. El Filoplano como hábitat de microorganismos.....		14
2.6.3.2. Antagonismo en <i>Phytophthora</i>		16
2.6.3.3. Antagonismo a <i>Phytophthora infestans</i>		17
2.6.3.4. Formulaciones.....		19
2.6.3.5. Sustratos.....		21

3.	MATERIALES Y METODOS	23
3.1.	Localización.....	23
3.2.	Procedimiento general.....	23
3.2.1.	Producción de plantas	23
3.2.2.	Recolección y mantenimiento del inoculo de <i>P. infestans</i>	23
3.2.3.	Mantenimiento y reproducción de antagonistas.....	24
3.2.4.	Preparación de sustratos.....	25
3.3.	Evaluación de sustratos y antagonistas a <i>P. infestans</i> en los cultivares de tomate Hayslip y Perialine	26
3.3.1.	Aplicación de sustratos	27
3.3.2.	Inoculación de antagonistas.....	27
3.3.3.	Inoculación de <i>P. infestans</i>	27
3.3.4.	Variables evaluadas.....	28
3.3.5.	Análisis de resultados.....	28
3.3.6.	Recuperación de antagonistas.....	29
3.4.	Evaluación de tres concentraciones de <i>P. infestans</i> en tomate cultivar Perialine.....	30
3.5.	Evaluación del efecto de las épocas de aplicación de sustratos sobre los antagonistas de <i>P. infestans</i>	31
3.6.	Evaluación del efecto de formulaciones sobre antagonistas de <i>P. infestans</i>	32
4.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	34
4.1.	Efecto de sustratos sobre los antagonistas de <i>P. infestans</i>	34
4.1.1.	Efecto de los antagonistas sobre el patógeno.....	34
4.1.2.	Efecto de los sustratos sobre la actividad de los antagonistas.....	37
4.1.2.1.	Celulosa.....	37
4.1.2.2.	Glucano.....	42
4.1.3.	Efecto de los sustratos sobre el patógeno.....	47
4.1.4.	Efecto de sustratos y antagonistas en el periodo de incubación de la enfermedad.....	49
4.1.5.	Recuperación de antagonistas.....	51
4.1.6.	Efecto del cultivar sobre <i>P. infestans</i>	53
4.2.	Evaluación de tres concentraciones de <i>P. infestans</i> en tomate cultivar Perialine.....	53
4.3.	Evaluación del efecto de las épocas de aplicación de sustratos sobre los antagonistas de <i>P. infestans</i>	54

4.4	Evaluación del efecto de formulaciones sobre antagonistas de <i>P. infestans</i>	57
5	CONCLUSIONES.....	61
6	RECOMENDACIONES.....	63
7	LITERATURA CITADA.....	64
8	ANEXOS.....	70

PEREZ MANCIA, J.E. 1998 Efecto de sustratos, celulosa y glucano, sobre antagonistas de *Phytophthora infestans* en tomate.

Palabras claves: control biológico, antagonistas, celulosa, glucano, *Phytophthora infestans*, tomate, formulaciones.

RESUMEN

El tomate es un cultivo muy rentable y ampliamente distribuido en toda el área centroamericana, su producción se ve limitada por el ataque de patógenos, como *Phytophthora infestans*, causante del tizón tardío. En este trabajo se evaluó el efecto de dos sustratos, celulosa (1 y 2 g/L) y glucano (40 y 80 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v), cinco organismos antagonistas provenientes de la colección de CATIE: *Serratia* sp. (054), *Penicillium* spp. (067 y 071), *Trichoderma* sp. (069) y *Fusarium* sp. (108), sobre el desarrollo de *Phytophthora infestans* en los cultivares de tomate Hayslip y Peraline bajo techo. Veinticuatro horas después de aplicados los sustratos se inocularon los antagonistas (10^5 esporas y 10^7 unidades formadoras de colonias de los aislamientos de hongos y bacterias respectivamente) y 48 horas después el inoculo de *P. infestans* (8×10^3 esporangios/ml) en los tres folíolos terminales de las hojas tercera y cuarta de cada planta. El inoculo del patógeno se mantuvo *in vivo* en hojas de tomate del cultivar Hayslip. Se hicieron observaciones diarias de la severidad de la enfermedad según el porcentaje de área foliar afectada (PAFA) en los folíolos inoculados y del periodo de incubación. Se realizaron recuperaciones de antagonistas del follaje de las plantas inoculadas a los ocho y quince días después de haberse aplicado. La metodología desarrollada para la inoculación del patógeno bajo techo resultó efectiva con una excelente infección del hongo en plantas testigo. Todos los antagonistas evaluados mostraron un efecto claro de interferencia sobre el desarrollo de la enfermedad en condiciones bajo techo pues disminuyeron la severidad de la enfermedad en más de un 200% respecto al testigo. *Penicillium* sp. (067) fue el mejor antagonista ya que presentó

la menor severidad cuando fue aplicado con sustratos y no permitió el desarrollo de la enfermedad cuando se aplicó sin sustratos, características que le dan un alto potencial como agente de control biológico de *P. infestans*. Los sustratos ejercieron un efecto negativo sobre *Trichoderma* sp. (069) ya que la severidad de la enfermedad aumentó cuando dicho antagonista se inoculó posteriormente a la aplicación de sustratos. La severidad observada con los antagonistas fue mayor cuando se aplicó glucano que cuando se usó celulosa, independientemente de las concentraciones evaluadas. El mejor sustrato evaluado fue celulosa 2 g/L pues se observaron los menores niveles de severidad y mayores periodos de incubación al combinarse con los antagonistas evaluados, a excepción de *Trichoderma* sp. (069). No se observó efecto antagónico cuando el sustrato (celulosa 2 g/L) y el antagonista (*Penicillium* sp. 067) fueron aplicados 1 ó 2 semanas antes del patógeno. La mejor época para recuperar antagonistas del follaje inoculado fue a los 8 días después de su inoculación. El cultivar Pieraline presentó tolerancia al ataque de *P. infestans* pues no presentó síntomas de la enfermedad. Bajo condiciones ambientales naturales la formulación con aceite y agua favoreció el efecto antagonista, únicamente de *Fusarium* sp. (108). Los resultados obtenidos aportan información importante para el control biológico de *P. infestans* y sugieren la necesidad de continuar investigando con otros antagonistas y combinaciones de sustratos.

SUMMARY

Key words : biological control, antagonism, antagonist, cellulose, glucane, *Phytophthora infestans*, tomato, formulations.

Tomato is a very profitable and widely distributed crop in the Central American region however, its yield are constrained by attacks by pathogens, such as *P. infestans*, which causes late blight disease. This investigation evaluated the effect of two foliar amendments, cellulose (1 and 2 g/L) and glucane (40 and 80 g/L of colloidal glucane 0.28% p/v), and five antagonists obtained from the CATIE's collection namely, *Serratia* sp. (054), *Penicillium* spp. (067 y 071), *Trichoderma* sp. (069) and *Fusarium* sp. (108), on the development of *P. infestans* in tomato plants cvs. Hayslip and Peraline. The antagonists were inoculated with fungi and bacterium isolates (10^5 spores and 10^7 colony forming units, respectively) 24 h after the application of the foliar amendments. Forty eight hours later, *P. infestans* inoculum (8×10^3 sporangia/ml) was applied to three terminal leaflets of the third and fourth leaves of each plant. The inoculum of the pathogen was conserved *in vivo* in the leaves of tomato cv. Hayslip. Disease severity, measured as the percentage of leaf area infected (PLAI) in the inoculated leaflets, was evaluated daily and the duration of the incubation period noted. Antagonists were recovered from the foliage of the plant eight and 15 days after application. The methodology developed for inoculating pathogens in experimental environment was effective because *P. infestans* performed very well in the control plants. All the antagonists evaluated showed a clear effect of interfering with disease development under controlled conditions because disease severity was diminished by more than 200% compared to the control. *Penicillium* sp (067) was the best antagonist having presented the least severity when applied with foliar amendments and, in addition, did not allow

disease development when applied without foliar amendments. These results suggest that this antagonist has a high potential as a biological control agent of *P. infestans*. The foliar amendments had a negative effect on *Trichoderma* sp. (069) due to the fact that disease severity increased when this antagonist was inoculated after applying amendments. The disease severity observed was greater with glucane than with cellulose, irrespective of the concentration used. The best foliar amendment evaluated was cellulose (2 g/L) because lower levels of disease severity and longer incubation periods were observed when combined with the evaluated antagonists, except with *Trichoderma* sp. (069). No antagonistic effect was observed when the foliar amendments and the antagonists were applied one or two weeks before the pathogen. The best period to recover antagonist in the inoculated foliage was eight days after inoculation. Tomato cv. Peraline was tolerant to *P. infestans* infection because no disease symptoms were observable. Under natural environmental conditions oil and water formulations favored the antagonist effect but only in *Fusarium* sp. (108). These results provide important information on the biological control of *P. infestans* and suggest the need to continue working with other antagonist and combinations of foliar amendments.

LISTA DE CUADROS

<i>Cuadro 1.</i> - Características de antagonistas evaluados. CATIE, Costa Rica	25
<i>Cuadro 2.</i> - Tratamientos evaluados.....	26
<i>Cuadro 3.</i> - Efecto de cinco antagonistas evaluados sobre el desarrollo del tizón tardío, de acuerdo a los valores promedio de Area Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE).....	37
<i>Cuadro 4.</i> - Efecto de celulosa 2 g/L sobre los cinco antagonistas evaluados de acuerdo al Area Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE) promedio.....	39
<i>Cuadro 5.</i> - Efecto de celulosa 1 g/L sobre los cinco antagonistas evaluados de acuerdo al Area Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE) promedio.....	42
<i>Cuadro 6.</i> - Efecto 80 g/L de Glucano coloidal 0.28% p/v sobre los cinco antagonistas evaluados de acuerdo al Area Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE) promedio.....	44
<i>Cuadro 7.</i> - Efecto 40 g/L de Glucano coloidal 0.28% p/v sobre los cinco antagonistas evaluados de acuerdo al Area Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE) promedio.....	46
<i>Cuadro 8.</i> - Efecto de celulosa y glucano, en dos dosis diferentes, sobre los antagonistas evaluados de acuerdo al Area Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE) promedio.....	49
<i>Cuadro 9.</i> - Periodo de incubación promedio observado por los cinco antagonistas y el testigo.....	50
<i>Cuadro 10.</i> - Periodo de incubación promedio observado en los cuatro sustratos evaluados y el testigo.....	51
<i>Cuadro 11.</i> - Antagonistas recuperados en cada sustrato a los 8 y 15 días después de inoculados.....	52
<i>Cuadro 12.</i> - Efecto de dos épocas de aplicación, una o dos semanas antes de <i>Penicillium</i> sp. (067) y celulosa (2 g/L) sobre el desarrollo de tizón tardío de acuerdo al Area Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad promedio.....	56
<i>Cuadro 13.</i> - Periodo de incubación promedio observado en los cuatro tratamientos evaluados y el testigo.....	57
<i>Cuadro 14.</i> - Efecto de la formulación sobre <i>Penicillium</i> sp. (067) y <i>Fusarium</i> sp. (108) de acuerdo al Area Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad promedio.....	59

Cuadro 15.- Periodo de incubación promedio observado en los cuatro tratamientos evaluados y el testigo	60
--	----

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> - Efecto de cinco antagonistas en el desarrollo del tizón tardío, expresado como Porcentaje de Area Foliar Afectada (PAFA), a través de 10 días de evaluación.....	36
<i>Figura 2.</i> - Efecto de cinco antagonistas, usando celulosa 2 g/L como sustrato, en el desarrollo del tizón tardío, expresado como Porcentaje de Area Foliar Afectada (PAFA), a través de 10 días de evaluación.....	38
<i>Figura 3.</i> - Efecto de cinco antagonistas, usando celulosa 1 g/L como sustrato, en el desarrollo del tizón tardío, expresado como Porcentaje de Area Foliar Afectada (PAFA), a través de 10 días de evaluación.....	40
<i>Figura 4.</i> - Efecto de cinco antagonistas, usando 80 g/L de glucano coloidal al 0.28% p/v como sustrato, en el desarrollo del tizón tardío, expresado como Porcentaje de Area Foliar Afectada (PAFA), a través de 10 días de evaluación.....	43
<i>Figura 5.</i> - Efecto de cinco antagonistas, usando 40 g/L de glucano coloidal al 0.28% p/v como sustrato, en el desarrollo del tizón tardío, expresado como Porcentaje de Area Foliar Afectada (PAFA), a través de 10 días de evaluación.....	45
<i>Figura 6.</i> - Efecto de celulosa y glucano, cada uno en dos dosis diferentes, en el desarrollo del tizón tardío, expresado como Porcentaje de Area Foliar Afectada (PAFA), a través de 10 días de evaluación.....	48
<i>Figura 7.</i> - Efecto de los cinco tratamientos evaluados en el desarrollo del tizón tardío, expresado como Porcentaje de Area Foliar Afectada (PAFA), a través de 11 días de evaluación.....	55
<i>Figura 8.</i> - Efecto de los cinco tratamientos evaluados en el desarrollo del tizón tardío, expresado como Porcentaje de Area Foliar Afectada (PAFA), a través de 11 días de evaluación.....	59

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1A.- Tratamientos evaluados en el ensayo "Evaluación de sustratos y antagonistas a <i>P. infestans</i> en los cultivares de tomate Hayslip y Peraline".....	71
ANEXO 2A.- Análisis de varianza para la variable Porcentaje de Area Foliar Afectada, PAFA (severidad). Ensayo evaluación de sustratos y antagonistas a <i>P. infestans</i> en los cultivares de tomate Hayslip y Peraline. Los valores de severidad se transformaron $\sqrt{(x+0.5)}$	73
ANEXO 3A.- Análisis de varianza para la variable Area Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad. Ensayo evaluación de sustratos y antagonistas a <i>P. infestans</i> en los cultivares de tomate Hayslip y Peraline.....	75
ANEXO 4A.- Análisis de varianza para la variable Periodo de Incubación. Ensayo evaluación de sustratos y antagonistas a <i>P. infestans</i> en los cultivares de tomate Hayslip y Peraline.....	76
ANEXO 5A.- Análisis de varianza para la variable Porcentaje de Area Foliar Afectada PAFA (severidad). Ensayo evaluación del efecto de las épocas de aplicación de sustratos sobre los antagonistas de <i>P. infestans</i> . Los valores de severidad se transformaron $\sqrt{(x+0.5)}$	77
ANEXO 6A.- Análisis de varianza para la variable Area Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad. Ensayo evaluación del efecto de las épocas de aplicación de sustratos sobre los antagonistas de <i>P. infestans</i>	78
ANEXO 7A.- Análisis de varianza para la variable Periodo de Incubación. Ensayo evaluación del efecto de las épocas de aplicación de sustratos sobre los antagonistas de <i>P. infestans</i>	79
ANEXO 8A.- Análisis de varianza para la variable Porcentaje de Area Foliar Afectada PAFA (severidad). Ensayo evaluación del efecto de formulaciones sobre antagonistas de <i>P. infestans</i> . Los valores de severidad se transformaron $\sqrt{(x+0.5)}$	80
ANEXO 9A.- Análisis de varianza para la variable Area Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad. Ensayo evaluación del efecto de formulaciones sobre antagonistas de <i>P. infestans</i>	81
ANEXO 10A.- Análisis de varianza para la variable Periodo de Incubación. Ensayo evaluación del efecto de formulaciones sobre antagonistas de <i>P. infestans</i>	82

EFFECTO DE SUSTRATOS, CELULOSA Y GLUCANO, SOBRE ANTAGONISTAS DE *Phytophthora infestans* EN TOMATE

1. INTRODUCCION

El tomate es un cultivo muy rentable y ampliamente distribuido en toda el área centroamericana, su producción se ve limitada por el ataque de muchos patógenos, como *Phytophthora infestans*, hongo causante del tizón tardío; enfermedad ampliamente difundida y de importancia económica ya que, por sus características epidemiológicas, provoca drásticas reducciones en los rendimientos y altos costos de control reducen los ingresos del agricultor. Cuando las condiciones de clima y suelo son favorables, el tizón tardío puede destruir totalmente campos sembrados con tomate al cabo de una o dos semanas (CATIE, 1990).

En Costa Rica y en la mayoría de países del área centroamericana, el control del tizón tardío en tomate, depende principalmente de la aplicación de fungicidas ya que la mayoría de cultivares sembrados son altamente susceptibles. La mayoría de agricultores deben realizar aplicaciones repetidas de fungicidas, dos veces a la semana durante la estación lluviosa, tanto con compuestos sistémicos como protectores (Calvo *et al.*, 1992) para mantener la enfermedad bajo control. Pero estas aplicaciones continuas de fungicidas perjudican no sólo la salud del agricultor, la de los consumidores y además contribuyen a la contaminación del suelo, el agua y en general del medio ambiente.

Con el propósito de mantener la sostenibilidad del agroecosistema es necesario involucrar, dentro de la prácticas actuales de manejo integrado del tizón tardío, estrategias relacionadas con el control biológico de enfermedades foliares, como las

aplicaciones de sustratos para incrementar las poblaciones de antagonistas a *P. infestans* en el follaje o las aplicaciones de antagonistas formulados y contrarrestar así el efecto negativo de dicha enfermedad y promover el empleo de prácticas de control amigables con el medio ambiente.

1.1 Objetivos

1.1.1 General

Determinar el efecto de dos sustratos (celulosa y glucano) y cinco organismos antagonistas sobre el desarrollo de *Phytophthora infestans* en tomate.

1.1.2 Específicos

Identificar cuál de los dos sustratos (glucano o celulosa) y cuál de las dos dosis tienen mejor efecto para incrementar las poblaciones de organismos antagonistas a *Phytophthora infestans* en el follaje de tomate.

Determinar cuál o cuáles de los microorganismos presentan un mejor efecto antagónico sobre *Phytophthora infestans*.

Determinar si diferentes épocas de aplicación de sustratos y antagonistas influyen sobre la capacidad para reducir la severidad de *Phytophthora infestans*.

Determinar si la formulación tiene algún efecto sobre la capacidad antagónica de los microorganismos.

1.2 Hipótesis

Las aplicaciones de celulosa y glucano (sustratos) no incrementan las poblaciones de organismos antagonistas a *Phytophthora infestans* en el follaje de tomate.

Las dosis de aplicación de celulosa y glucano no influyen en el incremento de las poblaciones de antagonistas a *Phytophthora infestans*.

El desarrollo de *Phytophthora infestans* en tomate no es afectado por organismos antagonistas.

Las épocas de aplicación de sustratos no influyen sobre la capacidad de los antagonistas para controlar a *Phytophthora infestans*.

La aplicación de los antagonistas formulados no tiene efecto sobre la capacidad antagónica de los microorganismos.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Generalidades de *P. infestans*

P. infestans, agente causal del tizón tardío del tomate y la papa, fue descubierto en Europa en 1845, cuando causó efectos desastrosos en la producción de papa y originó gran hambruna en Irlanda (Gregory, 1983 ; Bourke, 1991). De Bary (1876), siguiendo las consideraciones preliminares hechas por Montage identificó al agente causal del tizón tardío de la papa y lo llamó *Phytophthora infestans*.

P. infestans pertenece a la clase Oomicetes, orden Peronosporales, y familia Pythiaceae. Su micelio es cianocítico, de pared celular compuesta principalmente por glucano, pero también contiene celulosa y carece de quitina (Alexopoulos y Mims, 1979 ; Erwin y Ribeiro, 1996) ; tiene núcleos diploides y vegetativos, puede reproducirse tanto sexual como asexualmente y además es productor de esporas móviles llamadas zoosporas (Sansome, 1977 ; Brasier, 1992 ; Fry *et al.*, 1993). Presenta dos tipos de apareamiento conocidos, A1 y A2. La interacción entre las hifas de cada tipo de apareamiento opuesto da como resultado la formación de oosporas (Gallegly y Galindo, 1958).

