EFECTO DE ENMIENDAS FOLIARES SOBRE EL DESARROLLO DEL TIZON TEMPRANO CAUSADO POR *Alternaria solani* Y SOBRE LA POBLACION BACTERIAL EN TOMATE (*Lycopersicon esculentum* MILL)*

Shuichi Okumoto
Elkin Bustamante

ABSTRACT

The chitin or milk application did not show any significant effect regarding early blight (*Alternaria solani*) severity and tomato yield. Phytotoxicity was observed on the plants sprayed with the mixture of chitin and fungicide alone and with milk. The chitin plus fungicide application caused a significant decrease in the tomato fruit yield and affected the microbial environment with a decrease in the bacterial population. The population changes of total bacteria, *Bacillus* spp. and fluorescent *Pseudomonas* spp. were not due to the amendment application, but to the sampling time during the field experimental periods.

RESUMEN

La aplicación de quitina o de leche no mostró efecto significativo sobre la severidad del tizón temprano (*Alternaria solani*) ni sobre el rendimiento de frutos de tomate. Se observó fitotoxicidad en las plantas asperjadas con una combinación de quitina, su fungicida y leche. La aplicación de quitina más fungicida, también causó una disminución significativa en el rendimiento de frutos de tomate y disminuyó la población bacterial. Durante el experimento de campo, los cambios en la población de bacterias, *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. fluorescentes, no se debieron a la aplicación de las enmiendas, sino al tiempo de muestreo.

INTRODUCCION

Ploper y Backman (1991) reportaron el efecto de enmiendas foliares, especialmente de quitina y de celulosa, sobre la modificación de la ecología microbial y el control del tizón temprano. Es importante por consiguiente encontrar si en las condiciones del trópico humedo, existe relación entre las enmiendas y la severidad de enfermedades de importancia económica, como el tizón temprano en el tomate con el fin de buscar alternativas de control que disminuyan las aplicaciones de fungicidas. Por este motivo, se proyectó este estudio de laboratorio y campo, con los siguientes objetivos: - Evaluar el efecto de enmiendas sobre el desarrollo de *A. solani* en el campo, y - estudiar la variación de la población bacterial con la aplicación de enmiendas en las hojas de tomate.

MATERIALES Y METODOS

El experimento se realizó a partir del 27 de febrero hasta el 26 de julio de 1992, en el laboratorio e invernadero de Fitopatología y en la Estación Experimental La Montaña, del CATIE.

Recibido: 09/06/93. Aprobado: 08/10/93.

*Basado en la Tesis de Mag. Sc. del primer autor. Programa de Posgrado. CATIE, Turrialba, **Costa Rica**.

CATIE, Area de Fitoprotección, 7170 Turrialba, **Costa Rica.

Efecto de enmiendas sobre la enfermedad en el campo. Se utilizó el cultivar de tomate 'Dina Panamá', moderadamente susceptible al patógeno. Se evaluaron ocho tratamientos correspondientes a tres factores (quitina, leche, clorotalonil) y dos niveles (aplicar o no aplicar). Se utilizó como fungicida el clorotalonil a una concentración de 500 g/200 L de agua. La suspensión coloidal de quitina fue aplicada a una concentración de 0.5 %. La formulación con quitina para la primera aplicación fue ajustada aproximadamente a un pH de 7, agregando solución de NaOH 1 N. La quitina coloidal fue preparada a partir de conchas de camarones por el método de Backman modificado (P.A. Backman, Comunicación personal).

Se utilizó leche cruda de la finca de ganadería, CATIE y se aplicó a una concentración de 4.8 L/200 L de agua. Algunos agricultores costarricenses la usan para control de enfermedades aún sin conocer su mecanismo de acción.

Las formulaciones de los tratamientos se prepararon con una mezcla de aceite de soya y Tween 20 como surfactante. Se utilizó el diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones y se evaluaron las siguientes variables:

1. La severidad de *A. solani*, iniciando las lecturas al aparecer las primeras manchas y continuando cada 7 a 10 días durante el ciclo de cultivo. La severidad del patógeno se evaluó con base en la escala de Horsfall-Barratt modificada por Large (1966), para luego calcular dos parámetros; la tasa de infección aparente (r) mediante el modelo logístico del porcentaje de la enfermedad a través del tiempo (Van der Plank 1963) y el área debajo de

del tiempo (Van der Plank 1963) y el área debajo de la curva de progreso de la enfermedad (Shaner y Finney 1977).

