CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE
INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA
AREA DE POSGRADO

DETERMINACION DE GLUCANO EN SUBPRODUCTOS EVALUACION DEL EFECTO DE MICROORGANISMOS GLUCANOLITICOS SOBRE *Mycosphaerella fijiensis* EN BANANO

Tesis sometida a la consideración del comité Técnico Académico del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de

MAGISTER SCIENTIAE

Por

Mario E. Talavera Sevilla.

Turrialba, Costa Rica

1996

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Jefatura del Area de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:

Elkin Bustamante, Ph.D.
Profesor Consejero

Roberto González, M.Sc.
Miembro Comité Asesor

Vera Sánchez, Ph.D.
Miembro Comité Asesor

Juan Antonio Aguirre, Ph.D.
Jefe, Area de Postgrado

Pedro Ferreira, Ph.D.
Director, Programa de Enseñanza

Mario Talavera
Candidato

DEDICATORIA

A mis padres **Abel de Jesús Talavera**

Cristina del Carmen Sevilla

Por su gran ejemplo, apoyo y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso, porque siempre ha iluminado mi camino, brindándome inteligencia y fortaleza para salir adelante.

Expreso mi mas sincero agradecimiento:

** Al Dr. Elkin Bustamante, por su amistad, su comprensión, su apoyo y excelente orientación como profesor consejero en el trabajo de tesis.

** Al MSc. Roberto González, por su enorme apoyo, su positivismo, su interés y sus oportunas y acertadas ideas en el desarrollo del trabajo de tesis.

** A la Dra. Vera Sánchez, por sus valiosas orientaciones y su gran aporte en la corrección del documento final.

** A Franklin López, por su sincera amistad, su perseverancia y su valiosa colaboración en el desarrollo de los trabajos de laboratorio.

** A los amigos Arturo Gamboa, Manrique González, Carlos Aguirre, Carlos Ruíz y Mario Cervantes; por su amistad y su apoyo oportuno y desinteresado.

** A los "Vampiros", grupo de compañeros que me brindaron su amistad y apoyo; especialmente a Sergio García, Justino González, Toribio Contreras, Francisco Gutiérrez y familia y Yudis Heredia.

** Al DAAD, por haber financiado mis estudios.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA III

AGRADECIMIENTOS IV

TABLA DE CONTENIDO V

INDICE DE CUADROS VIII

INDICE DE FIGURAS IX

RESUMEN X

SUMMARY XII

1. INTRODUCCION 1

2. REVISION DE LITERATURA 3

2.1 GENERALIDADES SOBRE SIGATOKA NEGRA Y SU AGENTE CAUSAL 3

2.1.1 Distribución geográfica y situación actual de la enfermedad. 3

2.1.2 Sintomatología de la enfermedad. 4

2.1.3 Biología de *Mycosphaerella fijiensis* y descripción del proceso infectivo 5

2.1.4. Diseminación de la enfermedad. 8

2.1.5. Factores climáticos que afectan el desarrollo de la enfermedad. 9

2.2 ASPECTOS DE LA FILOSFERA 10

2.2.1 El medio ambiente de la filosfera. 10

2.2.2 Implementación del control biológico en la filosfera. 12

2.2.2.1. La resistencia inducida. 13

2.2.2.2. El uso de microorganismos antagonistas. 15

2.2.2.3 La manipulación del ambiente. 17

2.3 ESTRATEGIAS DE MANEJO LA SIGATOKA NEGRA 18

2.3.1 El uso de fungicidas. 18
2.3.2 Prácticas culturales. 19
2.3.3 El preaviso biológico y biometeorológico. 20
2.3.4 Resistencia genética. 21
2.3.5 El control biológico como alternativa. 22
2.3.5.1 El uso de glucano como sustrato y como activador de las barreras defensivas de la planta. 23
3. MATERIALES Y METODOS 27
3.1 LOCALIZACION 27
3.2 EXTRACCIÓN DE LA GOMA DE BETA-GLUCANO 27
3.2.1 Materiales utilizados 27
3.2.2 Procedimiento. 27
3.2.3 Método de extracción modificado para el desecho de levadura de cerveza. 29
3.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE BETA-GLUCANO. 30
3.3.1 Procedimiento. 30
3.4 AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS GLUCANOLÍTICOS. 33
3.4.1 Sitios seleccionados para realizar los aislamientos. 33
3.4.2 Aplicación de glucano al follaje y procesamiento de muestras. 34
3.4.3 Preparación de medios de cultivo. 34
3.4.4 Aislamiento de microorganismos glucanolíticos. 35
3.4.5 Selección de cepas glucanolíticas. 36
3.5 PRUEBA DE ANTAGONISMO EN LABORATORIO 36
5.5.1 Procedimiento para la obtención de descarga de ascosporas. 36
3.5.2 Preparación de discos de hoja. 37
3.5.3 Multiplicación y aplicación de microorganismos glucanolíticos. 37
3.5.4 Prueba de antagonismo. 37
3.5.5 Evaluación de los tratamientos y análisis estadístico. 38
3.6 COMPATIBILIDAD DE LAS CEPAS GLUCANOLÍTICAS SELECCIONADAS A FUNGICIDAS. 38

3.6.1 Variable evaluada. 39
3.7 PRUEBA DE ANTAGONISMO EN CAMPO UTILIZANDO PLANTAS EN MACETAS. 40
3.7.1 Localización del experimento. 40
3.7.2 Preparación del material vegetal. 40
3.7.3 Preparación del material experimental. 40
3.7.4 Tratamientos evaluados y diseño experimental. 41
3.7.5 Procedimiento general. 41
3.7.6 Evaluación de tratamientos y análisis estadístico. 42

4. RESULTADOS Y DISCUSION. 43

4.1 EXTRACCIÓN DE ß-GLUCANO. 43
4.2 DETERMINACIÓN DE ß-GLUCANO. 45
4.3 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS GLUCANOLÍTICOS. 47
4.4 SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS GLUCANOLÍTICOS. 48
4.5 PRUEBA DE ANTAGONISMO A *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* EN LABORATORIO. 50
4.6 COMPATIBILIDAD DE CEPAS GLUCANOLÍTICAS A FUNGICIDAS. 53
4.7 EFECTO DE MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS GLUCANOLÍTICOS SOBRE LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD EN CAMPO UTILIZANDO PLANTAS EN MACETAS. 55
4.7.1 Condiciones climáticas. 55
4.7.2 Prueba de antagonismo. 57

5. CONCLUSIONES 60

6. RECOMENDACIONES 62

7. LITERATURA CITADA 63

8. ANEXOS 75

INDICE DE CUADROS

Número Página

Cuadro 1. Porcentaje de goma de ß-glucano obtenida a partir de los substratos evaluados..... 44

Cuadro 2. Número y porcentaje de aislamientos de organismos glucanolíticos de acuerdo al sitio de selección..... 47

Cuadro 3. Procedencia y tiempo al cual se dio la actividad glucanolítica de las cepas seleccionadas..... 49

Cuadro 4. Análisis de varianza para el efecto antagónico de cepas glucanolíticas sobre la germinación de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*..... 50

Cuadro 5. Análisis de varianza para el efecto antagónico de cepas glucanolíticas sobre la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*..... 52

Cuadro 6. Efecto de inhibición de productos químicos sobre la zona de crecimiento de las cepas glucanolíticas seleccionadas..... 54

Cuadro 7. Análisis del efecto antagónico de los tratamientos sobre *Mycosphaerella fijiensis* en campo utilizando plantas en macetas, según prueba de contrastes ortogonales..... 57

Cuadro 8. Resultados de la prueba de Tukey para el efecto antagónico de los tratamientos sobre la severidad de la enfermedad..... 58

INDICE DE FIGURAS

Número Página

Figura 1. Procedimiento para la extracción de la goma de ß-glucano..... 28

Figura 2. Porcentaje de goma de ß-glucano en los sustratos evaluados..... 44

Figura 3. Porcentaje de ß-glucano en los substratos evaluados en su estado original..... 46

Figura 4. Efecto de cepas glucanolíticas sobre la germinación de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*..... 51

Figura 5. Efecto de cepas glucanolíticas sobre la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*..... 52

Figura 6. Comportamiento semanal de la temperatura durante el período en que se desarrollo el experimento..... 55

Figura 7. Comportamiento semanal de la precipitación durante el período en que se desarrollo el experimento..... 56

Figura 8. Comportamiento semanal de la humedad relativa durante el período en que se desarrollo el experimento..... 56

Figura 9. Efecto promedio de los tratamientos sobre la severidad de la enfermedad en campo utilizando plantas en macetas..... 59

TALAVERA SEVILLA, M.E. 1996. Determinación de ß-glucano en subproductos agrícolas y evaluación del efecto de microorganismos glucanolíticos sobre *Mycosphaerella fijiensis en* banano.

Palabras claves : *Mycosphaerella fijiensis*, control biológico, ß-glucano, microorganismos antagonistas, Sigatoka negra, banano.

RESUMEN

La Sigatoka negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis,* es el principal problema fitopatológico que enfrentan los productores de banano de Centro América y de la mayoría de países del trópico donde se produce este cultivo. El manejo tradicional de la enfermedad se ha llevado a cabo a través de la aplicación de fungicidas, los cuales, debido a la agresividad del patógeno deben ser aplicados frecuentemente, provocando el desarrollo de resistencia por parte del patógeno, incrementando los costos de producción y ocasionando serios problemas de contaminación ambiental. En los últimos años, el control biológico, a través del uso de microorganismos antagonistas ha surgido como una alternativa de alto potencial. González *et al.*(1996), obtuvo resultados satisfactorios con el uso de microorganismos quitinolíticos.

Este trabajo tuvo por objetivos identificar una fuente de glucano común en nuestro medio y evaluar el efecto de microorganismos glucanolíticos sobre *Mycosphaerella fijiensis* en banano. La investigación se llevó a cabo en el CATIE, Turrialba, Costa Rica; en el laboratorio de diagnóstico y en campo, utilizando vitroplantas de la variedad Gran Enano sembradas en macetas.

Se determinó el contenido de ß-glucano en los substratos semolina de arroz, avena comercial, bagazo de caña de azúcar, granza de arroz y desecho de levadura de cerveza; seleccionándose este último, el cual es muy común en nuestro medio, es barato y rindió un buen porcentaje de ß-glucano, cuya extracción se efectuó por medio de un método sencillo y barato.

Ciento noventa y seis cepas bacteriales, 37 de las cuales pertenecieron al género *Bacillus,* se aislaron de plantas de banano de la variedad Gran Enano. Estos microorganismos fueron

purificados y luego evaluados en medio agar-glucano y agar nutriente-glucano, seleccionándose siete cepas, las cuales mostraron la mayor actividad glucanolítica en el menor tiempo. A nivel de laboratorio, utilizando discos de hoja de banano, cuatro de estas cepas, identificadas con los códigos GS2, GBC2, GS3 y GC1, mostraron un buen efecto antagónico sobre ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*, inhibiendo su germinación en un 25%, !8%, 14% y 9%, respectivamente y reduciendo la longitud del tubo germinativo en un 47%, 37%, 40% y 38%, respectivamente. Estas cepas también mostraron, a nivel de laboratorio, buena compatibilidad con los fungicidas mas usados en banano.

A nivel de campo, se probó el efecto antagónico de las cuatro cepas bacteriales aplicadas con y sin glucano, al igual que el efecto del glucano aplicado solo, sobre la severidad de la enfermedad, utilizando plantas de la variedad Gran Enano sembradas en macetas e inoculadas en forma natural con el patógeno. Todos los tratamientos mostraron diferencias significativas con respecto al testigo (agua), controlando la enfermedad en un 58.5% en promedio. De acuerdo a la prueba de contrastes, no se encontraron diferencias significativas entre grupos de tratamientos, lo cual puede deberse a la doble acción del glucano al incrementar las poblaciones de otros microorganismos, particularmente glucanolíticos, y la activación de los mecanismos de defensa de la planta, especialmente las glucanasas. La prueba de Tukey al 5% detectó diferencias significativas para los tratamientos GS3 + glucano, GS2 + glucano, la cepa GS2 sola y el Glucano, los cuales redujeron la severidad de la enfermedad en un 67.0, 66.2, 65.4 y 65.0 porciento, respectivamente.

TALAVERA SEVILLA, M. E. 1996. Determination of ß-glucan in agricultural subproducts and evaluation of glucanolitic microorganisms on *Mycosphaerella fijiensis* in bananas.

Key words: *Mycosphaerella fijiensis*, biological control, ß-glucan, antagonistic microorganisms, black sigatoka, bananas.

SUMMARY

Black sigatoka, caused by the fungus *Mycosphaerella fijiensis*, is the principal phytopathological problem faced by banana producers in Central America and in the majority of tropical countries where this crop is cultivated. The traditional management of the disease has been through the aplication of fungicides, which, due to the aggresiveness of the pathogen must be applied frequently, inducing the development of resistance by the pathogen, increasing the costs of production and causing serious problems of environmental contamination. In the last few years, biological control, through the use of antagonistic microorganisms, has emerged as a highly potential alternative. González *et al.*(1996), obtained satisfactory results using quitinolitic microorganisms.

This study had as its objective to identify, locally, a common glucan source and to evaluate the effect of glucanolitic microorganisms on *Mycosphaerella fijiensis* in bananas. The research was conducted at CATIE, Turrialba, Costa Rica; in the diagnostic laboratory and in the field, using vitroplants of the Grand Nain variety planted in pots.

ß-glucan content was determined for the substrates; rice bran, commercial oats, sugarcane bagasse, rice hull and yeast residue of beer processing; the last being selected due to its easy availability, its low cost and its yield of a good percentage of ß-glucan, whose extraction was accomplished by a economic and simple method.

A hundred and ninety six bacterial lines, of which 37 belonged to the genus *Bacillus*, were isolated from plants of the Grand Nain variety. These microorganisms were purified and later evaluated in agar-glucan and nutrient agar-glucan medium, resulting in the selection of seven lines, which showed the major glucanolitic activity in the least time. At laboratory level, using

banana leaf discs, four of these lines, identified with the codes GS2, GBC2, GS3 and GC1, showed good antagonistic effects on *M. fijiensis* ascospores, inhibiting its germination in a 25%, 18%, 14% and 9% respectively and reducing the lenght of the germinative tube in a 47%, 37%, 40% and 38%, respectively. These lines also exhibited, at laboratory level, good compatibility with the most utilized fungicides in bananas.

