



Evaluación de la capacidad biocontroladora de metabólicos de *Trichoderma inhamatum* Bol12 QD sobre cepas nativas de *Phytophthora infestans* in vitro

Assessment of metabolic capacity of *Trichoderma inhamatum* Bol12 QD biocontrol on native strains of *Phytophthora infestans* in vitro

Puño Ramon^{1*}, Terrazas Enrique², Alvares Teresa², Giménez Alberto², Mendoza Laura²
Hugh, Smeltekop¹, Loza-Murguía Manuel^{1,3}

Datos del Artículo

¹Universidad Católica Boliviana San Pablo-UCB, Unidad Académica Campesina Carmen Pampa-UAC-CP, Ingeniería Agronómica, Coroico - Nor Yungas ó La Paz, Bolivia. 591 (2) 8781991.

²Laboratorio de Biotecnología Ambiental, Área Control Biológico de Fitopatógenos, Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímica, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz (Bolivia)

³Departamento de Enseñanza e Investigación en Bioquímica & Microbiología-DEI&BM, Unidad Académica Campesina Carmen Pampa-UAC-CP.

*Dirección de contacto: Campus Leahy...Unidad Académica Campesina Carmen Pampa, Coroico, La Paz Bolivia Casilla 4242 Tel.: 591 (2) 8781991. E-mail address: raymonver@hotmail.com

Palabras clave:

Phytophthora infestans,
Trichoderma spp.,
metabolitos secundarios,
actividad antagonista,
biocontrol.

J Selva Andina Res Soc. 2011; 2(1):26-33.

Historial del artículo.

Recibido Noviembre, 2010.
Devolto Marzo, 2011.
Aceptado Junio, 2011.
Disponible en línea Julio 2011.

Resumen

Phytophthora infestans es un fitopatógeno causante de la disminución del rendimiento de los cultivos del tomate, para controlar estas pérdidas los agricultores utilizan productos químicos. Esto trae consecuencias al medio ambiente, la salud humana y los organismos benéficos del ecosistema. El objetivo fue obtener e identificar aislados nativos de *Trichoderma* spp., en suelos sembrados con tomate en Tlayacapan, Morelos (México), con problemas de *Alternaria solani* y *Phytophthora infestans*; asimismo, determinar su capacidad antagonista *in vitro*. *Trichoderma* se aisló directamente del suelo por el método de dilución en placa con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Por otro lado se realizaron diluciones en placa del fermento de *T. inhamatum* Bol12 QD producido en cultivos batch durante 30 días para comparar la efectividad del biocontrolador. Los fermentos filtrados inhibieron el crecimiento cinético micelial del agente causal en laboratorio; con la dilución 1:2 el crecimiento fue de 32,5%, para la dilución 1:4 el crecimiento micelial fue de 69,1% y finalmente para la dilución de 1:8 del fermento biocontrolador el micelio creció hasta un 95,2%. Para demostrar la actividad inhibitoria sobre el patógeno en campo, se produjeron cultivos de 3 L en batch durante 4 meses. La aplicación de tres dosis (puro, dilución 1:2 y dilución 1:4 más un testigo solamente agua) se realizó en un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones con el cultivo de tomate, perteneciente a la variedad Santa Cruz Kada Gigante, en las parcelas de la Unidad Académica Campesina-Carmen Pampa. El análisis estadístico por el test de Duncan mostró que el fermento puro redujo la infección de *Phytophthora infestans* de manera significativa en el tomate. Apareció otro fitopatógeno del tomate, *Septoria lycopersici*, durante el desarrollo del trabajo de campo. Se evaluó también el efecto de las dosis del fermento a esta enfermedad, y se notó igualmente una reducción significativa con todas las dosis del fermento. Con estos experimentos se demuestra que los fermentos de *T. inhamatum* Bol12 QD tienen efecto biocontrolador sobre el cultivo de tomate. La capacidad antagonista se evaluó mediante el método del papel celofán y la clase de antagonismo con la técnica de cultivos duales. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y pruebas de Tukey. Se obtuvieron 20 aislados de *Trichoderma*. El rango de porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de los fitopatógenos por los aislados varió desde 38.8 a 81.3% en *A. solani*; y desde 16.3 a 85.5% en *P. infestans*. Se seleccionaron 10 aislados que inhibieron al menos el 65% del crecimiento, que pertenecen a las especies: *T. harzianum* (Thz), *T. longibrachiatum* (Tl) y *T. koningii* (Tk). Los aislados Tl-17, Tl-19, Tl-20, Tl-21, Thz-16 y Tk-4, seleccionados contra *A. solani*, presentan antagonismo clase 1, sobrecreciendo al fitopatógeno y esporulando sobre él. Los aislados THz-17, Thz-18, Tl-17, Tl-18 y Tl-19 seleccionados contra *P. infestans*, presentan antagonismo clase 2 y Thz19 antagonismo clase 3. Por su acción antagonista *in vitro* sobre *P. infestans* y *A. solani*, puede considerarse a *Trichoderma* como agente promisorio en el control biológico de las enfermedades que ocasionan estos fitopatógenos

