

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias

Escuela Académico Profesional de Biología Microbiología

Efecto antagonista del microparásito *Clonostachys rosea* frente al hongo *Botrytis cinerea* patógeno en el cultivo de *Lycopersicon esculentum* (tomate) en condiciones de invernadero.

Tesis

Presentada por

Patricia Cortez Ayala

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

BIOLOGO MICROBIOLOGO

Tacna - Perú

2004

UNIVERSIDAD NACIONAL "JORGE BASADRE GROHMANN"

FACULTAD DE CIENCIAS

JURADO CALIFICADOR Y CALIFICACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE
TESIS

TESIS N° 124

TÍTULO PROFESIONAL
DE: **Biólogo Microbiólogo**

La Secretaría Académico Administrativa de la Facultad de Ciencias, Certifica que por Resolución de Facultad N° 2951-2004-FACI-UN/ JBG, fueron designados como Jurados de sustentación de Tesis con el tema : "Efecto Antagonista del Micoparásito *Clonostachys rosea* frente al hongo *Botrytis cinerea* Patógeno en el cultivo de *Lycopersicum esculentum* (tomate) en Condiciones de Invernadero".

El mismo que está formado por:

Presidente : Blgo. Victorino Delgado Tello.
Secretario : Blga. Soledad Bornás Acosta.
Vocal : Mblga. Liduvina Sulca Quispe.

Para calificar la sustentación del tema de Tesis en acto público el día 16 de Diciembre del año 2004.

Presentada por la señorita Patricia Cortez Ayala de la Escuela Académico Profesional de Biología Microbiología.

El jurado calificador en forma secreta e individual emitió su calificativo sobre el tema de tesis expuesto y procedió a obtener el promedio que arrojó el calificativo

de aprobado con la nota de trece

Para ratificar lo detallado firman:



Blgo. Victorino Delgado Tello
PRESIDENTE



Blga. Soledad Bornás Acosta
SECRETARIA



Mblga. Liduvina Sulca Quispe
VOCAL

T
570
c78a

2010

Agradecimientos a:
Dios pues Él creó toda la naturaleza,
y gracias a Él pude concluir mi trabajo de investigación,
pues Él proveyó todo para su culminación.

Foto
Foto
Foto

Agradecimientos a:

**Mis padres José A. Cortez Ávalos y Mercedes Ayala de Cortez,
pues fueron los canales de Dios para proveer todo cuanto
necesité, y fueron las personas que más apoyo y ánimo
me brindaron en los momentos más difíciles.**



Agradecimientos a:

**Mis asesores y profesores que me instruyeron en
la realización de este trabajo de investigación
y me formaron académicamente a lo largo de
mis años de estudio.**

Agradecimientos a:

Al Programa Nacional de Control Biológico por haberme
brindado la oportunidad de ejecutar dicho trabajo de investigación,
en especial agradezco a la Ing. Hilda Gómez quien me guió
en la realización del trabajo experimental, y a todo el personal que me apoyó
durante todo el tiempo de la ejecución.

CONTENIDO

Resumen	3
I. Introducción	6
II. Marco teórico	11
1. Antecedentes de la investigación	11
1.1 Características del cultivo de <i>Lycopersicon esculentum</i>	15
1.2. Descripción taxonómica de <i>Botrytis cinerea</i>	19
1.2.1 La podredumbre gris como enfermedad del tomate	20
1.2.2 La enfermedad y su ciclo	24
1.3 El hongo <i>Clonostachys rosea</i> en el control biológico de enfermedades	29
1.3.1. Taxonomía y características de <i>Clonostachys</i>	30
1.3.2 Mecanismos de acción de <i>Clonostachys</i>	32
1.3.3 Necesidades nutricionales de <i>Clonostachys</i>	37
III. Materiales y Métodos	38
1. Centro de experimentación	38
2. Población	38
3. Muestra	39
4. Hongos empleados	39
4.1. Prueba de antagonismo de <i>Clonostachys rosea</i> sobre <i>Botrytis cinerea</i> <i>in vitro</i>	39
4.2. Reactivación y aislamiento de <i>Botrytis cinerea</i>	40

4.3	Reactivación de <i>Clonostachys rosea</i>	41
4.4	Prueba de antagonismo de <i>Clonostachys rosea</i> sobre <i>Botrytis cinerea</i> <i>in vitro</i>	42
4.5	Prueba de antagonismo de <i>Clonostachys rosea</i> sobre <i>Botrytis cinerea</i> en plantas de tomate en invernadero	45
4.6	Evaluación de la enfermedad	49
IV.	Resultados	51
V.	Discusión	59
VI.	Conclusiones	62
VII.	Recomendaciones	63
VIII.	Bibliografía	64
	Anexos	70

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue probar el efecto antagónico de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea*, causante de la enfermedad del moho gris en las plantas de tomate en nuestro país, ya que el tomate es uno de los cultivos que más se siembra a lo largo de toda la costa peruana, para ello se realizó pruebas de antagonismo *in vitro*, y en invernadero con plantas de *Lycopersicon esculentum* "tomate" durante septiembre del 2003 a abril del 2004.

La prueba de antagonismo *in vitro* y la experimentación en invernadero se realizó en el Laboratorio del Programa Nacional de Control Biológico del SENASA (Lima).

Para las pruebas de antagonismo *in vitro* se empleó el método de las placas precolonizadas con medio de cultivo APD y agar Saboraud.

Para la prueba en invernadero se siguió un diseño completamente aleatorizado con cinco plantas por cada tratamiento, siendo en total tres

tratamientos con cuatro repeticiones cada uno, siendo una población de 60 plantas.

A un tratamiento se le aplicó *Clonostachys rosea* más el patógeno, al segundo un agente químico (benomil) más el patógeno, y al tercero el patógeno más agua. El inóculo aplicado a todas las plantas de tomate de *Botrytis cinerea* fue hecho por aspersión con una concentración de 10^5 ufc/ml en un volumen de 200ml, dicha aplicación se realizó a los sesenta días después del transplante de almácigo a macetero. Luego de diez días se observó la presencia de síntomas de la enfermedad, entonces se procedió a la aspersión de *Clonostachys rosea* con una concentración de 10^5 ufc/ml en un volumen de 200ml a las plantas correspondientes a éste tratamiento, ese mismo día se asperjó el agente químico en una concentración de 1:10 en un volumen de 200ml al grupo de plantas correspondientes a éste tratamiento, y al grupo restante sólo se le asperjó agua.

Los resultados de las pruebas realizadas en laboratorio muestran existencia de antagonismo de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* al colonizar las placas en un lapso de nueve días. En condiciones de invernadero el efecto antagónico fue de 25.72 % y un porcentaje de floración de 59%. Para el caso del agente químico existe un control de 34.77 % y un porcentaje de floración de 37%.

INTRODUCCIÓN

El control biológico se basa en que el mundo viviente es un sistema complejo, en el cual todos los organismos luchan por su existencia, a menudo perjudicándose mutuamente.

La mayor parte de las estrategias de control utilizadas hasta el momento se han basado en el empleo de agentes químicos. Sin embargo, la utilización de fungicidas es cada vez menos recomendable y más restringida debido a los problemas de contaminación ambiental que de su aplicación se derivan y por la frecuente aparición de cepas del patógeno resistentes a los fungicidas utilizados.

Es por eso la búsqueda de métodos biológicos que supriman o disminuyan las enfermedades o plagas que afectan a los diversos cultivos.

El control biológico es la reducción de la densidad de inóculo o actividad productora de enfermedad del patógeno o parásito en su estado activo o latente, por uno o más organismos antagónicos, en forma natural

o por manejo del ambiente, hospedante o de los propios microorganismos (Baker, 1968).

En 1948 Grossbard mostró que en un suelo estéril enriquecido con glucosa, paja de trigo o pulpa de betarraga, *Penicillium patulum* produce una sustancia antibacteriana llamada "patulina" (Koc,1993).

En el presente trabajo se dio importancia al cultivo de tomate, cultivo vegetal para la experimentación, que se encuentra en su mayoría en las costas del norte, centro y sur de nuestro país, debido a que es un cultivo propenso a diversas plagas y enfermedades, en este cultivo una de las enfermedades de mayor importancia económica es la "podredumbre gris" causada por el hongo patógeno *Botrytis cinerea*, perteneciente a la familia de la Monilaceae, que es capaz de ingresar a la planta por las partes aéreas de la misma (tallos, hojas, flores, fruto), a través de heridas y de estructuras como son estomas, lenticelas, etc.

La manifestación de la enfermedad varía en las diferentes partes de la misma, ya que en hojas los síntomas son marchitamiento y una coloración

pardo-amarillenta, en las flores se observa un marchitamiento, y en el fruto ablandamiento del tejido y la esporulación del hongo sobre la parte apical, que es visible (Agrios, 1995).

Uno de los adversarios de dicho moho gris, *Botrytis cinerea*, es *Clonostachys rosea* antiguamente llamado *Gliocladium roseum*, también perteneciente a la familia Monilaceae pero del género *Gliocladium*, su forma es verticilada, a manera de un Penicillum, éste ejerce su efecto antagónico presumiblemente sobre dicho hongo parasitándolo o por secreción de sustancias tóxicas, es decir por antibiosis (Kubicek, 1998).

En la actualidad se vienen usando diversos antagonistas en nuestro país con la excepción de *Clonostachys rosea*, es por eso el interés en este hongo en la presente investigación, éste antagonista ha sido estudiado en diversas partes del mundo por su amplio rango de hábitat, entre ellos el tropical, templado, subtropical, y regiones desérticas; y los resultados sobre dicho patógeno han sido eficaces (Sutton, 1997).

Una de las causas de la enfermedad del moho gris causada por *Botrytis cinerea* es el exceso de humedad que se da en los meses más fríos, atacando a tallo, hojas, flores principalmente, y frutos, siendo comúnmente controlado con los funguicidas, sustancias que son perjudiciales para nuestra salud, es por eso la búsqueda e investigación de más controladores biológicos. En el presente trabajo se planteó el siguiente problema ¿Tendrá el micoparásito *Clonostachys rosea* efecto antagonista sobre el hongo *Botrytis cinerea* patógeno en el cultivo de *Lycopersicon esculentum* (tomate) en condiciones de invernadero? Teniendo como hipótesis lo siguiente:

Clonostachys rosea ejerce un efecto antagónico sobre el patógeno *Botrytis cinerea* en el cultivo de tomate en condiciones de invernadero.

Los objetivos que se plantearon fueron:

1.- Objetivo general

Determinar el antagonismo de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea*.

2.- Objetivos específicos

- 2.1. Determinar el efecto antagónico *in vitro* de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea*.
- 2.2. Determinar el efecto antagónico de *Clonostachys rosea* en invernadero sobre *Botrytis cinerea* en el cultivo de *Lycopersicum esculentum* (Tomate).

II. MARCO TEORICO

1. Antecedentes de la Investigación

El primer intento en la aplicación directa de control biológico en los patógenos de las plantas fue hecho en 1920-1940 por C. Hartley (1921); inoculó al suelo del centro de los bosques con trece hongos antagonistas en un intento de controlar el daño a nivel de raíz de almácigos de pinos (Castaño, 1997).

El control biológico como resultado del fenómeno de antagonismo entre microorganismos se manifiesta en las siguientes categorías:

Antibiosis o producción de sustancias metabólicas (antibióticos), que actúan ejerciendo un efecto biocida hacia muchos organismos patógenos. La formación de antibióticos ha sido determinada especialmente en microorganismos habitantes del suelo en donde la producción de dichas sustancias es determinada por factores diversos como tipo de suelo, su pH, la esterilización, la presencia de sustancias orgánicas, etc (Koc, 1993).

Competencia, es el efecto dañino de un organismo sobre otro por la interferencia en el uso de algunos recursos del medio ambiente. Como consecuencia de ello, el organismo afectado tiende a iniciar un estado de latencia, fenómeno observable especialmente en aquellos casos de carencia de sustancias necesarias para que las diferentes estructuras germinen (Koc,1993).

