

**FACULTAD DE
CIENCIAS AGRONÓMICAS
Y DE LOS ALIMENTOS**



**PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE
VALPARAÍSO**

TALLER DE TÍTULO

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Levadura *Candida sake* cepa CPA-1 como controlador biológico de *Botrytis cinerea* en tomate bajo invernadero.

CAROL MELISSA BRIGUEZ CARTAGENA

QUILLOTA, CHILE

2018

Índice

Resumen.....	1
Definición del problema u oportunidad.....	2
Hipótesis.....	4
Objetivos	4
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos.....	4
Estado del arte	5
Producción de tomate.....	5
Contexto mundial.....	5
Contexto nacional	5
Importancia económica	5
Cultivo de tomate.....	5
Establecimiento del cultivo.....	5
Condiciones ambientales bajo invernadero	6
Enfermedad pudrición gris	6
Agente causal Botrytis cinerea.....	7
Control químico de Botrytis cinerea.....	7
Resistencia a fungicidas químicos	7
Control biológico.....	8
Cepa CPA-1 de Candida sake	8
Importancia de la cepa CPA-1	8
Condiciones ambientales.....	9
Evidencia de uso en hortalizas	10
Metodología	10
Ubicación del ensayo.....	10
Antagonista.....	10
Producción de inóculo de Botrytis cinerea	10
Efectividad de Candida sake in vivo contra Botrytis cinerea	10
Eficacia de C. sake como controlador de B. cinerea bajo invernadero	11
Diseño experimental y análisis de datos	11
Informe final	12

Bibliografía.....	12
Plan de trabajo.....	15
Pedir cepa CPA-1 de Candida sake.....	15
Cotización y compra de insumos	15
Aislación de Botrytis cinerea.....	15
Invernaderos Estación Experimental La Palma.....	15
Evaluación de C. sake in vivo	16
Evaluación de C. sake bajo invernadero.....	16
Obtención y análisis de datos	16
Informe final	16
Carta Gantt	17
Resultados esperados	18
Organización	19
Cargos y funciones	19
Presupuesto.....	21
Presupuesto total por cuenta (MM\$)	21
Presupuesto total por año (MM\$)	22
Anexo Planilla de Presupuesto	23

Resumen

El cultivo de tomate es relevante a nivel mundial. Cuando es cultivado bajo invernadero está bajo condiciones que son propicias para el desarrollo de hongos y bacterias. Uno de los hongos más importantes que lo afecta es *Botrytis cinerea*, enfermedad conocida comúnmente como pudrición gris. Se caracteriza por la formación de un moho gris, el cual es perjudicial en épocas de invierno y primavera cuando el cultivo tiene gran volumen de follaje. En esta investigación se evaluará la eficacia de la levadura *Candida sake* cepa CPA-1 como control biológico para combatir *B. cinerea* en tomate primor cultivado bajo invernadero. Esta investigación se realizará en la Región de Valparaíso y para llevarla a cabo se deberá obtener la levadura antagonista de España, posteriormente aislar y producir *B. cinerea*. Para medir la efectividad de *C. sake* se deberá evaluar *in vivo* tomates infectados a diferentes dosis de la levadura. Luego se medirá la eficacia de *C. sake* en tomate cultivado bajo invernadero, también a diferentes dosis, en comparación a un tratamiento testigo y un tratamiento comercial. Se espera tener la respuesta de eficacia de *Candida sake* cepa CPA-1 como biocontrolador de *Botrytis cinerea*.

Definición del problema u oportunidad

El tomate es la hortaliza más cultivada en el mundo, ocupando el primer lugar en superficie con 4,7 millones de hectáreas en el año 2016, con una producción de 177 millones de toneladas. A nivel mundial este cultivo ocupa el lugar 40° en superficie, con 13.864 ha con una producción de 872 mil t, posicionándose en el lugar 24° en este mismo sentido. Se estima cerca del 20% de la superficie del cultivo de dicha hortaliza corresponde a producción bajo invernadero, equivalente a 1.000 ha (FAOSTAT, 2018).

A nivel nacional, el consumo fresco de tomate se posiciona a continuación del cultivo de choclo y lechuga. Las principales zonas productoras de dicha hortaliza se concentran en la región del Maule, Valparaíso, Metropolitana y de Arica y Parinacota, representando cerca del 19, 18, 16 y 15% respectivamente de la superficie total (Flaño, 2015).

La época de plantación del cultivo del tomate se determina mediante el momento en el cual se quiera vender. Así, se denomina “primor temprano” a producciones que comienzan en mayo y la cosecha termina en noviembre; “primor tardío” a producciones que comienzan en agosto y la cosecha termina a principios de marzo; “otoño temprano” a producciones que comienzan a mediados de diciembre y terminan a mediados de marzo; y “otoño tardío” a producciones que comienzan en marzo y terminan en julio (Escaff *et al.*, 2005).

La producción bajo plástico presenta condiciones ambientales características, presentada por altas temperaturas y humedad relativa, lo cual favorece el desarrollo de enfermedades. Si dichas condiciones no se manejan de forma adecuada, mediante prácticas culturales como correcta ventilación, riego eficiente, entre otras medidas, pueden generarse grandes pérdidas, tanto en etapa de precosecha como postcosecha. Los sistemas productivos bajo invernadero corresponden a monocultivos exponiendo a los mismos microorganismos en cada ciclo (Escaff *et al.*, 2005).