The antagonistic effect of the four bacterial lines applied with or without glucan, and glucan only on the severity of the disease was field tested, using plants of the Grand Nain variety planted in pots and inoculated naturally with the pathogen. All treatments showed significant differences with respect to the control (water), controlling the disease on an average of 58.5%. In accordance with a contrast analysis, there were no significant differences between groups of treatments, which could be a result of the double activity of the glucan, increasing the populations of other microorganisms, particularly glucanolitic organisms, and the activation of defense mechanisms of plants, especially glucanases. The tukey test at 5% detected significant differences for the GS3 + glucan, GS2 + glucan, GS2 line only and the glucan only treatments, which reduced the severity of the disease on a 67.0, 66.2, 65.4 and 65.0%, respectively.

DETERMINACION DE GLUCANO EN SUBPRODUCTOS AGRICOLAS Y EVALUACION DEL EFECTO DE MICROORGANISMOS GLUCANOLITICOS SOBRE *Mycosphaerella fijiensis* EN BANANO.

1. INTRODUCCION

El banano es uno de los cultivos más importantes en Centro América y en general, en la mayoría de países del trópico, tanto por la superficie dedicada a su siembra, como por el valor de su producción. Genera una entrada alta de divisas, emplea gran cantidad de mano de obra y promueve una considerable actividad económica por el monto de los insumos y horas/hombre dedicados a su producción, mercadeo y agroindustria.

Sin embargo, el banano enfrenta serios problemas patológicos, los cuales reducen de manera sustancial su rendimiento e incrementan los costos de producción. La Sigatoka negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, es en la actualidad la enfermedad de mayor importancia económica del cultivo. La cual, se encuentra ampliamente diseminada en América Central (Stover, 1989). Según Wilson (1985), el patógeno es altamente virulento en el trópico húmedo, pudiendo causar pérdidas cuantiosas sino se implementan medidas de manejo adecuadas.

La enfermedad provoca un rápido deterioro del área foliar de la planta cuando no se le combate. La disminución de la capacidad fotosintética afecta el crecimiento y productividad de las plantas, y produce una reducción de la calidad de la fruta al favorecer la maduración prematura (González, 1995).

El manejo de la enfermedad se ha basado en el uso casi exclusivo de fungicidas, los cuales, debido a su gran agresividad, se aplican con mucha frecuencia. Este tipo de manejo ha incrementado los costos de producción, además de estar propiciando el desarrollo de resistencia del agente causal a dichos productos.

Por otro lado, el uso excesivo de fungicidas representa una seria amenaza para la salud de las personas involucradas en el proceso productivo y atenta contra la conservación del ambiente en las zonas productoras y sus alrededores.

Es necesario buscar nuevas opciones de manejo para su combate de manera que reduzcan el uso indiscriminado de fungicidas. Una alternativa viable al problema es la implementación del Control Biológico dentro de un programa de Manejo Integrado. Este no causa contaminación ambiental, no representa riesgos para la salud pública y podría ser más rentable que el control químico (Hanson e Hilje, 1993), por lo que podría ser económica y ecológicamente deseable.

Dentro del Control Biológico de enfermedades de la filosfera, el uso de microorganismos antagonistas, capaces de habitar y colonizar el nicho ecológico del patógeno, se presenta como una opción de alto potencial.

Según Broglie *et al.* (1994) uno de los principales constituyentes de la pared celular de los hongos fitopatógenos es el glucano, un polímero de cadena larga. Este hecho sugiere la posibilidad de implementar el uso de substratos con base en glucano para incrementar las poblaciones de microorganismos glucanolíticos de la filosfera, capaces de reducir la incidencia y el daño causado por hongos fitopatógenos tan destructivos como *Mycosphaerella fijiensis,* lo cual puede servir como complemento a la ya comprobada habilidad de microorganismos quitinolíticos (González, 1996) en el control de dicho patógeno.

Basados en lo anterior, el presente trabajo tuvo por objetivos principales identificar una fuente de glucano común en nuestro medio, así como el aislamiento de microorganismos glucanolíticos y la evaluación de su capacidad antagónica a *Mycosphaerella fijiensis* a nivel de laboratorio y campo.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Generalidades sobre Sigatoka negra y su agente causal.

2.1.1 Distribución geográfica y situación actual de la enfermedad.

La Sigatoka negra se describió por primera vez como una nueva enfermedad de las musaceas en Fiji en 1963 (Leach, 1964). Posteriormente fue reportada en otras regiones asiáticas, las islas del pacífico y África (Bureau, *et al.*, 1992); aunque en varios de estos lugares se le conocía como 'raya negra'.

En el continente americano, la Sigatoka negra fue observada por primera vez en Honduras en el año 1972 (Stover, 1980). La enfermedad se ha diseminado ampliamente desde entonces, encontrándose actualmente en la totalidad del área centroamericana, México, el Caribe y varios países de Sur América (Mourichon y Fullerton, 1990); incluyendo Venezuela, país en el cual se reportó en 1992 (Haddad *et al.*, citado por Ruiz, 1995).

La enfermedad, por su agresividad y dificultad de control, se ha constituido en el principal problema fitopatológico para la industria agrícola bananera. La alta capacidad destructiva de la enfermedad ha obligado a los productores a modificar las estrategias de combate, aumentando el número de aplicaciones de productos fungicidas por año, lo cual ha originado el desarrollo de resistencia por parte del patógeno a varios de estos productos, teniendo entonces que recurrir a la utilización de nuevos productos o a la utilización de mezclas mas eficaces para lograr su control, incrementado substancialmente los costos de producción.

En Costa Rica, la Sigatoka negra es la principal responsable de la disminución de los rendimientos, los cuales pasaron de 2620 cajas por hectárea por año en 1990 a 1850 cajas en 1994 (Sauma, 1995).

El manejo de la enfermedad basado en la utilización de productos químicos sintéticos es una estrategia muy cuestionada en la actualidad y existe un consenso general en que se necesita de medidas alternativas menos dañinas al medio ambiente, la biodiversidad y la salud humana.

Actualmente los trabajos de investigación relacionados con el combate de la enfermedad se encaminan a la búsqueda de materiales resistentes, el desarrollo de fungicidas mas eficaces y la implementación del control biológico, principalmente a través del uso de microorganismos antagonistas al patógeno, los cuales puedan ser incluidos dentro de un programa de manejo integrado.

2.1.2 Sintomatología de la enfermedad.

El desarrollo de los síntomas de la Sigatoka negra sobre la planta está directamente influenciado por las condiciones climáticas (Fouré, 1992). De acuerdo a las observaciones realizadas por Bureau *et al.* (1992), el desarrollo de la enfermedad puede ser dividido en los siguientes seis estadios:

Estadio 1: En la fase inicial se presenta como una pequeña decoloración, conocida como pizca, de aproximadamente 1 mm de largo, de color blanco a amarillo y visible únicamente en el envés de la hoja. Su observación requiere de la exposición del envés de la hoja a la luz.

Estadio 2: La decoloración se transforma en una estría de 2 a 3 mm de largo, de color rojizo. Esta puede observarse en ambos lados de la hoja.

Estadio 3: Estría mas larga y mas ancha. En este estadio aparecen los conidióforos.

Estadio 4: Se presenta como una mancha oval de coloración marrón a café oscuro en el envés y negra en el haz de la hoja.

Estadio 5: Se presenta como una mancha totalmente negra, de forma elíptica y rodeada por un halo amarillo cuyo centro empieza a deprimirse.

Estadio 6: Este es el estadio final del desarrollo de la enfermedad y se caracteriza porque el centro de la lesión se seca y toma una coloración blanco-grisáceo, en la que pueden observarse claramente los peritecios.

Según Meredith y Lawrence (1969), la coalescencia de las lesiones sobre la hoja, la cual toma una coloración oscura, ocurre 3 o 4 semanas después de que aparecen los primeros síntomas.

2.1.3 Biología de *Mycosphaerella fijiensis* y descripción del proceso infectivo.

El hongo ***Mycosphaerella fijiensis*** pertenece a la clase *Ascomycetes*, subclase *Loculoascomycetidae*, orden *Dothidiales*, familia *Dothideaceae*, género *Mycosphaerella* (Alexopoulus y Mims, 1979).

Este hongo se reproduce en forma sexual y asexual durante su ciclo de vida. La fase asexual se caracteriza por la formación de conidióforos, en cuyas estructuras se producen las esporas asexuales o conidios. Esta fase se presenta en los primeros estadios de desarrollo de la enfermedad (pizcas, manchas), durante los cuales los conidióforos salen de los estomas, principalmente en la superficie inferior de la hoja (Marín y Romero, 1992).

La emergencia de conidióforos es constante hasta el segundo estadio de mancha, a partir del cual, pocos nuevos conidióforos se desarrollan (Meredith y Lawrence, 1969). De acuerdo a Cervantes *et al* (1991) se pueden encontrar hasta 33 conidióforos por mm^2 de tejido afectado por síntoma 2 según escala de Fouré.

La producción de conidios es casi continua entre el segundo estado de estría y el segundo estado de mancha. Los primeros conidióforos en cesar la producción de conidios son los situados cerca del centro de la mancha, mientras los situados en la periferia de la misma son los últimos en cesar su producción. Los conidióforos emergen individualmente o en grupos de 2 a 8 (comúnmente 2 a 4) a través de los estomas situados en la superficie inferior de la hoja, emergiendo pocos conidióforos a través de los estomas situados en la superficie superior de la

lesión. Estos conidióforos emergen a partir de hifas presentes en la cavidad subestomática (Meredith y Lawrence, 1969).

Los conidióforos tienen forma recta a curva y son raramente ramificados en la base. Su coloración va de blanquecino a café oliváceo y pueden tener de cero a cinco septos. Su longitud y diámetro promedio son de 32µm y 5.5µm respectivamente. Cada conidióforo presenta una o más cicatrices de tamaño medio cerca de su parte terminal, lo cual es una característica importante en el diagnóstico. Además de conidióforos, en los estadios tempranos de estrías una o más hifas vegetativas pueden emerger a través de los estomas en la superficie inferior de la lesión, continuando su producción hasta el estadio de mancha. Los conidios son formados solitariamente en la punta del conidióforo, volviéndose luego a una posición lateral (si aún están adheridos) debido a los diversos grados de proliferación apical del conidióforo. En el campo, hasta 4 conidios en estado maduro pueden encontrarse adheridos a un solo conidióforo. Los conidios son rectos o medianamente curvados, son de un color verdoso pálido a oliváceo y con un número promedio de septos entre 5 y 7 (Meredith y Lawrence, 1969).

La fase sexual del hongo se caracteriza por la formación de espermogonios y pseudotecios (peritecios). Las esporas sexuales son las ascosporas, las cuales se producen en gran número en los pseudotecios.

Los espermogonios comienzan a desarrollarse en el segundo estadio de mancha, siendo mas abundantes en la superficie inferior de la lesión. La agregación de hifas hialinas dentro de la cámara subestomática es la primera indicación de que un espermogonio está a punto de formarse. Los espermogonios están consistentemente asociados a los conidióforos de *M. fijiensis*, provocando su desprendimiento de la hifa madre.

Los peritecios típicos del hongo son anfígenos, pero más abundantes en la superficie superior de la mancha. se encuentran dispersos e inmersos, perforando la epidermis por un ostiolo papilado fino o moderadamente grueso. Son globosos, con un diámetro de 50 a 85 µm; su pared está compuesta por 3 o mas capas de células poligonales color café-oscuro.

Las ascas son numerosas, bitunicadas, obclavadas; con 8 ascosporas y carentes de parafisos. Las ascosporas son biseriadas, uniseptadas, con una ligera constricción en dicho septo. Son de forma clavada-fusoide, con la célula mas grande situada en la parte superior del asca; son hialinas y miden un promedio de 13.7 x 3.7 µm (Meredith y Lawrence, 1969).

Mycosphaerella fijiensis esporula abundantemente sobre hojas infectadas (Leach, 1964; Meredith y Lawrence,1969). Durante las etapas tempranas del desarrollo de la lesión (pizcas y estrías) hay una producción relativamente escasa de conidióforos y conidios. En posteriores etapas (manchas) hay una producción copiosa de peritecios y ascas. La infección primaria en plantas jóvenes de cultivos nuevos ocurre casi exclusivamente debido a ascosporas transportadas por el viento. En plantaciones viejas se da la infección tanto por conidios como por ascosporas, predominando este último tipo (Meredith y Lawrence, 1973).

La infección usualmente comienza en el margen inferior izquierdo de la hoja debido a que esa área es la que primero se expone al inóculo en el campo, una vez que la hoja candela o cigarro se desenrolla. Además, la morfología de la hoja sugiere una mayor acumulación de humedad en esa área, una condición necesaria para el establecimiento y germinación de las esporas (Stover, 1980).

Una vez que los conidios o ascosporas están sobre la superficie de la hoja, estos tardan un período aproximado de 6 horas en germinar, si las condiciones de temperatura y humedad son favorables. Después de su germinación los tubos germinativos se alargan y penetran a través de los poros estomáticos en un período de 12 a 15 horas (Vásquez *et al*, 1989). Según Bureau *et al* (1992), en ciertos casos puede darse un período de crecimiento epífito de 4 a 6 días previo a la penetración

Una vez que el tubo germinativo logra penetrar a través del estoma, este se ramifica en la cavidad subestomática, estableciéndose la infección. Posteriormente las hifas del patógeno emergen por los estomas, pudiendo desarrollar conidióforos o crecer sobre la superficie e infectar estomas adyacentes; este desplazamiento causa el desarrollo de lesiones sobre toda la

hoja (Stover, 1980). El período de incubación y el desarrollo visible de la enfermedad, desde el primer estadío hasta la necrosis, están estrechamente relacionados con las condiciones climáticas prevalecientes (Bureau *et al*, 1992).