2. Los rendimientos se midieron en tres clases de acuerdo a las categorías de calidad de la fruta, empleadas en el CENADA (Centro Nacional de Abastecimientos, Costa Rica).

A la información obtenida se le hizo análisis de varianza, con las correspondientes pruebas de los efectos de los factores e interacciones.

Efecto de enmiendas sobre bacterias, *Pseudomonas* spp. fluorescentes y *Bacillus* spp. La población total de bacterias y los dos géneros de bacterias *Pseudomonas spp.* fluorescentes y *Bacillus* spp., que representan el mayor potencial de control biológico, en la superficie foliar de las hojas de tomate, se estimaron entre 7 y 10 días después de la aplicación de los tratamientos (a los 35, 44, 53, 72, 82, 92, 106 y 115 días después del trasplante).

Se tomaron los 15 discos (diámetro de 6 mm) de cinco folíolos por tratamiento y se colocaron en un Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de agua destilada estéril. Se mantuvo por 30-40 min. en el agitador y se colocó 1 ml de dicha solución en un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril, haciéndose diluciones decimales hasta 10^4. Para el conteo de número de bacterias, una gota (0.05) ml de las diluciones de 10^{-2} y 10^{-4} fueron sembradas cada una en los tres platos de agar nutritivo (AN). Se dejaron crecer en incubación a 30°C. La colonia de bacterias se contó entre 48 y 96 horas, estimándose el número de unidades formadoras de colonia por un área de cm^2 (cfu/cm^2) (Leben *et al.* 1961).

Tres platos con el medio de B de King en los cuales se efectuó el conteo de *Pseudomonas* spp. fluorescentes (King *et al.* 1954), fueron inoculados con una gota (0.05 ml) de la dilución de 10^{-1}. El número de colonias fluorescentes se contó bajo luz ultravioleta.

Para la estimación de la población de *Bacillus* spp., tres platos de AN fueron sembrados con la dilución original. Se colocaron en una incubadora a 41°C por 24 a 48 horas. Se contó el número de colonias de *Bacillus* spp., tomando en cuenta a la morfología de colonia, tinción de Gram y observación de la presencia de esporas (Gordon *et al* 1973).

La información se sometió a un análisis de varianza con las parcelas divididas en el tiempo y las correspondientes pruebas de los efectos de los factores e interacciones.

RESULTADOS Y DISCUSION

Al analizar los datos, no se encontraron interacciones significativas entre los factores principales (quitina, leche y clorotalonil) sobre la severidad del tizón temprano (Fig. 1).

El clorotalonil tuvo un efecto de reducción del grado de severidad del tizón temprano, ya que se encontró una diferencia altamente significativa ($p<0.01$) en el efecto del fungicida, con respecto a la tasa de infección aparente (r) y el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ACPE) (Cuadro 1).

La aplicación de leche no presentó efecto positivo, más bien mostró un incremento del tizón temprano, de acuerdo con los resultados del ACPE (Cuadro 1).

La aplicación de quitina no mostró ningún efecto con respecto a la severidad de la enfermedad, ya que no se presentó diferencia significativa en el análisis de varianza para la r y el ACPE (Cuadro 1). Este

CUADRO 1. Efecto de los factores principales sobre la severidad de *A. solani* y el nivel de significancia estadística mediante análisis de varianza, en los diferentes parámetros.

(a) tasa de infección aparente (r)

FACTOR* PRINCIPAL	APLICACION con		APLICACION sin		Pr< F
Quitina	0.179	0.033	0.179	0.022	ns.
Leche	0.185	0.032	0.174	0.022	ns.
Fungicida	0.159	0.012	0.200	0.022	P<0.01

b) área debajo de la curva de progreso de la enfermedad (ACPE).

Quitina	23.3	11.3	25.1	11.0	ns.
Leche	25.5	10.2	23.0	12.0	P<0.05
Fungicida	14.1	5.3	34.4	3.6	P<0.01

**: No se observó interacciones significativas entre los tratamientos.*

resultado difiere del encontrado por Ploper y Backman (1991), los cuales reportaron que el tizón temprano fue reducido con la aspersión foliar de polímeros insolubles como quitina y celulosa, siendo la quitina la que presentó menor severidad.