El manejo de tomate bajo las condiciones antes mencionadas, genera la presencia de distintas enfermedades donde la más común corresponde a la pudrición gris (*Botrytis cinerea* Pers.:Fr.) (Escaff *et al.*, 2005). Es un hongo que se encuentra principalmente en cultivos frutales, como vid, fresas, manzanas y peras; así como, cultivos hortícolas, destacando el cultivo de tomate. Se caracteriza por una capa fructífera conspicua de moho gris sobre los tejidos afectados (Agrios, 1996). La incidencia de dicha enfermedad

se puede producir en cualquier momento de su fenología, y en cualquier parte de la planta (Jarvis, 1977), lo que genera gran reducción en el rendimiento y calidad de los frutos, especialmente en las regiones de Coquimbo hasta el Maule (Estay y Bruna, 2002). En campo, es frecuente que aparezca antes, en los pétalos de la flor, siendo susceptibles cuando comienzan a envejecer, produciendo el micelio abundante y posteriormente produzca pudriciones del fruto y tallo (Agrios, 1996). La etapa de postcosecha en dicho cultivo presenta un factor crítico referido a la presencia de dicha enfermedad en los frutos, debido a que su presencia podría contaminar frutos sanos bajo alta humedad relativa y contacto (Estay y Bruna, 2002). *Botrytis cinerea* tiene un amplio espectro de acción caracterizándose por desarrollarse bajo temperaturas de 18 a 32°C y humedades relativas de 90 – 95%. Dado su amplio espectro de acción, sobrevive como estructura de resistencia sobre el suelo o como micelio en cosechas de la temporada pasada (Jarvis, 1977). El ingreso del patógeno a la planta se produce por heridas causadas por insectos u otros patógenos, así como manejos culturales (como poda, deshoje, guiado y cosecha) (Escaff *et al.*, 2005).

El control de esta enfermedad se realiza mediante la aplicación periódica de agroquímicos (Melgarejo *et al.*, 2005). *B. cinerea* es un patógeno con alto riesgo para la aparición de cepas resistentes (Russel, 2004), lo cual ha llevado a la búsqueda constante de nuevas estrategias de control, como lo es el control biológico.

Estudios recientes presentan a la cepa CPA-1 de la levadura *Candida sake* como una buena opción de control en *Botrytis cinerea* para vid, la cual junto a un recubrimiento comestible (caseinato de sodio o almidón) forman un compuesto, que cubre la baya de la vid inhibiendo la proliferación del patógeno en cuestión (Pozo, 2015).

La especie *Candida sake* es un microorganismo epífita, que se obtiene de diversos materiales vegetales, como manzanas, uvas, tomates, etc. (Viñas *et al.*, 2006).

La cepa de *Candida sake* tiene la capacidad de colonizar la fruta muy rápidamente y sin problemas con temperaturas desde 1°C hasta 20°C. Al llegar a los 34°C deja de crecer (Viñas *et al.*, 1997).

Debido a que la cepa ha sido aislada de la piel de tomate y de manzana (Viñas *et al.*, 1997), es que se plantea la idea de que esta cepa actúa como controlador biológico de *B. cinerea* en el fruto de tomate bajo invernadero.

Hipótesis

La cepa CPA-1 de la levadura *Candida sake* controla *Botrytis cinerea* en tomate primor cultivado bajo invernadero.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la eficacia de la cepa CPA-1 de la levadura *Candida sake* para el control de *Botrytis cinerea* en tomate primor bajo invernadero.

Objetivos específicos

1. Solicitar y conseguir permiso para la utilización de la cepa CPA-1 de *Candida sake* ante la Universidad de Valencia y el Servicio Agrícola y Ganadero.
2. Evaluar *in vivo* la actividad inhibidora de la cepa CPA-1 de *Candida sake* contra cepas chilenas de *Botrytis cinerea*.
3. Evaluar la actividad inhibidora de la cepa CPA-1 de *Candida sake* contra *Botrytis cinerea* en tomate primor bajo invernadero.

Estado del arte

Producción de tomate

Contexto mundial

El tomate es la hortaliza más cultivada en el mundo, alcanzando una superficie de 4,7 millones de hectáreas, con una producción de 177 millones de toneladas en el año 2016. Los principales países productores son China, Estados Unidos e India, con una participación del 18%, 7% y 6% respectivamente (FAOSTAT, 2018).

Contexto nacional

El cultivo del tomate es la tercera hortaliza con mayor superficie, después del choclo y la lechuga. Chile, al año 2016 tiene una producción de 997 mil toneladas, con una superficie de 14 mil ha (FAOSTAT, 2018). El 69% de la superficie en la producción nacional se concentra entre las regiones de Valparaíso y del Maule. La región con mayor superficie de esta hortaliza es la Región de O'Higgins, con 973 hectáreas (19%), seguida de la Región de Valparaíso, con 876 hectáreas (17%) (Flaño, 2015).

Importancia económica

A nivel regional se puede obtener una oferta continua durante todo el año. De todas las temporadas el precio más alto se alcanza en septiembre-octubre (periodo con mayor demanda y menor oferta). Hacia fines de diciembre aparecen los primeros tomates de la zona central, producción que dura hasta principios de abril, lo que se considera como la normal estacionalidad del tomate (coincide con precio más bajo). Arica y Parinacota abastecen la gran cantidad de demanda durante los meses de julio y agosto. Por otra parte, las importaciones han llegado a 864 toneladas en el año 2015, viniendo en su totalidad del Perú, entre los meses de julio y octubre. Esta situación tuvo un efecto negativo, ya que los precios en Chile no aumentaron durante esos meses, causando una reducción de 41% en el precio de octubre del mismo año, respecto al año 2014. En ese mismo año, 2014, se exportaron 139 toneladas, esto es debido a que el mayor mercado de éste es interno. Su principal destino fue Uruguay (93% de participación) y Reino Unido (7%) (Flaño, 2015).

Cultivo de tomate

Establecimiento del cultivo

El establecimiento del cultivo comienza entre los meses de agosto y septiembre, por lo cual la cosecha sería entre los meses de febrero hasta abril. Gracias a la producción bajo

invernadero y al tipo de variedad a utilizar es que se puede obtener una producción durante todo el año (Allende, 2017).

La rudeza de la planta de tomate permite cualquier condición de suelo, sólo debe tener gran drenaje y alto contenido de materia orgánica. El pH del suelo debe ser de 6 a 6,5 para que la planta se desarrolle en buenas condiciones y sin problemas. Sus óptimas condiciones son en climas secos con temperaturas moderadas, de estación cálida y temperaturas que varían entre los 18°C hasta los 30°C. Temperaturas diferentes a estas pueden ocasionar diferentes trastornos. Además, el tomate es muy sensible al estrés hídrico, de ser así, su producción se verá afectada, reduciendo tamaño y número de frutos (Allende, 2017).