© 2011. Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivia. Todos los derechos reservados.

Abstract

Plant pathogen *Phytophthora infestans* is a cause of decreased crop yield of tomato, to control these losses, farmers use chemicals. This has consequences for the environment, human health and beneficial organisms in the ecosystem. The objective was to obtain and identify native isolates of *Trichoderma* spp. In soil planted with tomato Tlayacapan, Morelos (Mexico), *Alternaria solani* problems and *Phytophthora infestans*, also determine their antagonistic capacity *in vitro*. *Trichoderma* was isolated directly from soil by dilution in culture medium plate with potato dextrose agar (PDA). On the other side plate dilutions of yeast T. QD Bol12 inhamatum crops produced in batch for 30 days to compare the effectiveness of biocontrol. The filtered yeast inhibited mycelial growth kinetic of the agent in laboratory with the 1:2 dilution growth was 32.5% for the 1:4 dilution mycelial growth was 69.1% and finally to the dilution of 1:8 of the yeast biocontrol mycelium grew to 95.2%. To demonstrate the inhibitory activity on the pathogen in field crops, there were 3 L batch for four months. The application of three doses (undiluted, diluted 1:2 and 1:4 plus a

Key words:

Phytophthora infestans, *Trichoderma* spp, secondary metabolites, antagonist activity, biological control.

control dilution water only) was performed in a complete block design with four replications randomly with the tomato crop, belonging to the variety Santa Cruz Kada Gigante in the plots of the Academic Rural United Campesina Carmen Pampa. Statistical analysis by Duncan's test showed that the pure leaven reduce infection by Phytophthora infestans significantly in tomato. Appeared another tomato plant pathogen, Septoria lycopersici, in the course of fieldwork. We also evaluated the effect of the dose of yeast to this disease, and also noticed a significant reduction with all doses of yeast. These experiments demonstrated that the seeds of T. QD Bol12 inhamatum have biocontrol effect on the tomato crop. The antagonistic capacity was assessed using the cellophane and the kind of antagonism with the dual culture technique. Data were subjected to analysis of variance and Tukey tests. We obtained 20 isolates of Trichoderma. The range of percentage inhibition of mycelial growth of plant pathogens by isolates ranged from 38.8 to 81.3% in A. solani, and from 16.3 to 85.5% in P. infestans. We selected 10 isolates inhibited at least 65% growth, which belong to the species: T. harzianum (THz), T. longibrachiatum (TI) and T. koningii (Tk). The isolated TI-17, TI-19, TI-20, TI-21, THz-16 and Tk-4, selected from A. solani, have antagonistic class 1, overgrowing the plant pathogen and fruiting on it. Isolates-17 THz, THz-18, TI-17, TI-18 and TI-19 selected against P. infestans, present antagonism antagonism Class 2 and Class 3 Thz19. Because of its antagonistic action in vitro on P. infestans and A. solani, can be considered as a promising agent Trichoderma in biological control of diseases brought about by these pathogens.