Según Fry y Goodwin (1997) cada individuo es bisexual, capaz de producir tanto estructuras femeninas (oogonios) como masculinas (anteridios). La sexualidad, masculino y femenino, es independiente del tipo de apareamiento (Brasier, 1983 ; 1992), algunos aislados tienden a producir oogonios y otros anteridios y las proporciones de formación de dichas estructuras dependen de las tendencias relativas de los aislamientos parentales para actuar como masculino o femenino. Las oosporas miden de

24 a 35 μm de diámetro (promedio 30 μm) ; en cultivo *in vitro* pueden medir entre 24 a 56 μm de diámetro (Erwin y Ribeiro, 1996), pueden sobrevivir bajo condiciones adversas, como el frío, la sequía y la ausencia de un hospedero durante varios meses y hasta por años (Fry y Goodwin, 1997)

Se ha observado que bajo condiciones de laboratorio *P. infestans* es capaz de autofecundarse y producir oosporas si es estimulado por la presencia de otro hongo como *Trichoderma* (Brasier, 1983) ; daño mecánico o por la presencia de sustancias orgánicas (Reeves y Jackson, 1974 ; Skidmore *et al.*, 1984 y Shattock *et al.*, 1986).

Cuando solo se encuentra presente un tipo de apareamiento el hongo se reproduce asexualmente a través de la producción de esporangios (Fry y Goodwin, 1997) ; los cuales son ovoides, elipsoides a limoniformes, caducos (pedicelo < 3 μm) y semipapilados ; su tamaño promedio varía en un rango de 36 x 22 μm a 29 x 19 μm (Erwin y Ribeiro, 1996). Dependiendo de la temperatura del ambiente, cada esporangio germina directamente vía la producción de tubo germinativo o indirectamente por la liberación de zoosporas móviles mononucleadas y biflageladas. Las zoosporas pueden permanecer móviles por alrededor de una hora antes de enquistar. Subsecuentemente forman tubos germinativos que penetran el tejido del hospedero (Fry y Goodwin, 1997 ; Sherf y Macnab, 1986).

2.2 Origen y distribución de *P. infestans*

French *et al.* (1994) mencionan que *P. infestans* se originó en coevolución con plantas de papas silvestres de México, subcentro de origen de las *Solanum tuberosum*, esta hipótesis se basa en el hecho de haberse encontrado allí inicialmente a los dos

grupos de compatibilidad sexual, A1 y A2 y porque la diversidad genética de *P. infestans* es más alta en el centro de México, particularmente en el Valle de Toluca, que en cualquier otro lugar del mundo (Goodwin *et al.*, 1992).

La primera migración de *P. infestans* incluyó uno o pocos variantes del tipo de apareamiento A1 que aparecieron primero en el noroeste de los Estados Unidos de Norteamérica en 1843 ; de allí continuó posiblemente a través de rutas comerciales a Europa. A mediados de octubre de 1845, la mayor parte del territorio Irlandés fue afectado, y se produjo una gran hambruna que causó la muerte de alrededor de un millón y medio de personas, en esta misma época la enfermedad se diseminó también a Alemania (French *et al.* 1994 ; Fry *et al.* 1993).

Según French *et al.* (1994), la segunda migración de tizón tardío se inició como consecuencia de dos años consecutivos de sequía en Europa, lo cual indujo a la importación de papa de varios países de otros continentes, incluyendo 25,000 toneladas desde México en 1976. En esta ocasión llegaron a Europa Occidental varias variantes del grupo de compatibilidad A1 de *P. infestans*, con mayor agresividad y adaptabilidad, los que se han diseminado y constituido una población nueva de A1 y A2 que ha desplazado a la antigua población A1. La presencia de estos grupos de apareamiento, prácticamente en todo el mundo, permite la producción de oosporas que constituyen una fuente de inóculo primario y estructuras de sobrevivencia (French *et al.* 1994, Fry *et al.*, 1993). Esta segunda migración es mucho más patogénica a tomate y presenta variantes del hongo resistentes a fungicidas sistémicos, lo que afecta el control químico del mismo (French *et al.*, 1994).

En Costa Rica se ha informado únicamente de la presencia del tipo de apareamiento A1 que según su condición genética corresponde a una migración particular procedente posiblemente de México (Sánchez, 1996).

2.3 Desarrollo de la enfermedad

La densidad poblacional de *Phytophthora* cambia con los cambios estacionales de temperatura y humedad (Weste, 1983). Fry y Goodwin (1997), mencionan que las epidemias de tizón tardío son esencialmente explosiones resultado de la rápida reproducción asexual de *P. infestans*. El inoculo puede aumentar en pocos días o semanas (Erwin y Ribeiro, 1996). Este incremento presenta una relación lineal cuando los números de propágulos son bajos pero se vuelve sigmoidea cuando son altos (Weste, 1983). Es considerada una enfermedad multicíclica pues nuevo inoculo es producido continuamente dentro del cultivo después de la infección inicial y mientras las condiciones ambientales sean favorables (Erwin y Ribeiro, 1996).

La producción de esporangios es favorecida por temperaturas entre los 18 y 21°C y una humedad relativa cercana al 100% ; bajo dichas condiciones, el esporangio puede madurar en un período de 3 y 10 horas. Los esporangios son liberados de los esporangióforos y diseminados por el viento a grandes distancias o a cortas distancias por el agua lluvia. Sin embargo, pueden perder rápidamente su viabilidad cuando la humedad relativa se encuentra por debajo del 95% y sobrevivir solamente 5 horas cuando la humedad relativa es del 80% (Agrios, 1986 ; Sherf y MacNab, 1986). Cuando los esporangios establecen contacto con el tejido foliar es necesaria la presencia continua de una película de agua para que se de la infección (Sherf y MacNab, 1986). Dependiendo de la temperatura ambiente los esporangios pueden germinar directamente

o liberar zoosporas. A temperaturas por debajo de los 21°C, los esporangios producen alrededor de 8 zoosporas. La temperatura óptima para formación de zoosporas es 12°C. Las zoosporas nadan en la película de agua, pierden sus flagelos y se enquistan, posteriormente forman un apresorio a partir del cual se forma un haustorio que penetra el tejido foliar. La germinación de las zoosporas puede ocurrir en un período de 2 horas. La temperatura óptima para la germinación de las zoosporas oscila entre los 12 y los 15°C, y para el desarrollo del tubo germinativo oscila entre los 21 y 24°C. Cuando la temperatura ambiente se encuentra entre los 21 y 30°C, a una temperatura óptima de 25°C, los esporangios germinan directamente por medio de un tubo germinativo; esto tarda alrededor de 8 a 48 horas (Agrios, 1986; Robertson, 1991; Sherf y MacNab, 1986).

El hongo penetra la hoja directamente a través de la cutícula y la epidermis, muy pocas veces a través de los estomas. Después de su ingreso, crece intercelularmente y produce haustorios en las células del mesófilo. La temperatura óptima para la colonización se encuentra entre los 22 y los 24°C. Los síntomas iniciales, incluyendo clorosis, pueden manifestarse a los 2 y 3 días después de ocurrida la infección, en el campo los síntomas pueden ser apreciados a los 5 ó 7 días después, algunas veces, hasta los 10 días después de la inoculación. Inmediatamente después que los síntomas son visibles, esporangióforos emergen a través de los estomas y producen esporangios (Sherf y MacNab, 1986). Los esporangióforos son formados en cantidades abundantes en el envés de las hojas donde hay más cantidad de estomas y donde el microclima es más favorable para la esporulación, también son producidos en el tejido del tallo, frutos y flores (Robertson, 1991). Recién emergidos pueden ramificarse una o más veces y terminar en un esporangio que sirve como inóculo secundario repitiendo el ciclo de la

enfermedad varias veces durante el desarrollo del cultivo (Sherf y MacNab, 1986 y Gregory, 1983). En general, el ciclo de la enfermedad (penetración, colonización, esporulación y dispersión) puede ocurrir en menos de cinco días ; cada lesión individual puede producir cerca de 300,000 esporangios (Fry y Goodwin, 1997).

Oogonios y anteridios pueden formarse cuando ambos tipos de apareamiento (A1 y A2) se encuentran presentes en el tejido, esto conlleva a la producción de oosporas (Robertson, 1991) que pueden sobrevivir en el suelo por tiempo indeterminado, meses o quizás años, convirtiéndose en una fuente alternativa de inóculo (Andrivon, 1995). En contraste, en el trópico o sub-trópico donde el tomate y la papa pueden cultivarse durante todo el año, el patógeno puede estar activo continuamente durante todo el año (Robertson, 1991).

2.4 Síntomas observados en tomate

P. infestans puede infectar hojas, tallos, ramas y frutos verdes o maduros, con excepción de las raíces (CATIE, 1990 ; Sherf y MacNab, 1986). En el follaje, la enfermedad se inicia con la aparición de manchas circulares o irregulares de apariencia acuosa ubicadas en las puntas o bordes de las hojas inferiores. Bajo condiciones de alta humedad relativa las manchas se extienden rápidamente y forman zonas pardas atizonadas, de bordes irregulares. En el borde de la lesión, en el envés de la hoja, se forman hifas y esporangios que cubren los folíolos en su totalidad y que más tarde mueren (CATIE, 1990). Si se infectan los pecíolos y tallos, partes completas de las plantas pueden marchitarse rápidamente. Las lesiones pueden expandirse y quemar la planta en aproximadamente 14 días (Sherf y MacNab, 1986).

Los frutos infectados presentan manchas acuosas de color verde grisáceo que pueden cubrirlo totalmente (CATIE, 1990). El tejido del fruto permanece firme al inicio aunque en lugares húmedos, puede crecer un micelio blanco algodonoso en la superficie de la lesión la cual puede ser invadida por organismos secundarios y causar pudriciones suaves (Sherf y MacNab, 1986).

2.5 Relaciones entre hospederos y *P. infestans*

De acuerdo a Brasier y Hansen (1992) la mayor parte de las especies de *Phytophthora* compiten pobremente con los necrótofos del suelo. Particularmente, *P. infestans* refleja las características de parásitos obligados como las royas y mildiús, debido a que esporula en tejido vivo y pasa todo su ciclo asexual en plantas vivas ; tiene haustorios e hifas intracelulares ; un reducido número de hospederos ; es incapaz de utilizar carbohidratos complejos ; y no produce enzimas maceradoras (Robertson, 1991). *P. infestans* puede sobrevivir en el suelo (Andrivon, 1995) entre 17 y 77 días en forma de esporangios y probablemente muchos años al formar oosporas, aunque tiene escasa o carece de habilidad saprofítica competitiva. Pero a diferencia de las royas y de los mildiú polvorientos, *P. infestans*, puede crecer en secciones estériles de plantas, especialmente vainas y semillas de legumbres y cereales, así como en medios de cultivo (Robertson, 1991).

P. infestans es capaz de atacar un número limitado de especies tuberosas de *Solanum* spp., y sus parientes más distantes incluyendo cultivos económicamente importantes como papa (*Solanum tuberosum*) y tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) (Fry et al., 1993), por ello, es considerado por Brasier (1992) un patógeno específico. Además, se ha sugerido la especialización dentro de las razas de *P. infestans* que

atacan tomate y papa (Shaw, 1991 ; Fry y Spielman, 1991 ; Drenth *et al.*, 1993 ; Legard *et al.*, 1993). Robertson (1991) y Sánchez (1996), observaron que los aislamientos provenientes de cultivos de papa atacaron solo papa, mientras que los aislamientos provenientes de tomate atacaron tanto papa como tomate. Aunque los aislados patogénicos en papa, después de su cultivo continuo en tomate, pueden establecerse y convertirse en una raza marcadamente patogénica.

2.6 Manejo de la enfermedad

El manejo actual del tizón tardío involucra una serie de estrategias como : la siembra de cultivares resistentes, aplicación de productos químicos y prácticas culturales. Por lo que se ha considerado interesante integrar estrategias de control biológico, amigables con el medio ambiente, como el empleo de antagonistas y sustratos, con el fin de generar un manejo ecológico de la enfermedad.

2.6.1 Resistencia genética

Sherf y MacNab (1986), mencionan que hay en el tomate dos tipos de resistencia al tizón tardío. El primer tipo, llamado raza-específica o resistencia vertical, es controlado por un gen dominante y es muy eficaz contra una raza específica del hongo. Las plantas con resistencia raza-específica reaccionan a la infección formando manchas pequeñas, muertas y no desarrolladas. Una desventaja de este tipo de resistencia es que nuevas razas del hongo pueden vencer la resistencia de la planta a la enfermedad.

El segundo tipo de resistencia es controlado por muchos genes, algunas veces es conocido como resistencia horizontal. Plantas con resistencia horizontal forman lesiones foliares pequeñas y atípicas que producen relativamente poca cantidad de esporas.

Esta resistencia si bien no es completa como la resistencia raza-específica, tiene la ventaja de ser efectiva contra todas las razas del hongo causante del tizón tardío (Sherf y MacNab, 1986).

Se han identificado en tomate algunos genes Ph que confieren resistencia raza específica (Gallegly y Marvel, 1955 ; Wilson y Gallegly, 1955 ; Turkensteen, 1973) pero también se ha identificado resistencia no específica, según Turkensteen (1973). En los programas de mejoramiento se busca que los cultivares mejorados cuenten con resistencia horizontal pues es más durable en el tiempo y puede resistir el ataque de diferentes razas del patógeno (Wastie, 1991).

2.6.2 Control Químico

Compuestos cúpricos, como la mezcla Bordelés y otros compuestos a base de cobre, han sido usados para controlar al tizón tardío desde 1885 y continúan siendo altamente eficaces (Erwin y Ribeiro, 1996).

Durante las décadas de los 80 y 90 se han desarrollado una serie de compuestos químicos preventivos y sistémicos. Los ditiocarbarnatos como maneb, mancozeb y zineb son usados como fungicidas preventivos o protectores, sin embargo, no tienen efecto sistémico y ejercen su efecto sólo antes de que la planta se vea infectada. Los compuestos sistémicos varían desde translaminares, movimiento a través de la hoja ; apoplástico, desde las raíces hasta los brotes, (metalaxil) y también simplasto, tanto hacia arriba como hacia abajo, (fosetyl-Al y fosfonate) (Erwin y Ribeiro, 1996).

La introducción de metalaxil abrió paso al control de enfermedades causadas por *Phytophthora* debido a su solubilidad en agua, actividad a dosis bajas, y translocación en el tejido de la planta lo que permitió el control de *Phytophthora* antes de que la planta fuera penetrada por el tubo germinativo del hongo y además mostró gran eficacia aún después de periodos lluviosos (Erwin y Ribeiro, 1996).

Sin embargo, el desarrollo de resistencia a metalaxil dentro de las poblaciones de *Phytophthora* ha resultado ser un serio problema ; en el trópico donde tanto el tomate como la papa pueden ser sembrados durante todo el año, el manejo de *P. infestans* depende mucho de la aplicación frecuente de fungicidas, los cuales son asperjados cada 3 a 14 días, dependiendo de las condiciones del clima y de la susceptibilidad de los cultivares sembrados (Calvo *et al.*, 1992). Esto puede originar la resistencia a los fungicidas, en algunos casos, en menos de un año e incrementar las poblaciones del patógeno resistentes a dicho fungicida afectando con ello el manejo de la enfermedad (Erwin y Ribeiro, 1996).

En Costa Rica el control del tizón tardío en tomate, depende principalmente de la aplicación de fungicidas pues la mayoría de cultivares de tomate que se siembran en la actualidad, como el popular Hayslip, son altamente susceptibles al ataque de dicha enfermedad. La mayoría de agricultores deben realizar aplicaciones repetidas de fungicidas para mantener la enfermedad bajo control (Calvo *et al.*, 1992).

2.6.3 Control Biológico

El Control Biológico ha ganado mucha atención en los últimos años, Cook y Baker (1983), lo definen como : “ *la reducción de la cantidad de inoculo de un patógeno o su*

capacidad de causar enfermedad por acción de uno o más organismos diferentes al ser humano". Dentro de esta definición, los autores incluyen la manipulación de la resistencia genética controlada en el hospedero y prácticas culturales como el empleo de microorganismos antagonistas del patógeno. Más recientemente, la Academia Nacional de la Ciencia (NAS) de los Estados Unidos (1987), considera al Control Biológico como : "el uso de organismos naturales o modificados, genes o productos de genes para disminuir los efectos de organismos indeseables (plagas) para favorecer organismos deseables como cultivos, árboles, animales, e insectos y microorganismos benéficos".

La interacción entre microorganismos es una consecuencia natural de su crecimiento y desarrollo en el ambiente (Malajczuk, 1983) y de acuerdo con Papavizas (1981), es una razón importante del por qué los cultivos no son destruidos completamente. Por lo tanto, el control biológico resulta de la estimulación de la flora residente, de la introducción masiva de antagonistas y otros microorganismos benéficos y de todas las prácticas culturales que provean condiciones favorables a los antagonistas. Debido a ello los métodos de control están dirigidos a estimular la colonización de antagonistas saprofiticos de tal forma que sean capaces de establecerse y reproducirse en la superficie foliar (Blakeman y Fokkema, 1982 y Papavizas, 1981).

2.6.3.1 El Filoplano como hábitat de microorganismos

La atmósfera que rodea la superficie aérea de las plantas o filoplano, tiene temperaturas fluctuantes, gases, radiación, aire, agua, contaminación y lluvia ácida. Las sustancias químicas en la superficie foliar, que constituyen un sustrato para el crecimiento de la microflora habitante del filoplano, se encuentran en forma de filtrados, sustancias exógenas y exudados. Los filtrados son sustancias que son removidas de la

superficie foliar por la lluvia, rocío, y neblina ; contienen macro y micro elementos, azúcares, alcoholes, sustancias pécticas aminoácidos y ácidos orgánicos. También se encuentran el polen, sustancias azucaradas producidas por los áfidos y otros ingredientes solubles que sirven de alimento a la microflora de la superficie foliar (Spurr, 1990).

La microflora residente del filoplano puede ser epifítica si habita la superficie de la hoja y endofítica si habita su estructura interna, puede moverse de la superficie al hábitat interno u ocupar ambos (Spurr, 1990).

La colonización del filoplano da inicio con la formación de tejido nuevo, luego se da una sucesión en la colonización iniciando con bacterias, levaduras y hongos filamentosos de acuerdo al crecimiento del hospedero y al ambiente en el que se está desarrollando (Spurr, 1990). La mayoría de bacterias presentes en el filoplano son gram negativas, los géneros más comunes son : *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, y *Flavobacterium* las cuales tienden a ser más abundantes en los primeros estados de desarrollo de la planta. Mientras que los hongos filamentosos colonizan en las etapas finales cuando inicia la senescencia de la hoja (Blakeman y Fokkema, 1982).

Ahmed y Saleh (1987) observaron que los conteos de hongos filamentosos, bacterias y actinomicetes en hojas de tomate alcanzaron su valor máximo en el estado de fructificación. Los hongos que más se encontraron fueron *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Acremonium strictum*, *Alternaria alternata*, *Ulocladium botrytis* y *Scopulariopsis brevicaulis*.

2.6.3.2 Antagonismo en *Phytophthora*

Erwin y Ribeiro (1996), mencionan que el antagonismo es un fenómeno que explora los efectos de uno o más organismos sobre los patógenos y es una alternativa de control que se ha investigado en muchos lugares del mundo debido a que no daña el ambiente. Incluye un número de mecanismos que resultan en la supresión de especies en la rizosfera o en la filosfera con procesos como la antibiosis (producción de metabolitos específicos o no específicos de origen microbiano, agentes líticos, enzimas u otras sustancias tóxicas); parasitismo; depredación y competencia; todos pueden operar juntos o independientemente para reducir el inoculo (Malajczuk, 1983; Fravel, 1988).

