

# AVANCES SOBRE EL CONTROL BIOLÓGICO DE TIZONES EN EL CULTIVO DE TOMATE

Vera Sánchez Garita, Elkin Bustamante, H. González y M. Cervantes  
Fitoprotección, CATIE

La preocupación sobre el efecto en la salud humana y la contaminación ambiental asociada con el uso excesivo de fungicidas en el control de enfermedades, así como la aparición de poblaciones de patógenos resistentes a los productos químicos de uso frecuente en la mayoría de los cultivos han contribuido a aumentar el interés en investigar alternativas de bajos insumos químicos, entre ellas el control biológico, para el manejo de enfermedades.

Recientemente se le ha dedicado más tiempo y dinero a investigar el control biológico de patógenos. De acuerdo a los resultados que a la fecha se han obtenido, el control biológico de patógenos del suelo ha tenido mayor éxito, mientras que en el follaje los logros son escasos, principalmente por la dificultad de establecer microorganismos antagonistas en la fitosfera. Esto es especialmente difícil en nuestras condiciones tropicales donde se presentan tanto altas precipitaciones como radiaciones solares muy altas.

## ¿Por qué el cultivo de tomate?

Se consideró que siendo el tomate un producto principalmente de consumo fresco, cuyo cultivo puede requerir al menos dos o tres aplicaciones de fungicidas por semana, para mantener bajo control las dos enfermedades fúngicas más importantes como lo son el tizón tardío (*Phytophthora infestans*) y el tizón temprano (*Alternaria solani*), el control biológico podría ofrecer una alternativa que dentro de un programa de manejo integrado disminuya el uso de químicos en el cultivo. También se consideró que la planta de tomate por ser de ciclo corto, fácil de manejar en invernadero, podría usarse como planta modelo para estos estudios.

## 1. ESTUDIOS REALIZADOS CON *Alternaria solani*

Se realizaron investigaciones tanto en laboratorio, invernadero y campo con el cultivar comercial Hayslip, con el propósito de determinar la posibilidad de control biológico de *A. solani*. En una primera etapa se identificaron cepas bacteriales de los géneros *Pseudomonas* (*Burkholderia*) y *Bacillus*, las cuales presentaron antagonismo *in vitro* hacia el patógeno (Okamoto, 1992). Particularmente la cepa A30

(*Bacillus* sp) presentó un efecto antagonista importante. Además esta cepa (A30) demostró capacidad de producir quitinasas capaces de hidrolizar la quitina presente en la pared de *A. solani* (Okamoto, Bustamante y Gamboa, 1993). Sin embargo, cuando las bacterias antagonistas fueron probadas bajo condiciones de campo no se observó efecto sobre tizón temprano. Tampoco se observó efecto sobre el desarrollo de tizón cuando se probó la aplicación de sustratos como leche y quitinasa para incrementar las poblaciones de bacterias quitinolíticas sobre la superficie de la hoja (Okamoto, 1992).

De los trabajos realizados se concluyó que posiblemente la arquitectura de la planta y (o) la alta precipitación en el área donde fueron realizadas las pruebas desfavoreció el establecimiento de las bacterias antagonistas. Todos estos ensayos fueron realizados en la Finca experimental La Montaña (CATIE) donde se presentan precipitaciones de hasta 3000 mm por año. Estos resultados coinciden con observaciones realizadas en otros países, donde cepas de *Bacillus* no han sido efectivas bajo precipitaciones igual o mayores de 2500 mm por año (E. Bustamante, comunicación personal).

Con base en estos resultados se iniciaron investigaciones para estudiar la posibilidad de inducción de resistencia de las bacterias antagonistas a *A. solani*. Se realizaron inoculaciones endofíticas de los antagonistas, en plántulas producidas en invernadero. Se usó el método de corte del hipocótilo y el método de inmersión de plántulas completas en la suspensión de los antagonistas. Los resultados fueron erráticos, por lo tanto se realizaron las mismas pruebas con hongos antagonistas de la colección de laboratorio. Se probaron dos aislamientos de *Trichoderma* (069 y Th 100) y dos de *Fusarium* (076 y 082) los cuales por el método de corte del hipocótilo presentaron disminución del desarrollo de la enfermedad en las hojas presentes en el momento de la inoculación con los antagonistas, el cual se mantuvo aproximadamente 24 días después de colocadas en el campo, sin embargo, no se observó efecto sobre las hojas emitidas. Se concluyó que las antagonistas no pudieron producir una reacción de resistencia en las hojas nuevas. (H. González, V. Sánchez, E. Bustamante, R. González y M. Cervantes, 1996).