Después de la primera aplicación, se observaron manchas necróticas de 2-3 mm de color claro en las plantas asperjadas con la mezcla de quitina, fungicida y leche. El clorotalonil se ha reportado como fitotóxico usado con algunos coadyuvantes (Jiménez Fernández 1982). Sin embargo, el clorotalonil solo no presentó fitotoxicidad. Al corregir el pH a más de 8 a partir de la segunda aplicación, el síntoma no apareció más. La verdadera causa de la fitotoxicidad no fue estudiada.

Esta fitotoxicidad, con daño visible o no, podría ser la causa de una disminución en el rendimiento de frutos de tomate, ya que en la aplicación de quitina y fungicida se encontró una interacción negativa altamente significativa con respecto a la calidad de fruto de la clase II y rendimiento total (Fig. 2), una interacción significativa con respecto al rendimiento de la clase I (Cuadro 2).

Durante el período experimental, los cambios de la población de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. fluorescentes no se debieron a la aplicación de las enmiendas, sino al tiempo de muestreo (Cuadro 3). La variación de la población total de bacterias mostró una diferencia altamente significativa ($p<0.01$) en el tiempo de muestreo. Por lo tanto, se puede concluir que la población de ellas, inclusive la población total de bacterias, fue afectada por los factores ambientales.

Al observar la Fig. 3, se encuentra alguna similitud en el comportamiento de las curvas entre la población total de bacterias, *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. fluorescentes. El comportamiento de las curvas corresponde a la fluctuación de la humedad relativa, es decir, la población de bacterias es susceptible al desecamiento. Esto coincide con Kundsen (1984) citado por Spurr y Kundsen (1985) quien afirma que la población de bacterias fue altamente sensitiva a la humedad de las hojas, ya que el período de secamiento (3-4 hr.) causó una disminución grande y rápida en el número de bacterias. La población de *Bacillus* spp. fue menos variable que la de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, confirmando los datos de Kundsen y Spurr (1987), sobre la supervivencia de bacterias gram-positivas formadoras de esporas (*Bacillus* spp.) la cual fue menos variable que la de gram-negativas no formadoras de esporas.

Las *Pseudomonas* spp. fluorescentes son más afectadas por la exposición al sol que *Bacillus* spp. Sztejnberg y Blakeman (1973) informaron que las bacterias aumentaron en una gota de agua en la superficie de hojas y disminuyeron rápidamente en corto tiempo de exposición a la luz ultravioleta.

El análisis de varianza, con respecto a la población bacterial, mostró también una interacción significativa ($p<0.05$) entre quitina y fungicida (Cuadro 3). Por consiguiente, bajo condiciones climáticas muy variadas, la aplicación de quitina con fungicida, posible causante de fitotoxicidad, afecta al ambiente microbial con una disminución en la población de bacterias, comparado con cualquiera de los factores individuales (Fig. 4).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye que la quitina y clorotalonil se deben aplicar en forma separada para no inducir fitotoxicidad en las plantas. La aplicación de quitina permitió aumentar la población de *Bacillus* spp. quitinolíticas (Okumoto 1992), aunque no era suficiente para el control de la

CUADRO 2. Rendimiento total por tratamiento y el nivel de significancia estadística, de acuerdo a la calidad de fruto. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

TRATAMIENTO[a]				RENDIMIENTO(ton/ha) (Categorías del fruto)			
	Quit.	Leche	Fung.	I	II	III	Total
T1	0	0	0	6.5	3.8	3.9	14.2
T2	0	0	1	16.5	10.8	7.2	34.5
T3	0	1	0	5.2	3.2	3.7	12.1
T4	0	1	1	11.8	8.5	7.2	27.5
T5	1	0	0	8.0	4.2	3.3	15.5
T6	1	0	1	9.3	6.8	5.4	21.5
T7	1	1	0	7.4	4.3	3.9	15.6
T8	1	1	1	10.9	5.4	6.7	23.0
Nivel de significancia estadística							
Bloque				p<0.01	ns.	ns.	p<0.01
Quitina				ns.	p<0.05	ns.	p<0.05
Leche				ns.	ns.	ns.	ns.
Quitina*Leche				ns.	ns.	ns.	ns.
Fungicida				p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01
Fungicida*Quitina				p<0.05	p<0.01	ns.	p<0.01
Fungicida*Leche				ns.	ns.	ns.	ns.
Fungicida*Quitina*Leche				ns.	ns.	ns.	ns.

a: 0 = No aplicar, 1 = aplicar.
ns.: No significativo.