Parasitismo, es el fenómeno por el cual unos microorganismos viven a expensas y en detrimento de otros microorganismos (Koc, 1993).

El cultivo del tomate es comúnmente atacado por diferentes enfermedades, entre ellas la del moho gris, es un poco dificultoso estimar las pérdidas sólo por el moho gris, ya que los agricultores enfrentan el conjunto de enfermedades, y también las pérdidas son cuantificadas por el conjunto de enfermedades que le atacan, y esto es al rededor de 1000 a 2000 kilos (Koc,1993).

El control biológico de enfermedades en plantas es utilizado como una alternativa en aquellos casos de patógenos, en los cuales se dificulta la aplicación de otros métodos de combate, especialmente el uso de productos químicos. Varios ejemplos como *Sclerotium rolfsii* Soc., *Rhizoctonia solani* Kuhne y *Pythium* spp. han sido controlados biológicamente utilizando antagonistas como *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp, *Aspergillus* spp y algunas bacterias (Elad,1980).

Un antagonista, comúnmente definido, es un oponente o un adversario. Dentro de la biología, el término se refiere a la interacción de un miembro que interfiere con otro miembro, el rango de interferencia entre las moléculas (factores de crecimiento), entre plantas superiores (inhibición de una planta por otra). En el control biológico de los patógenos de plantas, los antagonistas son agentes biológicos con un potencial para interferir en los procesos de la vida de los patógenos de las plantas (Elad,1980).

Una serie de documentación clásica de R. Weidling apareció de 1931 a 1941 en el antagonismo de *Trichoderma viride* para suelos portadores de

patógenos. Éstos saprofitos comunes de suelo fueron mostrados para parasitar *Rhizoctonia solani*. Los microorganismos antagonistas son un foco importante de investigaciones comunes para improvisar el control de *Botrytis cinerea* comúnmente llamado moho gris y otras enfermedades causadas por dicho patógeno en frutas, verduras, semilleros, plantas ornamentales y otros cultivos (Jarvis,1992).

Los microorganismos antagonistas de *Botrytis cinerea* tienen un potencial para ayudar a contrarrestar las ineficiencias, los períodos afectados y débiles, junto a las prácticas de control, que generalmente involucran medidas culturales y de sanidad, regulación del microclima y la fuerte dependencia de fungicidas. La frecuente resistencia de *Botrytis cinerea* a fungicidas y la inadecuada resistencia de los huéspedes contribuye a la vulnerabilidad de muchos cultivos a dicho patógeno. El hongo filamentoso *Clonostachys rosea* a emergido como un efectivo y versátil antagonista de *Botrytis cinerea*, con otros agentes de biocontrol, prometiendo mejorar el manejo de enfermedades en los cultivos (Li, 1996).

1.1 Características del cultivo de *Lycopersicum* *esculentum* (tomate)

División :	Fanerogama
Clase :	Dicotiledónea
Orden :	Tubiflorales
Familia :	Solanaceae
Género :	<i>Lycopersicum</i>
Especie :	<i>Lycopersicum esculentum</i>

(Maroto, 1983)

La especie *Lycopersicon esculentum* perteneciente a la familia *Solanaceae* , es una planta perenne de porte arbustivo que se cultiva como anual en algunos países. Puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta. Existen variedades de crecimiento limitado (determinadas) y otras de crecimiento ilimitado (indeterminadas). Su fase inicial comienza con la germinación de la semilla y se caracteriza por el rápido aumento en la materia seca ; la planta invierte su energía en la síntesis de nuevos tejidos de absorción y fotosíntesis. Su fase vegetativa es la continuación de la fase inicial, pero el aumento en materia seca

es más lento, esta etapa termina con la floración, dura entre 25 y 30 días; y su fase reproductiva se inicia a partir de la fructificación dura entre 30 ó 40 días y se caracteriza porque el crecimiento de la planta prácticamente se detiene y los frutos extraen de la planta los nutrientes necesarios para su crecimiento y maduración.

Su sistema radicular consta de una raíz principal (corta y débil), raíces secundarias (numerosas y potentes) y raíces adventicias. Seccionando transversalmente la raíz principal y de fuera hacia dentro encontramos una epidermis, donde se ubican los pelos absorbentes especializados en tomar agua y nutrientes, cortex y cilindro central, donde se sitúa el xilema (conjunto de vasos especializados en el transporte de los nutrientes). Su tallo principal tiene un grosor que oscila entre 2-4 cm en su base, sobre el que se van desarrollando hojas, tallos secundarios e inflorescencias. Su estructura, de fuera hacia dentro, consta de: epidermis, de la que parten hacia el exterior los pelos glandulares, corteza o cortex, cuyas células más externas son fotosintéticas y

las más internas son colenquimáticas, cilindro vascular y tejido medular. En la parte distal se encuentra el meristemo apical, donde se inician los nuevos primordios foliares y florales (Giacconi, 1998).

Presenta hoja compuesta, con folíolos peciolados, lobulados y con borde dentado, en número de 7 a 9 y recubiertos de pelos glandulares. Las hojas se disponen de forma alternativa sobre el tallo. La epidermis inferior presenta un alto número de estomas. Dentro del parénquima, la zona superior o zona en empalizada, es rica en cloroplastos. Los haces vasculares son prominentes, sobre todo en el envés, y constan de un nervio principal. Su flor es perfecta, regular y consta de 5 o más sépalos, de igual número de pétalos de color amarillo y dispuestos de forma helicoidal a intervalos de 135° , de igual número de estambres soldados que se alternan con los pétalos y forman un cono estaminal que envuelve al gineceo, y de un ovario bi o plurilocular. Las flores se agrupan en inflorescencias de tipo racemoso (dicasio), generalmente en número de 3 a 10 en variedades comerciales de

tomate; es frecuente que el eje principal de la inflorescencia se ramifique por debajo de la primera flor formada dando lugar a una inflorescencia compuesta, de forma que se han descrito algunas con más de 300 flores. La primera flor se forma en la yema apical y las demás se disponen lateralmente por debajo de la primera, alrededor del eje principal. La flor se une al eje floral por medio de un pedicelo articulado que contiene la zona de abscisión, que se distingue por un engrosamiento con un pequeño surco originado por una reducción del espesor del cortex. Las inflorescencias se desarrollan cada 2-3 hojas en las axilas. El fruto es una baya bi o plurilocular que puede alcanzar un peso que oscila entre unos pocos miligramos y 600 gramos. Está constituido por el pericarpio, el tejido placentario y las semillas. El fruto puede recolectarse separándolo por la zona de abscisión del pedicelo, como ocurre en las variedades industriales, en las que es indeseable la presencia de parte del pecíolo, o bien puede separarse por la zona peduncular de unión al fruto (Giacconi,1998).

La temperatura óptima de desarrollo oscila entre 20 y 30 ° C durante el día y entre 1 y 17 ° C durante la noche; temperaturas superiores a los 30-35 °C e inferiores a 12-15°C afectan a la fructificación, por mal desarrollo de óvulos y al desarrollo de la planta en general y del sistema radicular en particular, la fecundación es defectuosa o nula. La maduración del fruto está muy influida por la temperatura en lo referente tanto a la precocidad como a la coloración, de forma que valores cercanos a los 10 ° C así como superiores a los 30 ° C originan tonalidades amarillentas (Serrano, 1996).

1.2 Descripción y taxonomía de *Botrytis cinerea*

Reino :	Mycetae
División :	Eumycota
Subdivisión :	Deuteromycotina
Clase :	Hyphomycetes
Orden :	Hyphomycetales
Familia :	Moniliaceae
Género :	<i>Botrytis</i>
Especie :	<i>Botrytis cinerea</i>

(Según Alexopoulos, 1997)

1.2.1 La podredumbre gris como enfermedad del tomate.

El patógeno *Botrytis sp.* produce gran cantidad de micelio gris y varios conidióforos largos y ramificados, cuyas células apicales redondeadas producen racimos de conidios ovoides, unicelulares, incoloros o de color gris. Los conidióforos y los racimos de conidios se semejan a un racimo de uvas. El hongo libera fácilmente sus conidios cuando el clima es húmedo y luego éstos son diseminados por el viento. El hongo a menudo produce esclerocios irregulares, planos, duros y de color negro. En la primavera el micelio de los frutos momificados que se encuentran todavía en los árboles y de los cáncros de las ramitas producen nuevos conidios, mientras que los pseudoesclerocios de los frutos momificados que yacen enterrados en el suelo producen varios apotecios, los cuales forman ascas y ascosporas (Agrios, 1995).

Botrytis spp. inverna en el suelo en forma de esclerocios o micelio, el cual se desarrolla sobre restos de plantas en proceso de descomposición. Al parecer, este hongo no infecta a las semillas, pero puede propagarse con las semillas contaminadas mediante esclerocios del tamaño de esas semillas o sobre restos de plantas a los que ha infectado. Las etapas de invernación también se propagan mediante cualquier cosa que mueva el suelo o los restos vegetales que pudieran portar esclerocios o micelio del hongo. Este último requiere un clima húmedo y moderadamente frío (18 ° C a 23° C) para que se desarrolle adecuadamente, esporule, libere y germine sus esporas y para que produzca la infección (Agrios, 1995).

El patógeno muestra actividad a bajas temperaturas y produce pérdidas considerables en cosechas que se han mantenido almacenadas durante largos periodos, aun cuando las temperaturas oscilen entre 0 y 10° C. Las esporas que han germinado rara vez penetran directamente en los tejidos que

muestran un crecimiento activo, pero lo hacen en tejidos de la planta a través de heridas o después de que se han desarrollado durante un cierto tiempo y han formado micelio sobre los pétalos de flores senescentes, follaje moribundo de las plantas, escamas de bulbos muertos, etc (Agrios, 1995).

Agente causal de la podredumbre gris infecta más de 200 especies vegetales distintas, determinando serias pérdidas económicas. El patógeno puede atacar al cultivo de tomate en cualquier estado de desarrollo del mismo e infectar cualquier parte de la planta. Tiene una considerable incidencia y repercusión en cultivos importantes tales como la vid, tomate, fresa, ornamentales, etc (Jarvis, 1977).

Las enfermedades causadas por *Botrytis* son las más comunes de las plantas cultivadas en invernaderos. Aparecen principalmente en forma de tizones de inflorescencias y pudriciones del fruto, tallo (como cáncros), ahogamiento de plántulas, manchas foliares y como pudriciones de tubérculos,

bulbo y raíces. Bajo condiciones húmedas, el hongo produce una capa fructífera conspicua de moho gris sobre los tejidos afectados, una característica de la enfermedad. Botrytis ocasiona también las pudriciones blandas secundarias de frutos y hortalizas cuando se almacenan, transportan y venden en el mercado. En el campo, es frecuente que los tizones de las inflorescencias aparezcan antes y produzcan pudriciones del fruto y tallo. El hongo se establece en los pétalos de la flor, los cuales son particularmente susceptibles cuando comienzan a envejecer produciéndose micelio abundante. Cuando el clima es húmedo y fresco, el micelio del hongo produce numerosos conidios que ocasionan más infecciones, pero el micelio también se desarrolla, penetra e invade al resto de la inflorescencia, la cual se llena y cubre con un moho intrincado de color gris blanquizco o café claro. Conforme se pudren los tejidos de la epidermis del fruto este se rompe y el hongo produce numerosos cuerpos fructíferos. Los tejidos entonces se arrugan, deshidratan y el hongo

produce esclerocios aplanados de color negro sobre la superficie o hundidos en el tejido (Agrios, 1995).

1.3 La enfermedad y su Ciclo

Botrytis ataca a un amplio número de especies vegetales, afectando a todos los cultivos hortícolas protegidos, pudiéndose comportar como parásito y saprofito, precisa de bases nutritivas formadas por hojas senescentes, flores no fecundadas, heridas o muñones de hojas resultantes de las podas, es decir materia orgánica muerta, para poder iniciar la invasión de las partes vivas de la planta. En hojas y flores se producen lesiones pardas. En frutos tiene lugar una podredumbre blanda (más o menos acuosa, según el tejido), en los que se observa el micelio gris del hongo (Agrios, 1995).