El desarrollo de un programa de control biológico de un patógeno en particular involucra procedimientos de selección, multiplicación y aplicación de antagonistas a la planta y con frecuencia el uso de sustratos como sucrosa y extractos de levadura con el propósito de incrementar su población en la filosfera (Blakeman y Fokkema, 1982).

El desarrollo de prácticas de control biológico contra especies de *Phytophthora* es difícil debido a: la habilidad del patógeno para producir diferentes formas de inoculo (zoosporas, esporangios, oosporas y micelio); alta capacidad para penetrar e infectar al hospedero en pocas horas; su tendencia a sobrevivir en el suelo a profundidades que le permiten escapar a la mayoría de antagonistas, y en algunas especies su amplio ámbito de hospederos. Se han estudiado diferentes especies de bacterias, actinomicetos y hongos como antagonistas del género *Phytophthora*, pero su actividad en el campo de cultivo es limitada (Erwin y Ribeiro, 1996).

Erwin y Ribeiro (1996), mencionan el efecto antagonista de hongos como *Mucor spinosus*, e indican su potencial para controlar muchas especies de *Phytophthora*. A través de efectos líticos sobre el micelio, esporangios y oosporas.

Se ha informado sobre la producción de antibióticos, en cultivo *in vitro*, por bacterias antagonistas de especies de *Phytophthora*, dentro de las cuales se encuentran *Bacillus*, *Rhizobium*, *Flavobacterium*, y *Pseudomonas*. también se tienen datos de que virus, bacterias y algunos hongos, como *Trichoderma* spp., tienen la capacidad de colonizar tanto estructuras vegetativas como reproductivas de *Phytophthora* spp. (Malajczuk, 1983).

Se ha observado antagonismo a *P. cinnamomi* con *Myrothecium verrucaria*, *Epicoccum purpurascens*, *Streptomyces* spp., *Trichoderma* y otros (Finlay y McCracken, 1991). Indigine *et al.* (1992), encontraron el efecto de *Pythium oligandrum* sobre *P. capsici* en chile dulce bajo condiciones de invernadero ; *Fusarium oxysporum* fue menos consistente pero proporcionó un buen control. *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* spp. (Smith *et al.*, 1990 ; Roiger y Jeffers, 1991) y también *Enterobacter aerogenesis* (Ribeiro y Linderman, 1991) se han identificado por tener potencial para el control biológico de *P. cactorum*, agente causal de la pudrición de la raíz y de la corona del manzano.

2.6.3.3 Antagonismo a *Phytophthora infestans*

Específicamente los ejemplos de control biológico efectivo sobre tizón tardío son pocos. Rodgers (1989), informó que *Trichoderma harzianum* produce harzianopiridone, la cual ha mostrado, en cultivo *in vitro*, actividad contra *P. infestans* en tomate ; su forma de acción ha sido ligada con la producción de piridones extracelulares. Roy *et al.* (1991),

mencionan que los hongos: *Aspergillus terreus*, *Pestalotiopsis mangiferae*, *Penicillium oxalicum*, *Pe. aurantiogiseum* y *Myrothecium verrucaria* produjeron entre un 52 y 62% de inhibición de *P. infestans* en hojas de tomate arrancadas de la planta y en repetidas pruebas *M. verrucaria* y *Pe. aurantiogiseum* mostraron alto potencial antagonista.

Jindal *et al.* (1988) observaron que *Pe. aurantiogiseum* y *Fusarium equiseti* mostraron máxima inhibición de *P. infestans in vitro*. Asimismo, observaron que al aplicar esporas de dichos organismos en plantas de papa en invernadero la intensidad de la enfermedad se redujo significativamente. El máximo control se obtuvo cuando se inocularon esporas de *P. aurantiogiseum* 12 horas antes de la inoculación con *P. infestans*.

Jongebloed *et al.* (1993) seleccionaron dos bacterias antagonistas: *Pseudomonas fluorescens* (aislamiento C148) y *Bacillus sp.* (aislamiento B39) y ambos aislamientos probaron ser altamente supresivos contra *P. infestans* en plantas desarrolladas en una cámara con clima controlado. Sin embargo, cuando el aislamiento C148 fue probado en el campo, no fue exitoso, probablemente debido a que el número de células antagonistas retenidas en la filosfera fue bajo.

Por otro lado, Clulow *et al.* (1995), demostraron que algunas bacterias que colonizan la superficie de tubérculos de papa, cuando ellos se encuentran en compost húmedo, fueron antagonistas de *P. infestans* y además proporcionaron resistencia a los tubérculos.

Sánchez *et al.* (1998), aislaron 158 microorganismos (83 bacterias y 75 hongos) de los cuales el 57% fueron encontrados en la filosfera de tomates comerciales y especies silvestres de *Lycopersicon*. Al realizar pruebas, 32 de ellos mostraron ser eficientes en la reducción de la severidad del tizón tardío en folíolos desprendidos (8 bacterias y 24 hongos) dentro de ellos se encontraban 11 aislamientos del género *Fusarium*, tres del género *Penicillium* y una especie del género *Trichoderma*. No se observó relación obvia entre los antagonistas y el lugar de la planta de donde fueron aislados. Por ejemplo *Serratia sp.* (054), obtenido de la endosfera de tomate comercial mostró un efecto antagónico sobre *P. infestans* cuando fue aplicado tanto endofítica como epifíticamente. De manera similar varias especies de hongos que mostraron antagonismo sobre *P. infestans* cuando fueron aplicados epifíticamente provenían de varias fuentes diferentes. Por ejemplo *Fusarium* (aislamientos 108 y 113) fueron encontrados en la filosfera de tomate comercial, *Trichoderma* (aislamiento 069) y *Penicillium* (aislamiento 067) fueron aislados de las raíces de *L. pimpinellifolium* y *Penicillium* (aislamiento 071) fue encontrado en el mismo hospedero pero en el follaje.

2.6.3.4 Formulaciones

Cada año son descubiertos microorganismos con alto potencial para ser usados como agentes de control biológico ; no obstante, su adecuada formulación es el factor clave para el éxito de su aplicación al cultivo (Connick *et al.*, 1990).

La formulación tiene como objetivos : proteger al antagonista de las restricciones impuestas por las condiciones ambientales puesto que todas las estructuras reproductivas necesitan una película de agua en la lámina foliar o al menos encontrarse expuestas a humedad relativa alta para germinar y crecer, proteger al antagonista de las

variaciones de temperatura, de los rayos ultravioleta y de la escasez de nutrientes disponibles y además, facilitar la aplicación con el equipo agrícola convencional (Connick *et al.*, 1990 y Greaves *et al.*, 1998).

Las formulaciones a base de aceite son más viscosas que las formulaciones acuosas y más efectivas en cuanto al movimiento y ubicación de estructuras reproductoras en las superficies hidrofóbicas de las hojas ; además son, por lo general, menos volátiles que el agua protegiendo por más tiempo las estructuras reproductivas aplicadas al follaje (Greaves *et al.*, 1998).

Además, se espera que la formulación mantenga la viabilidad de los microorganismos a través de su procesamiento, almacenamiento y aplicación ya que, a diferencia de los químicos, los agentes biocontroladores deben sobrevivir y proliferarse en el ambiente donde son aplicados (Connick *et al.*, 1990).

El mayor obstáculo que enfrenta el uso de microorganismos antagonistas para el control biológico de enfermedades ha sido el carecer de métodos comerciales adecuados para su crecimiento, formulación y liberación en el ecosistema (Connick *et al.*, 1990). Sin embargo, se ha tenido éxito en la formulación de algunos antagonistas como *Pseudomona fluorescens* contra el mal del talluelo del algodón (Connick *et al.*, 1990). Beagle-Ristaino y Papavizas (1985) mencionan el que uso de formulaciones de *Trichoderma viride* y *Gliocladium virens* en semilla de papa infectada con *Rhizoctonia solani* redujo la incidencia del patógeno en el campo en un 50%. También se han formulado conidias y micelio de hongos con potencial comercial para ser usados como tratamientos de semilla como *Pythium oligandrum* que ha sido mezclado con arcilla como

medio de diseminación y peletizado con semillas de zanahoria y remolacha para controlar mal del talluelo (Luchmeah y Cooke, 1985).

2.6.3.5 Sustratos

Si se considera que un antagonista exitoso deberá tener la capacidad de multiplicarse y colonizar la superficie foliar, puede ser posible contribuirle mediante la manipulación del ambiente del filoplano. Esta modificación puede ser aplicando nutrientes de consumo rápido, como sucrosa, extracto de lavadura y suero (Blakeman y Fokkema, 1982).

Sánchez *et al.* (1998), mencionan que algunos microorganismos que tienen buen efecto antagónico sobre *P. infestans* hidrolizan celulosa y glucano, ejemplo: *Serratia* (054), *Penicillium* (071) y *Fusarium sp.* (108) ya que produjeron zonas hidrolíticas claras en agar con celulosa y glucano, *Penicillium sp.* (067) mostró la capacidad para producir solamente celulasa, esta característica es importante ya que se esperaría que la aplicación de una fuente de glucano y/o celulosa favoreciera el establecimiento del antagonista en el filoplano y más tarde participara en el ataque a *P. infestans*, cuya pared celular está compuesta por polímeros similares a la celulosa (Erwin y Ribeiro, 1996).

No obstante, Okumoto y Bustamante (1993), mencionan que la aplicación de quitina sola al follaje de plantas de tomate no presentó disminución de tizón temprano, ya que no aumentó la población de antagonistas. Por otro lado, González *et al.* (1996), mencionan que la mezcla de quitina con microorganismos antagónicos a *Mycosphaerella fijiensis* aplicada al follaje de plantas de banano, no presenta un mejor efecto antagónico

que la quitina aplicada sola o los microorganismos solos. Talavera *et al.* (1998a), menciona que las aplicaciones de glucano, como sustrato, a follaje de banano para controlar *Mycosphaerella fijiensis*, en condiciones de campo, redujeron un 65% el área afectada por el patógeno. Además, Ruiz-Silvera *et al.* (1997) mencionan que en pruebas realizadas bajo techo las aplicaciones de leche y melaza mostraron los mejores resultados con respecto a la supervivencia de *Serratia marcescens* R1 en el follaje de banano y que dichos sustratos también mostraron un efecto positivo sobre el crecimiento de antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis* en banano.



3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Localización

La investigación se realizó durante los meses de octubre de 1997 a septiembre de 1998, en los laboratorios e invernaderos del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE, localizado en Turrialba, provincia de Cartago, Costa Rica, situado a 602 m.s.n.m. a 9°55'21"N y 83°39'40"W. Las condiciones climatológicas del lugar son temperatura, precipitación y humedad relativa promedio anual de 21.7°C, 2065 mm y 87% respectivamente.

3.2 Procedimiento general

3.2.1 Producción de plantas

En los ensayos se utilizaron los cultivares de tomate Hayslip y Peraline, las plantas se sembraron bajo techo con paredes protegidas con malla para evitar infecciones de virus transmitidos por insectos, como mosca blanca. Se utilizaron macetas plásticas y suelo esterilizado con calor, a 100°C por 24 horas. Además se mantuvo una producción constante de plantas del cultivar Hayslip, de donde se tomaron hojas para mantener *in vivo* el inóculo de *P. infestans*.

3.2.2 Recolección y mantenimiento del inóculo de *P. infestans*

Se recolectó material vegetal con lesiones típicas de *P. infestans*, en diferentes áreas dedicadas a la producción de tomate ubicadas en las localidades de Guayabo, Cervantes y Paraíso.

Las muestras se lavaron con abundante agua destilada estéril para eliminar posibles contaminantes (suelo y productos químicos). Luego se colocaron en cámaras húmedas en cuyo fondo se colocó papel toalla húmedo y se incubaron por 48 h en una cámara de crecimiento a una temperatura de 18°C y a una humedad relativa del 80% con el propósito de estimular la esporulación del hongo.

Con ayuda de un pincel se cosecharon los esporangios y se procedió a preparar la suspensión concentrada en la cual se impregnaron pequeñas porciones de algodón las que fueron colocadas en el envés de los folíolos de plantas producidas bajo techo los cuales se depositaron en bandejas plásticas en cuyo fondo se encontraba una esponja estéril humedecida con agua destilada, para mantener la humedad dentro de la bandeja; después de la inoculación cada bandeja era cubierta con una tapa de vidrio y colocada en la cámara de crecimiento a 18°C y 80% de humedad relativa. Generalmente los folíolos mostraron síntomas de infección a los 3 días después de inoculados y a los 5 días se observaron los primeros signos en las lesiones. Cuando los folíolos presentaron abundante esporulación, se inocularon nuevos folíolos y así se mantuvo el inoculo a ser usado en los ensayos durante toda la investigación.

3.2.3 Mantenimiento y reproducción de antagonistas

El inoculo de los antagonistas se produjo en medio de cultivo, agar nutriente (AN) para bacterias y agar papa dextrosa (PDA) para hongos, los cultivos se incubaron a una temperatura de 26°C. Los antagonistas seleccionados para esta investigación fueron *Serratia* sp. (054), *Fusarium* sp. (108), dos especies de *Penicillium* sp. (067 y 071) y *Trichoderma* sp. (069), procedentes de la colección de antagonistas de *P. infestans* del CATIE, caracterizados por Sánchez *et al.* (1998), cuadro 1.

Cuadro 1.- Características de antagonistas evaluados. CATIE, Costa Rica.

GENERO	AISLAMIENTO	FUENTE	PRODUCCION CELULASA	DE ENZIMAS GLUCANASA
<i>Serratia</i> sp	054	EC *	+	+
<i>Penicillium</i> sp	067	RW	+	-
<i>Trichoderma</i> sp.	069	RW	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	071	PW	+	+
<i>Fusarium</i> sp.	108	PC	+	+

*EC= endosfera de tomate comercial

PC= filosfera de tomate comercial

PW=filosfera de tomate silvestre

RW=rizosfera de tomate silvestre

FUENTE : Sánchez *et al.*, 1998.

+ = si produce la enzima

- = no produce la enzima

3.2.4 Preparación de sustratos

Se evaluaron dos sustratos, glucano (β -1, 3 glucosa y β -1, 4 glucosa) y celulosa (β -1,4 glucosa). La fuente de β -glucano utilizada en el experimento fue glucano coloidal extraído a partir de desecho de levadura de cerveza según el método de extracción modificado utilizado por Talavera *et al.* (1998b) ; el desecho fue diluido en agua destilada en una relación 1 :34. Luego la mezcla se agitó vigorosamente por 3 minutos y su pH fue ajustado a 7.0 adicionando NaOH 2M. Posteriormente se adicionó a la solución una cantidad igual de alcohol 2-propanol, se agitó vigorosamente por 3 minutos y se dejó en reposo por 15 minutos. Finalmente la solución fue centrifugada a 3000 rpm por 20 minutos y el precipitado conteniendo el glucano fue colocado en frascos de vidrio los cuales se guardaron en refrigeración hasta el momento de su utilización. Análisis de laboratorio, según metodología propuesta por la compañía Megazyme (1993), determinaron que el glucano coloidal extraído a partir del desecho de levadura de cerveza tenía una concentración de 0.28% p/v de β -glucano.

La fuente de celulosa utilizada fue Celulosa (β -1,4 glucosa) microcristalina calidad reactivo de la marca Baker TLC.

3.3 Evaluación de sustratos y antagonistas a *P. infestans* en los cultivares de tomate Hayslip y Peraline.

En este ensayo se evaluó el efecto de sustratos, celulosa y glucano, sobre antagonistas a *P. infestans* en plantas de tomate de los cultivares Hayslip y Peraline sembradas en macetas bajo techo. El diseño experimental utilizado fue bloques completos al azar en arreglo de parcelas sub-sub divididas con 5 repeticiones (2 x 5 x 6), cuadro 2, en donde cada planta correspondió a una unidad experimental, de tal forma que en cada repetición habían 60 unidades experimentales (anexo 1). Las plantas de tomate, de 9 ó 10 semanas de edad, el día previo al inicio de la aplicación de los tratamientos, fueron rociadas con agua por alrededor de 5 minutos, hasta que el follaje se lavó completamente para disminuir los efectos de la tomatina y propiciar condiciones óptimas para el proceso de inoculación e infección tanto de antagonistas como de *P. infestans*,

Cuadro 2.- Tratamientos evaluados.

FACTOR	APLICADO A	TRATAMIENTOS
CULTIVAR	PARCELAS GANDES	Hayslip y Peraline
SUSTRATO	SUB PARCELAS	40 y 80 g/ L de glucano coloidal al 0.28% p/v ; 1.0 y 2.0 g/L de celulosa y testigo sin aplicación de sustratos
ANTAGONISTAS	SUB-SUB PARCELAS	<i>Serratia</i> sp. (054), <i>Penicillium</i> sp. (067), <i>Trichoderma</i> sp. (069), <i>Penicillium</i> sp. (071), <i>Fusarium</i> sp. (108) y testigo sin aplicación de antagonistas

3.3.1 Aplicación de sustratos

Tres días antes de la inoculación con el patógeno se procedió a hacer las aplicaciones de los sustratos ; para lo cual se prepararon las soluciones en agua destilada a las concentraciones correspondientes (cuadro 2) y se colocaron en bombas aspersoras manuales con capacidad de 1.5 L ; se organizaron grupos de 60 plantas (30 de cada cultivar) y se asperjó la solución a todo el follaje de la planta. Se aplicaron alrededor de 33 ml de la solución de sustrato por planta. El testigo sin aplicación de sustrato fue asperjado únicamente con agua destilada.

3.3.2 Inoculación de antagonistas

Un día después de la aplicación de los sustratos se realizó la inoculación de los microorganismos antagonistas, para ello se prepararon las suspensiones en agua destilada a una concentración de 10^5 y 10^7 esporas y unidades formadoras de colonias de los aislamientos de hongos y bacterias respectivamente. Se utilizó inóculo proveniente de cultivo de quince días en medio artificial para hongos y cinco días para la bacteria. Se organizaron grupos de 50 plantas (25 plantas de cada cultivar), las suspensiones preparadas fueron aplicadas con ayuda de bombas aspersoras manuales con capacidad de 1.5 L a todo el follaje de las plantas de cada grupo respectivo, se aplicó alrededor de 40 ml de inóculo por planta. La inoculación se realizó en horas frescas de la tarde. El testigo, sin aplicación de antagonistas fue asperjado solamente con agua destilada.

3.3.3 Inoculación de *P. infestans*

Cuarenta y ocho horas después de haber realizado la aplicación de los antagonistas se procedió a la inoculación con *P. infestans*. Se preparó una suspensión

de esporangios en agua destilada a una concentración de 8×10^3 esporangios/ml. El inoculo fue asperjado en horas de la tarde a los tres folíolos terminales de la tercera y cuarta hoja más jóvenes de cada planta con ayuda de atomizadores Devilbiss con capacidad para 25 cc, producidas por Health Care Division y una pantalla para evitar contaminación a todo el follaje de las plantas de tomate ; se aplicaron entre 2 y 3 ml de inoculo por hoja. Inmediatamente después y por un periodo de 18 h y a intervalos de 6 h, las plantas fueron rociadas con agua a través de microaspersores instalados en el invernadero con el propósito de simular un rocío natural, mantener una película de agua en el follaje y proporcionar así condiciones favorables para la penetración del patógeno.

3.3.4 Variables evaluadas

La evaluación de las plantas se inició 48 h después de haber realizado la inoculación de *P. infestans*. Se hizo observaciones diarias de la severidad de la enfermedad en cada uno de los tratamientos, se evaluó el porcentaje de área foliar afectada (PAFA) en los tres folíolos terminales de las hojas tercera y cuarta, hasta que las plantas testigo alcanzaron el 100% de infección en los folíolos evaluados.