Condiciones ambientales bajo invernadero

Las temperaturas máximas y mínimas de la Región de Valparaíso son adecuadas para el cultivo bajo invernadero, presentando condiciones competitivas con temperaturas medias mínimas cercanas a 6°C, pero heladas poco frecuentes con baja intensidad y la ocurrencia de temperaturas mínimas absolutas cercanas a los 0°C son más importantes. Una humedad relativa mayor a 75% beneficiará frutos de mayor tamaño y con menos defectos, pero estas humedades altas son propicias para crecimientos de hongos y bacterias, por lo cual hay que mantener humedades relativas medias cercanas a 50%, teniendo cuidado de no llegar a niveles altos de saturación. El suelo debe tener al menos 1 metro de profundidad, ya que se requiere 70 cm para su desarrollo radicular y otros 30 cm para el drenaje (Escaff *et al.*, 2005).

Principales plagas y enfermedades

Las condiciones que debe tener el invernadero de temperaturas de 18°C hasta 30°C y humedad relativa cercanas al 75%, hacen que sea propicio la aparición de hongos y plagas, donde principalmente destacan: pudrición gris, mildiu y raíz corchosa; y entre las plagas se encuentran: polilla del tomate y mosquita blanca de los invernaderos (Escaff *et al.*, 2005).

Enfermedad pudrición gris

Botrytis cinerea Pers.:Fr. es el hongo causante de esta enfermedad, tiene el aspecto de un área bien definida, acuoso y de un color pardo. Bajo circunstancias de humedad se incrementa una cubierta de moho de color grisáceo o gris pardusco sobre las zonas putrefactas. La pudrición puede iniciarse en la inflorescencia o en el extremo del

pedúnculo del fruto, o bien, en cualquier herida, hendidura o incisión de los tejidos de los órganos (Agrios, 1996).

Agente causal *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea es un hongo clasificado como Ascomycetes, del orden Helotiales y familia Sclerotiniaceae (Soto, 2017). *Botrytis cinerea* inverna en el suelo en forma de esclerocios o de micelio, el cual se desarrolla sobre residuos de plantas en fase de descomposición. Las conidias son diseminadas por viento y agua, requiere de un clima húmedo y moderadamente frío, de 18°C a 23°C, para que se desarrolle adecuadamente, esporule, libere y germine sus esporas, para que produzca infección. Las esporas que han germinado rara vez penetran directamente en los tejidos que muestran un crecimiento activo, pero penetran en los 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 o follaje moribundo de las plantas. Es común que los esclerocios de *B. cinerea* germinen produciendo filamentos miceliales que infectan directamente a los tejidos del hospedante, pero en algunos casos dichos esclerocios germinan produciendo apotecios y ascosporas (Agrios, 1996).

Control químico de *Botrytis cinerea*

El control de *Botrytis cinerea* se realiza principalmente por medio de fungicidas químicos de síntesis. Según SAG (2018), los ingredientes activos permitidos son: mancozeb, cimoxalino, tiofanato-metilo, pirimetilino, ciprodinilo, fludioxonilo, azufre, clorotalonilo, fenhexamida, tebuconazol, boscalid, piraclostrabina, carbendazima, iprodiona, kresoxim metilo. También se encuentra en el mercado mezclas de estos ingredientes, teniendo un mayor espectro de efectividad.

Resistencia a fungicidas químicos

Un estudio realizado en las Islas Canarias revela cepas resistentes de *Botrytis cinerea* de diferentes ingredientes activos en fungicidas químicos, principalmente de carbendazim, iprodiona y pirimetanil, en invernadero (Rodríguez *et al.*, 2014).

Además, estudios realizados en poblaciones de *Botrytis cinerea* indican que el patógeno tiene variabilidad genética, y que debido a esta razón es que el control se hace difícil y sin dar los mismos resultados esperados (Esterio *et al.*, 2010).

Sin embargo, el desarrollo de resistencia, sumado a la preocupación por el medio ambiente y la salud humana, ha provocado una disminución en el uso de estos químicos y se ha comenzado a investigar nuevas estrategias de control alternativo, siendo el control biológico el mejor candidato para sustituir o complementar el control químico (Teixidó *et al.*, 2018).

Control biológico

El control biológico es un medio ecológico para reducir plagas y los efectos de éstas mediante el uso de enemigos naturales, por lo tanto, regulan un organismo como consecuencia de la actividad de otro, logrando un equilibrio poblacional (Rodríguez *et al.*, 2010).

Se han realizado múltiples estudios con el objetivo de encontrar algún producto que sea eficaz para el control de *B. cinerea* y que tenga bajo impacto para el medio ambiente. Según Elad y Kapat (1999) el hongo *Trichoderma harzianum* T39 genera proteasa, el cual reduce de un 56 a 100% la gravedad de la enfermedad causada por *B. cinerea*. También se estudió el hongo *Clonostachys rocea*, con 4 aislados, todos poseen un efecto de inhibición en *B. cinerea* (Borges *et al.*, 2014).

Dik *et al.* (1999) realizó un estudio en tomates el cuál evaluó *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus laurentii* var. *flavescens*, *Gliocladium catenulatum*, *G. roseum*, *Chaetomium globosum*, *Ulocladium atrum* y *Pseudomonas*. Éstas eran capaces de reducir significativamente los síntomas y esporulación de *B. cinerea*, pero una vez que se establece la enfermedad ninguno podía causar gran reducción o esporulación de ésta, a excepción de *A. pullulans*, esto era debido a que protegían la herida. *Ulocladium atrum* no fue eficiente en la protección de la herida, pero sí lo fue en la eliminación de la esporulación. Se discute, además, que estos resultados se deban a que los inóculos utilizados en el ensayo del patógeno eran mucho más altos de lo que podría aparecer en invernaderos, por lo cual se sugiere un ensayo *in situ*.

Cepa CPA-1 de *Candida sake*

Importancia de la cepa CPA-1

Un estudio realizado en dos temporadas en zonas vitivinícola en Lleida (Cataluña, España), confirma la efectividad de *Candida sake* cepa CPA-1 utilizado junto con el aditivo Fungicover plus ® (este aditivo forma una barrera de protección y nutrición a la levadura), para el control de *Botrytis cinerea* aplicado en un campo de viñedos para el

desarrollo de pudrición del racimo. Las aplicaciones se realizaron entre la floración y la cosecha, logrando reducir la incidencia y la severidad de la enfermedad de la pudrición en un 64% y 90% respectivamente en la temporada 2009, y un 67% y 89% en el año 2010. Además, los tratamientos no tuvieron ningún efecto en la calidad del vino (Calvo-Garrido *et al.*, 2013). Es por esto que se sugiere el uso de la cepa CPA-1 de la levadura *C. sake* para el biocontrol de *B. cinerea* en tomate bajo invernadero.