Las lesiones del tallo en tomate pueden ocurrir por la entrada a través de cotiledones senescentes o tejido dañado. Las lesiones del tallo también pueden ocurrir durante la cosecha.

Pueden infectarse los tallos a través de las cicatrices de la hoja, hojas muertas, o cualquier forma de daño del tallo. Lesiones del tallo a menudo parcialmente el cinto el tallo, pero a veces el tallo entero es afectado y la planta se muere. Las lesiones en Pétalos parecen muy similares a las lesiones en el tallo y a menudo son el resultado de la infección y colonización de una hoja. Las lesiones de la hoja empiezan a menudo en tejido senescente o por cualquier daño físico o químico. El patógeno puede crecer a lo largo del peciolo y pueden formar una lesión en el fruto. Partes de la flor que se han caído hacia las hojas son un punto de arranque común para la colonización de la hoja. El Polen de las flores y parte de la flor pueden actuar como un estimulante a las esporas de *B. cinerea*, no sólo estimular la germinación, pero también aumentando la virulencia. En el campo el hongo aparece como una cubierta gris, aterciopelado de esporas en flores agonizantes y en el cáliz del fruto. Las flores senescentes frecuentemente son colonizadas por *Penicillium* spp. y este hongo puede confundirse con el moho gris. Las infecciones se extienden de las flores y fructifican hacia el tallo; el tallo se

vuelve crema a blanco y desarrolla una úlcera maligna. El fruto verde inmaduro se torna castaño ligero o blanco. Una putrefacción suave puede desarrollarse en la piel del fruto que permanece intacto, pero el tejido interno se pone blando y acuoso. Después, un moho rizado gris desarrolla, y los esclerocios pueden aparecer. En el campo, los campos se llenarán de fruta desechada. El fruto verde también puede infectarse directamente por esporas aerotransportadas en lugar de contacto con otras infecciones. Las manchas aparecen en el fruto como un halo redondo blanco determinado como "la mancha fantasma". Estas manchas persistirán y pueden aparecer en frutos maduros y verdes. Como fruta madura, el color de los halos cambia de blanco a amarillo. La "mancha fantasma" que el síntoma es el resultado de la germinación de la espora y penetración al fruto. La penetración del micelio de *Botrytis* en el fruto produce una reacción que previene cualquier crecimiento micelial extenso y la localización del patógeno. El halo se forma alrededor del punto de entrada (Agrios, 1995).

Las principales fuentes de inóculo las constituyen las conidias y los restos vegetales que son dispersados por el viento, salpicaduras de lluvia, gotas de condensación en plástico y agua de riego. La temperatura, la humedad relativa y fenología influyen en la enfermedad de forma separada o conjunta. La humedad relativa óptima oscila alrededor del 95% y la temperatura entre 17°C y 23°C. Los pétalos infectados y desprendidos actúan dispersando el hongo (Baker, 1974).

Las condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad son temperaturas que oscilan entre los 20 y 25 ° C, siendo la humedad relativa el factor limitante. Con humedades relativamente elevadas, el rango de temperatura es de 10 a 25 ° C. Las conidias para germinar, producir el tubo germinativo e infectar el hospedante necesitan, además de elevada humedad relativa en el invernadero, que la superficie de la planta esté mojada durante cierto periodo. Estas condiciones pueden darse con frecuencia en los invernaderos, donde el agua de

condensación del plástico juega un importante papel en este periodo de la infección (Coley-Smith, 1990).

Las esporas de *B. cinerea* pueden ser producidas sobre cualquier material vegetal y transportadas grandes distancias por corrientes de aire, hasta alcanzar la superficie del huésped, donde presenta varias fases para infectar, como son:

- 1) la adhesión y germinación de las esporas sobre la superficie del hospedante,
- 2) su penetración en el tejido vegetal, bien a través de heridas o aberturas naturales, mediante la participación de distintas actividades enzimáticas o procesos mecánicos,
- 3) el establecimiento del patógeno en la zona de penetración, determinando la muerte de las células adyacentes y dando lugar a la formación de una lesión primaria como consecuencia de la expresión de los mecanismos de defensa de la planta,
- 4) en muchos casos se inicia una fase de latencia durante la cual los mecanismos de defensa de la planta parecen controlar al patógeno que permanece localizado en el área de necrosis,
- 5)

transcurrido un tiempo, en algunas lesiones primarias el patógeno es capaz de vencer las barreras defensivas de la planta e inicia su diseminación en el tejido vegetal circundante a partir de aquellas, determinando la colonización y la maceración del tejido infectado en un breve período de tiempo. Sobre el tejido infectado el patógeno produce una nueva generación de esporas que pueden iniciar un nuevo ciclo de infección (Benita, 2000).

1.4 *Clonostachys* en el control biológico de enfermedades

Los miembros del género *Clonostachys* son hongos que se pueden encontrar tanto fuera como dentro de la rizósfera (Beagle-Ristaino & Papavizas, 1985; Papavizas, 1981); es en la rizósfera donde pueden colonizar y proteger las raíces de las plantas (Lorito et al.,1993); pero raramente están involucrados o asociados con las enfermedades en las plantas (Gams &Bissett, 1998).

Se le encuentra asociado a quistes de *Heterodera* spp., *Globodera* spp., y otros nemátodos del suelo y con *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phymatotrychum omnivorum*, *Rizoctonia solani*, *Botrytis* spp., *Verticillium* spp., y otros hongos de suelo y materiales de plantas. *Clonostachys rosea* es un hongo de un amplio rango de hábitats tropicales, templados, subárticos, y regiones desérticas del mundo. En los pasados 35 años dicho hongo ha ganado una reputación distintiva como micoparásito de un amplio rango de hongos (Daswood, 1988). Igualmente sobresalen diversas asociaciones con raíces, tallos, hojas, frutos y semillas de plantas (Brandsberg, 1969).

1.3.1 Taxonomía y características de *Clonostachys*

Reino :	Fungi
Phylum :	Ascomycota
División :	Eumycota
Subdivisión:	Deuteromycotina
Clase:	Hyphomycetes
Orden :	Hyphomycetales
Familia :	Moniliaceae
Género :	<i>Clonostachys</i>
Especie :	<i>Clonostachys rosea</i>

(Según Ellis, 1979)

Clonostachys roesea es un hongo imperfecto de la subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetes (Agrios, 1995). *Clonostachys* no posee la etapa sexual por lo que producen únicamente esporas asexuales. La forma anamorfa de *Clonostachys rosea* es *Nectria ochroleuca* también ubicado en la clase *Ascomycetos* de los hypocreales (Samuels, 1976) .

Clonostachys rosea es un inusual hypomiceto que produce una célula conidial en dos distintos tipos de conidióforos, una ramificación penicilada y otra verticilada. Las colonias en medios con agar son generalmente blancuzcas, naranjas, o salmón (Domsch and Anderson, 1980; Elad and Evensen, 1995).

Clonostachys rosea es común en un extraordinario rango de hábitats en el mundo, particularmente en sustratos de pH neutrales a alcalinos (Elad and Evensen, 1995).

Clonostachys rosea son hongos que están presentes en casi todos los suelos agrícolas y en otros ambientes tales como madera que se decae y en material de descomposición (Papavizas,1991). Igualmente remarcable son las diversas asociaciones con raíces, tallos, hojas, frutos, y semillas de plantas. Hay reportes sobre abundante *Clonostachys rosea* en raíces y hojas senescentes de una amplia variedad de plantas débiles por factores estresantes como insecticidas y enfermedades (Brandsberg, 1969).

1.4.2 Mecanismos de acción de *Clonostachys*

Clonostachys spp. suprime la actividad de otros hongos patógenos a través de ciertos mecanismos como la antibiosis, el micoparasitismo y la competencia por espacio y nutrientes (Kubicek, 1998).

Clonostachys spp. produce una variedad de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben otros microorganismos con los que no tienen contacto físico. Dichas sustancias inhibidoras son consideradas antibióticos. Los más conocidos de los metabolitos antifúngicos producidos por este género son la gliotoxina, y el glioviridin que han sido aislados de algunas especies de *Clonostachys*. Las enzimas que actúan degradando barreras extracelulares, de algunos hongos, matando a distancia, esto es tradicionalmente incluido en el concepto de **micoparasitismo** (Kubicek, 1998).

Los saprofito *Clonostachys* spp. son biológicamente adaptables a la colonización por nutrientes básicos y persisten como clamidosporas y conidias cuando escasean los nutrientes. Las características de éste género son reflejadas en su uso como un agente de control biológico: cuando se induce su crecimiento por la presencia de nutrientes, éstos colonizan el sustrato rápidamente, a veces empleando

antibiosis o micoparasitismo directo contra los competidores (Kubicek, 1998).

Un ejemplo importante es el biocontrol de *Botrytis*, patógeno oportunista que invade tejido senescente o de plantas muertas como base de su nutrición. *Clonostachys* ha sido usado como biocontrolador de *Botrytis* en fresa, manzana, y pepino (Tronsmo, 1977).

La **competición** por nutrientes o sustrato y el **micoparasitismo** son presumiblemente modos de antagonismo de *Clonostachys rosea* hacia *Botrytis cinerea* en plantas huésped. La **competición** por sustrato fue considerada un modo clave de biocontrol en hojas senescentes de fresa. Evidentemente los antagonistas colonizaron y exploraron los tejidos senescentes mucho más rápido que *Botrytis cinerea* y en gran medida evita la colonización por el patógeno.

Este modo de acción es el más importante porque contribuye a la supresión del inóculo de *Botrytis cinerea*. Mientras la mayoría de estudios fueron hechos en medios sintéticos, recientes observaciones en cereza indicaron que el micoparasitismo puede ser un importante modo de biocontrol de *Botrytis cinerea* en plantas huésped. Notablemente interacciones diferentes de *Clonostachys rosea* y *Botrytis cinerea* fueron encontrados en hojas, tallos, y estambres de cereza mantenidas bajo condiciones continuas de humedad alta. En hojas, *Clonostachys rosea* suprime la germinación y crecimiento de tubos germinativos de *Botrytis cinerea* pero raramente parasita al patógeno. En tallos, sin embargo, las conidias de *Botrytis cinerea* frecuentemente germinan y producen buen desarrollo de tubos germinativos e hifas superficiales poco considerables. El antagonismo fue manifestado como una modesta supresión de tubos germinativos y parasitismo intenso de *Botrytis cinerea* por *Clonostachys rosea*. Durante la persistencia de la elevada humedad (32-72hr), pequeñas hifas tabicadas de

Clonostachys rosea se dieron a conocer, crecieron y se colocaron alrededor del patógeno, invadieron conidias e hifas de *Botrytis cinerea*, originando carencia de células e hifas colapsadas (Sutton, 1997).

Comparando la competición y micoparasitismo, *Clonostachys rosea* posiblemente controle a *Botrytis cinerea* por **antibiosis**. Los antagonistas producen una variedad de inhibidores fúngicos y enzimas degradadoras, algunas de las cuales pueden funcionar en escenarios superpuestos de antibiosis y micoparasitismo. Se observa pérdida de turgencia y lisis de las hifas de *Botrytis cinerea*, cada inducción comúnmente producida por *Clonostachys rosea* puede ser considerada en el contexto de ambos tipos de antagonismo (Sutton, 1997).

Factores medioambientales influyen indirectamente la producción de antibióticos por especies de *Clonostachys*, probablemente la más importante es el sustrato en que el

hongo crece. Inicialmente la producción de gliotoxin fue favorecida por el crecimiento del hongo en medio Raulin-Thom comparado con otros medios, más tarde reportaron que el medio más óptimo para la producción de gliotoxin contiene glucosa y fenilalanina (Kubicek, 1998).