Se llevaron registros del período de incubación, es decir, el intervalo en días desde la inoculación hasta el apareamiento de los primeros síntomas en los tres folíolos terminales de las hojas tercera y cuarta para todos los tratamientos.

3.3.5 Análisis de resultados

Los datos del porcentaje de área foliar afectada (PAFA) de los seis folíolos evaluados fueron promediados y luego transformados según la ecuación $\sqrt{(x+0.5)}$. Se

realizó análisis de varianza conteniendo las correspondientes pruebas de los efectos de los factores evaluados y de sus respectivas interacciones.

Además se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad ABCPE para cada tratamiento (Shaner y Finney, 1977), que nos indica la cantidad de enfermedad existente entre dos observaciones de tiempo, según la ecuación :

$$ABCPE = \text{SUM } (y_i + y_{i+1})/2 \times dt_i$$

Donde :

y_i = proporción de enfermedad (incidencia o severidad) afectada en la i ésima observación.

t_i = tiempo (días) después de la inoculación en la i ésima observación.

SUM = sumatoria de n observaciones.

Se realizó análisis de varianza para el ABCPE con el propósito de identificar las posibles diferencias entre tratamientos y entre sus respectivas interacciones. Además se realizaron pruebas LSMeans con el propósito de identificar diferencias entre medias.

3.3.6 Recuperación de antagonistas

Ocho y quince días después de haber realizado la inoculación de los antagonistas se realizó su recuperación, según metodología descrita por González *et al.* (1996), con el propósito de ver si habían tenido la capacidad de establecerse en el follaje de las plantas de tomate.

Para ello se tomaron al azar dos hojas de cada planta para cada tratamiento y se formó una muestra compuesta por el follaje recolectado de las 5 repeticiones. Las

muestras fueron depositadas en bolsas plásticas debidamente identificadas. Se llevaron al laboratorio en donde cada muestra fue cortada en secciones de aproximadamente 1 cm², se pesaron 3 gramos y se colocaron en erlenmeyers conteniendo 30 ml de agua destilada estéril donde fueron agitadas por 45 minutos en un agitador orbital. Se tomó 1 ml de la solución y se colocó en un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de agua destilada estéril, se hicieron diluciones hasta 10⁻⁴. Se sembraron en dos platos petri, conteniendo PDA en el caso de hongos y AN en el caso de bacterias, alícuotas de 20 microlitros de las diluciones 10⁻³ y 10⁻⁴ y se incubaron a temperatura ambiente. Se observó el crecimiento de las colonias en los platos petri a los 5 días en el caso de bacterias y a los 8 días en el caso de los hongos.

3.4 Evaluación de tres concentraciones de *P. infestans* en tomate cultivar Pieraline

Dado que en el experimento anterior se observó que el cultivar Pieraline no mostró ninguna sintomatología de infección por *P. infestans*, se decidió verificar si en este cultivar la cantidad de esporangios inoculada fue muy baja como para causar infección ; por ello se realizó un ensayo en donde se evaluaron dos concentraciones más altas, en plantas de tomate del cultivar Pieraline de 8 semanas de edad producidas bajo techo en suelo estéril. La inoculación del patógeno se realizó en horas de la tarde a los tres folíolos terminales de la tercera y cuarta hoja más jóvenes de cada planta según metodología descrita en el punto 3.3.3.

El diseño experimental fue completamente al azar con 5 repeticiones, los tratamientos evaluados fueron : 8 x 10³ (testigo), 12 x 10³ y 16 x 10³ esporangios de *P. infestans* ml⁻¹.

Cuarenta y ocho horas después de la inoculación de *P. infestans* se iniciaron evaluaciones diarias de la severidad de la enfermedad, se evaluó el porcentaje de área foliar afectada (PAFA) en los tres folíolos terminales de las hojas inoculadas y además se tomaron datos sobre el número de días desde la inoculación hasta el apareamiento de los primeros síntomas de la enfermedad.

Además se realizó una prueba de comprobación en la folíolos desprendidos del cultivar Perialine fueron inoculados de la forma como se describe en el apartado 3.2.2 y luego colocados en la cámara de crecimiento a 18°C y 80% de humedad relativa con el propósito de asegurarse que en dicho cultivar *P. infestans* no produce infección.

3.5 Evaluación del efecto de las épocas de aplicación de sustratos sobre los antagonistas de *P. infestans*

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo donde se evaluó el efecto de sustratos y antagonistas a *P. infestans* se planeó la realización de un ensayo en el que se evaluaron épocas de aplicación, este ensayo se realizó con plantas de tomate del cultivar Hayslip de 8 semanas de edad, producidas bajo techo. Se utilizó un diseño completamente al azar con 5 repeticiones, se evaluaron cinco tratamientos en un arreglo pseudofactorial $2 \times 2 + 1$. Los factores evaluados fueron la aplicación y no aplicación de sustrato, en este caso celulosa a una concentración de 2 g/L ; la aplicación del sustrato y el antagonista (*Penicillium* sp. 067) al follaje de las plantas una y dos semanas antes de la inoculación de *P. infestans* y un testigo sin aplicación de sustrato y antagonista.

La aplicación del sustrato y las inoculaciones de *Penicillium* sp. (067) y *P. infestans* fueron hechas según metodología descrita anteriormente (3.3.1, 3.3.2 y 3.3.3).

Las evaluaciones se iniciaron, como se describió anteriormente, 48 h después de haber realizado la inoculación de *P. infestans*. Las variables evaluadas fueron la severidad de la enfermedad con base al porcentaje del área foliar afectada (PAFA) en los tres folíolos terminales de las hojas inoculadas así como el período de incubación. Además se calculó el ABCPE según procedimiento descrito anteriormente.

Se realizaron análisis de varianza, conteniendo las pruebas de los factores evaluados y de sus respectivas interacciones tanto para los datos de PAFA como para los de ABCPE y período de incubación según procedimiento descrito en 3.3.3.

3.6 Evaluación del efecto de formulaciones sobre antagonistas de *P. infestans*.

Dado que los antagonistas *Penicillium* sp. (067) y *Fusarium* sp. (108) presentaron en los ensayos anteriores los menores niveles de severidad, se formularon de acuerdo a la propuesta por Greaves et. al (1998), quienes recomiendan que esporas de microorganismos se mezclen en aceite de canola y agua en una relación 1 :9 v/v y 0.1% de tween 40 como emulsificante. Sin embargo, debido a la no disponibilidad en el mercado de aceite de canola, fue necesario probar diferentes marcas de aceites existentes en el mercado : Clover compuesto por aceite de oliva y aceite vegetal ; Girol compuesto por aceite de girasol ; Clover compuesto por aceite de soya ; Bonella compuesto por aceites de girasol, canola y maíz y Numar compuesto por aceite de maíz.

Para ello se realizaron suspensiones de dichos hongos en agua destilada a una concentración de 10^5 conidias ml^{-1} con los diferentes aceites evaluados en proporción 1 :9 v/v más 0.1% de tween 40. Se tomó 1 ml de cada formulación y se sembró en placas petri conteniendo PDA las cuales fueron incubadas a temperatura ambiente. Se

seleccionó el aceite de girasol (Girol, producido por CENTENARY, S.A., Industria Argentina) donde el crecimiento de los antagonistas fue más rápido, abundante y uniforme.

El diseño del ensayo fue completamente al azar con 5 repeticiones, se evaluaron cinco tratamientos resultantes de un arreglo pseudofactorial $2 \times 2 + 1$. Los factores evaluados fueron : dos antagonistas *Penicillium* sp. (067) y *Fusarium* sp. (108) aplicados al follaje del tomate formulados y sin formular y además un testigo sin aplicación de antagonistas.

Se utilizaron plantas de tomate de 8 semanas de edad del cultivar Hayslip, la inoculación de los antagonistas se realizó 48 h antes de la inoculación de *P. infestans*. Veinticuatro horas después las plantas fueron colocadas a la intemperie con el propósito de exponerlas a las condiciones ambientales naturales.

La evaluación del ensayo se inició 48 h después de la inoculación con *P. infestans*. Las variables evaluadas fueron el porcentaje de área foliar afectada (PAFA) y el periodo de incubación, además se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad, ABCPE, como se describió anteriormente.

La información obtenida fue examinada por medio de un análisis de varianza realizando las correspondientes pruebas de los efectos de los factores evaluados e interacciones, además se realizaron pruebas LSMeans y Tukey para ver las diferencias entre medias de tratamientos según se describe en 3.3.5.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Efecto de sustratos sobre los antagonistas de *P. infestans*

El análisis de varianza para el porcentaje de área foliar afectada PAFA (severidad), en los tratamientos evaluados en esta investigación, dos sustratos (glucano y celulosa) cada uno en dos dosis ; cinco antagonistas y dos cultivares (Hayslip y Pieraline), indicó que existe una diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) en la interacción cultivar, sustrato, antagonista a lo largo del tiempo, lo cual se explica ya que la severidad aumentó a medida que transcurrió el tiempo de evaluación. Además la diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) para el factor cultivar se produjo porque el cultivar Pieraline no permitió el desarrollo de la enfermedad (anexo 2).

El análisis de varianza del área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE), confirmó la interacción sustrato antagonista lo cual indica que los sustratos tuvieron efecto sobre la actividad antagonista de los microorganismos evaluados (anexo 3).

4.1.1 Efecto de los antagonistas sobre el patógeno

Como se observa en la figura 1 todos los microorganismos evaluados presentaron efecto antagónico a *P. infestans* ya que los porcentajes de área foliar afectada PAFA (severidad) en la última evaluación, 0%, por *Serratia* sp. (054) y *Penicillium* sp. (067), 19.00% por *Penicillium* sp. (071), 8.83% en *Fusarium* sp. (108), y 7.83% con *Trichoderma* sp (069) fueron menores al 55% observado por el testigo absoluto (sin aplicación de antagonistas y sustrato). De acuerdo a la prueba LSMeans de separación de medias, el ABCPE promedio calculada para el testigo absoluto

(278.04) fue estadísticamente diferente a las áreas promedio calculadas correspondientes a los tratamientos en los que se aplicaron los diferentes antagonistas evaluados, mientras que las ABCPE promedio calculadas para los diferentes antagonistas no fueron diferentes entre sí, pero si menores a dicho valor ; cabe hacer notar que tanto *Serratia* sp. (054) como *Penicillium* sp. (067) obtuvieron un valor de 0 lo cual confirma el efecto antagónico que dichos microorganismos ejercen por sí solos sobre *P. infestans* (cuadro 3).

También puede observarse que existe un comportamiento antagónico diferente entre *Penicillium* sp. (071) y *Penicillium* sp. (067), ya que las ABCPE promedio calculadas, 72.70 y 0, respectivamente, indican que son dos especies diferentes una de la otra. En investigación realizada por Sánchez *et al.* (1998), se menciona que *Penicillium* sp. (067), fue aislado de la rizosfera de tomate silvestre ; mientras que *Penicillium* sp. (071), fue aislado de la filosfera de tomate silvestre, esta situación confirma el que sean especies diferentes y actúen de forma diferente como antagonistas.

Al respecto, Andrews (1992), menciona que la filosfera es un ambiente dinámico con variables ambientales cíclicas y no cíclicas, dentro de las que se encuentran variaciones de temperatura, humedad relativa, neblina, viento y rayos ultravioleta con diferentes fuentes de nutrientes ; mientras que el rizosfera está compuesta por diferentes micronichos que proporcionan diferentes combinaciones de fuentes de nutrientes, humedad y regímenes de aireación lo que hace que la microflora existente sea abundante y rica en especies e incrementa las probabilidades para el antagonismo, por

lo tanto es de suponer que la capacidad antagónica de los microorganismos aislados de la rizosfera sea mayor que la de los aislados de la filosfera.

Por otro lado, Sánchez *et al.* (1998), mencionan que *Penicillium* sp. (067), tiene una alta capacidad antagónica para enfermedades de la filosfera como *P. infestans*.

En experimentos realizados en folíolos desprendidos de tomate se pudo observar el efecto antagónico de *Serratia* sp. (054) y *Penicillium* sp. (067), ya que al evaluarlos junto con otros antagonistas los resultados obtenidos permitieron seleccionarlos como agentes con alto potencial de control biológico de *P. infestans* (Sánchez *et al.* 1998).

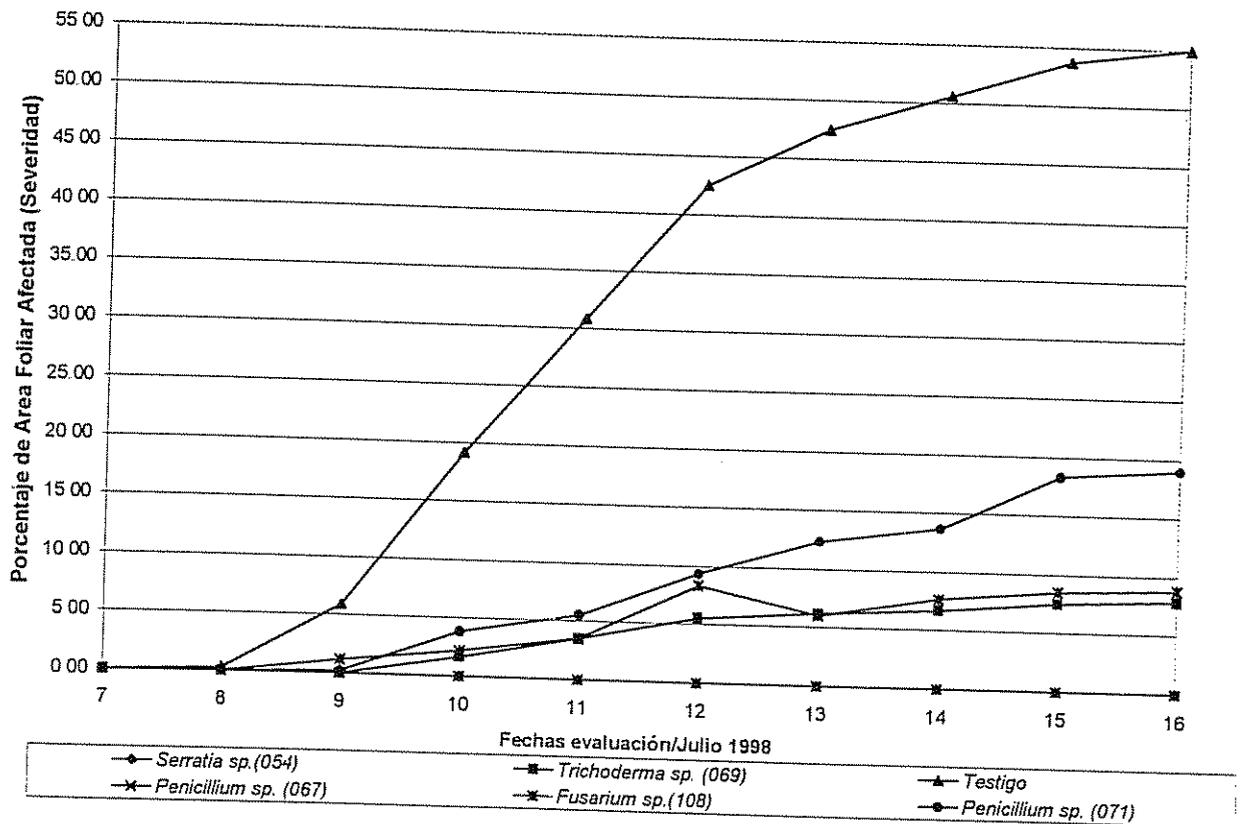


Figura 1.- Efecto de cinco antagonistas en el desarrollo del tizón tardío, expresado como Porcentaje de Area Foliar Afectada (PAFA), a través de 10 días de evaluación.

Cuadro 3.- Efecto de cinco antagonistas evaluados sobre el desarrollo del tizón tardío, de acuerdo a los valores promedio de Area Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE)

TRATAMIENTOS	ABCPE PROMEDIO
Testigo *	278.04a
<i>Penicillium</i> sp. (071)	72.70b
<i>Fusarium</i> sp. (108)	41.75b
<i>Trichoderma</i> sp. (069)	34.92b
<i>Serratia</i> sp. (054)	0.00b
<i>Penicillium</i> sp (067)	0.00b

*Sin aplicación de antagonista ni sustrato (testigo absoluto)
La separación de medias se hizo por la prueba LSMeans, letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($\alpha = 0.05$).

El hecho que el testigo absoluto haya mostrado síntomas de la enfermedad hace suponer que la metodología desarrollada para la inoculación de *P. infestans* bajo techo, superó las dificultades enfrentadas por Sánchez (1996) y Sánchez *et al.* (1998), ya que se proporcionó al patógeno, a través del rocío aplicado, la película de agua en el follaje necesaria para una buena germinación de los esporangios y penetración del tejido del hospedero.

4.1.2 Efecto de los sustratos sobre la actividad de los antagonistas

4.1.2.1 Celulosa

En la figura 2 se puede observar el efecto combinado de la celulosa 2 g/L con los antagonistas; los valores de severidad promedio (PAFA) observados en la última evaluación fueron 32.20%, 31.00%, 4.83%, 3.17%, 2.00% y 0% para *Trichoderma* sp. (069), testigo con sustrato, *Penicillium* sp. (071), *Serratia* sp. (054), *Penicillium* sp. (067) y *Fusarium* sp (108) respectivamente.

Además, puede observarse que los porcentajes promedio alcanzados por *Trichoderma* sp. (069), *Serratia* sp. (054) y *Penicillium* sp. (067) fueron superiores a los valores observados cuando fueron aplicados al follaje sin sustrato (figuras 1 y 2) lo cual puede indicar que celulosa 2 g/L interfirió sobre su capacidad antagónica.

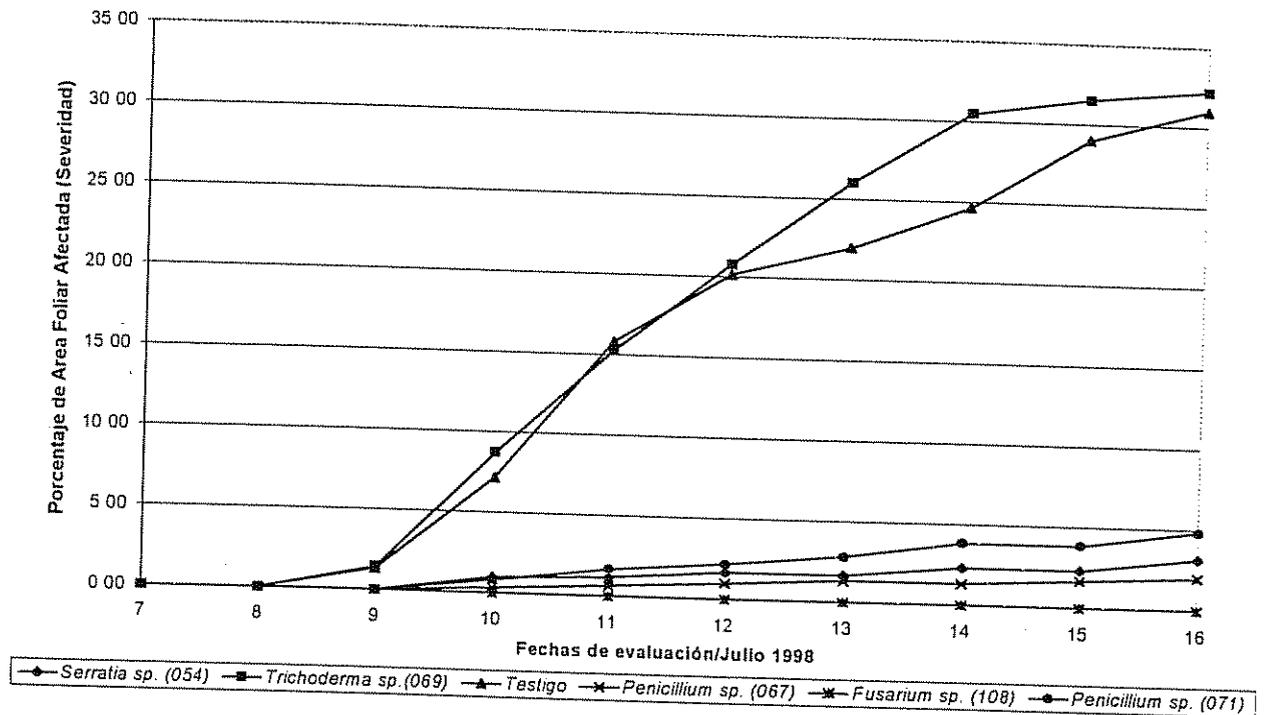


Figura 2.- Efecto de cinco antagonistas, usando celulosa 2 g/L como sustrato, en el desarrollo del tizón tardío, expresado como Porcentaje de Area Foliar Afectada (PAFA), a través de 10 días de evaluación.