Condiciones ambientales

La tasa estándar de *C. sake* es de 5×10^7 CFU ml⁻¹, ya que es una concentración para un control efectivo y consistente para la pudrición de racimo de *B. cinerea* en uva. Además, los estudios indicaron que con cuatro aplicaciones de la mezcla del producto en las etapas claves del crecimiento fueron suficientes para un control efectivo (Calvo-Garrido *et al.*, 2013).

Estudios realizados por Teixidó *et al.* (1998), indican que se han realizado mejoras para la supervivencia de *C. sake* CPA-1 a niveles de estrés. Adaptaron células osmóticas que se obtuvieron por la actividad del agua del medio de crecimiento con solutos orgánicos, aplicándolas en manzanas al campo, demostrando adaptaciones significativamente mejor que las no adaptadas.

Cañamas *et al.* (2008), contribuyó con un estudio con células de *C. sake* CPA-1 expuestas a 30 y 33°C en diferentes fases de fermentación, volviéndose termotolerantes bajo condiciones *in vitro*, por lo cual sugieren, que *C. sake* podría estar adaptado a ambientes extremos. Además, se indicó que temperaturas superiores a 35°C detenían el crecimiento de *C. sake*, con la excepción de la formulación que contenía el aditivo Fungicover Plus®.

Según Teixidó la levadura se aisló de fruta, en concreto manzana, y es común en muchos ambientes (Comunicación personal).¹

Según Usall *et al.* (2000), la levadura no genera ningún antibiótico, lo que sucede es que hay competencia efectiva por nutrientes y el lugar para la colonización, ya que *C. sake* coloniza muy rápido las heridas de la fruta.

¹ Neus Teixidó i Espasa. Patología de la postcosecha. IRTA.

Evidencia de uso en hortalizas

En un estudio realizado por Rodríguez *et al.* (2014) observaron la resistencia a químicos por parte de aislados de *Botrytis cinerea*, en invernaderos de tomate, en Islas Canarias. Aplicaron *C. sake* CPA-1 en la postcosecha de tomates, los resultados mostraron que las lesiones de los tomates fueron significativamente menores que en los controles.

Metodología

Ubicación del ensayo

Este ensayo tendrá lugar en la Región de Valparaíso, Quillota, en la Estación Experimental La Palma, zona productora de tomate bajo invernadero, con producción de tomate primor. Valparaíso cuenta con una de las mejores condiciones climáticas para tener un balance positivo de energía dentro de la estructura y suficiente para el resguardo del frío (Escaff *et al.*, 2005).

Antagonista

La cepa CPA-1 de *Candida sake* será pedida a la “Colección Española de Cultivos Tipo” (CECT-10817) en la Universidad de Valencia, Burjassot, España. La cepa fue aislada a partir de manzanas, por el Centro UdL-IRTA, en Lleida, Cataluña, España. Será pedido como cultivo activo para utilizar de inmediato cuando llegue la cepa (Cañamas *et al.* 2011; CECT, 2018). Además, se obtendrá el permiso necesario por parte del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) para su internación.

Producción de inóculo de *Botrytis cinerea*

Se utilizará un aislado de *B. cinerea* obtenido a partir de tomates infectados en un invernadero de la localidad de Quillota. Este aislado se cultivará en agar papa dextrosa (PDA) durante 15 días a 20°C, con un fotoperíodo de 14 h diario y 10 h de oscuridad para inducir la esporulación (Cañamas *et al.*, 2011).

Efectividad de *Candida sake* in vivo contra *Botrytis cinerea*

Para evaluar la efectividad de la levadura se sumergirán quince tomates sanos por 20 segundos en *Candida sake* cepa CPA-1 a diferentes concentraciones, luego se esperará un día a que colonice el tomate, para luego inocular, en los mismos tomates *Botrytis cinerea* a una concentración de 1×10^5 conidios/ml y evaluar el efecto de este ensayo viendo si fue efectiva o no la colonización de *B. cinerea*. Repetir este ensayo 3 veces.

Cuadro 1. Descripción de tratamientos

Tratamientos	Dosis de <i>Candida sake</i> CPA-1
T _A	1x10 ⁷
T _B	5x10 ⁷
T _C	1x10 ⁸

Eficacia de *C. sake* como controlador de *B. cinerea* bajo invernadero

El ensayo *in situ* se realizará con el modelo de diseño completamente al azar (DCA), se realizarán 6 tratamientos, con 3 repeticiones cada uno. Cada tratamiento se realizará en un invernadero, contando con un total de 30 plantas. Para la evaluación de la eficacia de control hacia *B. cinerea* los tratamientos se describen en el Cuadro 2. Para los tratamientos T1, T2 y T3 se asperjará sobre la planta completa, se deberá esperar un día para que *C. sake* pueda colonizar, T4 se asperjará sobre la planta completa, se deberá esperar un día para que *Bacillus subtilis* pueda colonizar. Luego los tratamientos T1, T2, T3 y T4 se deberán inocular con *B. cinerea* a una concentración de 1x10⁵ conidios/ml. Las aplicaciones a los tratamientos se realizarán cuando los frutos de tomate estén inmaduros, cuando ya tengan el tamaño comercial, aproximadamente en el día 80 después de plantación.

Cuadro 2. Descripción de tratamientos.

Tratamiento	Descripción	Dosis
T00	Planta testigo (sin aplicación)	-
T0	Planta con inóculo de <i>B. cinerea</i>	1x10 ⁵
T1	Planta con <i>C. sake</i> CPA-1	1x10 ⁷
T2	Planta con <i>C. sake</i> CPA-1	5x10 ⁷
T3	Planta con <i>C. sake</i> CPA-1	1x10 ⁸
T4	Planta con Serenade® MAX	5,13x10 ¹⁰

Diseño experimental y análisis de datos

Las variables para monitorear serán: rendimiento medido por kilogramos por planta y tomates con pudrición gris por planta. Para realizar la evaluación del modelo estadístico se analizará la varianza ANOVA, y para realizar la comparación entre los diferentes tratamientos se realizará el test de separación de medias de Tukey ($\alpha=0,05$).