2.3 Necesidades nutricionales de *Clonostachys*

La mayoría de especies del género *Clonostachys* habitan en los suelos y prefieren la superficie de la raíz. *Clonostachys* tienen la habilidad para degradar los polisacáridos, celulosa y hemicelulosa (Kubicek,1998).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Centro de experimentación

El presente trabajo de investigación se realizó en los ambientes del Programa Nacional de Control Biológico (PNCB) dependencia del Servicio Nacional de Sanidad Agriaria (SENASA), con sede en Vitarte-Lima durante los meses de septiembre del 2003 a marzo del 2004.

Los ambientes que se ocuparon fueron el laboratorio de producción de hongos antagonistas para realizar los cultivos *in vitro* y un invernadero para el cultivo de las plantas de tomate.

2. Población

Estuvo constituida por 60 plantas de tomate distribuidas en tres tratamientos, 05 plantas para cada tratamiento, cada tratamiento tuvo 04 repeticiones.

3. Muestra

La muestra estuvo formada por tres hojas, una de la parte basal, otra de la parte media y otra de la parte superior de cada una de las plantas de cada grupo experimental.

4. Hongos empleados

Hongo antagonista *Clonostachys rosea* y como patógeno al hongo *Botrytis cinerea* aislado de cultivos de tomate. Éstos hongos fueron proporcionados por el Programa Nacional de Control Biológico (PNCB)- SENASA - Lima.

5. Prueba de antagonismo de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* *in vitro*.

5.1 Reactivación y aislamiento del hongo *Botrytis cinerea*

Se extrajeron hojas de plantas de tomate sobre las cuales se inocularon por aspersion una suspensión de *B. cinerea* preparada con una asada del cultivo y 0.1% de tween. Las hojas inoculadas se colocaron en una cámara húmeda, con una humedad relativa entre 52%-65% y se incubo a 24 ° C hasta la aparición de signos manifestado por el desarrollo micelial (48 hrs). Finalmente, el hongo fue reaislado a partir de micelio desarrollado sobre las hojas cogiendo un pequeño inóculo y sembrado por puntura en el medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) con cinco repeticiones. Luego fueron incubadas en una cámara con un contenido de 52% de humedad relativa a 24 ° C durante 7-9 días en luminosidad hasta que la superficie del medio sea cubierto totalmente por el hongo, luego se cubre con un papel negro para su posterior esporulación que se da a los 10 - 12 días de incubado. Las placas colonizadas se usaron en la confrontación con el antagonista.

5.3 Reactivación del hongo *Clonostachys rosea*.

Se realizó cultivos monospóricos del antagonista; dado que dicho hongo estuvo almacenado en agar Saboraud por mucho tiempo pudiéndose haber degenerado, por esta razón se hicieron diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} con agua destilada estéril y tween al 0,1%, con el hongo correspondiente, para que luego del tubo con la dilución 10^{-3} se sembró en placas con PDA en estría simple. Luego de 18 horas de incubación se revisaron éstas placas con el microscopio por la cara inferior de la placa, con un aumento de 100X, hasta que se ubicaron esporas germinadas y aisladas, las cuales fueron extraídas cortando la zona con un bisturí siendo trasladadas a una placa con agar extracto de malta y luego fueron llevadas a un cuarto de incubación a 24 ° C en oscuridad por 10 a 12 días, luego de este tiempo se obtuvieron cultivos puros de *Clonostachys rosea*. Luego a partir de las placas obtenidas anteriormente de los cultivos puros se cortó tiras de agar con el hongo de 5 x 25 mm que fueron colocados en el interior, en un costado de las placas

Para la reactivación de *Clonostachys rosea* se realizó cortes al cultivo puro en tiras de agar con el hongo de 5 x 25 mm que fueron colocados en el interior, en un costado de las placas con *Botrytis cinerea* anteriormente obtenidas y se incubó durante 10 días para luego observar la interacción antagonista-patógeno.

La acción antagónica fue considerada cuando el micelio de *Clonostachys rosea* empezó a cubrir el micelio del patógeno hasta llegar al extremo opuesto. Luego se eligió aquellas placas en que el antagonista cubrió más rápido al patógeno para reaislarlo en agar extracto de malta; obteniendo así al hongo reactivado.

5.4 Prueba de antagonismo de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* in vitro

Se realizó según la técnica de las placas precolonizadas (Krauss, 1998). Se realizaron tres tratamientos, uno consistió en placas con el biocontrolador en medio extracto de malta, el

segundo *Botrytis cinerea* en medio APD y el tercero el patógeno y el biocontrolador enfrentados, para éste tratamiento, se colocó sobre el micelio de *Botrytis cinerea* en uno de sus extremos una tira de 5 x 25 mm de bloque de agar cubierto con micelio de *Clonostachys rosea* extraído de sus respectivas placas reactivadas, de tal forma que el micelio de *Botrytis cinerea* se puso en contacto con el micelio de *Clonostachys rosea* quedando enfrentados, luego éstas placas enfrentadas y el otro tratamiento anteriormente mencionado se incubaron a 24° C y 52% de humedad relativa y con luz fluorescente por el tiempo necesario, la evaluación se realizó cada tres días, es decir al tercer día, sexto día, y al noveno día de enfrentados los hongos. La evaluación consistió en medir el crecimiento miceliar de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* y compararlo con el crecimiento sólo de *Clonostachys rosea*. Con la ayuda de un bisturí se procedió a realizar dos hendiduras paralelas sobre la superficie del agar contenido en la placa enfrentada con un ancho de 5 mm partiendo del bloque de agar con *Clonostachys rosea* hasta el extremo opuesto y cortes transversales entre las

hendiduras paralelas cada 5 mm de distancia para obtener bloques pequeños de 25 mm². De cada tira (por placa) se obtuvo 15 bloques pequeños de 25 mm², tales bloques pequeños fueron trasladados con la ayuda de una asa a una placa estéril y colocados distanciados unos de otro formando un espiral de afuera hacia el centro, marcando por fuera de la placa con un plumón los números del 1 al 15 para no confundirse con los bloques y así facilitar la evaluación, luego las placas fueron cubiertas con sus tapas en las cuales se colocó un círculo de papel toalla del mismo diámetro de la placa humedecido con agua destilada. Dichas placas se incubaron a 24 ° C por 24 hrs. Luego se observó el desarrollo de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* en los bloques de agar con la ayuda de un estereoscopio. Lo cual sirvió para establecer el efecto antagónico de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea*, y la rapidez de parasitación dependiendo del número de bloques evaluados a los 3, 6 y 9 días. Lo mismo se realizó con las placas del biocontrolador y del patógeno observando la velocidad de sus crecimientos miceliares.

5.5 Prueba de antagonismo de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* en plantas de tomate en invernadero.

Primeramente se sembró aproximadamente 100 semillas de tomate de la variedad "Rio Grande" sobre el sustrato compuesto de tierra, humus y arena (1:1:1), contenido en una bandeja para almácigos llamadas "spildin" de 30 cm de ancho x 50 cm de largo x 6 cm de alto, con divisiones a modo de celdas, una semilla por cada celda. Luego de sembradas las semillas, se regaron una vez por semana con agua potable. Después de 45 días de cultivadas en las bandejas, las plántulas alcanzaron una altura de 10 a 15 cm, se procedió a seleccionar las plántulas de mejor vigorosidad para ser trasplantadas individualmente a maceteros de 17 cm de diámetro x 15cm de alto, en los que se colocó un sustrato compuesto por tierra, humus y arena (1:1:1). Posteriormente las plantas fueron colocadas en grupos de cinco con sus cuatro repeticiones por tratamiento distribuidas al azar en el invernadero.

Se preparó una suspensión madre de las placas con *Botrytis cinerea* con 20ml de agua destilada estéril y tween al 0.1%, luego con una asa se raspó las esporas y el micelio, de ésta suspensión se procedió a realizar diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} con agua destilada estéril y tween al 0.1%, seguidamente se procedió a realizar conteo de esporas en cámara de New Bauer de las dos últimas diluciones, realizando los cálculos respectivos para obtener una concentración de 10^5 esporas/ml. Una vez obtenidos los cálculos se eligió el tubo con la dilución 10^{-2} con la concentración más cercana a la deseada, luego se pipeteó el volumen adecuado (7-9 ml), los cuales se vertieron en el asperjador con 200ml de agua blanda o destilada.

Con ésta suspensión de esporas se asperjó una sola vez sobre las hojas de las 60 plantas de tomate de los tres tratamientos de 60 días de transplantadas, de cada tratamiento, aproximadamente 10ml de la suspensión por planta.

Para favorecer la instalación de *Botrytis cinerea* en las hojas de tomate se asperjó agua blanda o destilada tres veces al día, una en la mañana, otra al medio día y otra en la tarde, manteniéndose una humedad alta de 52 a 65% y con una temperatura de 20 ° C a 26 ° C, todo el ambiente disponía de luz natural uniforme. Después de 10 días de aplicado la suspensión de *Botrytis cinerea*, se aplicó el segundo tratamiento *Clonostachys rosea*, procediendo de igual forma como el caso anterior; se preparó una suspensión madre de esporas en una placa del cultivo reactivado de *Clonostachys rosea* con 20ml de agua destilada estéril con tween al 0.1%, luego se realizó las diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} con 10ml con tween al 0.1%, luego se realizó el conteo de esporas de las dos últimas diluciones en una cámara de New Bauer. Luego se efectuaron los cálculos respectivos para obtener una concentración de 10^8 esporas/ml. Una vez obtenida la concentración se vertió el volumen adecuado entre (8 - 10 ml) de la suspensión de esporas con la concentración deseada en un asperjador con 200ml de agua estilada, para luego asperjar las hojas de tomate sólo de un

grupo experimental o tratamiento. La aplicación de *Clonostachys rosea* se realizó tres veces, cada siete días, durante 30 días.

A la vez se aplicó el tercer tratamiento, se asperjó una solución de agua potable con fungicida químico (Benomil) preparada con anticipación, a una concentración de 1g/L, se asperjó 10ml de dicha solución a un sólo grupo de experimentación. Así se tuvo tres grupos experimentales, uno asperjado con *Botrytis cinerea* y agua, otro con *Botrytis cinerea* y *Clonostachys rosea*, y el último con *Botrytis cinerea* y el fungicida químico. Las hojas de los tres grupos experimentales fueron asperjadas con agua destilada tres veces al día para mantener la humedad de las hojas y favorecer la instalación de los hongos hasta concluir el experimento. Los asperjadores utilizados fueron diferentes y marcados con un plumón para distinguir uno de otro tratamiento.

5.6 Evaluación de la enfermedad

El grado de severidad en las hojas se midió con la escala de Horsfall-Barratt (Campbell,1990), después de cada siete días de aplicado *Clonostachys rosea*, el método consistió en la observación visual directa de los síntomas en las hojas de las plantas, que se manifestaron como manchas pardas, las cuales se compararon con una guía (Clive,1971) donde las hojas modelo de la guía presentan la enfermedad en forma de manchas expresado en porcentajes (1%, 10%,25%,50%), según ésta guía se ubica en la escala de Horsfall-Barrat el grado de la enfermedad a la cual pertenece, cada tratamiento. Para obtener el porcentaje del efecto causado por el antagonista sobre el patógeno, se realizó una diferencia de resultados obtenidos en el testigo menos el resultado obtenido de la evaluación de la enfermedad en las plantas del tratamiento *Botrytis cinerea* + *Clonostachys rosea*; el mismo procedimiento se realizó para los demás tratamientos. Además se contabilizó las flores al inicio y término de la experimentación.

Tabla 1. Escala de Horsfall-Barratt para evaluación de la enfermedad.