2.1.4. Diseminación de la enfermedad.

La diseminación de la enfermedad se lleva a cabo tanto por medio de las ascosporas como de los conidios, ya que ambos tienen la capacidad de causar infección. En el proceso de diseminación se pueden diferenciar dos fases: la primera es la liberación de las ascosporas y/o los conidios y la otra consiste en el transporte de dichas estructuras reproductivas (Bureau *et al.*, 1992).

Una estría joven, de no mas de 20 mm^2 es capaz de producir hasta 1200 conidios en su superficie inferior. Los conidios, cuando están maduros, son liberados con la ayuda del salpique del agua y del viento (Stover, 1980). Una vez liberados, el transporte se realiza por medio del agua y el viento. El transporte por agua es vertical, sobretodo responsable de la infección de plantas vecinas y de los hijos, y también de las reinfecciones (Bureau *et al.*, 1992). Según Fouré (1992), el número de conidios transportados por el viento es cien veces menor al número de ascosporas transportadas.

Las ascosporas son elementos de mayor importancia que los conidios en la diseminación de la enfermedad. En conteos realizados en áreas fuertemente infectadas se ha encontrado de 8000 a 33000 ascosporas por metro cúbico de aire en un período de 24 horas. Bajo condiciones climáticas favorables las ascosporas maduran 2 semanas después del estado de estría.

Cada peritecio produce una sola cosecha de ascosporas, sin embargo se ha encontrado que las descargas de ascosporas continúan hasta por 23 días después de que la hoja ha sido cortada y dejada en el suelo, lo cual indica que los peritecios continúan madurando en el suelo después de que la hoja ha sido separada de la planta (Stover, 1980).

Cuando el peritecio se moja y las ascosporas están maduras, estas son expulsadas y diseminadas por las corrientes de aire en un transporte lateral y ascendente, el cual es responsable de la

diseminación de la enfermedad a largas distancias (Bureau *et al.*, 1992). Según Fouré (1992), la lluvia tiene una relación clara con el vuelo de ascosporas, ya que en el momento en que llueve o inmediatamente después, se detecta un mayor vuelo de las mismas. Esto se debe, sin duda, a una mayor liberación de las ascosporas.

2.1.5. Factores climáticos que afectan el desarrollo de la enfermedad.

La biología de *Mycosphaerella fijiensis* y el desarrollo de la Sigatoka negra están estrechamente ligados a los factores climáticos del medio ambiente.

La lluvia, la humedad relativa, el rocío y la temperatura son consideradas como las principales variables climáticas que afectan el desarrollo de esta enfermedad (Marín y Romero, 1992 ; Gauhl, 1992 ; Stover, 1980 ; Stover, 1983). Estudios realizados por González y Jaramillo (1979), demostraron que las condiciones de tiempo caluroso y lluvioso, así como una alta humedad relativa, favorecen la rápida propagación de la enfermedad y un alto porcentaje de infección.

Tapia y Mata (1993), encontraron que el porcentaje de germinación de los conidios es mayor a temperaturas de 27 °C. Mientras tanto, Stover (1983), cita que la temperatura óptima para el desarrollo del tubo germinativo es de 28 °C. En general, las temperaturas mínimas parecen ser mas limitantes para el establecimiento y desarrollo del patógeno, mientras que las temperaturas máximas son rara vez limitantes (Marín y Romero, 1992).

La lluvia posee un papel muy importante en la liberación del inóculo y provee condiciones de humedad que favorecen la germinación de las esporas y el desarrollo de las infecciones. Según Fouré (1992), la duración del período en que se desarrollan los síntomas está correlacionada de manera significativamente positiva con el número de horas con humectación foliar.

Se considera que el rocío también es una variable climática de mucha importancia en el desarrollo de las infecciones causadas por *M. fijiensis*, ya que este provee la humedad necesaria para que la germinación de las ascosporas y/o conidios se lleve a cabo, lo cual es muy importante en ausencia o escasez de precipitación normal (Stover, 1980).

2.2 Aspectos de la filosfera.

2.2.1 El medio ambiente de la filosfera.

Existen muchas evidencias que demuestran que el control biológico natural provee protección contra un gran número de enfermedades foliares en el campo. La superficie de las partes aéreas de las plantas proveen un hábitat para el desarrollo de un gran número de microorganismos, muchos de los cuales son capaces de influenciar el crecimiento de los microorganismos patógenos. Estos microorganismos epífitos juegan un papel muy importante en la reducción de la incidencia de enfermedades foliares de cultivos en el campo (Blakeman y Fokkema, 1982).

El efecto antagónico de microorganismos foliares sobre organismos patógenos, depende en gran medida de las condiciones climatológicas y químicas prevalecientes en el microhabitat en el cual se encuentran ambos organismos. Este microhábitat especializado, usualmente llamado filosfera, tiende a mantener un balance biológico natural entre los organismos saprófitos o epífitos y los patógenos (Blakeman y Fokkema, 1982).

Según Windels y Lindow (1985), el control biológico de patógenos de la filosfera se ve limitado debido a que las interacciones bióticas y las condiciones abióticas en dicho microhabitat son complejas y difíciles de regular.

La filosfera se caracteriza porque las condiciones ambientales en la superficie de las hojas fluctúan mucho mas rápido en relación a lo que ocurre en la rizosfera. La variación de la temperatura dentro de una misma planta o en la superficie de una misma hoja y la variación en las temperaturas diurnas y nocturnas son eventos normales y propios de la filosfera (Blakeman, 1985). Según Hirano y Upper (1983), la filosfera ha sido frecuentemente vista como un ambiente hostil ya que sus habitantes están expuestos a fluctuaciones extremas de temperatura, a la radiación visible y ultravioleta y a períodos de desecación.

La humedad relativa es el factor de mayor influencia en el crecimiento y sobrevivencia de los microorganismos en la filosfera. Diferencias de humedad entre la superficie de las hojas y el aire circundante son el resultado de su continua transpiración ; un proceso determinado por el

espesor de la capa límite y la apertura estomática (Blakeman, 1985). La provisión irregular de humedad en la superficie de las hojas resulta en un crecimiento intermitente de los microorganismos, particularmente bacterias y hongos filamentosos, presentándose problemas de sobrevivencia durante períodos de sequía (Blakeman y Fokkema, 1982).

Por otro lado, la formación de rocío y la precipitación son elementos de mucha importancia en el crecimiento de los microorganismos foliares, ya que ambos contribuyen a mantener la superficie foliar mojada y una alta humedad relativa. La presencia de sustancias químicas hidrofóbicas en la superficie de las hojas y las rugosidades de estas también influyen en la retención y distribución del agua en la superficie foliar (Blakeman, 1985).

La disponibilidad de nutrientes en el área foliar tiene una marcada influencia en las poblaciones de microorganismos epífitos. En etapas tempranas del desarrollo vegetal, estos microorganismos obtienen sus nutrientes principalmente a partir del contenido celular que escapa de los tejidos foliares. Durante este período la disponibilidad de nutrientes es limitada, por lo que la población microbiana, compuesta principalmente por bacterias, es baja. En etapas mas avanzadas, otros componentes foráneos como el polen y secreciones de áfidos se encuentran disponibles y es cuando las poblaciones microbianas se incrementan (Blakeman y Fokkema, 1982).

Otros materiales que llegan a la superficie foliar y que proveen nutrientes para la microflora epífita incluyen restos de suelo y partículas de polvo, sustancias liberadas a partir de esporas de hongos (incluyendo carbohidratos y aminoácidos) y metabolitos microbiales extracelulares. De igual manera, las ceras de la cutícula son utilizadas por algunas levaduras epífitas (Morris y Rouse, 1985).

De las numerosas sustancias orgánicas e inorgánicas presentes en la superficie de la hoja, incluyendo aminoácidos esenciales, monosacáridos, polisacáridos, ácidos orgánicos y numerosos macronutrientes y micronutrientes, una cantidad considerable es perdida debido al efecto de lavado producido por la lluvia, el rocío, la neblina y la bruma (Blakeman y Fokkema, 1982 ; Hirano y Upper, 1983).

Según Blakeman y Fokkema (1982), las hojas de ciertas plantas también pueden secretar sobre su superficie sustancias fenólicas o terpenoides, las cuales inhiben el crecimiento microbial. Algunas levaduras producen ácidos grasos insaturados que restringen el crecimiento de algunas bacterias y promueven el crecimiento de otras levaduras (Morris y Rouse, 1985).

2.2.2 Implementación del control biológico en la filosfera.

El control biológico puede ser definido como la reducción de la cantidad de inóculo o las actividades de un patógeno tendientes a causar enfermedad mediante la acción de uno o mas organismos diferentes al hombre (Cook, 1983).

El control biológico de patógenos foliares es un área de investigación relativamente reciente y mucho menos desarrollada en relación al control biológico de patógenos de la rizósfera. Esto se debe principalmente a la uniformidad del medio ambiente en la rizósfera, lo cual contribuye a que los microorganismos puedan mantener sus poblaciones mas estables. Los microorganismos de la filosfera, por el contrario, se ven afectados por un ambiente en el que las condiciones son cambiantes y aveces impredecibles, lo cual hace que su microhabitat se mantenga en un estado de continua fluctuación (Blakeman y Fokkema, 1982).

Otro aspecto que ha contribuido significativamente al poco desarrollo de estrategias de control biológico de patógenos de la filosfera es la disponibilidad constante de productos fungicidas efectivos, de rápida acción, relativamente baratos y de fácil aplicación; lo cual viene a desincentivar la investigación en dicha área (Blakeman y Fokkema, 1982).

Una de las tácticas que mas se ha usado en el control biológico de patógenos foliares es la aplicación a la planta de microorganismos antagonistas. Estos microorganismos deben ser, preferiblemente, residentes de la superficie aérea de la planta, ya que estos están adaptados a sobrevivir y crecer en dicho hábitat, haciendo mas fácil la colonización de la planta (Blakeman y Fokkema, 1982). Otras estrategias , como la manipulación del ambiente y la inducción de resistencia, también están siendo objeto de mucho estudio en la actualidad.

Para lograr la implementación exitosa del control biológico de patógenos foliares es indispensable contar con un amplio conocimiento de las condiciones del microambiente de la filosfera, así como de las propiedades del patógeno y los microorganismos antagonistas (Blakeman, 1985).

Un hecho importante es el surgimiento, en los últimos años, de políticas ambientalistas tendientes a reducir el impacto negativo de los productos químicos sintéticos sobre el medio ambiente, la biodiversidad y la salud humana; con lo cual, el control biológico, aplicado dentro de un programa de manejo integrado, viene a convertirse en una alternativa de mucho potencial para enfrentar los problemas fitosanitarios.

2.2.2.1. La resistencia inducida.

La utilización de los mecanismos de defensa propios de la planta mediante la aplicación de tecnologías para inducir resistencia es otra alternativa promisoria que puede reducir el uso irracional e indiscriminado de pesticidas químicos en el manejo de plagas y enfermedades de las plantas.

La resistencia inducida puede entenderse como una resistencia intensificada o fortalecida en una planta con respecto a patógenos como resultado de un tratamiento previo con un patógeno, un patógeno atenuado o un producto químico que, como tal, no es un pesticida (Deverall y Dann, 1995).

La expresión de la resistencia inducida puede ser local o sistémica. Es localizada cuando la respuesta se da en el sitio donde se aplica el tratamiento inductor y sistémica cuando la respuesta es efectiva en todas o algunas partes de la planta, distantes del sitio de inducción (Deverall y Dann, 1995).

La resistencia sistémica inducida o resistencia sistémica adquirida (SAR), es en la actualidad de gran interés ya que es efectiva contra un amplio rango de patógenos, incluyendo virus, bacterias y hongos; pudiendo durar por períodos de tiempo prolongados (Kombrink y Somssich, 1995).

La protección de algunos cultivos contra ciertas enfermedades a través de la resistencia sistémica inducida ha sido demostrada bajo condiciones de campo (Heath, 1995). A nivel de laboratorio se ha logrado demostrar la inmunización en mas de 25 cultivos diferentes, incluyendo cereales, legumbres, cucurbitaceas, solanaceas, árboles y frutas menores; contra un amplio espectro de patógenos foliares y radiculares (Tuzun y Kloepper, 1995).

En la actualidad se conocen un gran número de organismos, sustancias y productos químicos inductores de resistencia. Entre estos están algunos organismos patogénicos, tal es el caso de la protección de plantas de tabaco contra la enfermedad del moho azul mediante la aplicación de suspensiones de esporangiosporas de *Peronospora tabacina*, el agente causal de dicha enfermedad (Tuzun y Kloepper, 1995).

La utilización de organismos no patogénicos como inductores de resistencia incluye suspensiones y/o filtrados de bacterias saprófitas como *Bacillus subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. pumulis* y *Erwinia herbicola*. Además se ha sugerido la inducción de resistencia a través del uso de micorrizas contra hongos, bacterias y nemátodos. Las rizobacterias además de haber sido reconocidas como promotoras del crecimiento (PGPR), juegan un papel importante en la inducción de resistencia. En el cultivo de frijol, por ejemplo, el tratamiento de la semilla con una cepa de *Pseudomonas fluorescens* redujo los daños causados por la posterior inoculación de *P. syringae pv. phaseolicola* (Tuzun y Kloepper, 1995).

Algunos materiales derivados de extractos de plantas también han demostrado ser buenos inductores de resistencia. El ácido oxálico obtenido de plantas de espinaca, por ejemplo, induce resistencia contra *Colletotrichum orbiculare* en pepino. De igual manera, una serie de sustancias químicas como el sodio dipotásico, fosfato de sodio tripotásico, ácidos grasos insaturados, ácido salicílico, ethaphon, chitosan (Tuzun y Kloepper, 1995); fenilalanina, polímeros de quitina, glucanos y lípidos provenientes de hongos (Lyon *et al.*, 1995), tienen la capacidad de inducir respuestas defensivas en la planta.