La prueba LSMeans de separación de medias para el ABCPE indicó que no hubo diferencia significativa entre los promedios calculados para *Trichoderma* sp. (069) y el testigo solamente con celulosa 2 g/L, 150.45 y 135.67 respectivamente, pero fueron diferentes a las ABCPE calculadas para *Penicillium* sp. (071), *Serratia* sp. (054), *Penicillium* sp. (067) y *Fusarium* sp. (108), los cuales fueron iguales entre sí (cuadro 4).

Se puede observar que tanto los valores de severidad (PAFA) como de ABCPE promedio calculada para *Trichoderma* sp. (069), *Serratia* sp. (054) y *Penicillium* sp. (067) con celulosa 2 g/L (figura 2 y cuadro 4), fueron mayores a los calculados para dichos microorganismos cuando no se aplicó sustrato (figura 1 y cuadro 3) esto indica que el sustrato, afectó la capacidad antagónica de dichos microorganismos. Sin embargo mejoró la capacidad antagónica de *Penicillium* sp. (071) y *Fusarium* sp. (108).

Cuadro 4.- Efecto de celulosa 2 g/L sobre los cinco antagonistas evaluados de acuerdo al Area Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE) promedio.

TRATAMIENTOS	ABCPE PROMEDIO
<i>Trichoderma</i> sp. (069)	150.45a
Testigo *	135.67a
<i>Penicillium</i> sp. (071)	17.58b
<i>Serratia</i> sp. (054)	11.75b
<i>Penicillium</i> sp. (067)	7.33b
<i>Fusarium</i> sp. (108)	0.00b

*Con Celulosa 2 g/L como sustrato.

La separación de medias se hizo por la prueba LSMeans, letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($\alpha = 0.05$).

Los valores de severidad promedio alcanzados por los antagonistas, en la última evaluación, al usar celulosa 1 g/L como sustrato fueron 65.66%, 31.17%, 10.67%, 7.83%, 3.33% y 0% para el Testigo, *Trichoderma* sp. (069), *Fusarium* sp. (108), *Penicillium* sp. (071), *Serratia* sp. (054) y *Penicillium* sp. (067) respectivamente (figura 3). Al compararlos con los porcentajes alcanzados cuando se aplicaron los antagonistas sin sustrato (figura 1), puede observarse que los valores de severidad observados por el

testigo, *Trichoderma sp.* (069), *Fusarium sp.* (108) y *Serratia sp.* (054) fueron mayores cuando se aplicaron junto con celulosa 1 g/L ; esto hace suponer que el sustrato ejerció un efecto negativo sobre la actividad antagonista de dichos microorganismos. Por otro lado, al parecer el sustrato no ejerció ningún efecto sobre el comportamiento de *Penicillium sp.* (067) ya que tanto con sustrato como sin él, el PAFA observado fue de 0% (figuras 1 y 3).

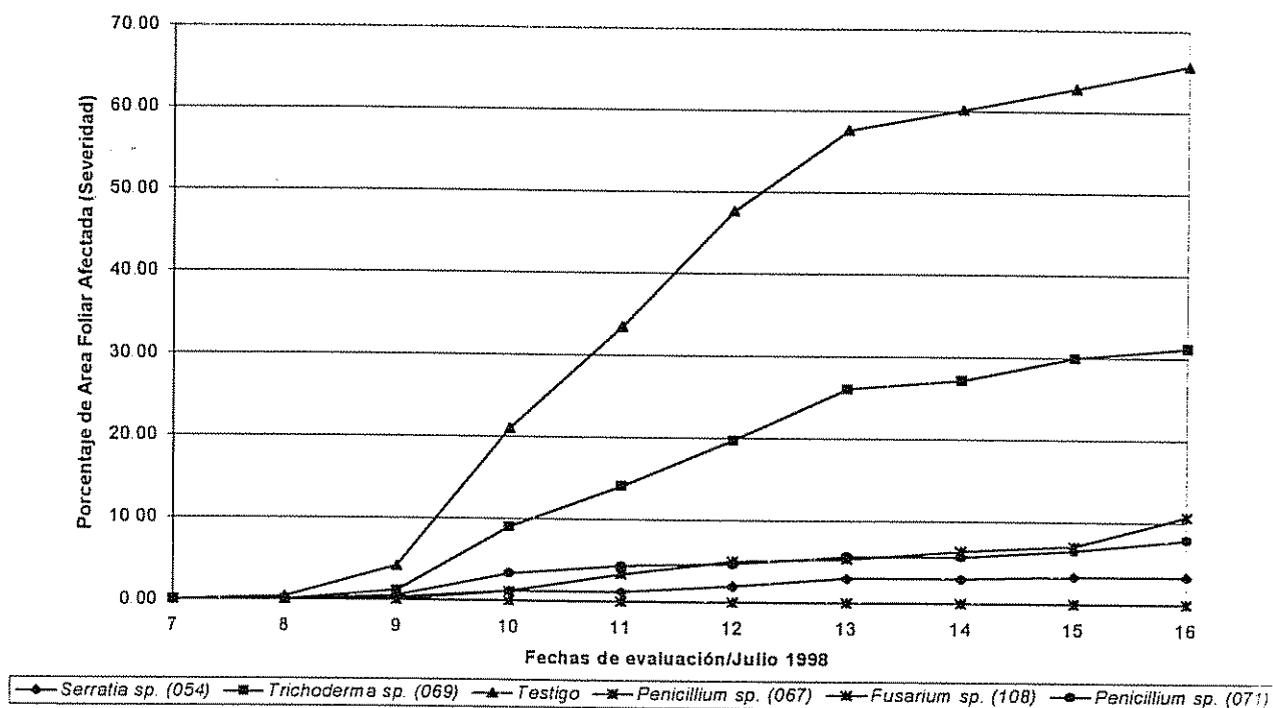


Figura 3.- Efecto de cinco antagonistas, usando celulosa 1 g/L como sustrato, en el desarrollo del tizón tardío, expresado como Porcentaje de Area Foliar Afectada (PAFA), a través de 10 días de evaluación.

En relación al área bajo la curva de progreso de enfermedad (ABCPE) promedio, cuando se usó celulosa 1 g/L como sustrato, tanto el testigo (320.23) como *Trichoderma*

sp. (069), 142.58, fueron diferentes significativamente (LSMeans), al resto de los antagonistas evaluados (cuadro 5) y presentaron los mayores valores ; cabe hacer notar que el efecto antagónico de *Trichoderma* sp. (069) se ve interferido cuando se utiliza celulosa en 1 ó 2 g/L ya que tanto su severidad observada como el ABCPE calculada alcanzaron valores mayores a los observados por este antagonista sin aplicación de sustrato (figuras 1 y 2 ; cuadros 3 y 5).

Esto podría deberse a que la cantidad de sustrato aplicado fue muy alta, lo que ocasionó que el antagonista utilizara dicho sustrato para obtener los nutrientes necesarios para establecerse en el follaje y no ejerciera efecto alguno sobre *P. infestans*. Otra explicación podría ser que el periodo entre la aplicación de sustratos, inoculación de antagonistas e inoculación del patógeno fue muy corto como para que el antagonista se estableciera en la lámina foliar y ejerciera su poder antagónico sobre el patógeno o simplemente, que la aplicación del sustrato favoreció el desarrollo del patógeno.

En cuanto a *Penicillium* sp. (071), *Fusarium* sp. (108), *Serratia* sp. (054) y *Penicillium* sp. (067) no fueron diferentes significativamente entre sí (LSMeans). Sin embargo, *Penicillium* sp. (067), con celulosa 1 g/L, obtuvo tanto la severidad como el ABCPE promedio más bajas (figura 3 y cuadro 5), valor similar al obtenido cuando se inoculó sin la presencia de sustrato (cuadro 3).

Cuadro 5.- Efecto de celulosa 1 g/L sobre los cinco antagonistas evaluados de acuerdo al Area Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE) promedio.

TRATAMIENTOS	ABCPE PROMEDIO
Testigo *	320.23a
<i>Trichoderma sp.</i> (069)	142.58b
<i>Penicillium sp.</i> (071)	34.58c
<i>Fusarium sp.</i> (108)	33.50c
<i>Serratia sp.</i> (054)	16.17c
<i>Penicillium sp.</i> (067)	0.00c

*Con Celulosa 1 g/L como sustrato

La separación de medias se hizo por la prueba LSMeans, letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($\alpha = 0.05$).

4.1.2.2 Glucano

Cuando se utilizaron 80 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v los porcentajes de área foliar infectada (PAFA), en la última evaluación, fueron 47.17%, 30.67%, 32.33%, 15.83%, 15.33% y 8.00% para *Trichoderma sp.* (069), Testigo, *Serratia sp.* (054) *Fusarium sp.* (108), *Penicillium sp.* (071), y *Penicillium sp.* (067) respectivamente, figura 4. Al compararlos con los PAFA alcanzados sin aplicación de sustrato se puede observar que tanto *Trichoderma sp.* (069), *Serratia sp.* (054), *Fusarium sp.* (108) y *Penicillium sp.* (067) obtuvieron valores mayores con glucano que sin sustrato (figura 1). Lo cual hace suponer que glucano interfirió sobre el poder antagónico de dichos microorganismos.

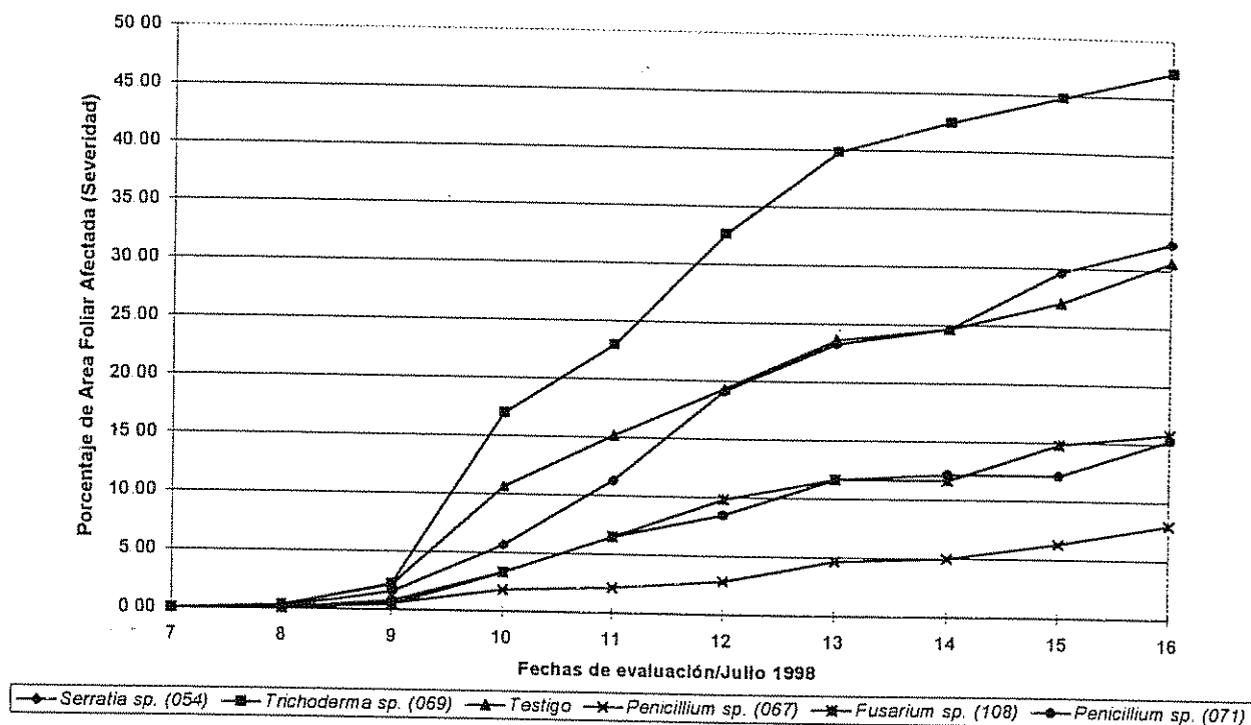


Figura 4 - Efecto de cinco antagonistas, usando 80 g/L de glucano coloidal al 0.28% p/v como sustrato, en el desarrollo del tizón tardío, expresado como Porcentaje de Área Foliar Afectada (PAFA), a través de 10 días de evaluación.

En relación al área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) promedio del tizón tardío usando, con 80 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v como sustrato, los valores observados por *Trichoderma sp. (069)*, 225.95 ; testigo, 138.27 ; y *Serratia sp. (054)*, 131.70, fueron diferentes significativamente a los otros tratamientos ($P < 0.05$) ; además, fueron superiores a los calculados cuando ambos antagonistas se aplicaron sin sustrato. El resto de antagonistas no mostró diferencia significativa en su ABCPE promedio calculada, sin embargo *Penicillium sp. (067)* obtuvo el menor valor

27.43, (cuadro 6), valor más alto que el calculado para dicho microorganismo cuando se aplicó sin sustrato (cuadro 3). Los resultados anteriores hacen suponer que glucano ejerce un efecto negativo sobre los microorganismos puesto que los valores calculados de ABCPE son superiores a los calculados para los tratamientos en los que se usó celulosa como sustrato

Cuadro 6.- Efecto 80 g/L de Glucano coloidal 0.28% p/v sobre los cinco antagonistas evaluados de acuerdo al Area Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE) promedio.

TRATAMIENTOS	ABCPE PROMEDIO
<i>Trichoderma sp.</i> (069)	225.95a
Testigo *	138.27a
<i>Serratia sp.</i> (054)	131.70a
<i>Fusarium sp.</i> (108)	66.18b
<i>Penicillium sp.</i> (071)	63.37b
<i>Penicillium sp.</i> (067)	27.43b

*Con 80 g/L de Glucano coloidal al 0.28% p/v como sustrato
La separación de medias se hizo por la prueba LSMeans, letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($\alpha = 0.05$).

Los resultados obtenidos al usar 40 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v son similares a los obtenidos al usar la dosis de glucano coloidal de 80 g/L ya que el testigo y *Trichoderma sp.* (069) obtuvieron, en la última evaluación los PAFA más altos, 56.13% y 49.17% respectivamente, y *Penicillium sp.* (067) el más bajo 6%, figura 5.

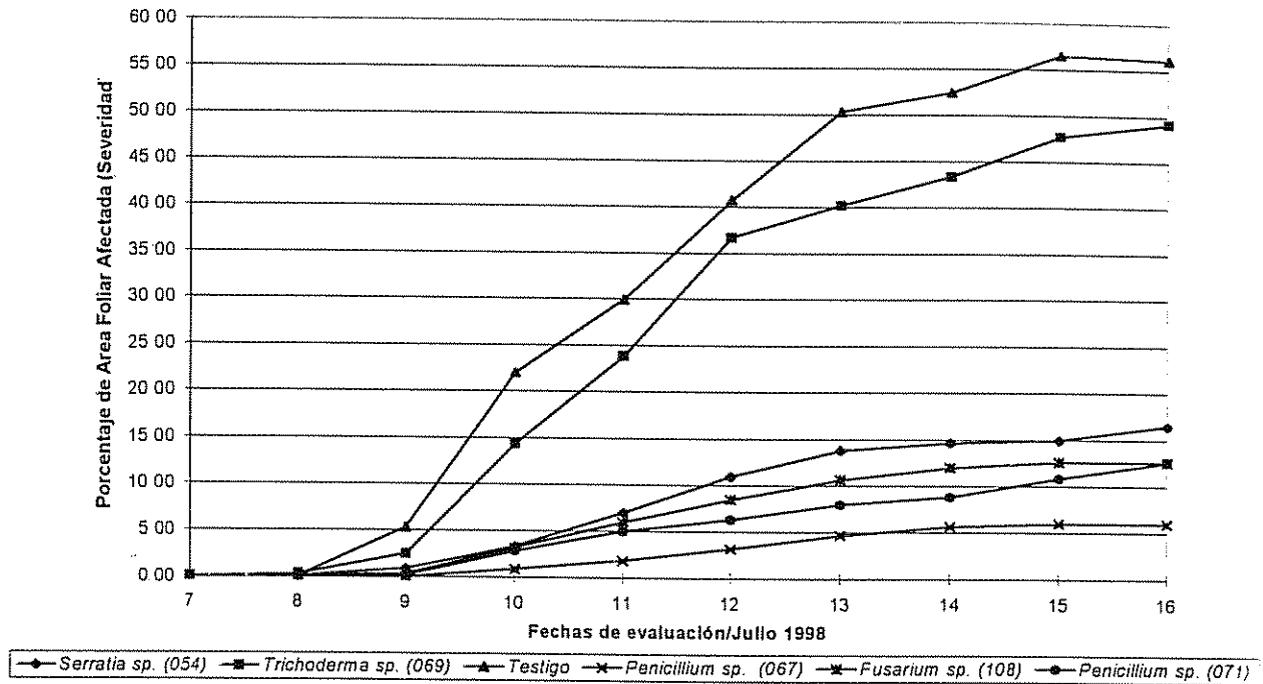


Figura 5.- Efecto de cinco antagonistas, usando 40 g/L de glucano coloidal al 0.28% p/v como sustrato, en el desarrollo del tizón tardío, expresado como Porcentaje de Area Foliar Afectada (PAFA), a través de 10 días de evaluación.

El ABCPE promedio del tizón tardío se comportó de manera similar puesto que el testigo y *Trichoderma* sp. (069) obtuvieron los mayores valores, 285.33 y 233.32 respectivamente ; y *Penicillium* sp. (067) el valor más bajo, 25.17 según la prueba LSMears de separación de medias (cuadro 7).

Cuadro 7.- Efecto 40 g/L de Glucano coloidal 0.28% p/v sobre los cinco antagonistas evaluados de acuerdo al Area Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE) promedio.

TRATAMIENTOS	ABCPE PROMEDIO
Testigo *	285.33a
<i>Trichoderma sp.</i> (069)	233.32a
<i>Serratia sp.</i> (054)	73.95b
<i>Fusarium sp.</i> (108)	59.77b
<i>Penicillium sp.</i> (071)	48.37b
<i>Penicillium sp.</i> (067)	25.17b

*Con 40 g/L de Glucano coloidal 0.28% p/v como sustrato

La separación de medias se hizo por la prueba LSMMeans, letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($\alpha = 0.05$).

En los cuadros 6 y 7 y en las figuras 4 y 5 se puede notar que *Trichoderma sp.* (069), *Serratia sp.* (054), *Fusarium sp.* (108) y *Penicillium sp.* (067) alcanzaron valores mayores, tanto de PAFA como de ABCPE calculada promedio, al usar 40 ó 80 g/L de glucano coloidal 28% p/v, comparadas con las obtenidas cuando fueron aplicados sin sustrato y al aplicar 1 ó 2 g/L de celulosa.