Clase	-Enfermedad % Severidad incidencia	Punto medio
0	0	0
1	0-3	1.5
2	3-6	4.5
3	6-12	9
4	12-25	18.5
5	25-50	37.5
6	50-75	62.5
7	75-88	81.5
8	88-94	91.0
9	94-97	96.5
10	97-100	98.5
11	100	100

IV. RESULTADOS

En el cuadro 1 se muestra el efecto antagónico *in vitro* de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* medido por el número de bloques de agar con *Botrytis*, colonizadas por *Clonostachys* cada tres días dentro de una placa Petri (bc/día) después de ser ambos hongos enfrentados. Se puede apreciar que el máximo efecto fue de 1.66 bc/día que correspondió a toda el área de la placa que estuvo colonizada por *Botrytis* y que fue invadida por *Clonostachys* a los nueve días después de ser enfrentados. Y en los cuadros 2 y 3 se observa el crecimiento micelial del biocontrolador y del patógeno, respectivamente, que fue medido de la misma manera que el caso anterior.

En el cuadro 4 se observa que la enfermedad causada por *Botrytis* estuvo presente en todas las plantas de tomate de los tratamientos de la experimentación; los síntomas se presentaron en las hojas (basal, media y superior). Siendo el porcentaje mayor la que se presentó en el tratamiento control en las hojas basales con un valor promedio de 81.775% y el

porcentaje menor de enfermedad en el tratamiento químico y en el del controlador con un valor promedio porcentual igual a 1.5.

En el cuadro 5 se tiene el valor promedio efectivo de la enfermedad controlada en porcentaje ejercido sobre *Botrytis cinerea* en los tratamientos químico y controlador después de haber sustraído el respectivo valor porcentual de enfermedad del tratamiento control. Se aprecia que en el tratamiento químico se obtuvo el mayor valor efectivo de enfermedad controlada de 46.43% en la hoja basal y el menor valor efectivo de enfermedad controlada en la hoja superior de 25.35% del tratamiento químico. Lo que no ocurre con el biocontrolador pues sus valores son menores, en la hoja basal 19.87% y en la hoja superior un 27.35 %. Teniendo como porcentajes totales de control para el químico un 34.77% y para el biocontrolador un 25.72%, valores estadísticamente diferentes.

CUADRO 1. Efecto antagónico *in vitro* de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* a través del número de bloques de agar con *Botrytis* colonizados por *Clonostachys* por día (bc/día) dentro de una placa Petri en diferentes números de días (bc/día) después de ser enfrentados ambos hongos.

Repetición de la experimentación	Número de bloques de agar con <i>Botrytis cinerea</i> invadido por <i>Clonostachys rosea</i> a tiempos diferentes			Efecto antagónico (bc/día) días		
	3 días	6 días	9 días	3 días	6 días	9 días
I	4	10	15	1.33	1.66	1.66
II	4	12	15	1.33	2.00	1.66
III	4	13	15	1.33	2.16	1.66
IV	4	12	15	1.33	2.00	1.66
V	4	13	15	1.33	2.16	1.66

CUADRO N° 2 .- Crecimiento miceliar de *Clonostachys rosea* sobre los bloques de agar, evaluado cada tres días.

Repeticiones	Crecimiento	Miceliar	(bc/día)	
	3	6	9	12
I	1	6	10	15
II	2	5	12	15
III	2	5	12	15
IV	2	6	10	15
V	2	6	12	15

CUADRO Nº 3 .- Crecimiento miceliar de *Botrytis cinerea* sobre los
 bloques de agar, evaluado cada tres días.

Repeticiones	Crecimiento	Miceliar	(bc/día)	
	3	6	9	10
I	3	7	13	15
II	2	8	10	15
III	3	6	12	15
IV	2	6	11	15
V	2	6	12	15

Cuadro 4. Valor promedio porcentual de enfermedad sobre la base de los valores medios porcentuales de la enfermedad según la escala de Horsfall-Barrat, obtenido en las plantas de los tratamientos en sus hojas a los 84 días de iniciada la experimentación de antagonismo de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* en condiciones de invernadero.

TRATAMIENTO	VALOR PROMEDIO % DE ENFERMEDAD		
	Hoja basal	Hoja media	Hoja superior
Control	81.775	33.375	28.854
Químico	35.35	2.85	1.5
Controlador	61.875	3.45	1.5

Cuadro 5. Valor promedio efectivo de enfermedad obtenido de las plantas de los tratamientos experimentales en sus hojas a los 84 días de iniciada la experimentación de antagonismo de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* en condiciones de invernadero.

TRATAMIENTO	VALOR PROMEDIO EFECTIVO DE ENFERMEDAD (%)		
	Hoja basal	Hoja media	Hoja superior
Químico	46.425	30.525	27.354
Controlador (<i>Clonostachys rosea</i>)	19.875	29.925	27.354

*NOTA: Después de sustraer el respectivo valor promedio porcentual de enfermedad del tratamiento control, valores obtenidos sobre la base de los valores medios porcentuales de la enfermedad según la escala de Horsfall-Barrat aplicado a las diferentes plantas.

Cuadro 5. Valor grado de control de la enfermedad obtenido de las plantas de los tratamientos experimentales en sus hojas a los 84 días de iniciada la experimentación de antagonismo de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* en condiciones de invernadero.

TRATAMIENTO	GRADO DE CONTROL DE LA ENFERMEDAD %			PORCENTAJE PROMEDIO TOTAL
	Hoja basal	Hoja media	Hoja superior	
Químico (Agente químico + <i>Botrytis cinerea</i>)	46.43	30.53	27.35	34.77
Controlador (<i>Clonostachys rosea</i> + <i>Botrytis cinerea</i>)	19.87	29.93	27.35	25.72

*NOTA: Después de sustraer el respectivo valor promedio porcentual de enfermedad del tratamiento control, valores obtenidos sobre la base de los valores medios porcentuales de la enfermedad según la escala de Horsfall-Barrat aplicado a las diferentes plantas.

V. DISCUSIÓN

Mediante la prueba de la placa precolonizada, se determinó el efecto antagónico de *Clonostachys rosea* al haber colonizado totalmente el desarrollo de *Botrytis cinerea* (Anexo 2)(Cuadro N°1).

Esta colonización al haberse efectuado al cabo de nueve días determina que *Clonostachys rosea* es un buen biocontrolador considerando con lo establecido en el método de Krauss (Krauss,1998). Si lo comparamos con *Trichoderma viride* que coloniza a *Botrytis cinerea* en cinco días, *T. harzianum* lo coloniza en seis a siete días, hecho que se realizó en el mismo laboratorio y en las mismas condiciones; podríamos decir que es un poco lento pero no deja de ser un buen controlador, a comparación de *T. virens* que coloniza a *Botrytis cinerea* en diez días, siendo más rápido, estos resultados de laboratorio no indican que este hecho ocurrirá de la misma manera en invernadero no obstante es un indicio de que puede tener un efecto excelente de biocontrol en invernadero (Krauss, 1998).

El efecto antagónico de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* es probable que sea ejercido a que *Clonostachys* produce la enzima Gliotoxin la cual se sabe que tiene una acción antagónica al crecimiento de ciertos hongos (Harman, 1998).

En el cuadro n° 6 al observarse que el control ejercido tanto por el controlador como por el agente químico al ser estadísticamente diferentes indica que el antagonista *Clonostachys rosea* suprime el crecimiento de *Botrytis cinerea* en menor grado que un agente químico, posiblemente evitando la germinación de esporas y el desarrollo de los tubos germinativos. Por lo observado en la experimentación la vigorosidad de la planta biocontrolada nos indica que el antagonista ejerce un control sobre el crecimiento del patógeno *Botrytis cinerea*. El efecto antagónico encontrado de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* de acuerdo a las referencias bibliográficas puede deberse a la acción micoparasitaria, pues este efecto se observa en los estudios realizados con begonias (Sutton, 1997)

El efecto antagónico de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* es probable que sea ejercido a que *Clonostachys* produce la enzima Gliotoxin la cual se sabe que tiene una acción antagónica al crecimiento de ciertos hongos (Harman, 1998).

En el cuadro nº 5 al observarse que el control ejercido tanto por el controlador como por el agente químico al ser estadísticamente diferentes indica que el antagonista *Clonostachys rosea* suprime el crecimiento de *Botrytis cinerea* en menor grado que un agente químico, posiblemente evitando la germinación de esporas y el desarrollo de los tubos germinativos. Por lo observado en la experimentación la vigorosidad de la planta biocontrolada nos indica que el antagonista ejerce un control sobre el crecimiento del patógeno *Botrytis cinerea*. El efecto antagónico encontrado de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* de acuerdo a las referencias bibliográficas puede deberse a la acción micoparasitaria, pues este efecto se observa en los estudios realizados con begonias (Sutton, 1997)

VI. CONCLUSIONES

En las condiciones trabajadas se concluye lo siguiente:

1. *Clonostachys rosea* ejerce un efecto antagónico sobre *Botrytis cinerea* *in vitro*.
2. *Clonostachys rosea* ejerce efecto antagónico sobre *Botrytis cinerea* en el cultivo *Lycopersicum esculentum* (tomate) en condiciones de invernadero.
3. El efecto antagónico de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* en el cultivo *Lycopersicum esculentum* (tomate) en condiciones de invernadero es de 25.72% y un brote de flores en un 59%, lo cual se ve disminuido en el tratamiento de funguicida químico.

VII. RECOMENDACIONES

- * Continuar con la experimentación a nivel de campo para tener conclusiones mucho más exactas acerca de la acción antagónica de *Clonostachys rosea*.
- * Realizar experimentos aplicando el antagonista a nivel de semilla y a nivel de almacigo .
- * Investigar la acción antagónica de *Clonostachys rosea* sobre otros hongos.
- * Investigar cómo extraer y utilizar la toxina producida por *Clonostachys* como un agente de biocontrol.
- * Realizar pruebas de antagonismo mezclando *Clonostachys rosea* con diferentes hongos biocontroladores para observar la existencia de una mejor eficacia.

VII. RECOMENDACIONES

- * Continuar con la experimentación a nivel de campo para tener conclusiones mucho más exactas acerca de la acción antagónica de *Clonostachys rosea*.
- * Realizar experimentos aplicando el antagonista a nivel de semilla y a nivel de almacigo .
- * Investigar la acción antagónica de *Clonostachys rosea* sobre otros hongos.
- * Investigar cómo extraer y utilizar la toxina producida por *Clonostachys* como un agente de biocontrol.
- * Realizar pruebas de antagonismo mezclando *Clonostachys rosea* con diferentes hongos biocontroladores para observar la existencia de una mejor eficacia.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Agrios, G.** 1995. Fitopatología. 2da Edición. Editorial Limusa, S.A. México. 838p.
2. **Alexopoulos, C.J.** and C.W. Mims. 1997. Introductory Mycology, 4^o edition. John Wiley and Sons, Inc.: New York. 215-257 pp.
3. **Baker, R.** 1968. Mechanismn of biological control of soli-borne pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 6:263-294.
4. **Baker, K.F., James, R.** 1974. Biological control of plant pathogens. Primera edición. Editorial Freeman and company. 60- 99pp. United States of America.
5. **Beagle-Ristatino, J. and Papavizas, G.** 1985. Survival and proliferation of propagules of *Trichoderma* spp., and *Gliocladium virens* in silland plant rhizospheres. Phytopathology 75:729-732.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Agrios, G.** 1995. Fitopatología. 2da Edición. Editorial Limusa, S.A. México. 838p.
2. **Alexopoulos, C.J.** and C.W. Mims. 1997. Introductory Mycology, 4^o edition. John Wiley and Sons, Inc.: New York. 215-257 pp.
3. **Baker, R.** 1968. Mechanismn of biological control of soli-borne pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 6:263-294.
4. **Baker, K.F., James, R.** 1974. Biological control of plant pathogens. Primera edición. Editorial Freeman and company. 60- 99pp. United States of America.
5. **Beagle-Ristatino, J. and Papavizas, G.** 1985. Survival and proliferation of propagules of *Trichoderma* spp., and *Gliocladium virens* in silland plant rhizospheres. Phytopathology 75:729-732.