© 2011. Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivian. All rights reserved.

Introducción

La producción agrícola se ve constantemente afectada en su rendimiento y calidad de producción, por ataque de una diversidad de fitopatógenos, principalmente hongos y bacterias, siendo los primeros el grupo principal de agentes causales de enfermedades en las plantas. (Agrios 1991) Las entidades fitopatógenos, bacterias, nematodos, u hongos, constituyen la mayor causa de pérdidas en la producción agrícola (Benítez et al 2004). Entre éstos, los hongos comprenden los principales grupos, tanto por su diversidad biológica, como por las pérdidas que ocasionan a nivel económico (Benítez et al 2000). La persistencia de varias especies de hongos fitopatógeno, como *Phythium*, *Phytophthora*, *Botrytis*, *Sclerotinia*, *sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, y *Fusarium* ha aumentado considerablemente en los últimos años, debido a cambios en las prácticas agrícolas principalmente, por el uso indiscriminado de químicos y la contaminación que ocasionan su empleo, con efectos perjudiciales sobre los cultivos de

importancia económica, además de generar resistencia en las estrategias desarrolladas en los últimos años para su control. (Benítez et al 2000)

Las especies de *Trichoderma spp* producen enzimas extracelulares, sustancias antibióticas de naturaleza volátil y no volátil y compuestos antifúngicos, a su vez son fuertes antagonistas por el espacio y nutrientes frente a otros fitopatógenos, además promueven el crecimiento de las plantas induciéndoles resistencia sistémica. (Hermosa et al 2000) Por tal razón, los hongos del género *Trichoderma spp* han sido los microorganismos más utilizados para el biocontrol de enfermedades en plantas producidas por hongos durante más de 70 años, pero solo hasta hace poco tiempo, estas cepas han adquirido un valor comercial importante, sus resultados efectivos durante su aplicación y la aparición de nuevas tecnologías para la producción masiva y desarrollo de productos a base de este hongo. (Clavijo 1998; Papavizas 1985)

De ahí que se hayan desarrollado diferentes estrategias o sistemas de producción masiva de este hongo biocontrolador sobre varios sustratos usando técnicas de fermentación tanto líquida

como sólida para la obtención de conidios en rendimientos que alcanzan hasta 10^9 conidios/g. (Peña 2002)

La búsqueda de microorganismos benéficos, agentes de control biológico como alternativa para aumentar la productividad de plantas o mejorar su estado fitosanitario, de ahí que este trabajo tiene como objetivo determinar la actividad biocontroladora de metabolitos de fermentación de *Trichoderma inhamatum* Bol12 QD sobre cepas nativas *Phytophthora infestans* causante del tizón tardío en cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill)

Materiales y métodos

Localización del lugar de estudio. El trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología Ambiental, Área Control Biológico de Fitopatógenos del Instituto de Investigación Fármaco-Bioquímica (IIFB-UMSA). La investigación en campo se llevo a cabo en el Centro experimental de Ingeniería Agronómica, Campus Leahy de la Unidad Académica Campesina Carmen Pampa, ubicada en la Comunidad Carmen Pampa, perteneciente al Municipio de Coroico, primera sección de la provincia Nor Yungas del Departamento de La Paz ó Bolivia, situada a una altura de 1.850 msnm, a $16^{\circ} 20'30''$ de latitud sur y $67^{\circ} 50'30''$ de longitud oeste. La distancia de la ciudad de La Paz a Carmen Pampa es de 115,5 Km. (INE-MDSP-COSUDE 1999)

La zona presenta una precipitación de 1.853 mm, una temperatura promedio anual de $17,5^{\circ}$ C, una velocidad media del viento de 0,81 m/s de dirección norte-sur. (Estacional meteorológica Carmen Pampa 2006), pertenece al tipo bosque

húmedo premontano tropical con una humedad relativa del 75%, Holdridge (1987).