La exposición a pequeñas cantidades de luz ultravioleta (254 nm UV-C) y el tratamiento de frutos con $CO2^2$ también han demostrado tener un efecto inmunizante en frutas y vegetales, protegiéndoles de enfermedades post-cosecha (Tuzun y Kloepper, 1995).

Aunque los mejores resultados en el área de inducción de resistencia a patógenos se han obtenido principalmente a nivel de laboratorio, no cabe duda de que esta nueva estrategia al ser segura, efectiva y persistente, puede llegar a convertirse, en el futuro cercano, en una excelente alternativa al uso indiscriminado de pesticidas para controlar las enfermedades de las plantas.

2.2.2.2. El uso de microorganismos antagonistas.

Se considera que un microorganismo antagonista es aquel que interfiere con las actividades de otro microorganismo con el cual comparte un mismo nicho ecológico.

Generalmente se reconocen tres formas de antagonismo, a saber: competencia, antibiosis y depredación o hiperparasitismo. El uso de depredadores e hiperparásitos tiene como objetivo reducir el daño y no eliminar el patógeno. Estos son mas efectivos contra infecciones secundarias debido a que hay un tiempo de exposición mayor para que ocurra el contacto y destrucción del patógeno, requisito indispensable del cual carecen en infecciones primarias. La competencia de los antagonistas se da principalmente por nutrientes, sin embargo, en el control biológico la competencia por oxígeno y posiblemente por espacio es también importante. La antibiosis se refiere a la inhibición de un microorganismo por la acción de un metabolito producido por otro microorganismo. Normalmente los metabolitos son sustancias tóxicas, como los antibióticos gliotoxin y viridin producidos por el hongo *Trichoderma viride*, un efectivo antagonista a *Rhizoctonia solani*. Al contrario de lo que sucede con los organismos competidores e hiperparásitos, la antibiosis es un mecanismo rápido que generalmente resulta en endólisis (Baker y Cook, 1982).

El éxito de cualquier microorganismo antagonista depende de su capacidad para multiplicarse sobre la superficie de la planta y colonizar la misma. De acuerdo a ello, es preferible utilizar

aquellos microorganismos residentes, los cuales están adaptados a las condiciones prevalecientes en su hábitat (Blakeman y Fokkema, 1982).

La gran mayoría de los antagonistas son saprófitos. En el control biológico de fitopatógenos se incluyen antagonistas como bacterias, hongos, virus, protozoarios, nemátodos, ácaros y algunos otros de menor importancia. Las bacterias presentan el mayor potencial en el control biológico de fitopatógenos debido sobretodo a que es el grupo mas numeroso, a su rapidez de crecimiento y multiplicación y a su habilidad para utilizar diferentes formas de nutrientes bajo un amplio rango de condiciones. Estas son especialmente importantes como antagonistas de patógenos que producen tubos germinativos (Baker y Cook, 1982).

Los hongos, por su parte, son el grupo que mas atención ha recibido como antagonistas, posiblemente por la facilidad para manipularlos e identificarlos. Estos son altamente efectivos a través de la competencia y el hiperparasitismo y algunos producen potentes antibióticos, tal es el caso de *Trichoderma* y *Gliocladium* (Baker y Cook, 1982).

El aislamiento de microorganismos antagonistas específicos requiere de la utilización de medios selectivos, y de ser posible, de la aplicación de enmiendas foliares especiales que promuevan el crecimiento de las poblaciones de dichos organismos. Bajo ciertas condiciones es posible favorecer el crecimiento de los antagonistas mediante la manipulación del ambiente de la filosfera. Una de las técnicas mas exitosas es la alteración de las características químicas de la filosfera mediante la aplicación de substratos que sirvan como fuente de nutrientes para la población del antagonista deseado (Blakeman y Fokkema, 1982).

Una primera fase, muy importante en la selección de microorganismos antagonistas, es la comprobación de su capacidad antagónica. Las pruebas de laboratorio pueden dar alguna indicación del mecanismo de interacción entre el antagonista y el patógeno (producción de antibióticos, hiperparasitismo, etc.), así como de los efectos morfológicos causados por el antagonista sobre el patógeno, a saber: inhibición de la germinación, crecimiento anormal del tubo germinativo e interferencia con el desarrollo normal de estructuras infecciosas (Blakeman y Fokkema, 1982).

Una segunda fase es el estudio de las interacciones entre el antagonista y el patógeno sobre plantas hospederas bajo condiciones controladas (invernadero, casa de mallas), en las cuales la densidad poblacional del antagonista debe ser monitoreada y el crecimiento de la población del patógeno pueda ser comparada con la población presente en plantas no tratadas con el antagonista (Blakeman y Fokkema, 1982).

A nivel de campo, la determinación de la microflora sobre plantas tratadas y no tratadas con el antagonista es esencial para lograr una adecuada interpretación de las interacciones antagonista-patógeno. Además, es esencial comparar los efectos del antagonista sobre el desarrollo del patógeno y el desarrollo de la enfermedad (Blakeman y Fokkema, 1982).

2.2.2.3 La manipulación del ambiente.

La manipulación del ambiente se fundamenta en la modificación o alteración de las características físicas y/o nutricionales de la filosfera con el objetivo de proveer condiciones favorables al desarrollo y establecimiento del microorganismo antagonista y/o desfavorables para el patógeno.

Modificar el ambiente físico de la filosfera a nivel de campo es difícil, pudiéndose lograr una considerable modificación del microclima de la superficie foliar mediante la alteración de la arquitectura de la planta y/o el ajuste de la densidad de siembra. Alternativamente, el ambiente químico, especialmente las variables nutricionales, pueden ser manipuladas mas fácilmente a través de la aplicación de nutrientes apropiados a la filosfera (Morris y Rouse, 1985).

Se ha logrado determinar que la cantidad de nutrientes disponibles para el crecimiento de los microorganismos epífitos en la filosfera es muy baja, constituyéndose este en un factor limitante; particularmente al inicio de la etapa de crecimiento de la planta, cuando las cantidades de compuestos conteniendo carbono y nitrógeno son bajas, lo cual se refleja en una baja población microbial (Blakeman, 1985).

La aplicación de substratos al follaje es una estrategia mediante la cual se busca adicionar nutrientes especiales que vengan a estimular el crecimiento de los microorganismos epífitos antagonistas y/o inducir una mayor competencia entre los mismos (El Ghaouth *et al.*, 1995). Esta estrategia requiere de un amplio conocimiento del ecosistema de la filosfera, siendo necesaria la correcta identificación de la variable o variables nutricionales que favorecen o perjudican la actividad del antagonista o el patógeno (Morris y Rouse, 1985).

Mediante esta estrategia es posible estimular un rápido crecimiento inicial de la población de microorganismos antagonistas, tanto residentes como introducidos, lográndose un establecimiento temprano y una mayor actividad antagónica sobre el patógeno.

2.3 Estrategias de manejo de Sigatoka negra.

2.3.1 El uso de fungicidas.

Este ha sido el método tradicional de manejo en las diferentes áreas productoras de banano a nivel mundial. Los fungicidas utilizados hasta la fecha pueden agruparse en tres categorías: a) Protectores, como el mancozeb y el clorotalonil; b) De acción sistémica local, como el tridemorph; y c) Sistémicos, como el Benomil y el propiconazole. Como complemento de los fungicidas se ha utilizado el aceite agrícola, el cual mejora la penetración, distribución y permanencia del fungicida sobre el área foliar; además de tener efecto fungistático (Marín y Romero, 1992).

El desarrollo de resistencia de *Mycosphaerella fijiensis* a varios de estos productos fungicidas ha sido progresivamente detectado en varios países. Según Fullerton (1991) el potencial de desarrollo de resistencia del patógeno es bien reconocido, lo cual demanda un uso racional de estos productos, haciendo uso de rotaciones y estableciendo programas de monitoreo de resistencia del patógeno a los mismos.

Debido a la agresividad y al desarrollo de resistencia o tolerancia de *M. fijiensis* a algunos de estos productos, el número de aplicaciones de los mismos ha ido en aumento en los últimos

años. De acuerdo a Fouré (1992), en ciertas áreas productoras se hacen un promedio de 50 aplicaciones de fungicidas por año. En Costa Rica, según CORBANA (1993) se hacen un promedio de 35 aplicaciones por año.

Este tipo de manejo ha incrementado substancialmente los costos de producción, además de estar generando un alto nivel de contaminación ambiental y poner en peligro la salud humana. Por ello, es de primordial importancia la implementación de otras estrategias de manejo de la enfermedad, que vengan a racionalizar el uso de productos químicos sintéticos.

2.3.2 Prácticas culturales.

Algunas prácticas culturales, permiten disminuir la presencia de condiciones microclimáticas favorables para el desarrollo de *Mycosphaerella fijiensis*, asi como mantener una adecuada productividad.

Entre las principales prácticas culturales recomendadas para el manejo de la Sigatoka negra están:

A) Evitar plantar altas densidades para prevenir el traslape del follaje, lo cual crea un microclima favorable para el desarrollo de la enfermedad. Además, un buen espaciamiento asegura una distribución uniforme de las gotas de los fungicidas asperjados sobre el follaje.

B) Remover las hojas enfermas de las plantas infectadas para reducir la fuente de inóculo. Se recomienda cortar toda la hoja cuando el 75% de la misma está afectada y solamente eliminar la porción afectada (despuntar) cuando el área afectada es de un 50% o menos. Se debe evitar el sobre deshoje, ya que esto afecta seriamente el desarrollo y calidad de la fruta (Roperos, 1991). Estas operaciones deben ser realizadas una vez cada 10 a 12 días en época lluviosa y cada 15 a 20 días en época seca (Fages y Jiménez, 1995).

C) Evacuar eficientemente las aguas, tanto por escorrentía como por percolación. Esto permite disminuir la humedad presente en el campo y con ello, las condiciones de ambiente favorables a la enfermedad.

D) Mantener un buen control de malezas, ya que su proliferación crea condiciones de microclima favorables a la enfermedad (Bureau *et al.*, 1992).

E) Sembrar plantas vigorosas, las cuales son menos susceptibles a la enfermedad. Así como mantener un adecuado balance nutricional; sobretodo en lo referente a las relaciones potasio:magnesio y nitrógeno:potasio (Roperos, 1991).

2.3.3 El preaviso biológico y biometeorológico.

El preaviso es una estrategia de manejo de la enfermedad que permite determinar el momento más oportuno para efectuar las aplicaciones de fungicida, con el objeto de racionalizar su uso, maximizar su efectividad y proteger el ambiente.

El preaviso biológico es una metodología independiente del preaviso biometeorológico. Este se fundamenta en el análisis de descriptores biológicos (evolución de la enfermedad en relación con la planta), los cuales permiten concluir en el estado de evolución. Para ello, se hacen observaciones semanales de forma tal que la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad sobre las hojas jóvenes (2, 3 y 4) permiten determinar de forma constante y contable el desarrollo de la enfermedad (Bureau *et al.*, 1992). De esta forma, utilizando fungicidas de acción sistémica y curativos que tienen un buen efecto sobre los estadios tempranos de la enfermedad, se logra detener su desarrollo posterior (Marín y Romero, 1992). En Costa Rica, a nivel comercial en banano, han sido necesarias únicamente 16 aplicaciones de fungicidas para mantener un buen estado sanitario en las plantaciones (Jiménez, 1994).

El preaviso biometeorológico se fundamenta en el criterio biológico y el criterio meteorológico. El sistema toma como base para la decisión de hacer o no una aplicación de fungicida el nivel de infección de la hoja cuatro (NIH4) y la duración acumulada de la lluvia durante las seis semanas anteriores a la evaluación del NIH4 .

El NIH4 se determina semanalmente en 10 plantas, sobre el tercio apical de la cuarta hoja, con base a la escala de síntomas propuesta por Fouré (1982) y modificada por Ternisien (1985).

Esta variable es a veces denominada suma bruta de la hoja cuatro. La duración acumulada de las lluvias se obtiene sumando la duración de todos los eventos desde el día 1 al 28 (DLL1), del 8 al 35 (DLL2) y del 15 al 42 (DLL3), de los 42 días (6 semanas) precedentes a la fecha que es evaluado el NIH4 (Jiménez, 1994).

La decisión de aplicar o no aplicar se toma de acuerdo a las siguientes reglas:

Efectuar un tratamiento fungicida si han transcurrido mas de dos semanas desde la última aplicación y se cumple uno de los dos siguientes puntos:

a) El NIH4 aumenta más de 200 unidades con relación a la semana anterior.

b) La DLL2 aumenta más de 5 horas con relación a la DLL1 y la DLL3 aumenta más de 5 horas con relación a la DLL2.

Este sistema ha probado ser bastante efectivo tanto en banano como en plátano en condiciones de pequeño agricultor y actualmente se está probando en diferentes sitios de Costa Rica con resultados preliminares prometedores. Ambas metodologías deben formar parte de un sistema integrado de manejo de la enfermedad, única vía para garantizar la sostenibilidad ecológica y productiva de estos cultivos (Jiménez, 1994).

2.3.4 Resistencia genética.

Aunque por muchos años se ha tratado de desarrollar variedades de banano resistentes a *Mycosphaerella fijiensis*, esto no ha sido aun posible; quizás debido al poco entendimiento que se tiene de la genética de resistencia en el hospedante y la diversidad genética del patógeno. Varios estudios han demostrado que hay un amplio rango de variabilidad entre las poblaciones de este microorganismo y que este tiene la capacidad de cambiar. La variabilidad en los hongos patogénicos puede ser el resultado de una mutación espontánea, intercambio de material nuclear como resultado de la anastomosis de hyfas o la recombinación de material genético durante la reproducción sexual. Todas estas avenidas están disponibles para *M. fijiensis*, pudiéndose

eventualmente encontrar y seleccionar nuevas cepas dentro de cualquier localidad en la cual se estén usando cultivares nuevos y resistentes a una cepa anterior (Fullerton y Olsen, 1991).

De acuerdo a Sallé *et al.* (1989), se requiere de una estrecha cooperación entre estudios estructurales y bioquímicos para encontrar respuestas a los mecanismos involucrados en la resistencia del género *Musa* contra *M. fijiensis*, lo cual sería de mucho valor para los diferentes programas de mejoramiento genético.