6. **Benita P.E.,Mónica A.,Arturo P.E.**2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. Revista Iberoamericana de Micología:17: S43-S46.España.
7. **Bransberg,J.W.**1969. Fungi isolated from decomposing conifer litter. Mycologia 61:373-381.
8. **Campbell, C.L, Laurence V.M.** 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. 1ª edición. Editorial Wiley. Estados Unidos.
9. **Castaño Z,J. Luis R.M .** 1997. Manual para identificación, diagnóstico de hongos, bacterias, virus, y nematodos fitopatógenos. 1ªedición. Editorial Zamorano. Honduras.
10. **Clive,J.W.** 1971. An Illustrated Series of Assessment Keys for Plant Diseases, Their Preparation and Usage. Vol. 51, No.2.CAN. Plant disease.
11. **Coley-Smith, JR. Vorhoeff K, Jarvis WR.** The Biology of *Botrytis*. 1990. Academic Press.London.

12. **Dashwood, E.P., Fox, R.A., and Duncan, J.M.** 1993. Effect of substrate and plant maturity on the incidence of infection of potato roots by pathogenic fungi. *Mycol. Res.* 97:733-745.
13. **Deacon, J.W., and Berry, L.A.** 1992. Modes of action of mycoparasites in relation to biocontrol of soilborne plant pathogens. 157-167pp. London.
14. **Domsch, K.H., Gams, W., and Anderson, T.h.** 1980. Compendium of Soil Fungi. Editorial academic. London.
15. **Elad, I., Chet, I. and Katan, J.** 1980. *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70(2): 119-121.
16. **Elad, Y., and Evensen, K.** 1995. Physiological aspects of resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 85:637-643.
17. **Ellis, M.B.** 1979. Dematiaceous Hyphomycetes. CMI. Kew. 608 pp. (<http://ccfb.cornell.edu/biotaweb/LP98-000034.html>)

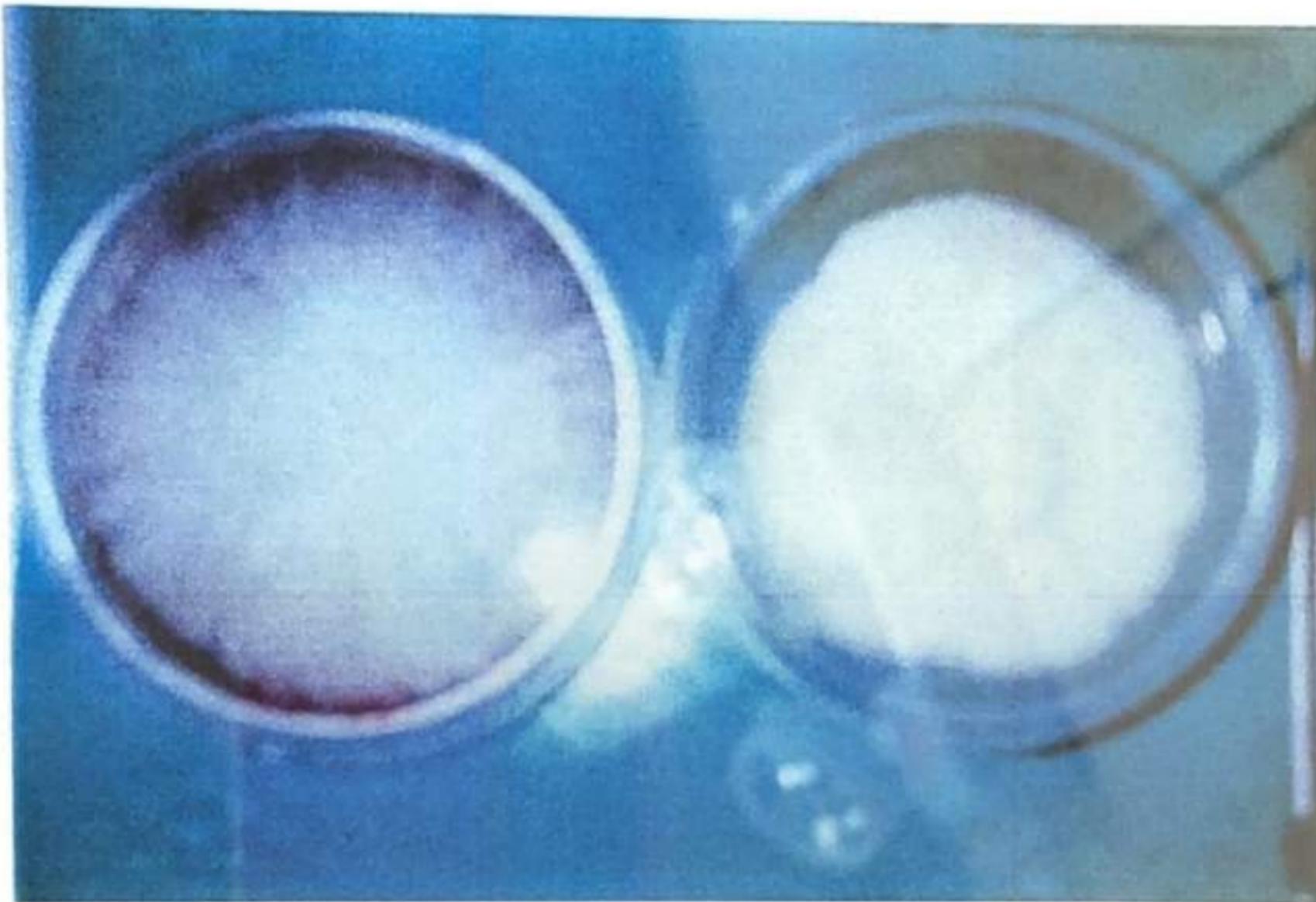
18. **Gams, W. and Bissett, J.** 1998. Morphology and identification of *Trichoderma* & *Gliocladium*. C. Kubicek and G. Harman. Vol.1.p. 3-34.
19. **Giaconi, V.M.** 1998. Cultivo de hortalizas. 13ª edición. Editorial Universitaria. Chile. 50-67 pp.
20. **Jarvis, W.R.** 1992. Managing Diseases in Greenhouse Crops. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 111-120pp.
21. **James, C.W.** 1971. An illustrated series of assessment keys for plant diseases, their preparation and usage. Vol.51. Nº 2. Can. Plant Disease. London.
22. **Koc, R.M.** 1993. Principios de control de enfermedades de las plantas. 1ª edición. UNALAM. Lima-Perú.
23. **Krauss, U., Bidwell, R & Ince, J.** 1998. Isolation and preliminary evaluation of mycoparasites as biocontrol agents against crown rot of banana. *Biological Control – Theory and Applications* 13, 111-119.
24. **Kubicek, C.P., and Gary, E.H.,** 1998. *Trichoderma and Gliocladium*, Vol I, 1ª edición, T.J. International Lid. 20-207pp.

25. **Li, D.W., Sutton, J.C. and Peng, G.**1996. Effective suppression of *Botrytis cinerea* in greenhouse-grown cyclamen by *Gliocladium roseum* (Abstr) Can.J.Plant Pathology 18:93-94.
26. **Lorito,M.;Harman,G.;Hayes,C,;Broadway,R.;Tronsm,A.;Woo,S. and Di Piedro,A.** 1993.Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosdase. Phytopathology 83(3):302-307.
27. **Maroto, J.** 1983. Horticultura herbácea especial. Editorial Mundi Prensa. Madrid. 235pp.
28. **Pachenari, A., and Dix, N.J.** 1980. Production of toxins and wall degrading enzymes by *Gliocladium roseum* . Trans. Br. Mycol. Soc. 74:561-566.
29. **Samuels,G.J.**1976. A revision of the fungi formely classified as *Nectria*, subgenus *Hyphonectria*,Mem.N. Y. Bot. Gard. 26:1-126.
30. **Sutton, J.C, De-Wei Li, Gang p., Hai Y., and Pinggao Z.** 1997. *Gliocladium roseum* a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. Plant Disease. Vol.81 n°4. 316- 327 pp. American phytopatholgical Society.

29. **Tronsmo, A. and Raa, J.** 1977. Antagonistic action of *Trichoderma pseudokoningii* against the apple pathogen *Botrytis cinerea*. *Phytopathol. Z.* 89:216-220 pp.

ANEXOS

ANEXO N° 1 Placas con *Clonostachys rosea* sembrado en agar melaza (izquierda) y en agar extracto de malta (derecha).



ANEXO N° 2 Placa precolonizada con *Botrytis cinerea* colonizada por *Clonostachys rosea* seccionada para obtener los bloques (Bc).



ANEXO N° 3 Placas con bloques de colonización que fueron evaluados cada uno para determinar en ellos la presencia de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* y determinar el número de bloques colonizados con la ayuda de un estereoscopio.



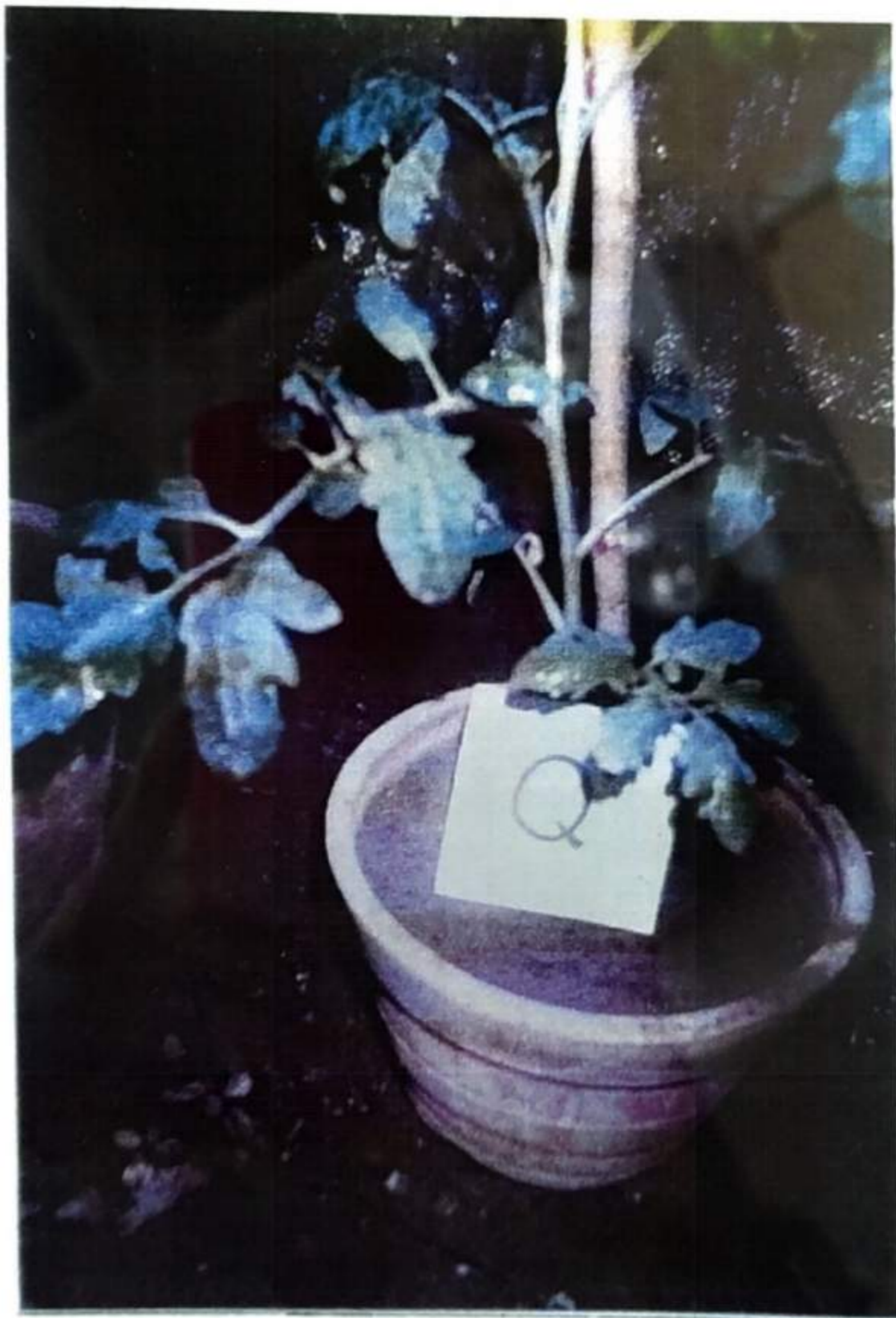
ANEXO N° 4 Aplicación del hongo por aspersión.