Informe final

Los resultados obtenidos serán expuestos en un informe final detallado.

Bibliografía

Agrios, G. (1996). *Fitopatología*. (2ª ed). México D.F, México: UTEHA.

Allende, M. (2017). Importancia y consideraciones del cultivo de tomate. In A. Torres (Ed), *Manual de cultivo del tomate al aire libre*, pp.11-18. Santiago, Chile: INIA La Cruz.

Borges, A., R. Saraiva, L. Maffia. (2014). Biocontrol of gray mold in tomato plants by *Clonostachys rosea*. *Trop. plant. pathol*, 40(2), 71-76.

Calvo-Garrido, C., P. Elmer, I. Viñas, J. Usall, E. Bartra, N. Teixidó. (2013). Biological control of botrytis bunch rot in organic wine grapes with the yeast antagonist *Candida sake* CPA-1. *Plant pathology*, 62, 510-519

Cañamas T., I. Viñas, J. Usall, N. Magan, C. Solsona, N. Teixidó. (2008). Impact of mild heat treatments on induction of thermotolerance in the biocontrol yeast *Candida sake* CPA-1 and viability after spray drying. *Journal of applied microbiology*, 104, 767-775.

Cañamas, T., I. Viñas, R. Torres, J. Usall, C. Solsona, N. Teixidó. (2011). Field applications of improved formulations of *Candida sake* cpa-1 for control of botrytis cinerea in grapes. *Biological control*. 56:150-158.

Colección Española de Cultivos Tipo. (2018). Buscador de cepas: *Candida sake*. Recuperado de <http://www.uv.es/uvweb/coleccion-espanola-cultivos-tipo/es/cect/catalogo-cepas/medios-cultivo/buscador-cepas-1285892802374.html>

Dik, A., G. Koning, J. Köhl. (1999). Evaluation of microbial antagonist for biological control of botrytis cinerea stem infection in cucumber and tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 115-122.

Elad, Y., A. Kapat. (1999). The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 177:189.

- Escaff, M., P. Estay, A. Bruna, P. Gil, R. Ferreyra, P. Maldonado, C. Barrera. (2005). *El cultivo del tomate en invernadero*. La Cruz, Chile: INIA La Cruz.
- Estay, P., A. Bruna. (2002). *Insectos, Ácaros y Enfermedades asociadas al Tomate en Chile*. Santiago, Chile: INIA La Platina.
- Esterio, M., J. Auger, C. Ramos, M. Araneda. (2010). *Botrytis en uva de mesa de exportación: PCR en Tiempo Real una innovadora herramienta tecnológica para la detección oportuna de resistencia a fungicidas*. Santiago, Chile: Universidad de Chile.
- FAOSTAT. (2018). Cultivo tomate. Recuperado de www.fao.org/faostat/es/#data/QC
- Flaño, A. (2015). *El mercado del tomate para consumo fresco*. Santiago, Chile: ODEPA.
- Jarvis, WR. (1977). *Botryotinia and Botrytis species: taxonomy, physiology and pathogenicity*. Canada Department of Agriculture. Monograph 15, Harrow, Ontario, Canada.
- Melgarejo, P., R. Raposo, C. Moyano, J. Delcan, V. Gómez. (2005). Resistencia de botrytis cinerea a fungicidas en cultivos hortícolas de invernadero. *Phytoma españa: la revista profesional de sanidad vegetal*. 173:25-29.
- Pozo, L. (2015). Efectividad de Candida sake incorporada a recubrimientos biodegradables en el control de Botrytis cinerea en uva. (Tesis máster en gestión de la seguridad y calidad alimentaria). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
- Rodríguez, A., C. Guillén, H. Valle, V. Uva, R. Segura, S. Laprade, J. Sandoval. (2010). Aspectos a considerar en el control biológico. Recuperado de <http://cep.unep.org/repcar/proyectos-demostrativos/costa-rica-1/publicaciones-corbana/control-biologica>
- Rodríguez, A., A. Acosta, C. Rodríguez. (2014). Fungicide resistance of Botrytis cinerea in tomato greenhouses in the Canary Islands and effectiveness of non-chemical treatments against gray mold. *World journal of microbiology and biotechnology*, 30(9), 2397-2406.
- Russel, P. (2004). Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management. Bruselas: Crop Life International. 56p

SAG. (2018). Plaguicidas y fertilizantes. Recuperado de <http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/plaguicidas-y-fertilizantes/78/registros>

Soto, S. (2017). *Fitopatología – Enfermedades en hortalizas: Pudrición gris – Moho gris en tomate*. Santiago, Chile: INIA La Platina.

Teixidó, N., I. Viñas, J. Usall, N. Magan. (1998). Control of blue mold of apples by preharvest application of *Candida sake* grown in media with different water activity. *Phytopathology*, 88, 960-964.

Teixidó, N., C. Calvo-Garrido, R. Torres, J. Usall. (2018). Una nueva estrategia de control de la podredumbre por *Botrytis* en uva. Cultivo de viñedo con prácticas de producción sostenible. *Tierras de castilla y León:Agricultura*, 262,118-121.

Usall, J., N. Teixidó, E. Fons, I. Viñas. (2000). Biological control of blue mould on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. *International journal of food microbiology*, 58, 83-92.

Viñas, I., J. Usall, N. Teixido, V. Sanchis. (1997). Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *International journal of food microbiology*. 40:9-16.

Viñas, I., J. Usall, N. Teixido, V. Sanchis. (1997). Nueva cepa de *Candida sake* (Saito & Ota) van uden and Buckley y su utilización como agente de control biológico de las enfermedades fúngicas de postcosecha de frutas. Patente española P2089981. Oficina Española de Patentes y Marcas.

Viñas, I., N. Teixidó, M. Abadías, R. Torres, J. Usall. (2006). Desarrollo, producción y formulación comercial de la cepa CPA-1 de *Candida sake* para el control de las principales enfermedades en postcosecha de fruta. *Phytoma España: la revista profesional de sanidad vegetal*. 182:69-64.