2.3.5 El control biológico como alternativa.

La búsqueda de alternativas al uso casi unilateral de productos fungicidas en el manejo de la Sigatoka negra en banano y plátano ha generado en los últimos años el desarrollo de una serie de investigaciones, particularmente en el CATIE, enmarcadas dentro del control biológico y sobretodo dirigidas al uso de microorganismos antagonistas y la manipulación del ambiente de la filosfera.

Esquivel (1992) identificó cinco hongos hiperparásitos de *Mycosphaerella fijiensis*, de los cuales el mas común fue *Mansfordia pulvinata*, asociado a la fase imperfecta del patógeno.

González (1996) identificó 120 cepas de microorganismos quitinolíticos provenientes de hoja de la banano. De estas, 13 cepas mostraron una buena actividad antagónica sobre el patógeno. Los microorganismos *Serratia marcescens,* cepas R1 y A23, *Bacillus cereus*, cepa A30 y *Serratia entomophyla*, cepa A100; mostraron resultados satisfactorios a nivel de laboratorio, invernadero y campo, reduciendo la severidad de la enfermedad.

En un estudio posterior, Ruiz (1995) evaluó el efecto de los substratos quitina, leche y melaza sobre la actividad antagónica de la bacteria *Serratia marcescens*, cepa R1 y sobre la severidad de la enfermedad, obteniendo buenos resultados con la aplicación de melaza en casa de mallas. Sin embargo, no encontró diferencias significativas entre los tratamientos con substratos y el tratamiento testigo a nivel de campo.

Miranda (1995) estudió el efecto de varios microorganismos antagonistas al hongo en combinación con agentes tensio activos y aceite agrícola, encontrando que *Serratia marcescens*, cepa R1, fue la de mayor capacidad antagónica en plantas desarrolladas en casa de mallas. A nivel de campo, sin embargo, esta bacteria no mostró diferencias significativas con el tratamiento testigo. En este estudio también se determinó que algunas bacterias inoculadas a través de la raíz como *Bacillus cereus* (cepa A30) y *Bacillus sp.* (cepa Q2) tuvieron mayor éxito al ingresar y colonizar el tejido interno de las plantas tratadas y que *Bacillus cereus*, cepa A30, promovió el crecimiento de las plantas en mas del doble con respecto al testigo.

2.3.5.1 El uso de glucano como sustrato y como activador de las barreras defensivas de la planta.

El glucano es un polisacárido de cadena larga, con enlaces glicosídicos beta (Clarke y Stone, 1962). Este es un componente estructural de las plantas de la familia Poaceae (Nevins *et al*, 1978; McNeil *et al*, 1984; Stinard y Nevins, 1980) y uno de los principales constituyentes de la pared celular de muchos hongos fitopatógenos (Mauch *et al*, 1984; Broglie *et al*, 1994).

Dentro de las propiedades nutricionales y promotoras de la buena salud que presenta el glucano (enlaces ß-1,3 y ß-1,4), se destaca su efecto dañino en la dieta de animales monogástricos al decrecer su tasa de crecimiento y su eficiencia de conversión alimenticia (Hesselman, 1983; Hesselman y Aman, 1986; Pettersson y Aman, 1992). Sin embargo, los efectos del glucano en la dieta humana son beneficiosos al reducir los niveles de colesterol (Anderson *et al*, 1984; Klopfenstein, 1988) y los niveles de glucosa en la sangre (Klopfenstein, 1988; Davison *et al*, 1991).

El uso de substratos como agentes de enmienda foliar para modificar las condiciones nutricionales de la filosfera y favorecer el crecimiento y las diferentes actividades de los microorganismos biocontroladores ha sido bastante investigado en los últimos años.

La aplicación de substratos como azúcares (El Ghaouth *et al.*, 1995), leche (Okumoto y Bustamante, 1993a ; Ruiz, 1995), melaza (Ruiz, 1995), almidón de yuca (Calvo y Vargas,

1989), quitina (Okumoto y Bustamante, 1993 ; González, 1996), quitosán (Benhamou *et al.*, 1994) y algunos otros; se ha estudiado con el objetivo de promover el crecimiento selectivo de antagonistas específicos, mejorar la efectividad de estos o activar mecanismos de defensa de las plantas.

El ß-glucano es un componente principal de la pared celular de una gran cantidad de hongos fitopatógenos, lo cual sugiere la posibilidad de implementar el uso de substratos con base en glucano para incrementar las poblaciones de microorganismos antagonistas glucanolíticos, capaces de habitar y colonizar el nicho ecológico del patógeno y reducir su incidencia y daño.

El uso de los β-glucanos como agentes de enmienda foliar, sin embargo, ha sido muy poco estudiado. Una de las principales limitantes para llevar a cabo este tipo de investigación en nuestro medio es la falta de información relacionada con la disponibilidad de productos o subproductos que provean cantidades apreciables de glucano, así como sobre los métodos adecuados de extracción y cuantificación del mismo.

Varias técnicas de extracción y cuantificación han sido desarrolladas para la determinación de ß-glucanos a partir de cereales como la cebada y la avena (Zygmunt and Paisley, 1993; Wood and Weisz, 1984; McCleary and Glennie-Holmes, 1985; Welch and Lloyd, 1989; Carr *et al*, 1990; Dawkins and Nnanna, 1993) y de algunas bebidas alcohólicas (McCleary and Nurthen, 1986). Sin embargo, los dos primeros materiales no están disponibles en nuestro medio, mientras que la utilización de una bebida alcohólica como fuente de glucano implicaría un costo muy elevado.

Kopp *et al.* (1989), estudiaron el efecto de una preparación de glucano obtenida a partir de las paredes miceliares del hongo *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea* contra la infección causada por diferentes viruses, incluyendo TMV, alfalfa mosaic virus y tomato black ring virus, en tabaco y otras especies de la familia Nicotianae. Ellos encontraron que este glucano, aplicado ya sea por inyección, inoculado o asperjado sobre la planta protegió ambas superficies de las hojas contra infecciones virales transmitidas mecánicamente, inhibiendo dramáticamente la producción de lesiones necróticas locales inducidas por los virus.

Hasta el momento no se ha documentado el uso del β-glucano como sustrato para promover el crecimiento y desarrollo de las poblaciones de microorganismos glucanolíticos presentes en la filosfera, mejorar su actividad antagónica a patógenos o su habilidad para persistir en la superficie foliar. Sin embargo, si se ha documentado el papel de una serie de compuestos bióticos, entre ellos los β-glucanos, como inductores de fitoalexinas en la planta y además como inductores de resistencia a enfermedades.

Phytophthora megasperma f. sp. sojae, *Uromyces phaseoli* y *Erysiphe graminis f. sp. hordei* son algunos ejemplos de microorganismos de cuyo micelio se ha logrado extraer β-glucano (Lyon, 1995). Dentro de las fuentes vegetales el glucano ha sido identificado en caña de azúcar (Neto y Díaz, 1994); arroz (Sauter y Kende, 1992); avena (Miller y Fulcher, 1994) y cebada (Kahlon *et al.* 1993), además de estar presente en el extracto de levadura de cerveza (Vargié y Mrsa, 1994).

Las enzimas glucanasas son consideradas como componentes de un mecanismo general de defensa contra patógenos en varias especies de plantas, pudiendo actuar sinergísticamente con las quitinasas (Dumas-Gaudot *et al.*, 1992).

Estas enzimas están presentes en las paredes celulares de las plantas y son las responsables de la liberación de los glucanos componentes estructurales del micelio de hongos fitopatógenos que tratan de penetrar dichas paredes. El grado de degradación del micelio depende de la actividad de dichas enzimas y podría producir una serie de glucanos de diferente peso molecular, siendo mas fácil para la planta tomar aquellos de menor peso molecular a través de la cutícula; toda vez que los receptores adecuados se encuentren presentes. Los glucanos aplicados exógenamente como un protector de la planta pueden similarmente ser modificados por las glucanasas presentes en la pared celular de las plantas y estimular las mismas respuestas defensivas contra patógenos (Lyon, 1995).

Los β-glucanos, al igual que otros activadores de las barreras defensivas de la planta, son asociados con genes menores o resistencia horizontal, por lo que es poco probable que los patógenos desarrollen resistencia a dichos compuestos. Estos no tienen actividad antimicrobial

directa y no tienen ningún efecto conocido sobre otros organismos que no sean las plantas. Su efecto sobre otros organismos y sobre el medio ambiente es entonces, en general, benigno. En consecuencia, una de las grandes ventajas de su utilización es que podrían ser usados junto con otros métodos de control biológico (Lyon, 1995).

El uso de substratos activadores de mecanismos de defensa es hoy en día una alternativa al uso indiscriminado de productos químicos sintéticos, aun y cuando por el momento aquellos son menos eficaces. Estos compuestos podrían ser utilizados en mezclas con los productos químicos, logrando así reducir la cantidad que de estos se aplica a los cultivos y al medio ambiente; o podrían ser aplicados junto con compuestos antimicrobiales de ocurrencia natural para mejorar su efectividad en la reducción de las enfermedades (Lyon, 1995).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Localización

La investigación se llevó a cabo durante los meses de enero a octubre de 1996. Los trabajos de laboratorio y campo se realizaron en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). El CATIE se encuentra localizado en Turrialba, provincia de Cartago, situada a 602 msnm a 9°55'21'' N y 83°39'40'' W; presentando una temperatura, precipitación y humedad relativa promedio anual de 21.7°C, 2065 mm y 87%, respectivamente.

3.2 Extracción de la goma de Beta-glucano.

3.2.1 Materiales utilizados.

Se usó un "kit" de ß-Glucano, conteniendo las enzimas Lichenasa y Beta-glucosidasa en su estado puro, solución estándar de glucosa, muestras estándar de glucano de avena y cebada y la metodología propuesta para llevar a cabo la prueba de determinación de ß-glucano, obtenido de la compañía Megazyme (Sydney, Australia). Se obtuvo muestras de semolina y granza de arroz, así como de bagazo de caña de azúcar y desecho de levadura de cerveza en industrias locales. La avena comercial y el alcohol 2-propanol fueron adquiridos en establecimientos comerciales locales. Todos los demás químicos utilizados fueron grado reactivo, obtenidos en casas locales.

3.2.2 Procedimiento.

Se utilizó el método propuesto por Dawkins y Nnanna (1993), con algunas modificaciones debido a la naturaleza de los substratos evaluados. Un esquema general del procedimiento de extracción es presentado en la figura 1.

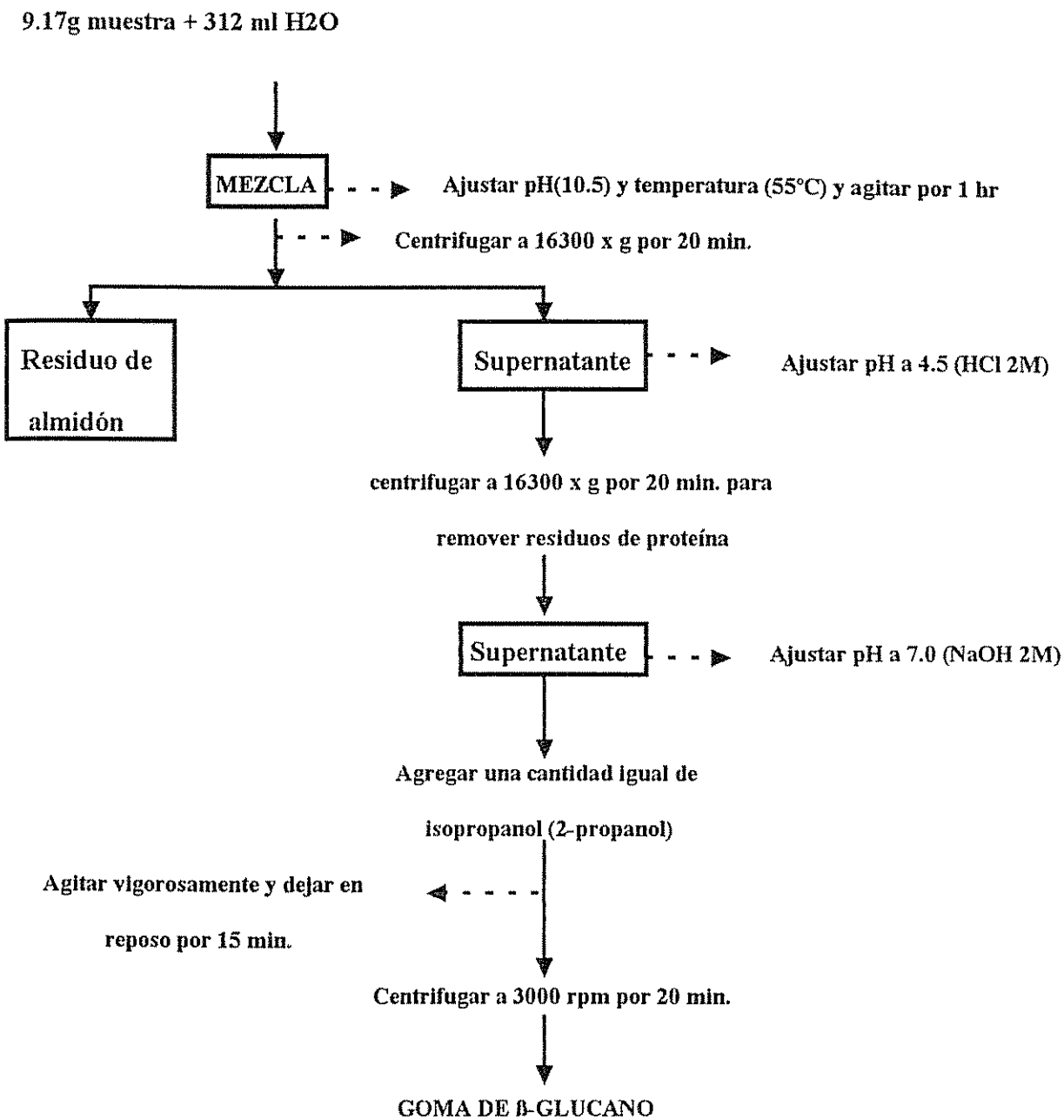

Figura 1. Procedimiento para la extracción de la goma de ß-glucano.