Tanto celulosa como glucano, independientemente de las concentraciones en que fueron aplicados no favorecieron a la mayoría de los antagonistas, a excepción de celulosa 2 g/L que presentó una tendencia a favorecer la actividad antagonista, particularmente de *Penicillium sp.* (071) y *Fusarium sp.* (108). Evidentemente ejercieron un efecto negativo sobre la capacidad antagónica de *Trichoderma sp.* (069) sobre *P. infestans* pues sus porcentajes máximos de PAFA observados y ABCPE promedio calculados son superiores a los demás antagonistas evaluados y similares a los del testigo; como consecuencia de ello se favoreció el desarrollo de la enfermedad.

Resultado similar obtuvieron Okumoto y Bustamante (1993), ya que al aplicar leche como sustrato ésta funcionó negativamente pues incrementó el tizón temprano en tomate y las aplicaciones de quitina no contribuyeron a aumentar la población microbial en el follaje.

Este resultado no nos permite inferir si las concentraciones de los sustratos evaluados fueron muy altas o bajas ya que las dos dosis evaluadas en cada sustrato dieron resultados muy similares, a pesar de que en celulosa si se observó mejor comportamiento antagonista en la dosis más alta (2 g/L). No obstante se puede suponer que el periodo de tiempo comprendido entre la aplicación del sustrato, la inoculación del antagonista y la inoculación de *P. infestans* no fue suficiente como para permitir el establecimiento del antagonista en el follaje o que causó que el antagonista se alimentara de ellos y no ejerciera influencia sobre el patógeno, situación observada por Sánchez *et al.* (1998).

También se ha podido observar que *Penicillium* sp. (067) tuvo un buen efecto antagónico sobre *P. infestans*, independientemente del sustrato y sus concentraciones observó los porcentajes máximos de infección más bajos lo cual hace suponer que dicho microorganismo tiene alto potencial como agente antagónico. Situaciones similares han sido observadas antes por Jindal *et al.* (1988), Roy *et al.* (1991), Sánchez (1996) y Sánchez *et al.* (1998).

4.1.3 Efecto de los sustratos sobre el patógeno

En relación a los sustratos, en los tratamientos en los que fueron aplicados sin antagonistas, se pudo observar que el porcentaje de área foliar afectada más bajo

alcanzado en la última evaluación fue obtenido cuando se utilizó celulosa 1 g/L (65.67%), seguido por 40 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v (56.14%), el testigo (55.00%), 80 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v (30.67%), y celulosa 2 g/L (31.00%), figura 6.

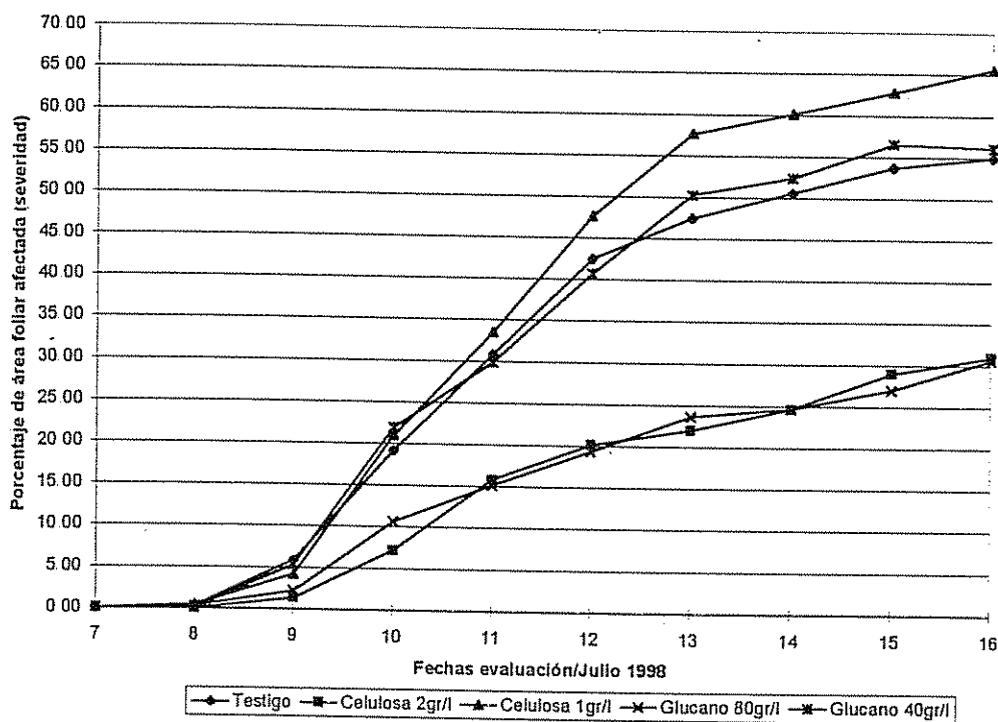


Figura 6.- Efecto de celulosa y glucano, cada uno en dos dosis diferentes, en el desarrollo del tizón tardío, expresado como Porcentaje de Area Foliar Afectada (PAFA), a través de 10 días de evaluación.

Con respecto al ABCPE promedio calculada para los sustratos, la prueba LSMeans de separación de medias indicó que los tratamientos donde se aplicó celulosa 2 g/L y 80 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v fueron diferentes a todos los demás; los mayores valores fueron obtenidos por celulosa 1 g/L, 40 g/L de glucano coloidal 0.28%

p/v, 320.23, 285.33 respectivamente, mayores que el ABCPE promedio calculada para el testigo (278.04); mientras que el menor valor fue obtenido por celulosa 2 g/L (cuadro 8), estos resultados corroboran lo mencionado anteriormente en cuanto a que tanto los valores de severidad como de ABCPE promedio calculada fueron mayores cuando se uso glucano que cuando se aplicó celulosa y también apoyan el supuesto de que el glucano y celulosa 1 g/L favorecen al tizón tardío o interfieren con el establecimiento del antagonista en la filosfera; mientras que celulosa 2 g/L presenta una tendencia a disminuir la severidad de la enfermedad.

Cuadro 8. - Efecto de celulosa y glucano, en dos dosis diferentes, sobre los antagonistas evaluados de acuerdo al Area Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE) promedio.

TRATAMIENTOS	ABCPE PROMEDIO
Celulosa 1 g/L	320.23a
40 g/L de Glucano coloidal 0.28% p/v	285.33a
Testigo*	278.04a
80 g/L de Glucano coloidal 0.28% p/v	138.27b
Celulosa 2 g/L	135.67b

*Sin aplicación de antagonista ni sustrato (testigo absoluto)

La separación de medias se hizo por la prueba LSM means, letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($\alpha = 0.05$).

4.1.4 Efecto de sustratos y antagonistas en el periodo de incubación de la enfermedad.

El análisis de varianza para los datos del periodo de incubación observado mostró que no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) en la interacción sustratos-antagonistas,

ni tampoco entre el factor sustratos y el factor antagonistas de forma independiente (anexo 4).

Sin embargo se puede observar (cuadro 9), que tanto con *Penicillium* sp. (067) como con *Serratia* sp. (054) no se observaron síntomas de la enfermedad lo cual confirma lo dicho anteriormente en cuanto a que dichos organismos ejercen su poder antagónico sobre *P. infestans* por sí solos. Por otro lado, el resto de antagonistas evaluados presentaron un periodo de incubación promedio mayor al obtenido por el testigo. Los valores mas altos fueron observados por *Trichoderma* sp. (069) y *Fusarium* sp. (108), esto nos indica que su periodo de incubación fue más largo y que las plantas inoculadas con ellos mostraron los síntomas más tarde los demás antagonistas evaluados, lo cual confirma el hecho de que tienen un alto potencial como agentes de control biológico.

Cuadro 9.- Periodo de incubación promedio observado por los cinco antagonistas y el testigo.

TRATAMIENTOS	PERIODO DE INCUBACION PROMEDIO (en días)
<i>Penicillium</i> sp. (067)	No mostraron síntomas
<i>Serratia</i> sp. (054)	No mostraron síntomas
<i>Trichoderma</i> sp. (069)	5.00
<i>Fusarium</i> sp. (108)	4.67
<i>Penicillium</i> sp. (071)	4.33
Testigo *	3.75

*Solamente con agua destilada

En relación al periodo de incubación promedio observado por los diferentes sustratos evaluados, se puede observar la tendencia de que celulosa 2 g/L y 80 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v obtuvieron los valores promedios más altos, 4.20 y 4.00 respectivamente ; al compararse con el obtenido por el testigo (3.75), cuadro 10. Lo cual nos indica que los síntomas del tizón tardío tardaron más en manifestarse en los tratamientos en donde se aplicaron dichos sustratos que en los restantes.

Cuadro 10.- Periodo de incubación promedio observado en los cuatro sustratos evaluados y el testigo.

TRATAMIENTOS	PERIODO DE INCUBACION PROMEDIO (en días)
Celulosa 2 g/L	4.20
80 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v	4.00
40 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v	3.80
Celulosa 1 g/L	3.80
Testigo*	3.75

*Solamente con agua destilada

4.1.5 Recuperación de antagonistas

Como puede observarse en el cuadro 11, se recuperó la mayor cantidad de antagonistas a los ocho días después de ser inoculados (ddi) en el follaje, en comparación con la recuperación realizada a los quince días. Además se puede notar que a los ocho ddi se recuperó el mayor número de antagonistas en los tratamientos en donde se aplicó glucano junto con los antagonistas. Por otro lado, se puede ver que *Trichoderma* sp. (069) no se recuperó en ninguno de los tratamientos mientras que *Serratia* sp. (054) se recuperó en todos los tratamientos siempre a los 8 ddi, resultados

similares obtuvieron Ruiz-Silvera *et al.* (1997), quienes al utilizar sustratos como leche, melaza y la combinación de ambos lograron recuperar la bacteria *S. marcescens* R1 de hojas de banano en donde había sido inoculada e incluso de hojas provenientes de plantas en donde no había sido inoculada directamente. Es importante considerar el periodo que un antagonista puede permanecer en el filoplano ya que puede ser utilizado para a la hora de decidir cuando repetir nuevamente la aplicación de sustrato y/o antagonista. Además es importante observar que en los tratamientos en los que solamente se aplicaron los sustratos no hubo recuperación de antagonistas.

Cuadro 11 - Antagonistas recuperados en cada sustrato a los 8 y 15 días después de inoculados.

TRATAMIENTOS	8 ddi	15 ddi
Testigo absoluto*	Ninguno	Ninguno
Testigo relativo**	<i>Serratia</i> sp. (054), <i>Fusarium</i> sp. (108), y <i>Penicillium</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.
Celulosa 2 g/L	Ninguno	Ninguno
Celulosa 2g/L + antagonistas	<i>Serratia</i> sp. (054)	Ninguno
Celulosa 1 g/L	Ninguno	Ninguno
Celulosa 1g/L + antagonistas	<i>Serratia</i> sp. (054)	Ninguno
80 g/L glucano coloidal 0.28% p/v	Ninguno	Ninguno
80 g/L glucano coloidal 0.28% p/v + antagonistas	<i>Serratia</i> sp. (054), <i>Fusarium</i> sp. (108), y <i>Penicillium</i> spp.	<i>Serratia</i> sp. (054), <i>Fusarium</i> sp. (108),
40 g/L glucano coloidal 0.28% p/v	Ninguno	Ninguno
40 g/L glucano coloidal 0.28% p/v + antagonistas	<i>Serratia</i> sp. (054) y <i>Penicillium</i> spp.	<i>Serratia</i> sp. (054), <i>Penicillium</i> spp.

*Solamente con aplicación de agua

**Solamente con aplicación de antagonistas

4.1.6 Efecto del cultivar sobre *P. infestans*

El análisis de varianza para el factor cultivar dio una diferencia altamente significativa ($p < 0.01$). Esto pudo observarse claramente, puesto que el cultivar Peraline no mostró síntomas de tizón tardío durante todo el período de tiempo que duró la evaluación del ensayo, mientras que el cultivar Hayslip si mostró síntomas de enfermedad, anexo 2. Este resultado llevó a suponer que la concentración de esporangios de *P. infestans* inoculada (8×10^3 esporangios/ml), era muy baja como para infectar y causar síntomas en el cultivar Peraline, por lo que se decidió realizar un ensayo para evaluar dos concentraciones más altas y confirmar *P. infestans* no produce infección en dicho cultivar.

4.2 Evaluación de tres concentraciones de *P. infestans* en tomate cultivar Peraline

En el ensayo donde se evaluaron tres concentraciones de esporangios de *P. infestans*, se observó que aún en la concentración más alta (16×10^3 esporangios/ml) las hojas inoculadas del cultivar Peraline no mostraron síntomas característicos de la enfermedad, después de 10 días de evaluación, a pesar de haber proporcionado las condiciones de humedad y película de agua en el follaje necesarias para que el patógeno infecte al hospedero. Sin embargo, en experimento realizado con folíolos desprendidos del cultivar Peraline, las hojas inoculadas si mostraron síntomas de enfermedad a los tres días después de haber sido inoculadas ; además se observó que las lesiones formadas eran más pequeñas y con menos esporulación que las formadas en el cultivar Hayslip. Según Sánchez (1996), en estudios realizados en Costa Rica que el cultivar Peraline mostró tanto resistencia horizontal como vertical a *P. infestans* pues en el campo este cultivar era menos afectado por el tizón tardío al compararlo con el cultivar comercial Hayslip. Por otro lado, Laterrot (1975, 1994) menciona que Peraline

obtiene su resistencia de un cruce entre Perialbo (susceptible) y Wva'63 una línea resistente de *L. pimpinellifolium* Wva 700. En esta investigación se observó que las variantes de *P. infestans* provenientes de las recolecciones realizadas en Paraíso, Cervantes y Guayabo no fueron patogénicas a dicho cultivar.

4.3 Evaluación del efecto de las épocas de aplicación de sustratos sobre los antagonistas de *P. infestans*

Los factores evaluados en este ensayo fueron la aplicación y no aplicación de celulosa 2 g/L al follaje de plantas de tomate cultivar Hayslip, así como la inoculación de *Penicillium* sp. (067) una y dos semanas antes de inocular *P. infestans*. El análisis de varianza realizado para la variable porcentaje de área foliar afectada (PAFA) indicó que hubo diferencia significativa para la severidad en la interacción sustrato-época de aplicación y evaluaciones ($p < 0.01$), anexo 5. Lo cual se explica porque la severidad de la enfermedad aumentó a medida transcurrió el tiempo de evaluación.

Sin embargo no hubo diferencia significativa entre tratamientos evaluados, es de suponer entonces que la presencia o ausencia de sustrato (celulosa 2 g/L) ni la época de aplicación, sustrato aplicado 1 ó 2 semanas antes de *P. infestans*, influyeron sobre el establecimiento de *Penicillium* sp. (067) en el follaje de la planta como para que disminuyera la severidad del tizón tardío (anexo 5).

Como puede observarse en la figura 7, los porcentajes máximos de severidad al final de la evaluación fueron para el testigo, 26.67% ; *Penicillium* sp. (067) 2 semanas antes, 16% ; *Penicillium* sp. (067) sin sustrato, 1 semana antes, 7.50% ; *Penicillium* sp. (067) con sustrato, 1 semana antes, 6.50% ; y el menor fue *Penicillium* sp. (067) con

sustrato, 2 semanas antes, 3.3%. Si se compara con los datos obtenidos en el ensayo de evaluación de sustratos y antagonistas (cuadro 3 y figura 1) se observa una tendencia de aumentar la severidad del tizón tardío cuando se aplicó *Penicillium* sp. (067) una o dos semanas antes de *P. infestans*, lo cual hace suponer que dicho antagonista actuó mejor cuando se aplicó 2 días antes del patógeno.

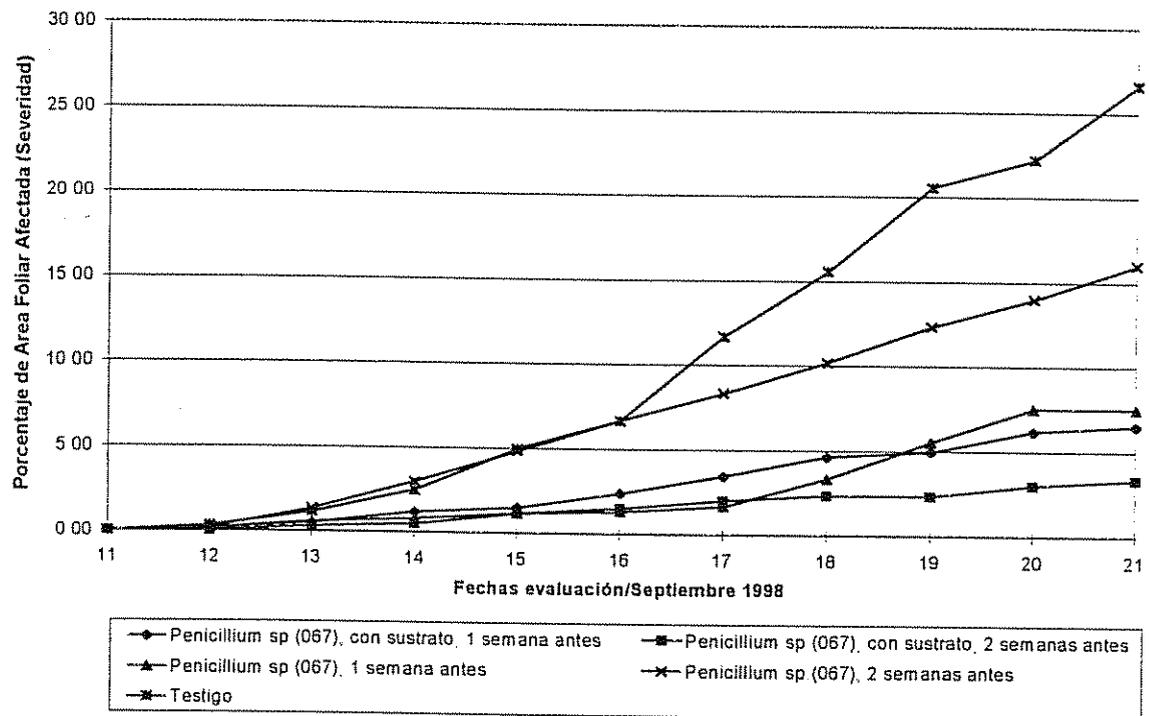


Figura 7.- Efecto de los cinco tratamientos evaluados en el desarrollo del tizón tardío, expresado como Porcentaje de Area Foliar Afectada (PAFA), a través de 11 días de evaluación.

El análisis de varianza para el ABCPE (anexo 6), mostró que no hubo diferencias entre tratamientos evaluados, resultado corroborado por la prueba LSMeans de separación de medias, cuadro 12. No obstante se observó la tendencia que algunos

antagonistas, como *Penicillium* sp (067), presentaron un desarrollo de la enfermedad inferior al testigo cuando se aplicó celulosa 2 g/L dos semanas antes de *P. infestans* (cuadro 12), e inclusive menor que el ABCPE observada por el mismo antagonista y el mismo sustrato en el primer ensayo (cuadro 4).

Cuadro 12.- Efecto de dos épocas de aplicación, una o dos semanas antes de Penicillium sp. (067) y celulosa (2 g/L) sobre el desarrollo de tizón tardío de acuerdo al Area Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad promedio.

TRATAMIENTOS	ABCPE PROMEDIO
Testigo*	94.00a
<i>Penicillium</i> sp. (067), 2 semanas antes	68.90a
<i>Penicillium</i> sp. (067), con sustrato, 1 semana antes	28.28a
<i>Penicillium</i> sp. (067), 1 semana antes	25.82a
<i>Penicillium</i> sp. (067), con sustrato, 2 semanas antes	14.83a

*Sin aplicación de antagonista ni sustrato (testigo absoluto)

La separación de medias se hizo por la prueba LSMeans, letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($\alpha = 0.05$).