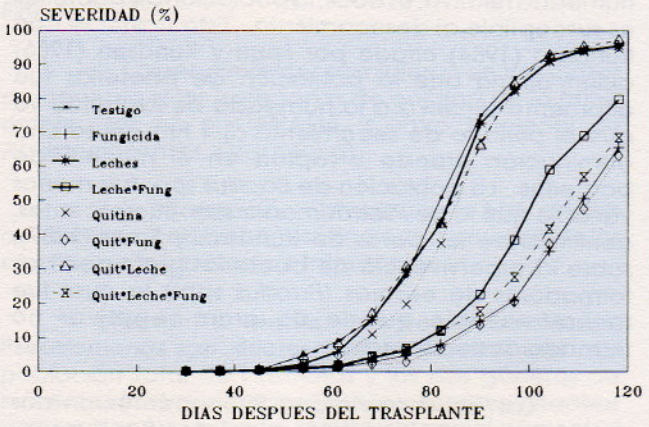


Fig. 1. Efecto de los tratamientos sobre el desarrollo de la enfermedad. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

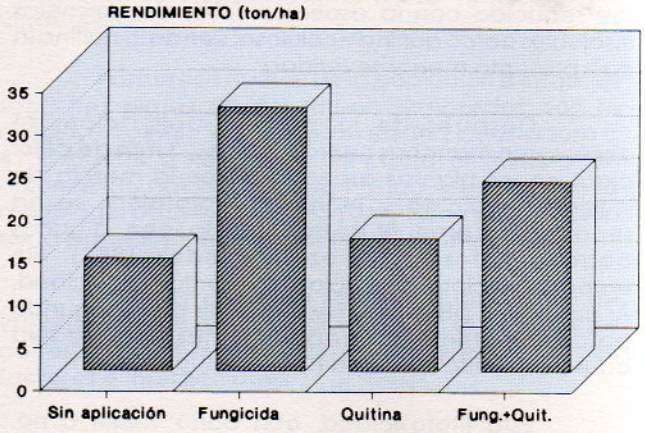


Fig. 2. Interacción entre quitina y fungicida en el rendimiento total. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