El procedimiento básico de extracción consistió de tres etapas: a) tratamiento alcalino de la muestra en una relación sólido-solvente 1:34; b) precipitación isoeléctrica del residuo de proteína; c) precipitación de la goma de ß-glucano con alcohol (2-propanol).

En el experimento se emplearon como substratos el desecho de levadura de cerveza, bagazo de caña de azúcar, granza de arroz, semolina de arroz y avena comercial; realizando un total de tres repeticiones.

Todos los substratos, exceptuando el desecho de levadura de cerveza el cual fue utilizado en su estado natural, fueron parcialmente deshidratados colocándolos en horno a temperatura de 60 °C por 4 horas y llevados a un diámetro de partícula de 0.5mm utilizando un molino especial y luego tamizándolos a través de un mesh # 60.

Posteriormente cada uno de los substratos fue disuelto en agua destilada (1:34) y el pH y temperatura de la mezcla llevados a 10.5 (NaOH 2M) y 55 °C respectivamente. Una vez estabilizado el pH y la temperatura, la solución se mantuvo en agitación constante por 60 minutos. Luego la muestra fue centrifugada a 16300 x g por 20 minutos para lograr precipitar y remover los residuos de almidones. Seguidamente el pH del supernatante obtenido fue llevado a 4.5 adicionando HCl 2M y se centrifugó a 16300 x g por 20 minutos para precipitar y remover las proteínas presentes en el mismo. El supernatante así obtenido fue llevado a pH 7 adicionando NaOH 2M y luego se le agregó alcohol 2-propanol (50% v/v). La mezcla fue agitada vigorosamente y luego dejada en reposo por 15 minutos, al final de los cuales fue centrifugada a 3000 rpm por 20 minutos para lograr la precipitación de la goma de ß-glucano.

Finalmente cada una de las gomas de ß-glucano extraídas fue colocada en viales, los cuales se taparon y guardaron en cuarto seco hasta el momento de su utilización.

3.2.3 Método de extracción modificado para el desecho de levadura de cerveza.

La levadura tiene la particularidad de hidrolizarce una vez muerta, liberando luego cantidades apreciables de ß-glucano. Esto es fácilmente detectable al llevar a cabo la tinción del desecho de levadura de cerveza con azul de algodón (cotton blue) con el cual las partículas dispersas de los ß-glucanos presentes en la misma toman la coloración azul característica.

Tomando en consideración lo anterior se procedió a utilizar una metodología de extracción mas corta, mas sencilla y menos costosa. El desecho de levadura de cerveza fue diluido en agua destilada en una relación 1:34. La mezcla se agitó vigorosamente por 3 minutos y luego su pH fue ajustado a 7.0 adicionando NaOH 2M. Posteriormente se adicionó a la solución una cantidad igual de alcohol 2-propanol, se agitó vigorosamente por 3 minutos y luego se dejó en reposo por 15 minutos. Finalmente la solución fue centrifugada a 3000 rpm por 20 minutos.

El precipitado conteniendo el ß-glucano fue colocado en tubos de polipropileno con tapa de rosca los cuales se guardaron en cuarto seco hasta el momento de su utilización.

3.3 Determinación del contenido de Beta-glucano.

Se cuantificó el contenido de ß-glucano presente en cada uno de los substratos evaluados por medio de la metodología propuesta por la compañia Megazyme (1993) y desarrollada por McCleary y Glennie-Holmes (1985) y McCleary y Codd (1991).

El método consistió en un proceso de digestión enzimática donde el Beta-glucano fue hidrolizado a glucosa en 2 etapas mediante tratamiento con dos enzimas: a) Lichenasa; una endoglucanasa específica para glucanos con enlaces beta, la cual rompió el polímero, convirtiéndolo en una mezcla oligosacárida de grado de polimerización. Después de remover los polisacáridos insolubles (almidón y celulosa), se trató con b) Beta-glucosidasa; la cual convirtió los beta-gluco-oligosacáridos a glucosa. Esta glucosa fue determinada colorimétricamente utilizando el reactivo glucosa oxidasa/peroxidasa. Finalmente las absorbancias de la muestra y del estándar de glucosa fueron medidas a 510 nm y el porcentaje de ß-glucano fue calculado (Zygmunt and Paisley, 1993).

3.3.1 Procedimiento.

Se hicieron pruebas de determinación a partir de muestras de cada substrato en su estado original, a partir de la goma de ß-glucano obtenida del desecho de levadura de cerveza y a partir

del precipitado de ß-glucano obtenido por el método de extracción modificado para el desecho de levadura de cerveza.

En el caso de las muestras en su estado original cada substrato fue finamente molido y tamizado a través de un mesh # 60 para llevarlos a un diámetro de partícula de 0.5 mm; excepto el desecho de levadura de cerveza el cual se utilizó en su estado líquido natural. Para determinar el contenido de humedad de cada substrato las muestras se colocaron en horno a 105 °C por 6 horas, se tomó su peso fresco inicial y su peso final. Posteriormente se calculó el peso seco (corregido) de cada muestra mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Peso seco} = \text{Peso fresco} \times \left(100 - \frac{\text{Contenido de humedad (\%)}}{100}\right)$$

En el caso de la goma de ß-glucano obtenida a partir del desecho de levadura de cerveza y del precipitado de ß-glucano obtenido por el método modificado (simple) de extracción a partir del desecho de levadura de cerveza, únicamente fue necesario calcular su contenido de humedad y peso seco (corregido).

Específicamente el método consistió en lo siguiente:

1. Se pesaron, cuidadosamente, muestras de aproximadamente 0.5g de cada uno de los substratos y se colocaron por separado en tubos de polipropileno.
2. A cada tubo se le adicionó una alícota (0.1 ml) de etanol acuoso (50% v/v) para ayudar a la subsecuente dispersión de cada muestra.
3. Se adicionaron 5.0 ml de buffer de fosfato de sodio (20 mM, pH 6.5) a cada muestra y luego se agitaron en vórtex.
4. Se incubaron los tubos en agua hirviendo por 2 min. y luego se agitaron vigorosamente en un vórtex para evitar la formación de grumos de material gelatinoso. Inmediatamente después los tubos se colocaron de nuevo en agua hirviendo por otros 3 min.

5. Se dejaron enfriar los tubos hasta 40 °C y luego se les adicionó 0.2 ml de lichenasa (10u), se taparon, se agitaron en vórtex y se incubaron a 40 °C por 60 min. (Ver anexo 1, inciso 4).

6. El volumen de cada tubo se ajustó a 30 ml adicionando agua destilada (se asume un volumen de 6.0 ml, por lo que se adicionaron 24 ml.).

7. Se mezcló completamente el contenido de cada tubo y posteriormente se filtró a través de papel filtro No. 41.

8. Se transfirió, cuidadosamente, una alícota de exactamente 0.1 ml. de cada filtrado al fondo de tres tubos de prueba.

9. Se adicionó una alícota de 0.1 ml de buffer de acetato de sodio (50 mM, pH 4.0) a uno de los tubos (blanco), mientras a los otros dos se les adicionó 0.1 ml. de beta- glucosidasa (0.2 u).

10. Posteriormente se adicionó a cada uno de los tres tubos 3.0 ml. del reactivo de glucosa oxidasa/peroxidasa (GOPOD) y se incubaron a 40 °C por 20 min.

11. Finalmente se midió la absorbancia a 510 nm para cada muestra y se calculó el porcentaje de ß-glucano (ver anexo 1, inciso 2).

Porcentaje de ß-glucano (w/w) $= \Delta E \times F \times 300 \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180$

$$= \Delta E \times F/W \times 27$$

Donde:

ΔE = absorbancia de la muestra (reacción) - absorbancia del blanco

$$F = \frac{100\ (\mu g \text{ de glucosa})}{\text{absorbancia de } 100\ \mu g \text{ de glucosa}} \quad \{ \text{conversión de absorbancia a } \mu g \}$$

1/1000 = conversión de microgramos a miligramos

162/180 = ajuste de la glucosa libre a anhidroglucosa (como ocurre en el ß-glucano)

300 = corrección del volumen (0.1 ml tomado de 30 ml)

100/W = factor para expresar el contenido de ß-glucano como porcentaje de la muestra

W = el peso seco calculado (corregido) de la muestra analizada, en miligramos.

3.4 Aislamiento y selección de microorganismos glucanolíticos.

3.4.1 Sitios seleccionados para realizar los aislamientos.

Tres sitios con características ambientales muy similares fueron seleccionados:

I) Finca La esperanza, propiedad de la Standard Fruit Company; ubicada en Pacuare, provincia de Limón.

II) Plantación experimental de banano de la Escuela de Agricultura de la Región del Trópico Húmedo (EARTH), ubicada en Guápiles, provincia de Limón.

III) Plantación comercial de la Escuela de Agricultura de la Región del Trópico Húmedo (EARTH), ubicada en Guápiles, provincia de Limón.

Los sitios bananeros I y III son manejados bajo un sistema de producción comercial, es decir, sometidos a un régimen de aplicaciones de productos químicos para controlar la Sigatoka negra. El sitio II, no estaba sometido a la aplicación de productos químicos y el manejo de la enfermedad se estaba llevando a cabo a través de métodos de control biológico.

3.4.2 Aplicación de glucano al follaje y procesamiento de muestras.

Con el objeto de incrementar las poblaciones de microorganismos glucanolíticos y facilitar su aislamiento, se preparó una solución de glucano mezclando 40g de glucano coloidal al 0.25% p/v, en un litro de agua destilada, la cual se aplicó a la planta de banano. El pH de la solución se fijó entre 7 y 8 utilizando una solución de 0.1 M NaOH.

Las aplicaciones se hicieron en la cuarta hoja según escala de Brun (1963), aplicando tres plantas por sitio. Las hojas tratadas fueron marcadas con cinta plástica y siete días después de la aplicación fueron recolectadas y trasladadas al laboratorio en bolsas plásticas estériles, las cuales se colocaron en una hielera conteniendo gelatina refrigerante para mantener baja la temperatura y evitar la desecación y la pérdida de microorganismos.

En el laboratorio, con un sacabocados de 10 mm de diámetro se obtuvo 5 g de hojas por cada muestra en forma al azar, seleccionándose aquellas áreas de la hoja donde la enfermedad, aparentemente, no estaba presente. Estas muestras fueron colocadas en erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de agua destilada estéril y agitadas por 45 minutos.

Este procedimiento se llevó a cabo en dos ocasiones, correspondientes a dos muestreos diferentes en los mismos tres sitios con el objeto de lograr el aislamiento del mayor número posible de microorganismos glucanolíticos.

3.4.3 Preparación de medios de cultivo.

Se prepararon dos tipos de medios, agar nutriente-glucano (ANG) y agar glucano (AG). El agar nutriente-glucano se preparó mezclando 15 g de agar nutriente más 5 g de agar en un litro de agua destilada en agitación, a una temperatura de 60 °C. Una vez disuelto el agar nutriente y el agar, se agregó 1 % (10 g) del extracto de glucano obtenido a partir del desecho de levadura de cerveza para promover el crecimiento de los microorganismos glucanolíticos. Posteriormente, el pH de la solución se fijó entre 7 y 8 agregando una solución de 0.1 M NaOH. Finalmente, el

medio fue esterilizado en autoclave a 15 psi por 30 minutos y luego se chorreó en platos petri estériles.

El agar-glucano se preparó mezclando 20 g de agar más 10 g del extracto de glucano en un litro de agua destilada utilizando el procedimiento anterior.

3.4.4 Aislamiento de microorganismos glucanolíticos.

Para llevar a cabo el aislamiento de microorganismos glucanolíticos se tomó como referencia la metodología utilizada en el aislamiento de microorganismos quitinolíticos (González, 1995).

De cada una de las soluciones preparadas (inciso 3.4.2) se tomó 1 ml el cual se colocó en un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril. De esta nueva solución se prepararon diluciones decimales hasta 10^{-4} . Seguidamente, con una micropipeta se tomó una gota de 20 microlitros (0.02 ml) de la dilución y se colocó en un plato petri conteniendo agar nutriente-glucano. Este procedimiento se repitió para cada una de las muestras, las cuales también fueron colocadas en medio agar-glucano. Los platos petri inoculados fueron incubados a 28 °C hasta obtener las cepas de microorganismos glucanolíticos.

Para obtener las cepas de *Bacillus* glucanolíticos cada dilución se colocó en baño maría a una temperatura de 80 °C por 10 minutos, eliminando así, microorganismos que no tienen esporas resistentes al calor. Posteriormente, siguiendo la metodología anterior se sembraron platos con agar nutriente-glucano y se incubaron a 28 °C hasta obtener las cepas glucanolíticas.

Las lecturas se tomaron entre las 24 y 96 horas después de sembrados los microorganismos. Se consideró como reacción positiva el borde transparente de la colonia, lo cual fue un indicativo de que el glucano del medio estaba siendo metabolizado por los microorganismos.

Las cepas glucanolíticas observadas fueron seleccionadas y purificadas haciendo cultivos sucesivos hasta tener colonias aparentemente puras. Estas cepas fueron luego transferidas a viales con tapa de rosca conteniendo ANG en posición inclinada. Una vez crecidos los

microorganismos y para minimizar su crecimiento posterior, los viales fueron sellados con aceite mineral estéril y colocados a temperatura de 10 °C.

3.4.5 Selección de cepas glucanolíticas.

Las cepas glucanolíticas aisladas fueron cultivadas en agar nutriente-glucano y agar-glucano, seleccionándose aquellas en las cuales se observó una mayor producción de glucanasa en ambos medios. Para ello, se midió la longitud (radio) del halo transparente formado alrededor de la colonia a las 12, 24, 36, 48 y 96 horas después de su siembra. También se considero el tamaño de la colonia como parámetro importante en la selección.

3.5 Prueba de antagonismo en laboratorio.

3.5.1 Procedimiento para la obtención de descarga de ascosporas.

Para llevar a cabo esta prueba se siguió la metodología propuesta por la compañía Dupont (1982).