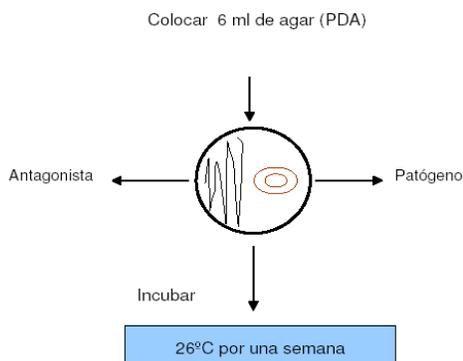
Material biológico. La selección de cepas nativas de *Phytophthora infestans* fueron aisladas (French & Heber 1980) de las hojas de la planta del tomate infectadas provenientes del invernadero del Centro experimental de Ingeniería Agronómica, Unidad Académica Campesina Carmen Pampa (UAC-CP). La observación microscópica de los cultivos de cepas nativas en placas de Petri de *Phytophthora infestans* fue realizada según (Jones 2001; Agrios 1996).

Cinética de crecimiento de las cepas criollas de Phytophthora infestans. El medio de cultivo para el crecimiento del hongo, contenía 200 mL de jugo de 8 verduras (V-8) con 2 g de carbonato de calcio (CaCO_3 anhidro), se agregó solución en tubos falcón, se centrifugo a 3000 r.p.m./10 minutos, luego se tamizó con una gasa, obteniendo 100 mL de sobrenadante clarificado se agrego 900 mL de agua destilada estéril, y 15 g de Agar, posteriormente se llevo a Baño María para homogenizar el medio de cultivo, se esterilizo en autoclave por 15 minutos a 1,5 atmósferas y 120°C .

Para medir la cinética (velocidad) de crecimiento, con un sacabocados estéril se hizo pozos de 0,5 cm en el medio de cultivo que estaba en las placa Petri, se inoculó 1×10^5 esporas de la cepa nativa de *Phytophthora infestans* en el pozo, se incubo las placas Petri a $18-22^{\circ}\text{C}$ hasta que el micelio detuviera su crecimiento por contacto con los bordes de la caja Petri. La medición se realizó por la medición de la UFC del reverso de la placa de Petri desde el borde del inculo hasta la punta del micelio. Se midió cada 24 horas, el crecimiento del frente hifal en las cuatro orientaciones (norte, sur, este, oeste) con una regla milimétrica. Las

veinte tres cepas biocontroladoras proporcionadas por el cepario del IIFB-UMSA, fue elegida la 12QB después de un Screening, de acuerdo a la producción de metabolitos con actividad biocontroladora del crecimiento de las cepas nativas de *Phytophthora infestans*, para la activación de las cepas liofilizadas del cepario del IIFB-UMSA, se preparó el caldo para dextrosa en un matraz Erlenmeyer, se colocó con una pipeta Pasteur de 1 mL a los 23 tubos que contenían las cepas biocontroladoras, después de 10 días, y una vez observado el crecimiento de los micelios, se trasladó con una aza bacteriológica a las placas Petri que contuvieron medio PDA (250 g papa, 10 g dextrosa, 15 g Agar, 1000 mL agua).