El análisis de varianza para el período de incubación (anexo 7), mostró que no hubo diferencias significativas entre tratamientos evaluados ($p < 0.05$), lo cual fue confirmado por la prueba LSMeans de separación de medias, cuadro 13. Sin embargo, se observa una tendencia de que *Penicillium* sp. (067) aplicado con celulosa 2 g/L, una y dos semanas antes presentó el período de incubación más largo, cuadro 13, lo que se traduce en un desarrollo lento de la enfermedad.

Lo anterior puede indicar que los periodos evaluados no permitieron detectar el periodo de tiempo adecuado como para que el antagonista se estableciera en el follaje y que le permitiera ejercer algún efecto sobre la enfermedad.

Cuadro 13.- Periodo de incubación promedio observado en los cuatro tratamientos evaluados y el testigo.

TRATAMIENTOS	PERIODO DE INCUBACION PROMEDIO (en días)
<i>Penicillium</i> sp. (067), con sustrato, 1 semana antes	4.00a
<i>Penicillium</i> sp. (067), con sustrato, 2 semanas antes	4.00a
<i>Penicillium</i> sp. (067), 1 semana antes	3.67a
Testigo*	3.33a
<i>Penicillium</i> sp. (067), 2 semanas antes	3.20a

*Sin aplicación de antagonista

La separación de medias se hizo por la prueba Tukey, letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($\alpha = 0.05$).

4.4 Evaluación del efecto de formulaciones sobre antagonistas de *P. infestans*

El análisis de varianza realizado para la variable porcentaje de área foliar afectada, PAFA (severidad) indicó que no hubo diferencia significativa para la interacción antagonista-formulación en el tiempo, así como para la interacción antagonista formulación (anexo 8).

Los valores PAFA máximos alcanzados para los tratamientos evaluados fueron 49.33% para el testigo ; 42.17% para *Fusarium* sp. (108) sin formular ; 24.67% para *Penicillium* sp. (067) sin formular ; 20.17% para *Penicillium* sp. (067) formulado y 15.67% para *Fusarium* sp. (108) formulado, figura 8. En relación al ABCPE calculada, el análisis

de varianza (anexo 9), indicó que no hubo diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). Lo cual es corroborado por la prueba Tukey de separación de medias, cuadro 14.

En el caso de *Fusarium* sp. (108) la formulación evidentemente contrarrestó el efecto de la lluvia, lo que hace suponer que la formulación podría tener un efecto positivo sobre dicho antagonista y que protegió al inóculo de las diferentes condiciones ambientales a las que fue expuesto.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos en la primera prueba bajo techo donde *Penicillium* sp. (067) presentó 0.00 de ABCPE promedio y *Fusarium* sp. (108) 41.75 (cuadro 3), con la prueba que se realizó fuera del invernadero (cuadro 14), se puede decir que la formulación sí favoreció la capacidad antagónica de los microorganismos evaluados ya que aún encontrándose bajo condiciones ambientales obtuvieron ABCPE calculadas menores a las del testigo en el primer ensayo (278.04).

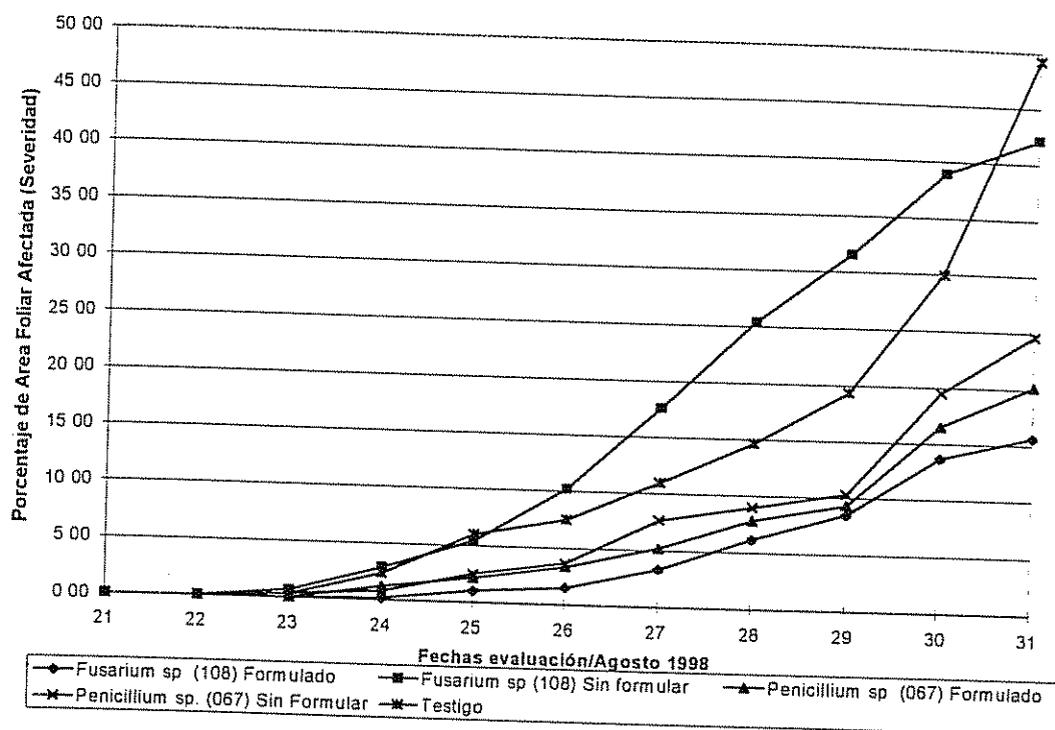


Figura 8.- Efecto de los cinco tratamientos evaluados en el desarrollo del tizón tardío, expresado como Porcentaje de Area Foliar Afectada (PAFA), a través de 11 días de evaluación.

Cuadro 14.- Efecto de la formulación sobre *Penicillium* sp. (067) y *Fusarium* sp. (108) de acuerdo al Area Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad promedio.

TRATAMIENTOS	ABCPE PROMEDIO
<i>Fusarium</i> sp. (108) Sin Formulación	153.92a
Testigo*	115.87a
<i>Penicillium</i> sp. (067) Sin Formulación	66.17a
<i>Penicillium</i> sp. (067) Formulado	55.62a
<i>Fusarium</i> sp. (108) Formulado	42.17a

*Sin aplicación de antagonista

La separación de medias se hizo por la prueba Tukey, letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($\alpha = 0.05$).

En relación al periodo de incubación observado en cada tratamiento, el análisis de varianza indicó que no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) para la interacción antagonista-formulación (anexo 10), corroborado por la prueba Tukey de separación de medias (cuadro 15). Aunque se observa una tendencia de que los microorganismos formulados cuentan con los rangos promedios más altos de periodo de incubación, lo cual puede indicar que la formulación retrasa el desarrollo de la enfermedad.

Cuadro 15.- Periodo de incubación promedio observado en los cuatro tratamientos evaluados y el testigo.

TRATAMIENTOS	PERIODO DE INCUBACION PROMEDIO (en días)
<i>Fusarium</i> sp. (108) Formulado	5.67a
<i>Penicillium</i> sp. (067) Formulado	5.50a
<i>Fusarium</i> sp. (108) Sin Formulación	5.00a
Testigo*	4.80a
<i>Penicillium</i> sp. (067) Sin Formulación	4.75a

*Sin aplicación de antagonista

La separación de medias se hizo por la prueba Tukey, letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($\alpha = 0.05$).

5. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en esta investigación, se concluye que :

La metodología desarrollada para inocular *P. infestans* bajo techo resultó efectiva con una excelente infección del patógeno en las plantas testigo.

Los antagonistas evaluados mostraron un efecto claro de interferencia sobre el desarrollo de la enfermedad causada por *P. infestans* en plantas producidas bajo techo pues disminuyeron la severidad de la enfermedad en más de un 200% con respecto al testigo.

Penicillium sp. (067) fue el mejor antagonista evaluado en todos los ensayos ya que presentó la menor severidad al aplicarse con y sin sustrato, característica que le da un alto potencial como agente de control biológico de *P. infestans*.

Los sustratos ejercieron un efecto negativo sobre *Trichoderma* sp. (069) ya que la severidad de la enfermedad aumentó cuando dicho antagonista se inoculó posteriormente a la aplicación de los sustratos.

La actividad de los antagonistas fue menor cuando se aplicaron después de los sustratos independientemente de las concentraciones evaluadas.

El mejor sustrato fue Celulosa 2g/L porque los antagonistas evaluados permitieron los menores niveles de severidad y mayores períodos de incubación al combinarse con los sustratos evaluados a excepción de *Trichoderma* sp. (069).

La mejor época para recuperar antagonistas del follaje inoculado fue a los 8 días después de su inoculación.

El cultivar Peraline presentó resistencia al ataque de las poblaciones de *P. infestans* usadas en esta investigación ya que no presentó síntomas de la enfermedad.

La formulación con aceite y agua de *Penicillium* sp. (067) y *Fusarium* sp. (108), favoreció el efecto antagonista bajo condiciones ambientales naturales únicamente de *Fusarium* sp (108).

6. RECOMENDACIONES

Se necesita realizar más investigaciones del efecto de antagonistas y sustratos sobre *P. infestans* bajo condiciones controladas y de campo.

Investigar si la aplicación de combinaciones de antagonistas mejora su efecto antagónico sobre *P. infestans* así como secuencias y frecuencias de aplicación.

Evaluar el efecto de dosis más bajas de glucano y celulosa sobre los antagonistas de *P. infestans*.

Realizar ensayos para determinar el periodo más efectivo entre la aplicación del sustrato , la inoculación de los antagonistas y la inoculación de *P. infestans*.

Involucrar al cultivar Peraline en trabajos de mejoramiento genético de tomate ya que puede ser una buena fuente de resistencia a *P. infestans*.

Evaluar si las aplicaciones de antagonistas formulados en diferentes épocas disminuyen la severidad del tizón tardío. Además evaluar si la formulación utilizada en este ensayo y otras formulaciones pueden ser utilizadas con otros antagonistas de *P. infestans*.

7. LITERATURA CITADA

- Ahmed, M.A., Saleh, E.A. 1987. Phyllosphere microflora of tomato leaves and their antagonistic activity against *Alternaria solani*. Proceedings of the First Conference of the Agricultural Development and Research. Vol. IV. Food Science & Microbiology. Faculty of Agriculture, Ain Shams University, El Cairo, Egipto del 19 al 21 de diciembre de 1987. pp 106-122.
- Agrios, G. N. 1986. Fitopatología. Editorial Limusa. México. pp 250-257.
- Alexopoulos, C. J. ; Mims, C.W. 1979. Introductory Mycology. John Wiley & Sons, New York. pp 145-188.
- Andrews, J.H. 1992. Biological control in the phyllosphere. Annual Review of Phytopathology 30 :603-635.
- Andrison, D. 1995. Biology, ecology and epidemiology of potato late-blight pathogen *Phytophthora infestans*. Phytopathology 85 :1053-1056.
- Blakeman, J.P. ; Fokkema, N.J. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. Annual Review of Phytopathology 20 :167-192.
- Beagle-Ristaino, J.E., Papavizas, G.C. 1985. Biological control of *Rhizoctonia* stem canker and black scurf of potato. Phytopathology 75 :560-564.
- Bourke, A. 1991. Potato blight in Europe in 1945 : the scientific controversy. In *Phytophthora*. J. A. Lucas ; R. C. Shattock ; D. S. Shaw ; L. R. Cooke, eds. Cambridge University Press, Cambridge. pp 12-24.
- Brasier, C. M. 1983. Problems and prospects in *Phytophthora* research. In *Phytophthora, its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. D.C. Erwin, S. Bartnicki-García ; P.H. Tsao, eds. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. Pp 351-364.
- Brasier, C. M. 1992. Evolutionary biology of *Phytophthora*. Part II : phylogeny, speciation, and population structure. Annual Review of Phytopathology 30 :173-200.
- Brasier, C. M. ; Hansen, E. M. 1992. Evolutionary biology of *Phytophthora*. Part I : genetic system, sexuality and the generation of variation. Annual Review of Phytopathology 30 :153-171.
- Calvo, G.; Barrantes, L.; Hilje, L.; Segura, L.; Ramírez, O.; Kopper, N.; Ramírez, A.; Campos, J. L. 1992. Informe de avance sobre la validación de tecnologías de manejo integrado de plagas en tomate en el Valle Central Occidental, 1991-1992. Primer informe. MAG-GTZ-CATIE. Costa Rica. 99 p.
- CATIE, Proyecto Regional de Manejo Integrado de Plagas. 1990. Guía para el manejo integrado de plagas del cultivo de tomate. Serie Técnica. Informe Técnico No. 151, CATIE, Turrialba, Costa Rica. 138 p.

- Clulow, S.A. ; Stewart, H.E. ; Dashwood, E.P. ; Wastie, R.L. 1995. Tuber surface microorganisms influence the susceptibility of potato tuber to late-blight. *Annals of Applied Biology* 126 :33-43.
- Connick, W.J., Lewis, J.A., Quimby, P.C. 1990. Formulation of biocontrol agents for use in plant pathology. In *New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases*. Proceedings of a UCLA colloquium held at Frisco, Colorado. Ralfph R. Baker y Peter E. Dunn eds. Editorial Alan R. Liss, Inc. pp 345-372.
- Cook, R.J. ; Baker, K.F. 1983. *The nature and practice of biological of plant pathogens*. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 539 pp.
- De Bary, A. 1876. Researches into the nature of the potato fungus *Phytophthora infestans*. *Journal of The Royal Agricultural Society of England* 12 :239-269.
- Drenth, A. ; Goodwin, S.B. ; Fry, W.E. ; Davidse, L.C. 1993. Genotypic diversity of *Phytophthora infestans* in the Netherlands revealed by DNA polymorphism. *Phytopathology* 83 :1087-1092.
- Erwin, D.C. ; Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. P 145-184.
- Finlay, A.R., McCracken, A.R. 1991. Microbial suppression of *Phytophthora cinnamomi*. In *Phytophthora*. J.A. Lucas ; R.C. Shattock ; D.S. Shaw ; L.R. Cooke, eds. Cambridge University Press, Cambridge. pp 338-398.
- Fravel, D.R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* 26 :75-91.
- French, E.R., Forbes, G., Landeo, J. 1994. Ola migratoria de variantes mas agresivas de *Phytophthora infestans* amenazan a la papa. *Fitopatología* 29(1) : 15-18.
- Fry, W.E. ; Goodwin, S.B. 1997. Resurgence of the Irish potato famine fungus. After 150 years, the late blight fungus is again menacing farmers. *BioScience* 47(6) :363-371.
- Fry, W.E. ; Goodwin, S.B. ; Drenth, A. ; Sujkowski, L.S. ; Koh, Y.J. ; Cohen, B.A. ; Spielman, L.J. ; Deahl, K.L. ; Inglis, D.A. ; Sandlan, K.P. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways, and implications. *Plant Disease* 77 :653-661.
- Fry, W.E. ; Spielman, L.J. 1991. Population biology. In *Phytophthora infestans: the Cause of Late Blight of Potato*. *Advances in Plant Pathology*. Vol. 7. D.S. Ingam and P.H. Williams, eds. Academic Press, San Diego. Pp 171-192.
- Gallegly, M.E., Galindo, J. 1958. Mating types and oospores of *Phytophthora infestans* in nature in Mexico. *Phytopathology* 45 :274-277.

- Gallegly, W.E., Marvel, M.E. 1955. Inheritance of resistance to tomato race 0 of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 45 :103-109.
- González, R.; Bustamante, E.; Shannon, P.; Okumoto, S.; Leandro, G. 1996. Selección de microorganismos quitinolíticos en el control de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. 40 :6-11.
- Goodwin, S.B., Spielman, L.J., Matuszak, J.M., Bergeron, S.N., Fry, W.W. 1992. Clonal diversity and genetic differentiation on *Phytophthora infestans* populations in Northern and Central Mexico. *Phytopathology* 82 : 955-961.
- Greaves, M.P.; Holloway, P.J.; Auld, B.A. 1998. Formulation of microbial herbicides. In *Formulation of microbial biopesticides, beneficial microorganisms and nematodes*. Burges, H. D. (Ed.). Chapman & Hall, United Kingdom.
- Gregory, P. 1983. Some major epidemics caused by *Phytophthora*. In *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. D. C. Erwin; S. Bartricki-García; P. H. Tsao, eds. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. Pp 217-278.
- Indiogine, S.E.; Liddell, C.M.; Giles, C.L.; McEntee, J.P. 1992. Biological control of *Phytophthora capsici* on chilli peppers with several fungal and bacterial strains. *Phytopathology* 82 :1129 (Abstract).
- Jindal, K.K., Singh, H., Madhu, M., Meeta, M. 1988. Biological control of *Phytophthora infestans* on potato. *Indian Journal of Plant Pathology* 6(1) : 59-62.
- Jongebloed, P.H.J.; Kessel, G.J.T.; Van der Plans, C.H.; Molhoek, W.M.L.; Fokkema, N.J. 1993. Biological control of *Phytophthora infestans* with selected bacterial antagonists. In *Proceedings ICPP 6 Montreal* (Abstract).
- Laterrot, H. 1975. Selection pour la resistance an mildio, *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary chez la tomate. *Annales Amelioration des Plantes*. 25 :129-149.
- Laterrot, H. 1994. NILs of tomato except for PH-2 genes. Research Report 21, Tomato Growers Cooperative (TGC). Reporte No. 44. pF2.
- Legard, D.E.; Goodwin, S.B.; Sujkowski, L.S.; Fry, W.E. 1993. Host specialization in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 83 :1334 (Abstract).
- Luchmeah, R.S., Cooke R.C. 1985. Pelleting of seed with the antagonist *Phytium oligandrum* for biological control of damping-off. *Plant Pathology* 34 :528-531.
- Malajczuk, N. 1983. Microbial antagonism to *Phytophthora*. In *Phytophthora, its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. D.C. Erwin; S. Bartnicki-García; P.H., Tsao, eds. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. Pp 197-218.

- Megazyme. 1996. Mixed-linkage beta-glucan : Assay procedure (McCleary method) ; AACC method 32-23 ; AOAC method 995.16, EBC methods 3.11.1, 4.16.1 and 8.11.1 Sidney, Australia. 15p.
- National Academy of Science. 1987. Report of the Research Briefing Panel on Biological Control in Managed Ecosystems. R.C. Cook, presidente. National Academy Press, Washington, D.C. 12 pp.
- Okumoto, S. ; Bustamante, E. 1993. Efecto de enmiendas foliares sobre el desarrollo del tizón temprano causado por *Alternaria solani* y sobre la población bacteriana en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 28 :1-6.
- Papavizas, G.C. 1981. Biological control in crop production. Allanheld Osmun, London. 461 p.
- Reeves, R.J. ; Jackson, R.M. 1974. Stimulation of sexual reproduction in *Phytophthora* by damage. Journal of General Microbiology 84 :303-310.
- Ribeiro, O.K. ; Linderman, G.G. 1991. Chemical and biological control of *Phytophthora* species in woody plants. In *Phytophthora*. J.A. Lucas ; R.C. Shattock ; D.S. Shaw ; L.R. Cooke, eds. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 299-410.
- Robertson, N.F. 1991. The challenge of *Phytophthora infestans*. In *Phytophthora infestans* : the Cause of Late Blight of Potato. Advances in Plant Pathology. Vol. 7. D.S. Ingam and P.H. Williams, eds. Academic Press, San Diego pp 1-30.
- Rodgers, P.B. 1989. Potential of biological control as a source of antifungal compounds for agrochemical and pharmaceutical product development. Pesticides Science 27 :155-164.
- Roiger, D.J. ; Jeffers, S.N. 1991. Evaluation of *Trichoderma* spp. for biological control of *Phytophthora* crown and root rot of apple seedling. Phytopathology 81 :910-917.
- Roy, S. ; Singh, B.D. ; Bhattacharyya, S.K. 1991. Biocontrol of late-blight of potato. *Phytophthora* Newsletter 17 :18.
- Ruiz-Silvera, C. ; Bustamante, E. ; Jiménez, F. ; Saunders, J.L. ; Okumoto, S. ; González, R. 1997. Efecto de sustratos sobre crecimiento y supervivencia de bacterias antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis*. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 45 :1-8.
- Sánchez G., V.A. 1996. Studies on Biological and Integrated Control of *Phytophthora infestans* on Tomato in Costa Rica. Thesis submitted for the degree of Philosophiae Doctor. School of Biological Sciences University of Wales, Bangor.
- Sánchez G., 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 : 25-34.