El material utilizado para la descarga se seleccionó a partir de hojas jóvenes con tejidos necróticos recolectadas en el campo. Este material fue trasladado al laboratorio y colocado en cámara húmeda por 48 horas para lograr la maduración del mayor número posible de peritecios y ascosporas. Posteriormente, el tejido necrosado fue observado a través de un estereoscopio y se seleccionaron aquellas áreas con peritecios abundantes. De este material se cortaron trozos de aproximadamente 4 cm^2 y con la ayuda de grapas se pegaron 5 trozos por cada disco de papel filtro de 9 cm de diámetro, con el haz hacia arriba. Estos discos con el material de descarga fueron luego sumergidos en agua destilada por 5 minutos, luego de lo cual, se extrajeron, se les eliminó el exceso de agua y se colocaron en las tapas de platos petri listos para iniciar la descarga de ascosporas sobre discos de hoja.

3.5.2 Preparación de discos de hoja.

Se seleccionó y recolectó la hoja 2 de plantas de banano de una zona en la cual no se habían hecho aplicaciones de fungicidas. De estas hojas se cortaron discos de 9 cm de diámetro los cuales, en la cámara de flujo laminar, fueron desinfectados sumergiéndolos en alcohol al 70% por un minuto. Para eliminar los residuos de alcohol, los discos fueron sumergidos, en forma sucesiva, en tres recipientes con agua destilada estéril, un minuto en cada uno de ellos. Finalmente los discos fueron colocados sobre papel filtro estéril para eliminar el exceso de agua.

3.5.3 Multiplicación y aplicación de microorganismos glucanolíticos.

Dos días antes de la inoculación del patógeno los microorganismos antagonistas glucanolíticos seleccionados fueron puestos a crecer en platos petri con medio agar nutriente-glucano, los cuales se incubaron a 28 °C.

Los microorganismos ya crecidos fueron colectados del medio de cultivo lavando la superficie del mismo con agua destilada estéril, ajustándose sus concentraciones a 10^8 células bacteriales por ml. Luego, cada una de las soluciones de los microorganismos fue colocada en platos petri, en los cuales se sumergieron los discos de hoja previamente desinfectados. Posteriormente, los discos fueron colocados con el envés hacia arriba en la base de platos petri, la cual se cubrió previamente con papel filtro estéril húmedo.

3.5.4 Prueba de antagonismo.

Sobre la base de los platos petri conteniendo los discos de hoja aplicados con los microorganismos glucanolíticos se colocó la tapa de los platos con el material de descarga de ascosporas. El material se dejó descargando por un período de 3 horas, luego de las cuales se marcaron las zonas de descarga y se retiró el papel filtro con los trozos de tejido necrosado. Los platos petri fueron nuevamente tapados e incubados a 28 °C por 48 horas.

Posteriormente, los discos de hoja fueron identificados y sumergidos por 2 ocasiones sucesivas en barniz transparente marca Glidden pro 100. Luego, con la ayuda de clips, los discos fueron colgados en un cordel y dejados así por 24 horas a temperatura ambiente con el objetivo de eliminar el excedente de barniz y lograr el secado de los mismos. Una vez seco el barniz, las zonas de tejido previamente marcadas fueron cortadas y la capa de barniz retirada. Esta capa de barniz fue inmediatamente colocada sobre un portaobjetos previamente identificado, se le colocó un cubreobjeto y luego se tiñó con azúl de algodón para finalmente llevar a cabo las evaluaciones al microscopio.

3.5.5 Evaluación de los tratamientos y análisis estadístico.

Se determinó la capacidad antagónica de los microorganismos glucanolíticos seleccionados sobre ascosporas. Las variables evaluadas fueron el número de ascosporas germinadas y el porcentaje de inhibición del tubo germinativo de 150 ascosporas por disco de hoja en 4 repeticiones. Para cada repetición se utilizaron cinco campos visuales los cuales se compararon con un testigo absoluto.

La inhibición del tubo germinativo se determinó midiendo su longitud con un microscopio calibrado a 40 X y con un lente micrométrico dentro de un ocular calibrado previamente con un micrómetro de platina.

Se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar y la información obtenida se analizó a través de un análisis de varianza y la aplicación de la prueba de Dunnett (Steel y Torrie, 1985), para comparar cada uno de los tratamientos con el testigo absoluto (agua), de acuerdo a cada categoría de medición.

3.6 Compatibilidad de las cepas glucanolíticas seleccionadas a fungicidas.

Se determinó la compatibilidad de los microorganismos seleccionados a los fungicidas más utilizados en el control de la Sigatoka negra del banano.

Se sembraron los microorganismos antagonistas seleccionados en medio agar nutriente-glucano 48 horas antes de iniciar la prueba. Posteriormente, se cortaron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro y se esterilizaron. Luego se prepararon soluciones madres a 1000 ppm en agua destilada estéril de los siguientes fungicidas:

Benomil 50% PM, a una concentración de 0.02 g en 10 ml de agua.
Propiconazole 25.3% EC, a una concentración de 0.04 g en 10 ml de agua.
Tridemorf 75% EC, a una concentración de 0.013 g en 10 ml de agua.
Mancozeb 80% PM, a una concentración de 0.013 g en 10 ml de agua.

El agri-mycin 500 44.3% PM se utilizó como testigo, a una concentración de 0.02 g en 10 ml de agua. Mediante diluciones decimales se prepararon soluciones a 100, 10 y 0 ppm de cada uno de los productos evaluados.

Con un marcador especial para vidrio se marcaron los platos petri conteniendo los microorganismos con el fungicida a evaluar y se dividieron en 4 partes iguales, marcando en cada una de ellas la concentración a aplicar. Con la ayuda de pinzas estériles se tomó cada uno de los discos de papel filtro estéril y con una micropipeta estéril en el aire se les colocó en el centro una gota de 0.05 ml del fungicida a evaluar en la concentración requerida, procurando que los discos quedaran bien impregnados de producto, pero siempre evitando los excedentes. Finalmente, los discos fueron colocados sobre los microorganismos y los platos petri fueron sellados e incubados a 28 °C por 48 horas.

3.6.1 Variable evaluada.

Se evaluó la zona de inhibición de los microorganismos causada por los fungicidas, la cual se manifestó como un halo transparente que rodea el disco de papel filtro impregnado con el fungicida. Para ello, se midió la distancia (mm) desde el borde del disco hasta el borde de la zona de inhibición.

3.7 Prueba de antagonismo en campo utilizando plantas en macetas.

3.7.1 Localización del experimento.

La prueba se realizó en los predios del área de fitoprotección del CATIE, en plantas sembradas en macetas. Los datos climatológicos se tomaron de la estación meteorológica del CATIE, ubicada a 200 m del lugar del ensayo. Esta prueba se llevó a cabo desde el 7 de agosto hasta el 23 de septiembre de 1996.

3.7.2 Preparación del material vegetal.

Se utilizaron plantas de banano de la variedad Gran Enano obtenidas de cultivo de tejidos. Estas plantas fueron sembradas en macetas plásticas polyplast de 2 Kg, utilizando suelo esterilizado con basamid (35 g/m^2 de suelo).

Se fertilizaron 30 días después del trasplante con urea (NPK 46-0-0) a una dosis de 10 g por planta. Se mantuvo el riego regularmente y se les eliminó la hoja bajera en senescencia hasta el inicio del ensayo.

Las plantas se mantuvieron en casa de mallas por un período de cuatro meses y medio y posteriormente fueron sacadas al campo donde permanecieron en aclimatación por un período de 15 días, previo al inicio de la prueba.

3.7.3 Preparación del material experimental.

Con base en los resultados obtenidos a partir de la prueba de antagonismo en laboratorio se seleccionaron 4 cepas bacteriales, las cuales se identificaron con los códigos GC1, GBC2, GS2 y GS3, de los cuales el microorganismo GBC2 pertenece al género *Bacillus*. Estos microorganismos fueron puestos a crecer en medio agar nutriente-glucano 48 horas antes de

iniciar la prueba. Como sustrato se utilizó una solución de glucano al 1% (w/v) en agua destilada.

3.7.4 Tratamientos evaluados y diseño experimental.

Se evaluaron 10 tratamientos los cuales incluyeron la aplicación de los microorganismos con y sin glucano, glucano solo y agua como testigo absoluto. La descripción de los tratamientos es la siguiente:

1. Testigo
2. Glucano
3. GC1 + glucano
4. GBC2 + glucano
5. GS2 + glucano
6. GS3 + glucano
7. Cepa GC1
8. Cepa GBC2
9. Cepa GS2
10. Cepa GS3

Se utilizó un diseño en bloques completamente al azar (DBCA) con 5 repeticiones por tratamiento en los cuales la parcela experimental correspondió a una planta.

3.7.5 Procedimiento general.

Para la aplicación de los tratamientos se seleccionó la hoja uno de cada planta, la cual fue marcada con cinta plástica y asperjada con atomizadores manuales tanto por el haz como por el envés. Las cepas glucanolíticas asperjadas se prepararon a una concentración de 10^8 ufc/ml en agua destilada estéril.

Se hicieron tres aplicaciones de los tratamientos a intervalos de 48 horas cada una. En el caso que correspondió aplicar el microorganismo más el glucano, este fue aplicado primero y el microorganismo 10 minutos después para permitir el escurrimiento del exceso del sustrato.

Para lograr la inoculación natural del patógeno, las plantas fueron trasladadas dos horas después de la tercera aplicación de los tratamientos a la finca experimental La Montaña, propiedad del CATIE, a una plantación de banano fuertemente atacada por *Mycosphaerella fijiensis*.

Luego de 4 días de exposición al inóculo natural, las plantas fueron nuevamente trasladadas al lugar donde se encontraban, quedando expuestas a las condiciones climáticas prevalecientes en espera del desarrollo de los síntomas de la enfermedad para llevar a cabo las evaluaciones respectivas.

3.7.6 Evaluación de tratamientos y análisis estadístico.

La evaluación se llevó a cabo 24 días después de la inoculación con el patógeno. Se evaluó la severidad de la enfermedad por medio de la cuantificación del total de estrías en el envés de la hoja aplicada con cada uno de los tratamientos. Para llevar a cabo la cuantificación se utilizó un marco de 3 cm^2, el cual se colocó en el área apical y en la parte media del margen derecho de la hoja vista de frente.

Para lograr una mayor precisión en la toma y cuantificación de los datos se procedió a registrar los síntomas observados utilizando material plástico transparente, el cual se colocó en el centro del marco de cartón (anexo 5). De esta forma se dispuso de mas tiempo para llevar a cabo la cuantificación de los síntomas presentes en la hoja.

Los registros obtenidos de cada planta fueron promediados para cada tratamiento. Los datos se analizaron por medio de un análisis de varianza, una prueba de contrastes ortogonales para determinar si habían diferencias significativas entre grupos de tratamientos y una prueba de Tukey para determinar diferencias entre los tratamientos.

4. RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1 Extracción de ß-glucano.

De los cinco substratos analizados, el extracto obtenido a partir de la avena comercial y de la semolina de arroz presentaron la consistencia de goma, mientras el obtenido de la granza de arroz, bagazo de caña y desecho de levadura de cerveza (Leva. 1) presentaban una consistencia coloidal, poco pegajosa.

Se observó que la semolina de arroz y la avena comercial rindieron la mayor cantidad de goma de ß-glucano (cuadro 1), con porcentajes de 15.68 y 11.92 respectivamente, con respecto al total de la muestra analizada.

Al llevar a cabo la extracción a partir del desecho de levadura de cerveza por el método modificado (leva. 2), se encontró un rendimiento del 34.96% con respecto a la muestra analizada (fig. 2).

El precipitado obtenido de cada una de las muestras analizadas es en esencia una mezcla coloidal oligosacárida en la cual está contenido el ß-glucano. Sin embargo, de acuerdo a las metodologías de extracción utilizadas, el precipitado obtenido a partir del desecho de levadura de cerveza por el método modificado posee cantidades mas altas de almidones y proteínas en solución y no presentó apariencia de goma . Por otro lado, no puede asumirse una relación directa entre la cantidad de goma de ß-glucano obtenida y la cantidad de ß-glucano puro presente en la muestra.

Cuadro 1. Porcentaje de goma de ß-glucano obtenida a partir de los substratos evaluados.

Substrato	Muestra (g) *	pH inicial	Extracto obtenido (mg)	% de goma en la muestra
Avena	9.17	6.1	1438.5	15.68
Semolina	9.17	6.6	1093.4	11.92
Bagazo caña azúcar	9.17	6.5	696.2	7.59
Granza de arroz	9.17	6.9	396.9	4.33
Leva. 1	9.17	5.9	326.6	3.56
Leva. 2	9.17	5.9	3206.0	34.96

* Disuelta en 312 ml de agua destilada

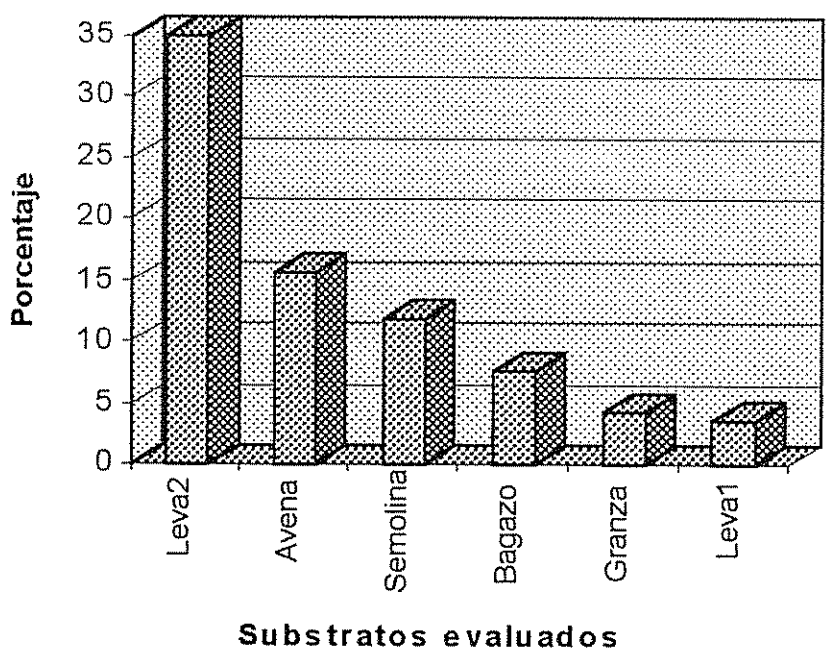

Figura 2. Porcentaje de goma de ß-glucano en los substratos evaluados.