ANEXO N° 5 Plantas enfermas con *Botrytis cinerea*
tratadas con *Clonostachys rosea*.



ANEXO N° 6 Planta enferma con *Botrytis cinerea* y tratada con fungicida químico.



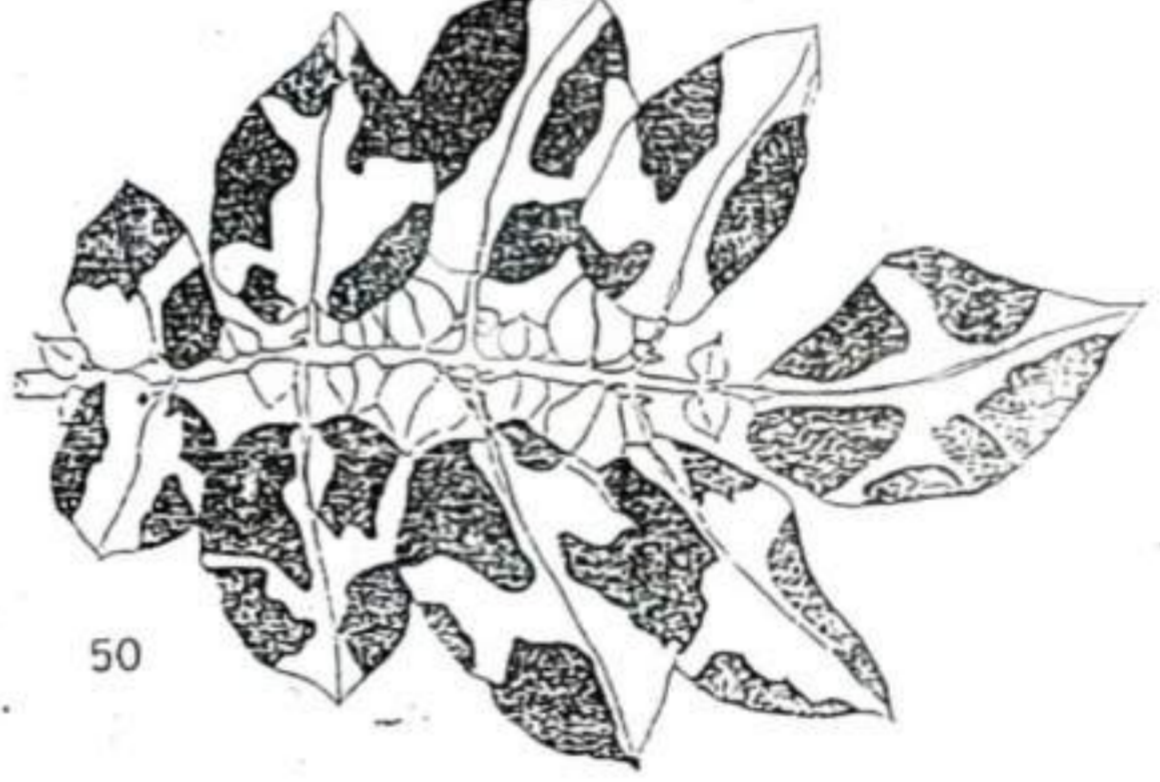
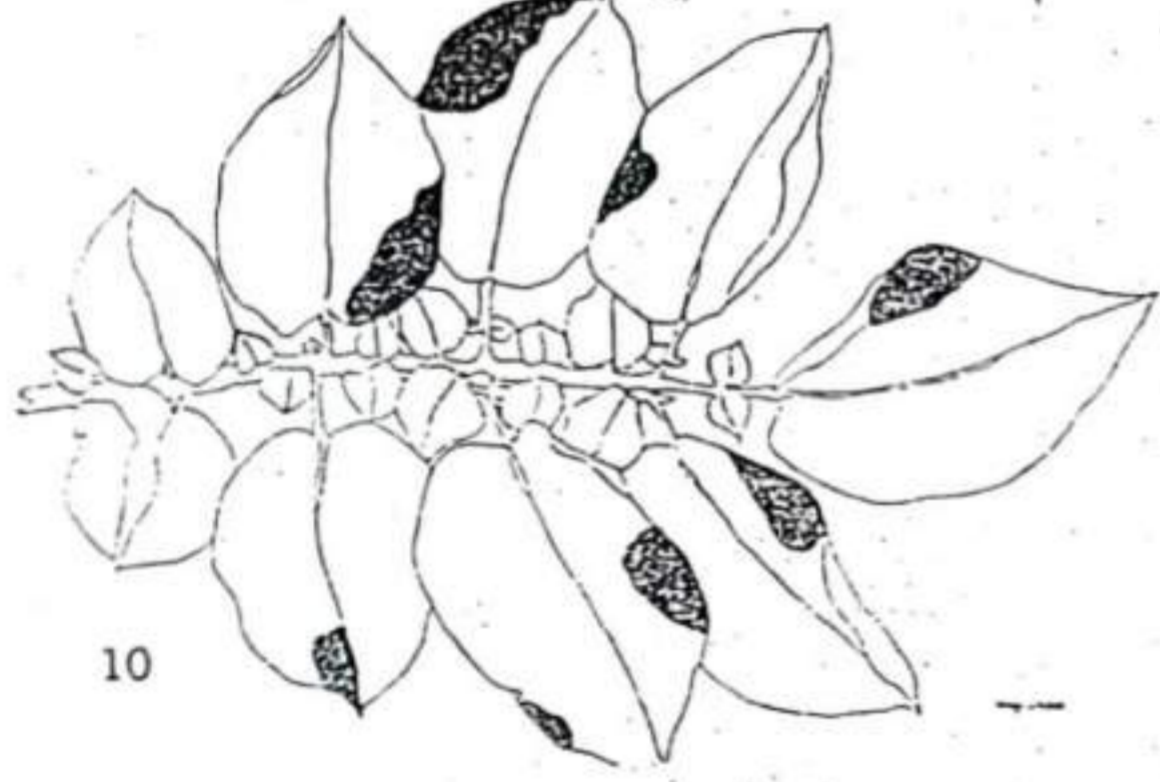
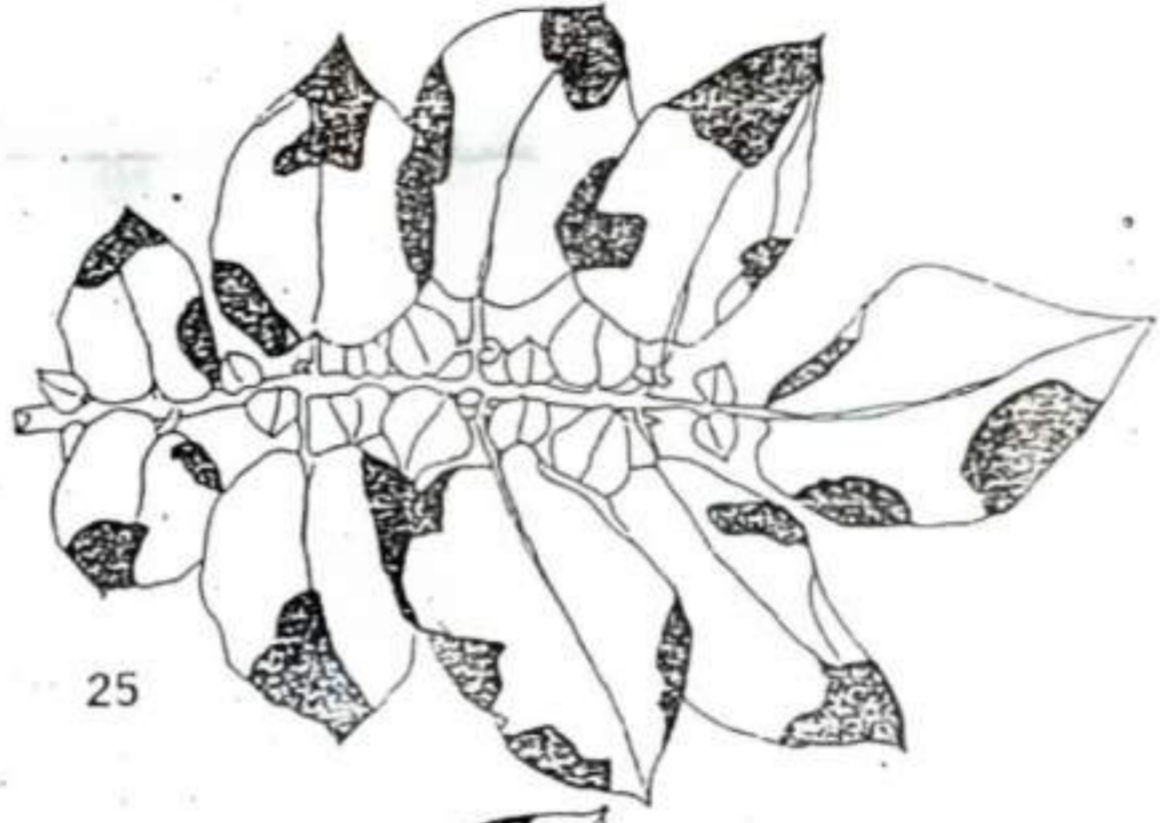
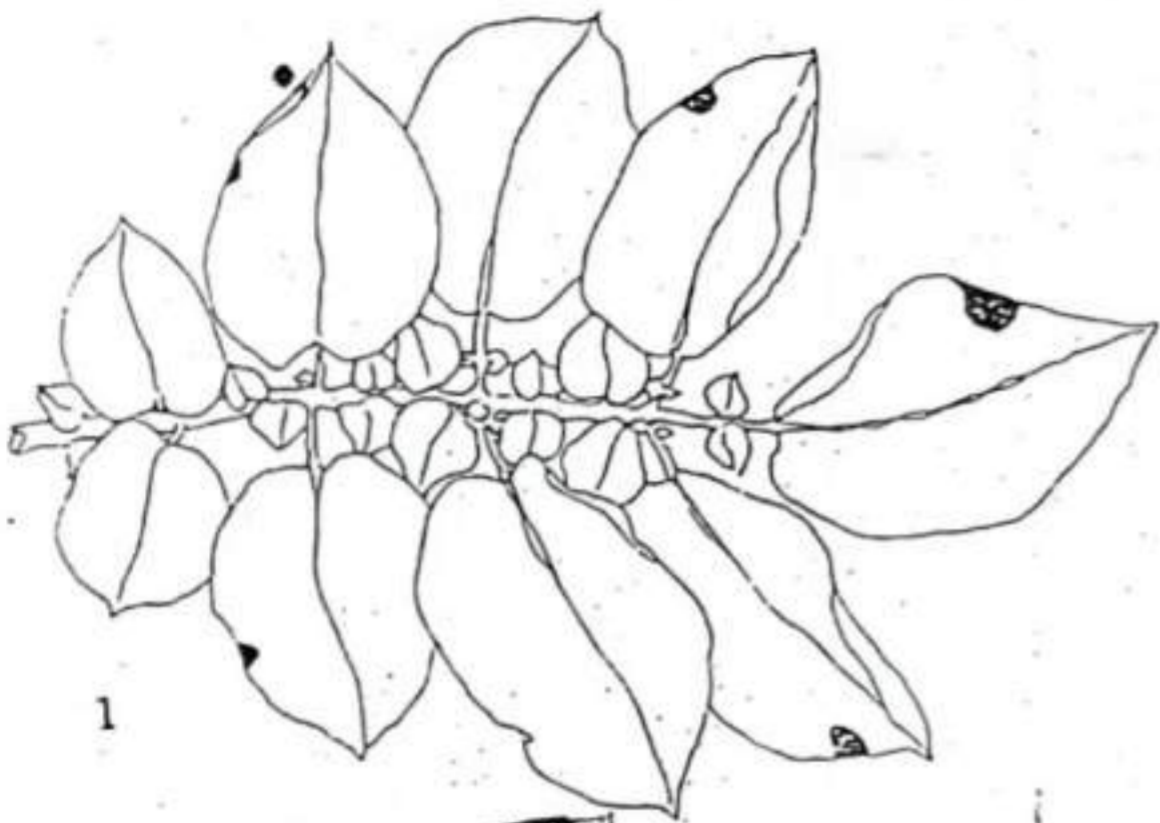
ANEXO N° 7 Plantas enfermas con *Botrytis cinerea*.