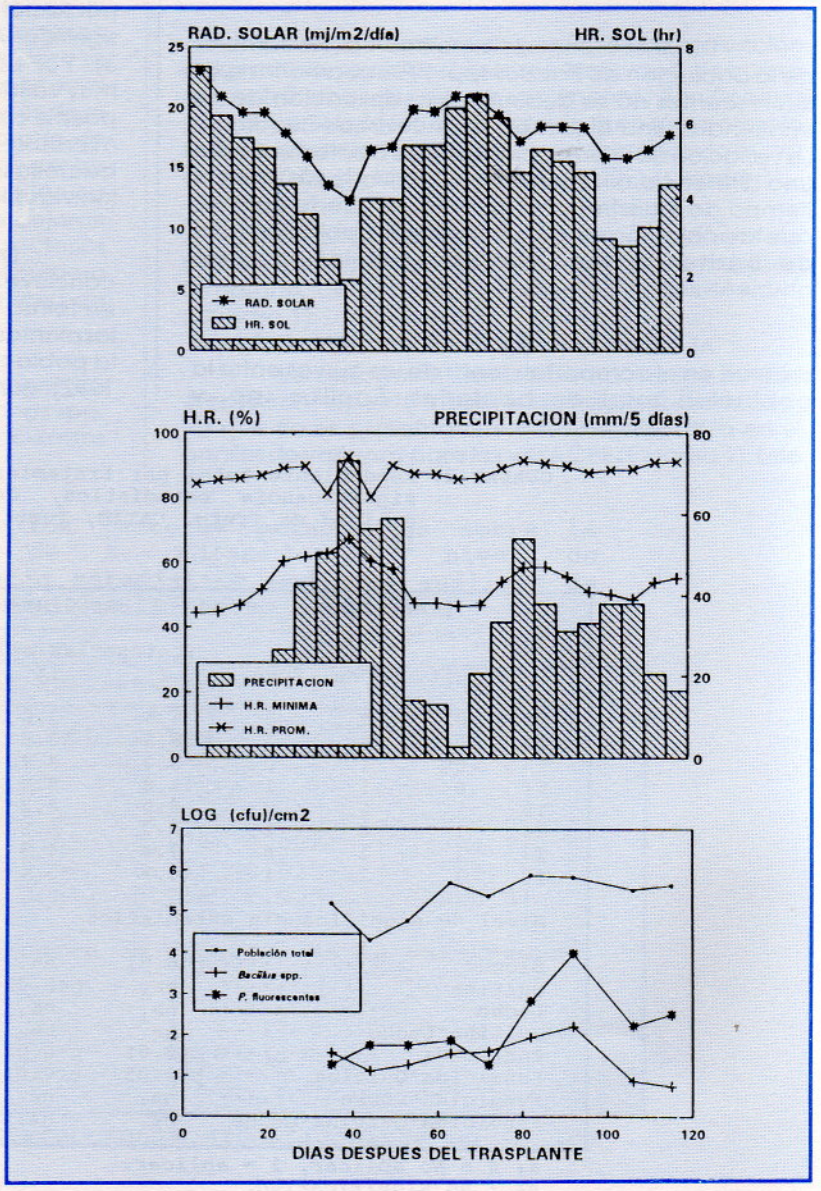


Fig. 3. Variación de las condiciones climáticas (radiación solar, h. de sol, precipitación, h. de H.R. mínima y promedia) y población de bacterias, *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. fluorescentes durante el ciclo de cultivo del tomate. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

CUADRO 3. Nivel de significancia estadística mediante análisis de varianza para la población total de bacteria, *Pseudomonas* spp. fluorescentes y *Bacillus* spp., respecto a la aplicación de los tratamientos. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

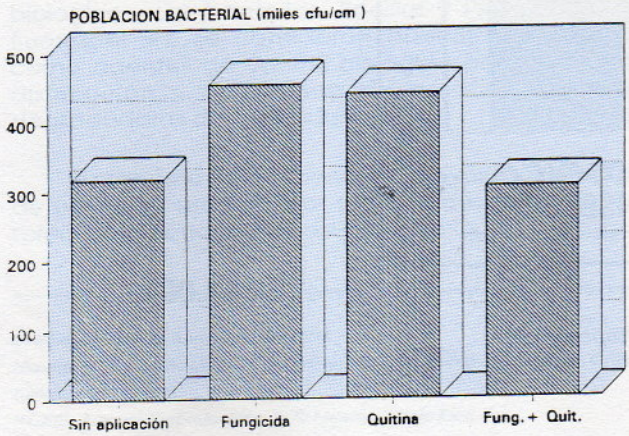
F.V.	G.L.	Bacteria	*Bacillus*	*Pseudomonas*
Bloque	2	ns.	ns.	ns.
Quitina	1	ns.	ns.	ns.
Leche	1	ns.	ns.	ns.
Quit.*Leche	1	ns.	ns.	ns.
Fungicida	1	ns.	ns.	ns.
Quit.*Fung.	1	p<0.05	ns.	ns.
Leche*Fung.	1	ns.	ns.	ns.
Quit.*Leche*Fung.	1	ns.	ns.	ns.
Error(a)	14			
Tiempo	7	p<0.01	p<0.01	p<0.01
Otros posibles combinaciones[1]	49	ns.	ns.	ns.
Error(b)	112			
Total	191			

ns.: No significativo.
*1: Iteracciones que no presentaron significancia: quitina *tiempo, leche*tiempo, quitina*leche*tiempo, fungicida*tiempo, quitina*fungicida*tiempo, leche*fungicida*tiempo, quitina*leche*fungicida*tiempo.*

enfermedad. Por lo tanto, es importante probar en un futuro trabajo, la aplicación de quitina con algunas de las bacterias quitinolíticas sobre el control de la enfermedad y conocer el comportamiento de ellas bajo condiciones del trópico húmedo.

CONCLUSIONES

- La aplicación de quitina sola no presenta disminución del tizón temprano, ya que no aumentó la población microbial.



4 Interacción entre quitina y fungicida en la población bacterial. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

- La mezcla de quitina y fungicida presentó un efecto negativo para el rendimiento de frutos de tomate y la población de bacterias.

- La aplicación de leche no afectó el rendimiento y funcionó negativamente en la supresión de la enfermedad.

- Durante el experimento de campo, no hubo diferencias por tratamiento en la población de bacterias, *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. fluorescentes.

- La población de bacterias, *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. fluorescentes fueron aparentemente afectadas por cambios bruscos del clima, en especial la humedad relativa y la radiación solar.