Plan de trabajo

Pedir cepa CPA-1 de Candida sake

Se solicitará la cepa a España, y la cepa debiese llegar lista para ser utilizada, por lo cual se deberá obtener los permisos necesarios, tanto con el SAG, como de la Colección Española de Cultivos Tipo. Esta levadura llegará al Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Agronomía, donde luego se multiplicará y posteriormente se evaluará la cepa *in vitro*.

Duración: 3 meses.

Cotización y compra de insumos

Se requiere de insumos a lo largo de todo el ensayo, como fertilizantes para el crecimiento de los tomates, elementos para el laboratorio, como por ejemplo el agar papa dextrosa, contenedor de plástico tipo envase de casata, por lo cual se verá más detallado en el presupuesto.

Duración: 2 meses.

Aislación de Botrytis cinerea

Se deberá aislar cepas chilenas de *B. cinerea*, para ello se obtendrá en invernaderos de tomate, cerca de la Estación Experimental, el ejecutor estará a cargo de la recolección del material. Luego el encargado del laboratorio deberá inducir las cepas recolectadas a esporulación para identificar la taxonomía de cada cepa de *B. cinerea* en el Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Agronomía.

Duración: 2 meses.

Invernaderos Estación Experimental La Palma

Se debe gestionar el uso de un invernadero para la realización de estos ensayos en la Estación Experimental La Palma. Para la preparación de suelo y trasplante se utilizará maquinaria para hacer la labor más rápida. Se necesita instalar el sistema de riego para luego llevar a cabo el trasplante. Los tomates serán indeterminados y tendrán un marco

de plantación de 1,5 m x 0,6 m. Para ello, se mandará a hacer plantines a una Plantinera. Es necesario que al momento de realizar los ensayos las plantas estén con 80 días de desarrollo después del trasplante.

Duración: 5 meses aproximadamente.

Evaluación de C. sake in vivo

Esta evaluación se realizará en el Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Agronomía y estará a cargo el encargado de laboratorio. Las repeticiones se realizarán sucesivamente y se irán tomando todos los datos. El análisis estadístico será realizado por parte del ejecutor.

Duración: 3 meses.

Evaluación de C. sake bajo invernadero

Esta evaluación será realizada en terreno, los 6 tratamientos estarán separados en condiciones bajo efecto borde dentro de un invernadero. Las aplicaciones serán realizadas por el obrero, supervisado por el ejecutor. La recolección de datos también será realizada por el ejecutor.

Duración: 6 meses.

Obtención y análisis de datos

Se recolectarán todos los datos obtenidos, tanto de laboratorio como de invernadero, y se analizarán a través de métodos estadísticos.

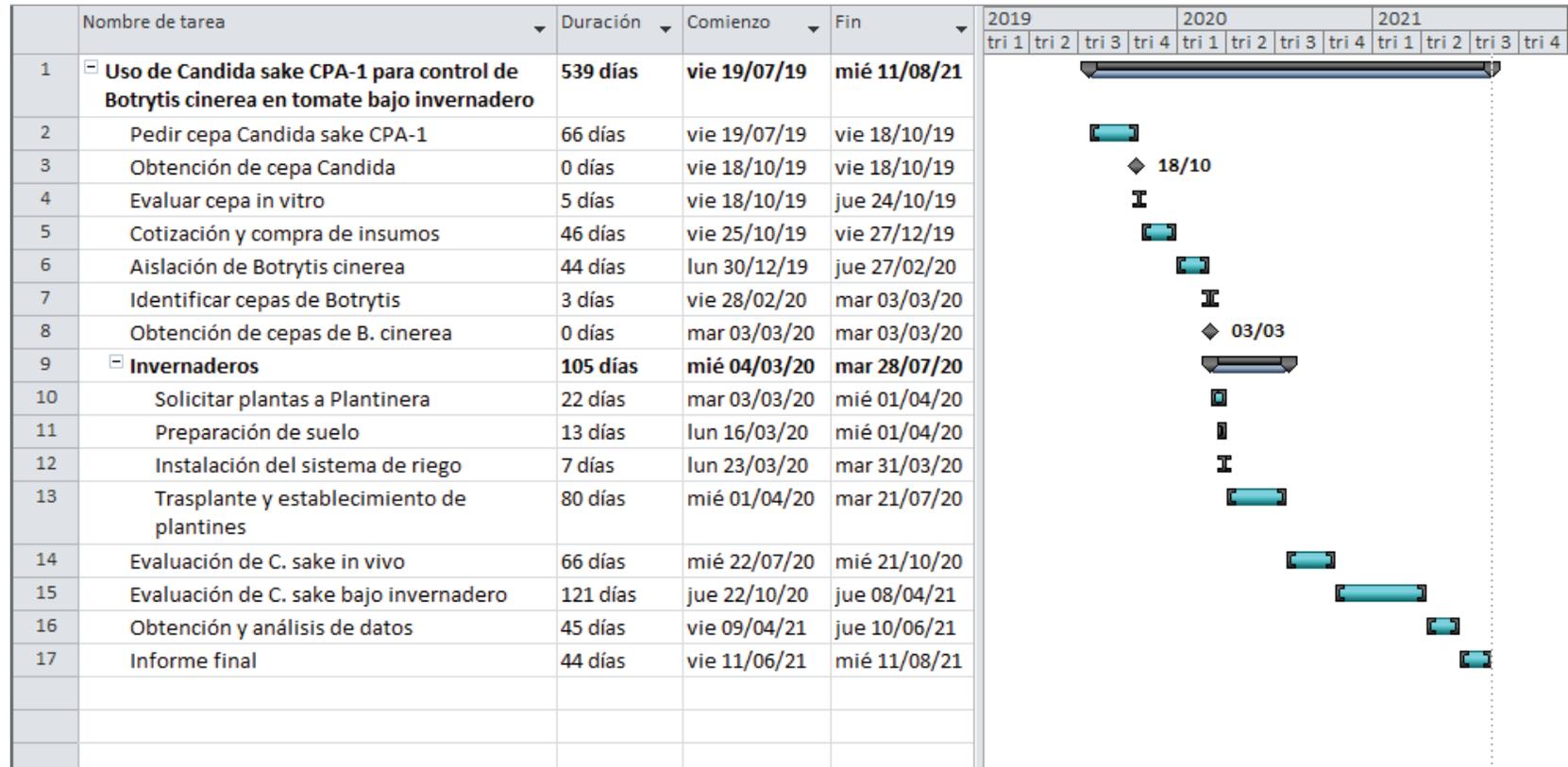
Duración: 2 meses.