Evaluación de la actividad biocontroladora de los metabolitos. Se colocó los hongos con actividad biocontroladora en las placas Petri que contuvieron el medio de cultivo (V-8) un fitopatógeno, a fin de determinar la producción de metabolitos secundarios y seleccionar la cepa como biocontrolador. (Fig. 1)



Cultivos en batch para la obtención de metabolitos secundarios. Se preparó caldo papa dextrosa (CPD), 250 g papa, 5 g dextrosa, 1000 mL agua, en matraces Erlenmeyer de 250 mL, los cuales contenían 50 mL del medio, se inoculó 1×10^5 esporas de hongos biocontroladores

activados por 30 días a 28°C, se observó el pigmento en los matraces a los 30 días, se tomaron muestras de 6 mL, de todas las cepas biocontroladoras para posteriormente transferirlas a tubos de ensayo de 10 mL. Para obtener el micelio y sobrenadante, se centrifugaron los tubos de ensayo por 30 minutos a 3500 r.p.m., el sobrenadante fue filtrado en milipore de 0,2 μm en viales estériles y con la ayuda de una jeringa, las muestras fueron guardadas a -4°C debidamente rotuladas.

Screening de los extractos obtenidos por el método Kirby-Bauer óModificado. Se preparó el medio de cultivo (V-8) en placas de Petri, se hizo un pozo en el centro con un sacabocado de 0,5 cm y cuatro orificios a los lados, se colocó en el orificio del centro 80 μl de un inóculo de 1×10^5 esporas de cepas nativas de *Phytophthora infestans*. A los cuatro orificios se le colocaron los sobrenadantes filtrados de los diferentes biocontroladores, se incubó a 18°C, a fin de seleccionar la cepa biocontroladora se observaron los halos de inhibición alrededor de los orificios de los sobrenadantes.

Evaluación de la actividad inhibitoria de la cepa seleccionada. Se preparó Agar (V-8) a doble concentración (200 mL V-8, 20 g Agar, 2 g Ca CO_3 , 900 mL agua estéril) y sobrenadante fúngico de los hongos, se procedió a verter cantidades iguales de medio V-8 (2x) y el sobrenadante fúngico de los hongos (a 55°C) en relación con la capacidad de las cajas Petri, un pozo de 0,5 cm en el centro de la placa Petri en medio V-8 y agua (control), y en otra placa Petri un pozo de 0,5 cm en el centro de la placa Petri con medio V-8 y sobrenadante fúngico de hongo, todo el experimento se realizó por triplicado. Se inocularon 80 μl de 1×10^5 esporas de las cepas

nativas de *Phytophthora infestans*, se incubaron las placas Petri a 18°C a fin de medir el desarrollo del fitopatógeno, la medición se realizó en la parte reversa de la placa desde el borde del inóculo hasta la punta del micelio, se midió el crecimiento del frente hifal en las cuatro orientaciones (norte, sur, este, oeste) con una regla milimétrica cada 24 horas, se procedió a realizar una comparación de la cinética de crecimiento del hongo fitopatógeno, inoculado en medio V-8 y el sobrenadante fúngico con respecto a su control, para determinar si los metabolitos presentaban actividad fungistática o fungicida.

Determinación de la concentración del sobrenadante fúngico efectivo para el control de cepas nativas de Phytophthora infestans. Se repitió el ensayo de evaluación de la actividad inhibitoria del crecimiento de las cepas nativas de *Phytophthora infestans* con diferentes diluciones del sobrenadante fúngico que resultó más efectivo para determinar la concentración mínima efectiva del sobrenadante fúngico, el aislado de la cepa *Trichoderma inhamatum*.

Diluciones	Sobrenadante fúngico	medio V-8	Volumen total
1/2	4 mL	4 mL	8 mL
1/4	2 mL	6 mL	8 mL
1/8	1 mL	7 mL	8 mL

Análisis Estadístico. El análisis de varianza se realizó con el programa estadístico Sistema de Análisis Estadístico (Statistical Analysis Systems, SAS).

Modelo lineal aditivo para el análisis estadístico en el laboratorio

El diseño que se acomoda el presente trabajo de investigación en el laboratorio es al diseño completamente al azar por las condiciones de homogeneidad del laboratorio. El diseño presenta el siguiente modelo lineal:

$$X_{ij} = \mu + i + ij$$

Donde:

X_{ij} = Una observación cualquiera. μ = Media general o población

i = Efecto del i-ésimo concentración del extracto del hongo antagonico

ij = Error experimental asociado con el j-ésimo tratamiento recibiendo el i-ésimo tratamiento.