También probaron diferentes concentraciones de coadyuvantes (NP-7, Silwet L-77 y aceite agrícola) para mejorar la adhesión de dos cepas de bacterias antagonistas (*Bacillus* A30 y *Serratia* R-1) a la superficie de la hoja y dos sustratos (leche y melaza) para favorecer su establecimiento en el campo. El Silwet y el aceite agrícola a bajas concentraciones favorecieron la capacidad antagonista de las dos bacterias probadas. La mezcla de melaza, leche y A30 fue el mejor tratamiento en la prueba de sustratos, el cual produjo una reducción significativa, de 47% de la enfermedad, comparado con el testigo con fungicidas (mancozeb, clorotalonil y la mezcla de oxadixil con mancozeb). El efecto se mantuvo durante 53 días desde el inicio del ensayo (H. González, sin publicar).

## 2. ESTUDIOS REALIZADOS CON *Phytophthora infestans*

El trabajo se inició con una búsqueda de antagonistas en plantas de tomate comercial (*Lycopersicon esculentum*) y tomate silvestre (*Lycopersicon pimpinellifolium*). Se tomaron muestras de plantas sanas de las dos especies de tomate, de donde se obtuvo microorganismos de la filosfera y de la rizosfera, por medio de el lavado de hojas y raíces, respectivamente. También se extrajo microorganismos de la endosfera de las muestras. Para la extracción de los microorganismos endófitos se licuó el material, cuya superficie fue previamente desinfectada con hipoclorito al 1%.

Los microorganismos obtenidos, 132 en total, (82 bacterias y 50 hongos) fueron probados para determinar su capacidad antagonista a *P. infestans*. Para estas pruebas se usó hojas desprendidas de plantas de tomate del cultivar Hayslip, producidas en invernadero, las hojas fueron sumergidas en una suspensión del microorganismo y posteriormente inoculadas con *P. infestans*. Como inóculo de *P. infestans* se usó una suspensión de esporangios obtenida de hojas de tomate previamente inoculadas con el patógeno. Las hojas inoculadas con cada microorganismo y el patógeno se mantuvieron en cámara húmeda durante toda la prueba, en total se hicieron 10 pruebas para evaluar los microorganismos. De estas pruebas se obtuvieron 32 microorganismos antagonistas (8 bacterias y 24 hongos), los cuales presentaron reducciones significativas en el tamaño de las lesiones causadas por *P. infestans*, en un rango de 27% a 100%. La mayoría de estos antagonistas fueron obtenidos de la filosfera de tomate silvestre (43%), de donde se puede concluir que la presencia de antagonistas a *P. infestans* fue mayor en plantas silvestres que no han sido sujetas a programas intensivos de aplicación de fungicidas.

Posteriormente se realizaron una serie de ensayos con el objetivo de realizar una segunda selección de los microorganismos en plantas completas pero bajo condiciones de invernadero. En estas pruebas se inocularon

los microorganismos tanto epifíticamente como por vía endofítica. Los resultados de estas pruebas no fueron contundentes pero permitieron seleccionar 5 microorganismos para ser probados en el campo. Los microorganismos seleccionados fueron una *Serratia* sp (aislamiento 054), dos *Penicillium* sp (aislamientos 067 y 071) un *Trichoderma* sp (aislamiento 069) y un *Fusarium* (aislamiento 108).

Estos 5 antagonistas se cultivaron en medio cultivo a base de celulosa o glucano, para conocer su capacidad de producir enzimas, como celulasas y gluconasas que podrían hidrolizar la celulosa y el glucano, principales componentes de la pared de *P. infestans*. En esta prueba se observó que 4 de los antagonistas producían celulasas en medio de cultivo, incluyendo la bacteria, y tres de ellos también lograron producir gluconasas. De acuerdo a las condiciones de la prueba, no se observó evidencia de producción de enzimas por parte del aislamiento 069 del género *Trichoderma*.

Con el propósito de observar el efecto de fungicidas de uso frecuente en el cultivo de tomate sobre el crecimiento *in vitro* de los antagonistas seleccionados, se cultivaron en medio de cultivo al cual se le adicionó 7 fungicidas (metalaxil en mezcla con mancozeb, oxadixil en mezcla con mancozeb, propamocarb, fosetil-AI, clorotalonil, fentin hidroxido y mancozeb). Los fungicidas se adicionaron en concentraciones de 0, 10, 100 y 1000 ppm de ingrediente activo. En esta prueba se observó que algunos fungicidas inhibieron el crecimiento de los microorganismos inclusive en concentraciones bajas, mientras que otros únicamente en las concentraciones mas altas o fueron selectivos. Lo que demuestra la importancia de elegir cuidadosamente el fungicida dentro de un programa de manejo de enfermedades que incluya microorganismos antagonistas.