Informe final

Los datos obtenidos se plasmarán a un informe final.

Duración: 2 meses.

Carta Gantt



Resultados esperados

Objetivos específicos	Resultados esperados
Solicitar y conseguir permiso para la utilización de la cepa CPA-1 de <i>Candida sake</i> ante la Universidad de Valencia y el Servicio Agrícola y Ganadero.	Respuesta de la Universidad de Valencia y el Servicio Agrícola y Ganadero para la utilización de la cepa CPA-1 de <i>Candida sake</i> obtenida.
Evaluar <i>in vivo</i> la actividad inhibidora de la cepa CPA-1 de <i>Candida sake</i> contra cepas chilenas de <i>Botrytis cinerea</i> .	Respuesta conocida de la cepa CPA-1 de <i>Candida sake</i> contra cepas chilenas de <i>Botrytis cinerea</i> .
Evaluar la actividad inhibidora de la cepa CPA-1 de <i>Candida sake</i> contra <i>Botrytis cinerea</i> en tomate primor bajo invernadero.	Capacidad de inhibición de <i>C. sake</i> CPA-1 hacia <i>B. cinerea</i> en tomate primor bajo invernadero conocida.

Organización

La organización de este proyecto se basa de acuerdo con labores específicas que debe cumplir cada persona, teniendo al director que guiará el proyecto, seguido de un ingeniero agrónomo que trabajará a la par con el director. Las labores que se deben cumplir serán simples de realizar, por lo cual sólo se necesitará 2 personas más: una persona encargada de las pruebas de laboratorio y un obrero encargado de la producción y preparación de las plantas de tomate.

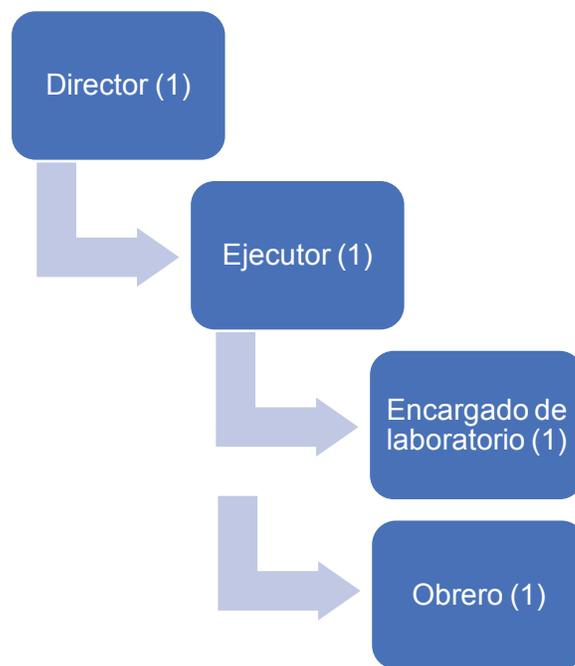


Figura 1. Organigrama.

Fuente: elaboración propia, 2018.

Cargos y funciones

Director: deberá tener un grado académico profesional (Ingeniero agrónomo con grado de doctor) ya que será el encargado de guiar todo el proyecto y poseer herramientas para manejar cualquier situación o dificultad que se presente a lo largo de éste, además trabajará en conjunto con el ejecutor del proyecto. Deberá realizar labores como la contratación del personal requerido, las cuentas del proyecto, la cotización y compras de insumo. También deberá encargarse de la revisión del informe final del proyecto.

Ejecutor: necesita poseer un título de ingeniero agrónomo, éste se encargará de todo el proceso y seguir instrucciones o sugerencias dadas por el director. Debe gestionar, asegurar y cumplir cada etapa del proceso. Tendrá que supervisar las labores de los obreros y de poder resolver inconvenientes que se presenten a lo largo del proyecto. Realiza análisis estadístico y elabora informe final.

Encargado de laboratorio: deberá tener el título de licenciado en biología y poder manejar los implementos necesarios de laboratorio para llevar a cabo las labores del proyecto, deberá ser minucioso en cada ensayo y anotar todos los resultados obtenidos en una planilla Excel, sin adulteración de estos, además de ser responsable.

Obrero: sin requerimiento de título, encargado de seguir instrucciones del ingeniero agrónomo. Estará a cargo de todo el sistema de producción, como riegos, fertilización, manejos como podas, etc., es el encargado de plantas. Debe ser proactivo y eficiente, también ser responsable durante todo el proceso de producción.

Formación/grado académico	Cargo en el proyecto	Costo del personal (MM\$)	Aporte FONDO CONCURSABLE (MM\$)
Ingeniero agrónomo con grado de doctor	Director	7.2	5
Ingeniero agrónomo	Ejecutor	19.2	13.4
Licenciado en biología	Encargado de laboratorio	2.4	1.6
Sin requerimiento	Obrero	2.4	1.6

Presupuesto

Presupuesto total por cuenta (MM\$)

	Cuenta	FONDO CONCURSABLE	APORTE EMPRESA		Total(MM\$)
			Pecuniario	No pecuniario	
A.	Total Recursos Humanos	21,84	9,36		31,20
B.	Total Subcontratos	2,16		6,07	8,23
C.	Total Capacitación				
D.	Total Misiones Tecnológicas				
E.	Total Difusión				
F.	Total Gastos de Inversión				
G.	Total Gastos de Operación	0,75	0,32		1,08
H.	Total Gastos de Administración		2,48	0,73	3,21
	Porcentaje de Aporte (%)	56,61	27,81	15,56	
TOTAL(MM\$)		24,76	12,16	6,81	43,73

Presupuesto total por año (MM\$)