ANEXO N°8 Evaluación de la enfermedad en las plantas.



ANEXO Nº9 Guía del área de la hoja cubierta con la que se evaluó la enfermedad en las hojas (Clive, 1971).



ANEXO N° 10 Resultados de la evaluación de daño de la enfermedad de las plantas de tomate del tratamiento Control (Plantas de tomate con *Botrytis cinerea* en invernadero)

Evaluación realizada cada siete días	Hoja evaluada	1ª Repetición	2ª Repetición	3ª Repetición	4ª Repetición	PROMEDIO
Primera evaluación	BASALES	4.5	1.5	1.5	9	4.125
Primera evaluación	BASALES	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Primera evaluación	BASALES	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Primera evaluación	BASALES	4.5	1.5	1.5	1.5	2.25
Primera evaluación	BASALES	4.5	4.5	1.5	9	4.375
PROMEDIO						2.85
Segunda evaluación	BASALES	4.5	4.5	1.5	4.5	3.75
Segunda evaluación	BASALES	37.5	13.5	4.5	37.5	24.5
Segunda evaluación	BASALES	37.5	9	1.5	62.5	27.625
Segunda evaluación	BASALES	37.5	62.5	1.5	1.5	25.75
Segunda evaluación	BASALES	96.5	1.5	1.5	37.5	34.25
Promedio						23.175
Tercera evaluación	BASALES	96.5	93.5	37.5	13.5	62.75
Tercera evaluación	BASALES	91	98.5	98.5	98.5	96.625
Tercera evaluación	BASALES	62.5	18.5	98.5	81.5	65.25
Tercera evaluación	BASALES	31.5	93.5	93.5	31.5	90
Tercera evaluación	BASALES	31.5	93.5	93.5	93.5	94.25
Promedio						81.775
Primera evaluación	MEDIA	4.5	1.5	1.5	1.5	2.25
Primera evaluación	MEDIA	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Primera evaluación	MEDIA	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Primera evaluación	MEDIA	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Primera evaluación	MEDIA	4.5	1.5	1.5	1.5	2.25
PROMEDIO						1.8
Segunda evaluación	MEDIA	9	1.5	1.5	1.5	3.375
Segunda evaluación	MEDIA	18.5	1.5	1.5	1.5	5.75
Segunda evaluación	MEDIA	18.5	1.5	1.5	1.5	5.75

Segunda evaluación	MEDIA	18.5	1.5	1.5	1.5	5.75
Segunda evaluación	MEDIA	9	1.5	1.5	1.5	3.375
PROMEDIO						4.8
Tercera evaluación	MEDIA	9	98.5	1.5	1.5	27.625
Tercera evaluación	MEDIA	18.5	91	98.5	4.5	53.125
Tercera evaluación	MEDIA	18.5	1.5	91	4.5	28.375
Tercera evaluación	MEDIA	18.5	1.5	98.5	4.5	30.75
Tercera evaluación	MEDIA	9	4.5	91	1.5	26.5
PROMEDIO						33.375
Primera evaluación	SUPERIOR	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Primera evaluación	SUPERIOR	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Primera evaluación	SUPERIOR	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Primera evaluación	SUPERIOR	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Primera evaluación	SUPERIOR	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
PROMEDIO						1.5
Segunda evaluación	SUPERIOR	9	4.5	1.5	1.5	4.125
Segunda evaluación	SUPERIOR	118.5	1.5	1.5	1.5	30.75
Segunda evaluación	SUPERIOR	9	1.5	4.5	1.5	4.125
Segunda evaluación	SUPERIOR	18.5	1.5	1.5	1.5	5.75
Segunda evaluación	SUPERIOR	18.5	1.5		1.5	7.16666667
PROMEDIO						10.38333333
Tercera evaluación	SUPERIOR	37.5	98.5	1.5	1.5	34.75
Tercera evaluación	SUPERIOR	37.58	4.5	98.5	1.5	35.52
Tercera evaluación	SUPERIOR	18.5	1.5	81.5	1.5	25.75
Tercera evaluación	SUPERIOR	37.5	1.5	98.5	1.5	34.75
Tercera evaluación	SUPERIOR	37.5	1.5		1.5	13.5
						28.854
Promedio		25.624	19.03333333	26.5465116	13.3	27.6748

ANEXO N°11 Resultados de la evaluación de daño de la enfermedad a las plantas de tomate tratadas con *Clonostachys rosea*.

Evaluación realizada cada siete días	Hoja evaluada	1ºRepetición	2ºRepetición	3ºRepetición	4ºRepetición	PROMEDIO
Primera evaluación	Basal	4.5	62.5	1.5	9	11.375
Primera evaluación	Basal	1.5	9	1.5	1.5	2.2125
Primera evaluación	Basal	1.5	4.5	1.5	1.5	1.875
Primera evaluación	Basal	1.5	1.5	1.5	1.5	2.2125
Primera evaluación	Basal	4.5	1.5	1.5	9	4.125
Promedio						4.6
Segunda evaluación	Basal	91	62.5	1.5	98.5	31.1666667
Segunda evaluación	Basal	9	18.5	4.5	81.5	19.58333333
Segunda evaluación	Basal	18.5	4.5	62.5	81.5	21.1666667
Segunda evaluación	Basal	18.5	18.5	4.5	4.5	9.91666667
Segunda evaluación	Basal	9	4.5	4.5	81.5	6
Promedio						17.5666667
Tercera evaluación	Basal	98.5	98.5	91	98.5	96.125
Tercera evaluación	Basal	18.5	18.5	81.5	98.5	54.25
Tercera evaluación	Basal	37.5	91	9	98.5	59
Tercera evaluación	Basal	18.5	9	91	62.5	45.25
Tercera evaluación	Basal	18.5	18.5	91	91	54.75
Promedio						61.875
Primera evaluación	Media	1.5	9	1.5	1.5	3.375
Primera evaluación	Media	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Primera evaluación	Media	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Primera evaluación	Media	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Primera evaluación	Media	1.5	15	1.5	1.5	4.875
Promedio						2.55
Segunda evaluación	Media	4.5	18.5	1.5	4.5	7.25

Segunda evaluación	Media	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Segunda evaluación	Media	4.5	1.5	1.5	4.5	3
Segunda evaluación	Media	4.5	1.5	1.5	1.5	2.25
Segunda evaluación	Media	4.5	1.5	1.5	4.5	3
Promedio						3.4
Tercera evaluación	Media	4.5	9	4.5	4.5	5.625
Tercera evaluación	Media	4.5	1.5	1.5	1.5	2.25
Tercera evaluación	Media	4.5	1.5	1.5	1.5	2.25
Tercera evaluación	Media	1.5	1.5	4.5	9	4.125
Tercera evaluación	Media	4.5	1.5	4.5	1.5	3
Promedio						3.45
Primera evaluación	Superior	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Primera evaluación	Superior	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Primera evaluación	Superior	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Primera evaluación	Superior	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Primera evaluación	Superior	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Promedio						1.5
Segunda evaluación	Superior	1.5	4.5	1.5	1.5	2.25
Segunda evaluación	Superior	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Segunda evaluación	Superior	1.5	1.5	1.5	4.5	2.25
Segunda evaluación	Superior	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Segunda evaluación	Superior	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Promedio						1.8
Tercera evaluación	Superior	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Tercera evaluación	Superior	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Tercera evaluación	Superior	1.5			1.5	1.5
Tercera evaluación	Superior	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Tercera evaluación	Superior	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Promedio		9.28888889	11.7045455	11.3863636	19.7	1.5

ANEXO Nº 12. Resultados de la evaluación de daño de la enfermedad a las plantas de tomate tratadas con fungicida químico.

Evaluación realizada cada siete días	Hoja evaluada	1ºrepeticion	2ºrepeticion	3ºrepeticion	4º repetición	Promedio
Primera evaluación	Basal	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Primera evaluación	Basal	1.5	1.5	4.5	1.5	2.25
Primera evaluación	Basal	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Primera evaluación	Basal	1.5	4.5	1.5	1.5	2.25
Primera evaluación	Basal	1.5	1.5		1.5	1.5
Promedio						1.8
Segunda evaluación	Basal	4.5	98.5	4.5	1.5	27.25
Segunda evaluación	Basal	1.5	4.5		1.5	2.5
Segunda evaluación	Basal	1.5	4.5	1.5	4.5	3
Segunda evaluación	Basal	4.5	62.5		1.5	22.83333333
Segunda evaluación	Basal	4.5	37.5		4.5	15.5
Promedio						14.2166667
Tercera evaluación	Basal	9	100	91	91	72.75
Tercera evaluación	Basal	1.5	1.5		1.5	1.5
Tercera evaluación	Basal	1.5	100		1.5	34.33333333
Tercera evaluación	Basal	4.5	98.5		1.5	34.83333333
Tercera evaluación	Basal	4.5	91		4.5	33.33333333
Promedio						35.35
Primera evaluación	Media	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Primera evaluación	Media	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Primera evaluación	Media	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Primera evaluación	Media	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Primera evaluación	Media	1.5	1.5		1.5	1.5
Promedio						1.5

Tercera evaluación	Media	4.5		1.5	1.5	2.5
Tercera evaluación	Media	1.5	1.5		1.5	1.5
Tercera evaluación	Media	1.5	9		1.5	4
Tercera evaluación	Media	1.5	9		1.5	4
Tercera evaluación	Media	1.5	1.5	1.5	4.5	2.25
Promedio						2.85
Segunda evaluación	Superior	1.5	4.5	1.5	1.5	2.25
Segunda evaluación	Superior	1.5	1.5		1.5	1.5
Segunda evaluación	Superior	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Segunda evaluación	Superior	1.5	1.5		1.5	1.5
Segunda evaluación	Superior	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Promedio						1.65
Tercera evaluación	Superior	1.5		1.5	1.5	1.5
Tercera evaluación	Superior	1.5	1.5		1.5	1.5
Tercera evaluación	Superior	1.5			1.5	1.5
Tercera evaluación	Superior	1.5	1.5		1.5	1.5
Tercera evaluación	Superior	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
		2.13333333	17.3690476	4.91071429	3.82222222	1.5

ANEXO N° 13. Análisis de Varianza de los resultados obtenidos del grado de control ejercido en la enfermedad realizado en el programa de SPSS v.11.

ANOVA

Promedio de porcentaje de enfermedad total

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9762.049	2	4881.024	6.807	.003
Within Groups	30115.409	42	717.034		
Total	39877.458	44			

El análisis de varianza nos indica que el valor de la significancia = 0.003 es menor al $\alpha = 0.05$ lo cual indica que los promedios del grado de control ejercido en las plantas son diferentes y existe una gran significancia.

PRUEBA DE Chi-Cuadrado

	Promedio de porcentaje de enfermedad total
Chi-Square	79.667
Df	29
Sig.	.000

a 30 cells (100.0%) have expected frequencies less than 5.
The minimum expected cell frequency is 1.5.

En la prueba de CHI-cuadrado observamos que el valor de la significancia es 0.0 que es menor a $\alpha = 0.05$ lo que significa que los promedios del grado de control ejercido en las plantas son diferentes.

Firma de los asesores de la presente tesis:



Asesor: Mgr. Roberto Castellanos Cabrera



Asesor externo: Ing. Hilda Gómez Ramirez



Coasesor: Mgr. Daladier Castillo Cotrina