Resultados

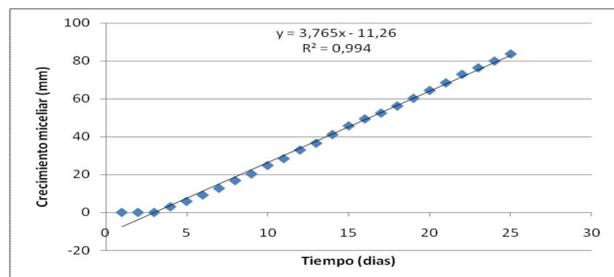
Identificación del tizón tardío.

(*Phytophthora infestans*)





Fig. 1 Tiempo de crecimiento de las cepas nativas de *Phytophthora infestans* en medio de cultivo (V-8)



En la Figura 1 se presenta la cinética de crecimiento en medio sólido V-8 de *Phytophthora infestans*. La biomasa micelial durante los primeros días no mostró ningún crecimiento; sin embargo a partir del día cuarto se tuvo una velocidad de crecimiento de 3.77 mm/día ($r=0.997$) con carácter de crecimiento lineal.

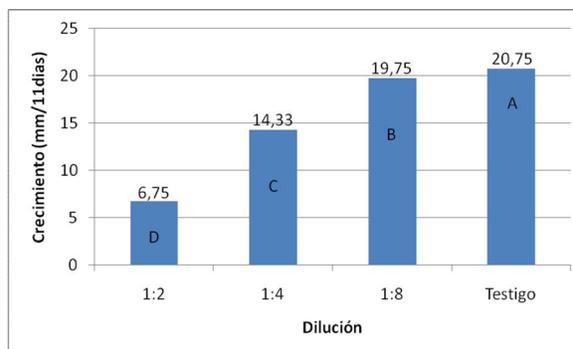
Fig. 2 Análisis de varianza para la inhibición de *P. infestans* con diferentes concentraciones del fermento *Trichoderma inhamatum* *in vitro*

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F calc.	Pr > F
Dilución	3	370.5156	123.5052	1077.86 **	<0.0001
Error	8	0.9167	0.1146		
Total	11	371.4323			

C.V. = 2.20 %

En la tabla 2 existen diferencias estadísticas entre las diferentes diluciones de *T. inhamatum*. El coeficiente de variación fue 2.20%, indicando una baja variación en la varianzas de los tratamientos.

Fig. 2 Crecimiento micelial de *Phytophthora infestans* con diferentes concentraciones de *T. inhamatum* *in vitro*



La figura 2 se aprecia con mayor detalle el efecto del filtrado de la actividad biológica del biocontrolador en comparación con la velocidad de crecimiento de la cepa nativa de *Phytophthora infestans*. De acuerdo con el análisis de comparación de medias significativas entre todas las diluciones realizadas referente al crecimiento micelial.

Discusión

Los filtrados o inóculos de los controladores actúan por medio de productos metabólicos que ejercen acción sobre la pared celular, membrana y ácidos nucleicos de muchos hongos fitopatógenos de importancia económica (Rodríguez 2002).

Ciancas (2006) hizo un experimento con la utilización del biocontrolador *Trichoderma inhamatum* para el control de *Botrytis cinerea* *in vitro* en condiciones muy parecidas al experimento realizado. Este investigador obtuvo una inhibición del 80% en condiciones no agitadas. En el presente experimento se determinó que el filtrado de *Trichoderma inhamatum* igualmente reduce el crecimiento micelial de *Phytophthora infestans* con la dilución 1/2 en condiciones *in vitro* en un 32,5% lo que corresponde a una inhibición del 67,5%.

Según Sandoval (2004), *Trichoderma* spp. es capaz de controlar un gran número de patógenos tales como *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia* spp. y *Fusarium* spp. en condiciones *in vitro*.