	Cuenta	Año 1	Año 2	Total(MM\$)
A.	Total Recursos Humanos			31,20
	<i>Pecuniario</i>	15,60	15,60	31,20
	<i>No Pecuniario</i>			
B.	Total Subcontratos			8,23
	<i>Pecuniario</i>	1,98		1,98
	<i>No Pecuniario</i>	3,21	3,03	6,25
C.	Total Capacitación			
	<i>Pecuniario</i>			
	<i>No Pecuniario</i>			
D.	Total Misiones Tecnológicas			
	<i>Pecuniario</i>			
	<i>No Pecuniario</i>			
E.	Total Difusión			
	<i>Pecuniario</i>			
	<i>No Pecuniario</i>			
F.	Total Gastos de Inversión			
	<i>Pecuniario</i>			
	<i>No Pecuniario</i>			
G.	Total Gastos de Operación			1,07
	<i>Pecuniario</i>	1,08		1,08
	<i>No Pecuniario</i>			
H.	Total Gastos de Administración			3,21
	<i>Pecuniario</i>	1,53	0,94	2,48
	<i>No Pecuniario</i>	0,37	0,36	0,73
	Total(MM\$)			43,73
	<i>Pecuniario</i>			36,74
	<i>No Pecuniario</i>			6,99

Anexo Planilla de Presupuesto

Cuenta	Unidad	Cantidad	Precio Unitario	Valor total	Año1		Año2		
					Pecuniario	No pecuniario	Pecuniario	No pecuniario	
Recursos humanos									
Incentivo director	Mensual	24	\$ 0.30 M	\$ 7.20 M	\$ 3.60 M		\$ 3.60 M		
Ejecutor	Mensual	24	\$ 0.80 M	\$ 19.20 M	\$ 9.60 M		\$ 9.60 M		
Encargado de laboratorio	Mensual	6	\$ 0.40 M	\$ 2.40 M	\$ 1.20 M		\$ 1.20 M		
Obrero	Mensual	8	\$ 0.30 M	\$ 2.40 M	\$ 1.20 M		\$ 1.20 M		
Total recursos humanos				\$ 31.20 M	\$ 15.60 M		\$ 15.60 M		
Subcontratos									
Arriendo de invernadero	Mensual	14.5	\$ 0.15 M	\$ 2.18 M		\$ 1.09 M		\$ 1.09 M	
Arriendo de laboratorio	Mensual	6	\$ 0.65 M	\$ 3.90 M		\$ 1.95 M		\$ 1.95 M	
Plantines de tomates	Unidad	150	\$ 0.00 M	\$ 0.06 M	\$ 0.06 M				
Arriendo camioneta	Diario	48	\$ 0.04 M	\$ 1.92 M	\$ 1.92 M				
Arriendo maquinaria	Diario	2	\$ 0.09 M	\$ 0.18 M		\$ 0.18 M			
Total subcontratos				\$ 8.24 M	\$ 1.98 M	\$ 3.22 M		\$ 3.04 M	
Gastos de operación									
Cepa Candida sake CPA-1	Unidad	1	\$ 0.13 M	\$ 0.13 M	\$ 0.13 M				
Contenedores plásticos de 1	Unidad	15	\$ 0.00 M	\$ 0.01 M	\$ 0.01 M				
Hipoclorito de sodio 1%	l	1	\$ 0.01 M	\$ 0.01 M	\$ 0.01 M				
Agar papa dextrosa (PDA)	g	500	\$ 0.00 M	\$ 0.04 M	\$ 0.04 M				
Serenade® MAX	l	20	\$ 0.01 M	\$ 0.25 M	\$ 0.25 M				
Ultrasol® Inicial	l	25	\$ 0.00 M	\$ 0.03 M	\$ 0.03 M				
Ultrasol® Crecimiento	l	25	\$ 0.00 M	\$ 0.03 M	\$ 0.03 M				
Ultrasol® Producción	kg	25	\$ 0.00 M	\$ 0.03 M	\$ 0.03 M				
Actara ® 25 WG	kg	1	\$ 0.23 M	\$ 0.23 M	\$ 0.23 M				
Guantes de látex	Unidad	100	\$ 0.00 M	\$ 0.04 M	\$ 0.04 M				
Alcohol etílico 96%	l	1	\$ 0.01 M	\$ 0.01 M	\$ 0.01 M				
Papel absorbente	Unidad	3	\$ 0.00 M	\$ 0.01 M	\$ 0.01 M				
Agua estéril	l	2	\$ 0.00 M	\$ 0.00 M	\$ 0.00 M				
Pulverizador manual	Unidad	3	\$ 0.00 M	\$ 0.01 M	\$ 0.01 M				
Cintas de riego 10 cm	m	3200	\$ 0.00 M	\$ 0.12 M	\$ 0.12 M				
Mulch bicolor	m	1000	\$ 0.00 M	\$ 0.09 M	\$ 0.09 M				
Conector de cinta 16x17	Unidad	40	\$ 0.00 M	\$ 0.00 M	\$ 0.00 M				
Conector 16mm con goma	Unidad	20	\$ 0.00 M	\$ 0.00 M	\$ 0.00 M				
Válvula espiga PE cinta 16x17	Unidad	40	\$ 0.00 M	\$ 0.02 M	\$ 0.02 M				
Abrazadera 1/2"	Unidad	60	\$ 0.00 M	\$ 0.01 M	\$ 0.01 M				
Codo plansa PVC 1/2"	Unidad	40	\$ 0.00 M	\$ 0.00 M	\$ 0.00 M				
Tee plansa PVC 1/2"	Unidad	20	\$ 0.00 M	\$ 0.00 M	\$ 0.00 M				
Plansa 1/2"	m	50	\$ 0.00 M	\$ 0.01 M	\$ 0.01 M				
Total gastos de operación				\$ 1.08 M	\$ 1.08 M				
Gastos administrativos									
Luz	Mensual	24	\$ 0.02 M	\$ 0.36 M		\$ 0.18 M		\$ 0.18 M	
Agua	Mensual	24	\$ 0.02 M	\$ 0.36 M		\$ 0.18 M		\$ 0.18 M	
Gas	Mensual	1	\$ 0.02 M	\$ 0.02 M		\$ 0.02 M			
Gastos oficina	Anual	1	\$ 0.40 M	\$ 0.40 M	\$ 0.40 M				
Imprevistos 5%	Anual			\$ 2.08 M	\$ 1.13 M		\$ 0.95 M		
Total gastos administrativos				\$ 3.22 M	\$ 1.53 M	\$ 0.38 M		\$ 0.36 M	
Total gastos proyecto					\$ 43.74 M	\$ 20.20 M	\$ 3.59 M	\$ 16.55 M	\$ 3.40 M
							\$ 19.95 M		