La prueba de campo del los cinco microorganismos seleccionados se llevó a cabo en una finca situada en Paraíso de Cartago, e incluyó además del testigo donde se aplicó solo agua, un tratamiento con el fungicida mancozeb. Todos los tratamientos se aplicaron dos veces por semana y la enfermedad se evaluó de igual forma, dos veces por semana. Apesar de que ninguna de los tratamientos evaluados presento diferencias significativas, el tratamiento con el antagonista 067 (*Penicillium* sp) produjo una reducción del área de lesión por planta de 20 a 40 %, durante 5 evaluaciones.

## 3. PRUEBA DE MANEJO INTEGRADO REALIZADA EN EL CAMPO

Se realizó un ensayo de manejo integrado de *A. solani* y de *P. infestans*. La prueba se realizó en la finca experimental "La Montaña" (CATIE). Los tratamientos fueron:

1- aspersiones con el aislamiento 067 (*Penicillium* sp), el cual fue seleccionado por su actividad antagonista hacia *P. infestans*, 2- una secuencia de dos aplicaciones del antagonista y una del fungicida clorotalonil, 3- una secuencia de tres fungicidas (mancozeb-propamocarb-clorotalonil) y 4- un testigo donde se uso unicamente agua. Estos tratamientos se aplicaron al cultivar comercial Hayslip y al cultivar Perialine, previamente seleccionado como tolerante a los tizones. Los tratamientos se aplicaron dos veces por semana y el desarrollo de las enfermedades se evaluó como porcentaje de daño, también dos veces por semana.

De acuerdo a las evaluaciones realizadas de *A. solani* en este ensayo, el cultivar Perialine mostró tolerancia a *A. Solani*, pero no se observó diferencias entre tratamientos. En el cultivar Hayslip la combinación del fungicida y el antagonista 067 (*Penicillium* sp) fue el mejor tratamiento, el cual presentó después de 53 días de plantado el ensayo en el campo, un 32 y 43 % de reducción de la enfermedad con respecto al tratamiento con fungicida y al testigo con agua, respectivamente.

En el caso del efecto de los tratamientos sobre tizón tardío, el efecto del cultivar Perialine fue dramático, en la reducción de la enfermedad, solamente comparado con la secuencia de fungicidas en el cultivar Hayslip, que además fue el único tratamiento que presentó diferencias significativas en este cultivar. En el cultivar Perialine el tratamiento con el antagonista (*Penicillium*, aislamiento 067) redujo significativamente la enfermedad comparado con el testigo con agua y el tratamiento que combinó el antagonista y el fungicida clorotalonil, pero no fue significativo con respecto al tratamiento con la secuencia de fungicidas. Por lo tanto de esta prueba se puede deducir

que el *Penicillium* 067 no tubo oportunidad de manifestar su potencial como antagonista bajo condiciones de alta presión de inóculo producidas en el cultivar susceptible Hayslip.

De los resultados anteriores se concluye que se deben realizar investigaciones de control biológico en tomate en condiciones de menor precipitación que favorezca un mejor establecimiento de los antagonistas en la superficie de la hoja. También se concluye que las investigaciones se deben realizar en cultivares tolerantes con el objetivo de que la severidad de las enfermedades sea menor y permita a los antagonistas, bajo un nivel menor de presión, desarrollar su potencial antagonista.

#### 4. AGRADECIMIENTO

Se le agradece al Proyecto Británico del Natural Resources Institute (NRI) el apoyo económico a esta investigación.

#### 5. BIBLIOGRAFIA

- GONZALEZ, H., SANCHEZ, V., BUSTAMANTE, E., GONZALEZ, R., CERVANTES, M. 1996. Control biológico de *Alternaria solani* con microorganismos endófitos. Memoria de la XLII Reunion Anual del PCCMCA, El Salvador. p90.
- OKOMOTO, S.1992. Efecto de enmiendas sobre una bacteria antagonista a *Alternaria solani* en el cultivo de tomate, (*Lycopersicon esculentum* Mill). Tesis de Maestria, CATIE, Turrialba, CR. 114p.
- OKOMOTO, S, BUSTAMANTE, E.; GAMBOA, A: .1993. Evaluación de la actividad de diferentes cepas de bacterias quitinolíticas *in vitro*. CATIE; Turrialba,CR.