Incidencia de la enfermedad Phytophthora infestans en el cultivo de tomate

En las evaluaciones realizadas con fermentos a nivel del campo de *Trichoderma inhamatum* con las diferentes concentraciones muestran una acción de control significativa del fitopatógeno *Phytophthora infestans*. Esto se debe a que los hongos del género *Trichoderma*, habitantes comunes del suelo, son capaces de controlar un gran número de patógenos (Sandoval 2004).

Meyer et al. (1998, Citado por (Ciancas 2006) expresa que en estudios realizados en la Facultad de Ciencias Agraria de la Universidad de Talca demuestran que la cepas del género *Trichoderma* son eficientes controladores de *Botrytis cinerea* con aplicaciones preventivas en el cultivo de hortalizas

Asimismo Oberti et al 1999 (Citado por Ciancas 2006) describen que la aplicación de una cepa de *Trichoderma* sobre la incidencia de *Sclerotinia sclerotiorum* producida en forma orgánica para su control depende mucho de la densidad y la variedad. Este es el factor determinante sobre la incidencia de las hortalizas.

De acuerdo con los objetivos y la hipótesis planteada, y los resultados obtenidos en la investigación realizada se llegó a las siguientes conclusiones.

En la colección de cepas fúngicas del IIFB, la cepa *Trichoderma inhamatum* controla el crecimiento de *Phytophthora infestans* en laboratorio.

La velocidad de crecimiento micelial de la cepa *Phytophthora infestans* aislada en Carmen Pampa en medio sólido V-8 es de 3.76 mm/día de crecimiento lineal. El fermento filtrado de la cepa *Trichoderma inhamatum* disminuye el crecimiento de *Phytophthora infestans* en condiciones *in vitro*. La reducción del crecimiento micelial del fitopatógeno fue de 67.5% para la dilución 1:2 en comparación con el testigo; 30.9% para la dilución 1:4; y 4.8% para la dilución de 1:8 del fermento biocontrolador.

La concentración pura del fermento de la cepa *Trichoderma inhamatum* tiene una acción significativa en la reducción de la incidencia a *Phytophthora infestans* en campo y del mismo modo para el fitopatógeno *Septoria lycopersici*.

Por lo manifestado se rechaza la hipótesis nula, confirmando que el fermento de *Trichoderma inhamatum* inhibe el crecimiento de *Phytophthora infestans* en condiciones *in vitro* y a las enfermedades presentes en campo.

Conflictos de interés

Esta investigación no presenta conflictos de interés.

Agradecimientos

Los autores agradecen al personal del Laboratorio de Investigaciones Fármaco Bioquímica. Al Instituto de Investigaciones de la Unidad Académica Campesina Carmen Pampa. Al responsable de la Estación Experimental de la Carrera de Ingeniería Agronómica de la UAC-CP.

Literatura citada

- Agrios G. 1991. Fitopatología. Editorial Limusa. México. 741p.
- Benitez T, Rincon AM, Limon MC, Codon A. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology. 2004;7:249-260.
- Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Rey M, Delgado-Jarana J. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. Revista Iberoamericana de Micología. 2000;17:S31-S36.
- Dirección de Estadística de la FAO (Organización de las Naciones Unidas de la Agricultura y la Alimentación, IT). 2007a. Cantidad de producción: tomates. Consultado 6 mayo 2007. Disponible en <http://faostat.fao.org/site/340/DesktopDefault.aspx?PageID=340>.
- Gutiérrez C. Control del tizón tardío (*Phytophthora infestans*) con biocida en tomate (*Lycopersicon esculentum*) en la comunidad de Carmen Pampa perteneciente al Municipio de Coroico (Nor Yungas, La Paz). tesis licenciatura. 2004;59 p.
- Papavizas GC. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. Annu. Rev. Phytopathol. 1985;23:23-54.
- Valades-Lopez A. Producción de hortalizas. México, Noruega. 1996; p.197-212.
-