- La variación en el tiempo de la población de *Pseudomonas* spp. fluorescentes fue mayor que la de *Bacillus* spp. en el período experimental.

RECONOCIMIENTO

Al Natural Resources Institute de Gran Bretaña, por la ayuda financiera para este estudio mediante el contrato extra-mural EMCX-0179, Manejo Integrado de Plagas del Suelo en América Central y AID/ROCAP/RENARM, por el apoyo adicional.

BIBLIOGRAFIA

GORDON, R.E.; HAYNES, W.C.; HOR-NAY PANG, C. 1973. The genus *Bacillus*. USDA. Agriculture Handbook No. 427. 283 p.

JIMENEZ, G.M.; FERNANDEZ, F.V. 1982. Manual técnico para uso y manejo de agroquímicos. San José, Costa Rica. Colegio de ingenieros agrónomos. Costa Rica. 171 p.

KING, E.O.; WORD, N.K.; RANEY, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyaninand fluorescin. J. Lab. Clin. Med. 44: 301-307.

KNUDSEN, G.R.; SPURR, H.W., JR. 1987. Field persistence and efficacy of five bacterial preparations for control of peanut leaf spot. Plant Disease. 71: 442-445.

LARGE, E.C. 1966. Measuring plant disease. Ann. Rev. Phytopathology. 4: 9-28.

LEBEN, C. 1961. Microorganisms on cucumber seedlings. Phytopathology 51: 553-557.

OKUMOTO, S. 1992. Efecto de enmiendas sobre bacterias antagónicas en *Alternaria solani* en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Tesis Mag. Sc. Turrialba (Costa Rica). CATIE. 114 p.

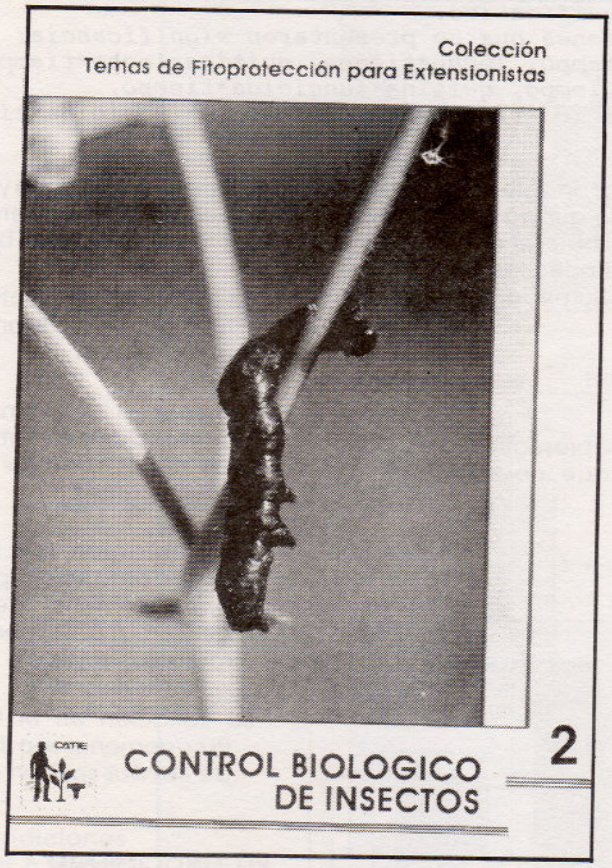
PLOPER, L.D.; BACKMAN, P.A. 1991. Modification of leaf microflora by foliar amendments and effects on disease of tomato, potato and apple. (Abstr.). Phytopathology. 81: 1152.

SHANER, G.; FINNEY, R.E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-midewing resistance in knox wheat. Phytopathology. 67: 1051-1056.

SPURR, H.W., JR.; KNUDSEN, G.R. 1985. Biological control of leaf diesease with bacteria. *In* Biological control on the phylloplane. WINDELS, C.E.; LINDOW, S.E. (Ed.). St. Paul. APS. 169 p.

STEJNBERG, A; BLAKEMAN, J.P. 1973. Ultraviolet-induced changes in populations of epiphytic bacteria on beet root leaves and their effect on germination of *Botritis cinerea* spores. Physiological Plant Pathology. 3: 443-451.

VAN DER PLANK, J.E. 1963. Plant diseases: Epidemics and control. New York. Academic Press. 349 p.



..... US$4.00

Centro de Información en Fitoprotección
CATIE, 7170
Turrialba, COSTA RICA