- Sansome, E. 1977. Polyploidy and induced gametangial formation in British isolates of *Phytophthora infestans*. *Journal of General Microbiology* 99 :311-316.
- Shaner, G., Finney, R.E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-midewing resistance in knox wheat. *Phytopathology* 67 :1051-1056.
- Shattock, R. C. ; Tooley, P.W. ; Fry, W.E. 1986. Genetics of *Phytophthora infestans* : characterisation of single-oospore cultures from A1 isolates induced to self by intra-specific stimulation. *Phytopathology* 76 :407-410
- Shaw, D.S. 1991. Genetics. In *Phytophthora infestans* : the Cause of Late Blight of Potato. *Advances in Plant Pathology*. Vol. 7. D.S. Ingam and P. H. Williams, eds. Academic Press, San Diego. Pp 131-170.
- Sherf, A.F., MacNab, A.A. 1986. Vegetable diseases and their control. Segunda edición. John Wiley & Sons, Inc. pp 652-657.
- Skidmore, D.I. ; Shattock, R.C. ; Shaw, D.S. 1984. Oospores in culture of *Phytophthora infestans* resulting from selfing induced by the presence of *P. drechsleri* isolated from blighted potato foliage. *Plant Pathology* 33 :173-183.
- Smith, V.L. ; Wilcox, W.F. ; Harman ; G.E. 1990. Potential for biological control of phytophthora root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathology* 80 :880-885.
- Spurr, H.W. 1990. The Phylloplane. In *New directions in biological control : alternatives for supressing agricultural pests and diseases*. *Proceedings of a UCLA colloquium held at Frisco, Colorado*. Ralfph R. Baker y Peter E. Dunn eds. Editorial Alan R. Liss, Inc. pp 271-278.
- Talavera Sevilla, M. ; Bustamante, E. ; González, R. ; Sánchez, V. 1998a. Selección y evaluación en laboratorio y campo de microorganismos glucanólíticos antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis*. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 47 : 24-30.
- Talavera Sevilla, M. ; López, F. ; Bustamante, E. ; González, R. 1998b. Extracción y cuantificación de Beta-Glucano a partir de sustratos comunes en el trópico. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 47 : 31-36.
- Turkensteen, L.J. 1973. Partial resistance of tomatoes against *Phytophthora infestans*. *Agricultural Research Report* 810, Wageningen.
- Wastie, R.L. 1991. Breeding for resistance. In *Phytophthora infestans* : the cause of Late Blight of Potato. *Advances in Plant Pathology*. Vol. 7. D.S. Ingam y P. H. Williams, eds. Academic Press, San Diego, CA. pp 193-224.
- Weste, G. 1983. Population Dynamics and Survival of *Phytophthora*. In *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. D.C. Erwin ; S. Bartnicki-García ; P.H. Tsao, eds. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. Pp 237-257.

Wilson, J.B., Gallegly, M.E. 1955. The interrelationship of potato and tomato races of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 45 :473-476.

8. ANEXOS

ANEXO 1A.- Tratamientos evaluados en el ensayo "Evaluación de sustratos y antagonistas a *P. infestans* en los cultivares de tomate Hayslip y Pieraline".

Tratamientos

- Hayslip+ sin sustrato + *Serratia* sp. (054)
 Hayslip+ sin sustrato + *Trichoderma* sp. (069)
 Hayslip+ sin sustrato + sin antagonista
 Hayslip+ sin sustrato + *Penicillium* sp. (067)
 Hayslip+ sin sustrato + *Fusarium* sp. (108)
 Hayslip+ sin sustrato + *Penicillium* sp. (071)
 Hayslip + celulosa 2 g/L + *Serratia* sp. (054)
 Hayslip + celulosa 2 g/L+ *Trichoderma* sp. (069)
 Hayslip + celulosa 2 g/L + sin antagonista
 Hayslip + celulosa 2 g/L + *Penicillium* sp. (067)
 Hayslip + celulosa 2 g/L + *Fusarium* sp. (108)
 Hayslip + celulosa 2 g/L + *Penicillium* sp. (071)
 Hayslip + celulosa 1 g/L + *Serratia* sp. (054)
 Hayslip + celulosa 1 g/L+ *Trichoderma* sp. (069)
 Hayslip + celulosa 1 g/L + sin antagonista
 Hayslip + celulosa 1 g/L + *Penicillium* sp. (067)
 Hayslip + celulosa 1 g/L + *Fusarium* sp. (108)
 Hayslip + celulosa 1 g/L + *Penicillium* sp. (071)
 Hayslip + 80 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + *Serratia* sp. (054)
 Hayslip + 80 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + *Trichoderma* sp. (069)
 Hayslip + 80 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + sin antagonista
 Hayslip + 80 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + *Penicillium* sp. (067)
 Hayslip + 80 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + *Fusarium* sp. (108)
 Hayslip + 80 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + *Penicillium* sp. (071)
 Hayslip + 40 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + *Serratia* sp. (054)
 Hayslip + 40 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + *Trichoderma* sp. (069)
 Hayslip + 40 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + sin antagonista
 Hayslip + 40 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + *Penicillium* sp. (067)
 Hayslip + 40 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + *Fusarium* sp. (108)
 Hayslip + 40 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + *Penicillium* sp. (071)
 Pieraline + sin sustrato + *Serratia* sp. (054)
 Pieraline + sin sustrato + *Trichoderma* sp. (069)
 Pieraline + sin sustrato + sin antagonista
 Pieraline + sin sustrato + *Penicillium* sp. (067)
 Pieraline + sin sustrato + *Fusarium* sp. (108)
 Pieraline + sin sustrato + *Penicillium* sp. (071)
 Pieraline + celulosa 2 g/L + *Serratia* sp. (054)
 Pieraline + celulosa 2 g/L+ *Trichoderma* sp. (069)
 Pieraline + celulosa 2 g/L + sin antagonista
 Pieraline + celulosa 2 g/L + *Penicillium* sp. (067)
 Pieraline + celulosa 2 g/L + *Fusarium* sp. (108)
 Pieraline + celulosa 2 g/L + *Penicillium* sp. (071)
 Pieraline + celulosa 1 g/L + *Serratia* sp. (054)

- Pieraline + celulosa 1 g/L+ *Trichoderma* sp. (069)
Pieraline + celulosa 1 g/L + sin antagonista
Pieraline + celulosa 1 g/L + *Penicillium* sp. (067)
Pieraline + celulosa 1 g/L + *Fusarium* sp. (108)
Pieraline + celulosa 1 g/L + *Penicillium* sp. (071)
Pieraline + 80 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + *Serratia* sp. (054)
Pieraline + 80 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + *Trichoderma* sp. (069)
Pieraline + 80 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + sin antagonista
Pieraline + 80 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + *Penicillium* sp. (067)
Pieraline + 80 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + *Fusarium* sp. (108)
Pieraline + 80 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + *Penicillium* sp. (071)
Pieraline + 40 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + *Serratia* sp. (054)
Pieraline + 40 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + *Trichoderma* sp. (069)
Pieraline + 40 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + sin antagonista
Pieraline + 40 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + *Penicillium* sp. (067)
Pieraline + 40 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + *Fusarium* sp. (108)
Pieraline + 40 g/L de glucano coloidal 0.28% p/v + *Penicillium* sp. (071)

ANEXO 2A.- Análisis de varianza para la variable Porcentaje de Area Foliar Afectada, PAFA (severidad). Ensayo evaluación de sustratos y antagonistas a *P. infestans* en los cultivares de tomate Hayslip y Piraline. Los valores de severidad se transformaron $\sqrt{(x+0.5)}$.

General Linear Models Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
R	5	1 2 3 4 5
C	2	1 2
S	5	1 2 3 4 5
A	6	1 2 3 4 5 6
F	10	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Number of observations in data set = 3000

NOTE: Due to missing values, only 2990 observations can be used in this analysis.

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: SEVER2

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	838	8642.0034035	10.3126532	29.04	0.0001
Error	2151	763.9710147	0.3551702		
Corrected Total	2989	9405.9744182			

R-Square	C V.	Root MSE	SEVER2 Mean
0.918778	40.03314	0.5959615	1.4886706

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
R	4	34.1596399	8.5399100	24.04	0.0001
C	1	1835.8513571	1835.8513571	5168.93	0.0001
R*C	4	31.9551687	7.9887922	22.49	0.0001
S	4	146.9653266	36.7413316	103.45	0.0001
C*S	4	147.8122763	36.9530691	104.04	0.0001
R*C*S	32	258.4775393	8.0774231	22.74	0.0001
A	5	914.2472886	182.8494577	514.82	0.0001
C*A	5	938.4590277	187.6918055	528.46	0.0001
S*A	20	201.8927461	10.0946373	28.42	0.0001
C*S*A	20	205.7159161	10.2857958	28.96	0.0001
R*C*S*A	199	1320.8217784	6.6372954	18.69	0.0001
F	9	789.2751520	87.6972391	246.92	0.0001
C*F	9	794.5723007	88.2858112	248.57	0.0001
S*F	36	62.1421083	1.7261697	4.86	0.0001
A*F	45	356.1243997	7.9138755	22.28	0.0001
C*S*F	36	60.9083153	1.6918976	4.76	0.0001
C*A*F	45	362.2741052	8.0505357	22.67	0.0001
S*A*F	180	89.6003289	0.4977796	1.40	0.0006
C*S*A*F	180	90.7486285	0.5041590	1.42	0.0004***

Tests of Hypotheses using the Type I MS for R*C as an error term

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
R	4	34.1596399	8.5399100	1.07	0.4750
C	1	1835.8513571	1835.8513571	229.80	0.0001***

Tests of Hypotheses using the Type I MS for R*C*S as an error term

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
S	4	146.96532655	36.74133164	4.55	0.0051
C*S	4	147.81227628	36.95306907	4.57	0.0049

Tests of Hypotheses using the Type I MS for R*C*S*A as an error term

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	5	914.24728862	182.84945772	27.55	0.0001
C*A	5	938.45902770	187.69180554	28.28	0.0001
S*A	20	201.89274606	10.09463730	1.52	0.0773
C*S*A	20	205.71591607	10.28579580	1.55	0.0686ns

*** diferencia altamente significativa $p < 0.01$

ns no mostró diferencias significativas

ANEXO 3A.- Análisis de varianza para la variable Area Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad. Ensayo evaluación de sustratos y antagonistas a *P. infestans* en los cultivares de tomate Hayslip y Peraline.

General Linear Models Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
R	5	1 2 3 4 5
S	5	1 2 3 4 5
A	6	1 2 3 4 5 6

Number of observations in data set = 150

NOTE: Due to missing values, only 149 observations can be used in this analysis.

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: AUC

Source	Sum of DF	Mean Squares	Square	F Value	Pr > F
Model	49	1370247.8633	27964.2421	4.37	0.0001
Error	99	632830.0149	6392.2224		
Corrected Total	148	2003077.8781			

R-Square	C.V.	Root MSE	AUC Mean
0.684071	90.92156	79.951375	87.934452

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
R	4	20298.66990	5074.66747	0.79	0.5319
S	4	98527.55215	24631.88804	3.85	0.0059
R*S	16	105379.18318	6586.19895	1.03	0.4324
A	5	870980.54986	174196.10997	27.25	0.0001
S*A	20	275061.90816	13753.09541	2.15	0.0070***

Tests of Hypotheses using the Type I MS for R*S as an error term

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
R	4	20298.669897	5074.667474	0.77	0.5600
S	4	98527.552149	24631.888037	3.74	0.0248

*** diferencia altamente significativa $p < 0.01$

ANEXO 4A.- Análisis de varianza para la variable Periodo de Incubación. Ensayo evaluación de sustratos y antagonistas a *P. infestans* en los cultivares de tomate Hayslip y Peraline.

General Linear Models Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
R	5	1 2 3 4 5
S	5	1 2 3 4 5
A	6	1 2 3 4 5 6

Number of observations in data set = 150

NOTE: Due to missing values, only 86 observations can be used in this analysis.

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: PERIN

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	46	32.54504239	0.70750092	1.01	0.4909
Error	39	27.32705063	0.70069361		
Corrected Total	85	59.87209302			

R-Square	C.V	Root MSE	PERIN Mean
0.543576	19.72285	0.837074	4.244186

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
R	4	3.59919041	0.89979760	1.28	0.2929
S	4	3.08021149	0.77005287	1.10	0.3707
R*S	16	10.45935779	0.65370986	0.93	0.5414
A	5	7.12989977	1.42597995	2.04	0.0949 ns
S*A	17	8.27638293	0.48684605	0.69	0.7885 ns

Tests of Hypotheses using the Type I MS for R*S as an error term

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
R	4	3.59919041	0.89979760	1.38	0.2861
S	4	3.08021149	0.77005287	1.18	0.3576 ns

ns no mostró diferencias significativas

ANEXO 5A.- Análisis de varianza para la variable Porcentaje de Area Foliar Afectada PAFA (severidad). Ensayo evaluación del efecto de las épocas de aplicación de sustratos sobre los antagonistas de *P. infestans*. Los valores de severidad se transformaron $\sqrt{(x+0.5)}$.

General Linear Models Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
TRAT	5	1 2 3 4 5
R	5	1 2 3 4 5
O	11	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Number of observations in data set = 275

NOTE: All dependent variable are consistent with respect to the presence or absence of missing values. However only 253 observations can be used in this analysis.

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: SEVER2

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	72	334.8191207	4.6502656	12.18	0.0001
Error	180	68.7280080	0.3818223		
Corrected Total	252	403.5471287			

R-Square	C.V.	Root MSE	SEVER2 Mean
0.829690	34.69614	0.617918	1.780941

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	4	69.9125521	17.4781380	45.78	0.0001
R(TRAT)	18	108.7349844	6.0408325	15.82	0.0001
O	10	126.8262971	12.6826297	33.22	0.0001
TRAT*O	40	29.3452870	0.7336322	1.92	0.0021***

Tests of Hypotheses using the Type I MS for R(TRAT) as an error term

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	4	69.91255210	17.47813802	2.89	0.0518

*** diferencia altamente significativa $p < 0.01$

ANEXO 6A.- Análisis de varianza para la variable Area Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad. Ensayo evaluación del efecto de las épocas de aplicación de sustratos sobre los antagonistas de *P. infestans*.

General Linear Models Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
R	5	1 2 3 4 5
A	3	1 2 3
F	3	1 2 3

Number of observations in data set = 25

NOTE: Due to missing values, only 23 observations can be used in this analysis.

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: AUC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	17669.26437	4417.31609	2.48	0.0805
Error	18	32026.08889	1779.22716		
Corrected Total	22	49695.35326			

R-Square	C.V.	Root MSE	AUC Mean
0.355552	99.89638	42.18089	42.22464

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	12576.57409	6288.28705	3.53	0.0507
F	1	1097.66806	1097.66806	0.62	0.4424
A*F	1	3995.02222	3995.02222	2.25	0.1513 ns

ns no mostró diferencias significativas

ANEXO 7A.- Análisis de varianza para la variable Periodo de Incubación. Ensayo evaluación del efecto de las épocas de aplicación de sustratos sobre los antagonistas de *P. infestans*.

General Linear Models Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
A	3	1 2 3
F	3	1 2 3

Number of observations in data set = 25

NOTE: Due to missing values, only 17 observations can be used in this analysis.

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: INCUB

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	1.98431373	0.49607843	1.44	0.2803
Error	12	4.13333333	0.34444444		
Corrected Total	16	6.11764706			

R-Square	C.V.	Root MSE	INCUB Mean
0.324359	16.35606	0.586894	3.588235

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	1.57598039	0.78799020	2.29	0.1440
F	1	0.23863636	0.23863636	0.69	0.4215
A*F	1	0.16969697	0.16969697	0.49	0.4961 ns

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	1	1.00086580	1.00086580	2.91	0.1140
F	1	0.16969697	0.16969697	0.49	0.4961
A*F	1	0.16969697	0.16969697	0.49	0.4961

ns no mostró diferencias significativas

ANEXO 8A.- Análisis de varianza para la variable Porcentaje de Area Foliar Afectada PAFA (severidad). Ensayo evaluación del efecto de formulaciones sobre antagonistas de *P. infestans*. Los valores de severidad se transformaron $\sqrt{(x+0.5)}$.

General Linear Models Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
R	5	1 2 3 4 5
A	3	1 2 3
F	3	1 2 3
O	11	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Number of observations in data set = 275

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: SEVER2

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	74	939.2368803	12.6923903	11.60	0.0001
Error	200	218.7550996	1.0937755		
Corrected Total	274	1157.9919799			

R-Square	C.V.	Root MSE	SEVER2 Mean
0.811091	44.36535	1.045837	2.357329

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	37.7478896	18.8739448	17.26	0.0001
F	1	39.1031560	39.1031560	35.75	0.0001
A*F	1	23.0223008	23.0223008	21.05	0.0001
R*A*F	20	249.8491955	12.4924598	11.42	0.0001
O	10	530.7188138	53.0718814	48.52	0.0001
A*O	20	27.8823825	1.3941191	1.27	0.1994
F*O	10	19.8233976	1.9823398	1.81	0.0604
A*F*O	10	11.0897445	1.1089744	1.01	0.4330 ns

Tests of Hypotheses using the Type I MS for R*A*F as an error term

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	37.74788964	18.87394482	1.51	0.2449
F	1	39.10315599	39.10315599	3.13	0.0921
A*F	1	23.02230084	23.02230084	1.84	0.1897 ns

ns no mostró diferencias significativas

ANEXO 9A - Análisis de varianza para la variable Area Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad. Ensayo evaluación del efecto de formulaciones sobre antagonistas de *P. infestans*.

General Linear Models Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
R	5	1 2 3 4 5
A	3	1 2 3
F	3	1 2 3

Number of observations in data set = 25

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: AUC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	43698.86500	10924.71625	1.58	0.2172
Error	20	137897.90556	6894.89528		
Corrected Total	24	181596.77056			

R-Square	C.V.	Root MSE	AUC Mean
0.240637	95.72184	83.03551	86.74667

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	12200.45250	6100.22625	0.88	0.4284
F	1	18696.61250	18696.61250	2.71	0.1152
A*F	1	12801.80000	12801.80000	1.86	0.1882 ns

ns no mostró diferencias significativas

ANEXO 10A.- Análisis de varianza para la variable Periodo de Incubación. Ensayo evaluación del efecto de formulaciones sobre antagonistas de *P. infestans*.

General Linear Models Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
A	3	1 2 3
F	3	1 2 3

Number of observations in data set = 25

NOTE: Due to missing values, only 21 observations can be used in this analysis.

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: INCUB

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	2.59285714	0.64821429	1.44	0.2672
Error	16	7.21666667	0.45104167		
Corrected Total	20	9.80952381			

R-Square	C.V.	Root MSE	INCUB Mean
0.264320	13.18086	0.671596	5.095238

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	0.63452381	0.31726190	0.70	0.5096
F	1	1.95161290	1.95161290	4.33	0.0539
A*F	1	0.00672043	0.00672043	0.01	0.9044

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	1	0.16801075	0.16801075	0.37	0.5502
F	1	1.94220430	1.94220430	4.31	0.0545
A*F	1	0.00672043	0.00672043	0.01	0.9044 ns

ns no mostró diferencias significativas