4.2 Determinación de ß-glucano.

Al analizar cada substrato en su estado original se observó que la avena comercial y la semolina de arroz presentaron el mayor contenido de ß-glucano con 1.94% y 0.28% respectivamente. El bagazo de caña de azúcar presentó un contenido de ß-glucano del 0.114%, el desecho de levadura de cerveza 0.104% y la granza de arroz 0.073% (fig. 3).

Dawkins y Nnanna (1993) en un análisis similar al presente, informaron un contenido de ß-glucano de 3.79% para la avena. Esa diferencia puede deberse al hecho de haber utilizado, en este caso, avena comercial, la cual es mezclada con otros compuestos antes de comercializarce, conteniendo así un porcentaje neto inferior de avena pura, lo cual se refleja en un contenido inferior de ß-glucano.

El análisis del precipitado del desecho de levadura de cerveza obtenido por el método modificado (leva2) dio como resultado un contenido de ß-glucano de 0.249% (fig. 3), es decir, 139% más en relación al obtenido a partir de la muestra original. Esto demuestra que con el método modificado se elimina una considerable cantidad de los almidones y proteínas presentes en el desecho de levadura de cerveza y se concentra el ß-glucano libre a través de su precipitación con alcohol 2-propanol.

También se determinó el porcentaje de ß-glucano presente en la goma de ß-glucano extraída a partir del desecho de levadura de cerveza y se encontró un valor de 2.067%, lo cual es lógico ya que el método de extracción de la goma de ß-glucano elimina la mayor parte de almidones y proteínas presentes en la muestra, concentrando el ß-glucano en el precipitado final.

Este contenido puede considerarse bajo si se compara con resultados obtenidos a partir de fuentes vegetales como la cebada y la avena (Dawkins y Nnanna, 1993). Sin embargo, debe considerarse que el desecho de levadura de cerveza utilizado pasó por un proceso industrial en el cual un porcentaje considerable del ß-glucano, originalmente presente en la levadura, es enzimáticamente degradado o perdido por causas afines a dicho proceso. Además, es importante tomar en cuenta que a diferencia de los demás substratos, este no requiere de equipo especial para lograr la extracción del glucano.

Tomando en consideración la apreciable cantidad de ß-glucano obtenido del desecho de levadura de cerveza por medio del método de extracción modificado, la alta disponibilidad y bajo costo de dicho substrato en nuestro medio, así como el bajo costo y simplicidad de este método en relación al método original, al no requerir de equipo y técnicas sofisticadas; se decidió trabajar en las pruebas sucesivas con el desecho de levadura de cerveza como substrato y con el método de extracción modificado.

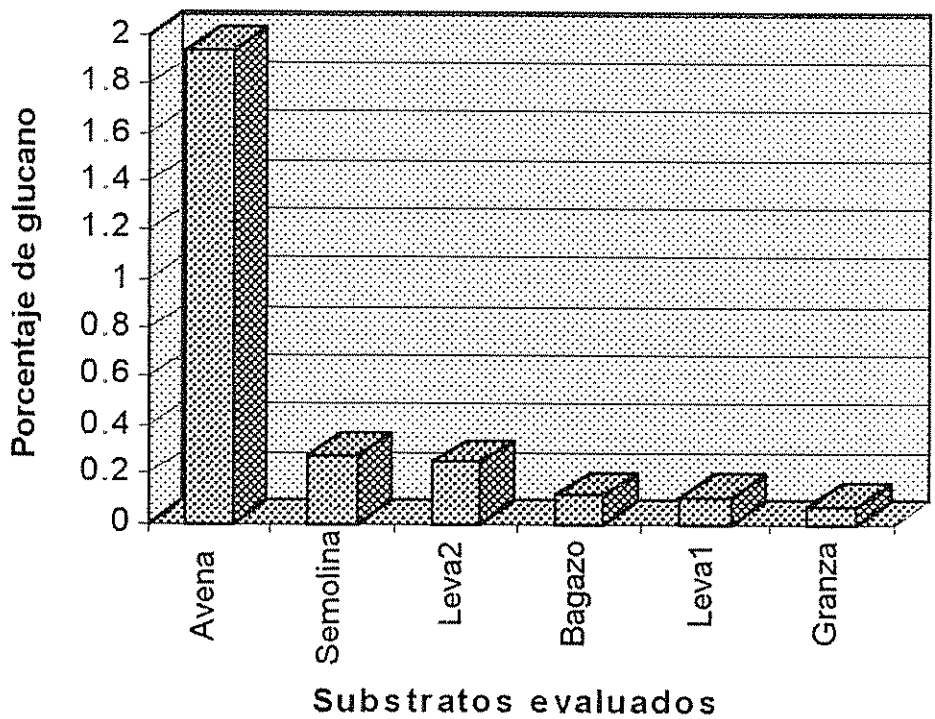

Figura 3. Porcentaje de ß-glucano en los substratos evaluados en su estado original.

4.3 Aislamiento de microorganismos glucanolíticos.

A partir de las extracciones realizadas de hoja (4) de banano se aislaron un total de 196 microorganismos que presentaron actividad glucanolítica. De estos, 39 fueron *Bacillus* y 157 fueron otras bacterias. Aunque no se usaron medios específicos, estos resultados confirman el hecho de que son las bacterias quienes colonizan las primeras hojas casi inmediatamente después de emergidas, gracias a su capacidad para aprovechar los nutrientes provenientes de los exudados de los tejidos foliares (Blakeman, 1985). El 91% de los aislamientos fueron obtenidos a partir de las diluciones 10^{-2} y el restante 9% a partir de las diluciones 10^{-1}.

En cuanto a la distribución de estos microorganismos de acuerdo al sitio de recolección, el sitio II (libre de la aplicación de productos químicos) presentó la mayor población de microorganismos glucanolíticos con un 53% del total de aislamientos; mientras los sitios I y III (sometidos a la aplicación de productos químicos) presentaron poblaciones mas bajas, 23 y 24% del total de aislamientos, respectivamente (cuadro 2). Según Blakeman (1985), las aplicaciones de productos químicos disturban los patrones naturales de colonización del filoplano ya que estos reducen las poblaciones de microorganismos epífitos residentes, lo cual puede explicar los resultados obtenidos.

Cuadro 2. Número y porcentaje de aislamientos de organismos glucanolíticos de acuerdo al sitio de selección.

Sitio	No. de aislamientos	Porcentaje del total
I	45	23
II	104	53
III	47	24
Total	196	100

4.4 Selección de microorganismos glucanolíticos.

Los 196 microorganismos aislados fueron purificados y evaluados en medio agar-glucano y agar nutriente-glucano con el objeto de seleccionar cepas con la capacidad de sobrevivir y reproducirse tanto en medios ricos, como en medios pobres. Para cada cepa bacterial se evaluó el tamaño del halo transparente formado a partir del borde de la colonia, así como su capacidad y/o rapidez de crecimiento.

El tamaño de la transparencia formada es importante ya que demuestra la capacidad del microorganismo para metabolizar el glucano, mientras la capacidad de multiplicación es muy importante desde el punto de vista de colonización del filoplano (González, 1995), ya que una alta masa bacterial es indispensable para lograr dicho propósito.

Las evaluaciones se llevaron a cabo a las 16, 24, 32, 48 y 96 horas después de sembrados los microorganismos. Siete bacterias, entre ellas dos *Bacillus*, mostraron la mayor actividad glucanolítica en el menor tiempo (cuadro 3) y el mayor crecimiento a lo largo del período de evaluaciones.

Características de la colonia como superficie plana, forma redonda y borde liso fueron comunes para los 7 microorganismos. La pigmentación varió de blanco-crema para los *Bacillus* a amarillo, naranja y rojo-rosado para las demás cepas. Los 7 microorganismos fueron identificados con los códigos GC1, GS2, GS3, GS4, GE1, GBC1 y GBC2 (cuadro 3).

Cuadro 3. Procedencia y tiempo al cual se dio la actividad glucanolítica de las cepas seleccionadas.

Microorganismo	Procedencia	Expresión de actividad glucanolítica (Hrs.)				
		16	24	36	48	96
GBC2	Sitio III	+	+	+	+	+
GC1	Sitio III	–	+	+	+	+
GS2	Sitio II	–	+	+	+	+
GS3	Sitio II	–	+	+	+	+
GS4	Sitio II	–	+	+	+	+
GE1	Sitio I	–	–	+	+	+
GBC1	Sitio III	–	–	+	+	+

+ = Reacción positiva

Las 7 cepas seleccionadas presentaron actividad glucanolítica después de un período de tiempo bastante corto , lo cual es una característica deseable y muy importante en la selección de microorganismos antagonistas ya que ello puede asegurar una acción rápida de estos sobre el patógeno. En el caso de antagonismo a *Mycosphaerella fijiensis* esta característica es de mucho valor ya que un efecto antagónico temprano puede reducir la germinación de sus estructuras reproductivas, además de interferir en el crecimiento del tubo germinativo, reduciendo así la capacidad del patógeno para penetrar a través de los estomas.

4.5 Prueba de antagonismo a Mycosphaerella fijiensis en laboratorio.

Esta prueba se desarrolló con el objeto de evaluar el efecto antagónico de las cepas glucanolíticas previamente seleccionadas sobre ascosporas de *M. fijiensis in vivo*.

De acuerdo al análisis de varianza se encontraron diferencias altamente significativas entre tratamientos para la variable germinación de ascosporas (Cuadro 4). La prueba de Dunnett al 5% de significancia, detectó diferencias significativas entre el testigo y los tratamientos GS2, GBC2, GS3, GC1 y GBC1 para la variable germinación de ascosporas (Anexo3).

Cuadro 4. Análisis de varianza para el efecto antagónico de cepas glucanolíticas sobre la germinación de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Pr > F
Tratamientos	7	3690.4542	527.2077	0.0001**
Error experimental	24	420.2057	17.5086	
Total	31	4110.6599	R^2 = 0.90	C.V. = 25.36

** = Altamente significativo al 1%

* = significativo al 5%

ns = no significativo

La cepa GS2 inhibió la germinación en un 25.05 %, 17.57 % para la cepa GBC2, 13.87 % para la cepa GS3, 8.95 % para la cepa GC1 y 4.58 % para la cepa GBC1 (Figura 4).

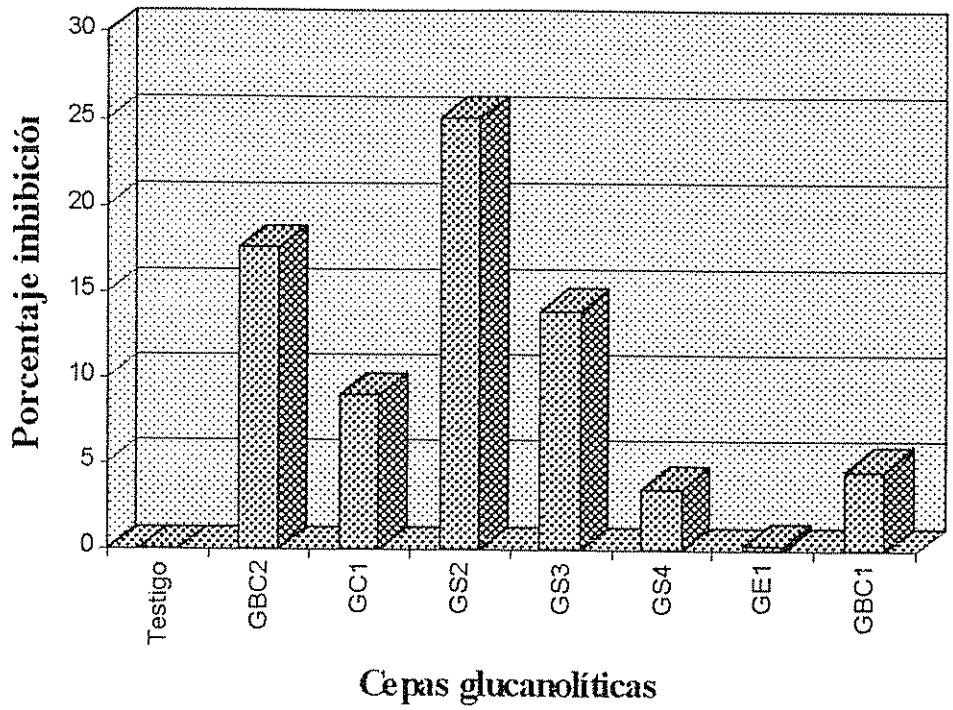

Figura 4. Efecto de cepas glucanolíticas sobre la germinación de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*.

El análisis de varianza también detectó diferencias altamente significativas entre tratamientos para la variable inhibición del crecimiento del tubo germinativo (Cuadro 5). Se encontraron diferencias significativas entre el testigo y las cepas evaluadas, excepto la cepa GE1, de acuerdo a la prueba de Dunnett al 5% de significancia (Anexo 2).

La evaluación de la longitud del tubo germinativo mostró que los tratamientos GS2, GS3, GC1 y GBC2 con porcentajes de inhibición del mismo de 47, 40, 38 y 37, respectivamente, fueron las mejores cepas antagónicas dentro de las evaluadas (Figura 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza para el efecto antagónico de cepas glucanolíticas sobre la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*.

F. V.	G. L.	S. C.	C. M	Pr > F
Tratamientos	7	2849.0671	407.0095	0.0001**
Error experimental	24	206.6605	8.6108	
Total	31	3055.7276	$R^2 = 0.93$	C.V. = 2.9344

** = altamente significativo al 1%
* = significativo al 5%
ns = no significativo

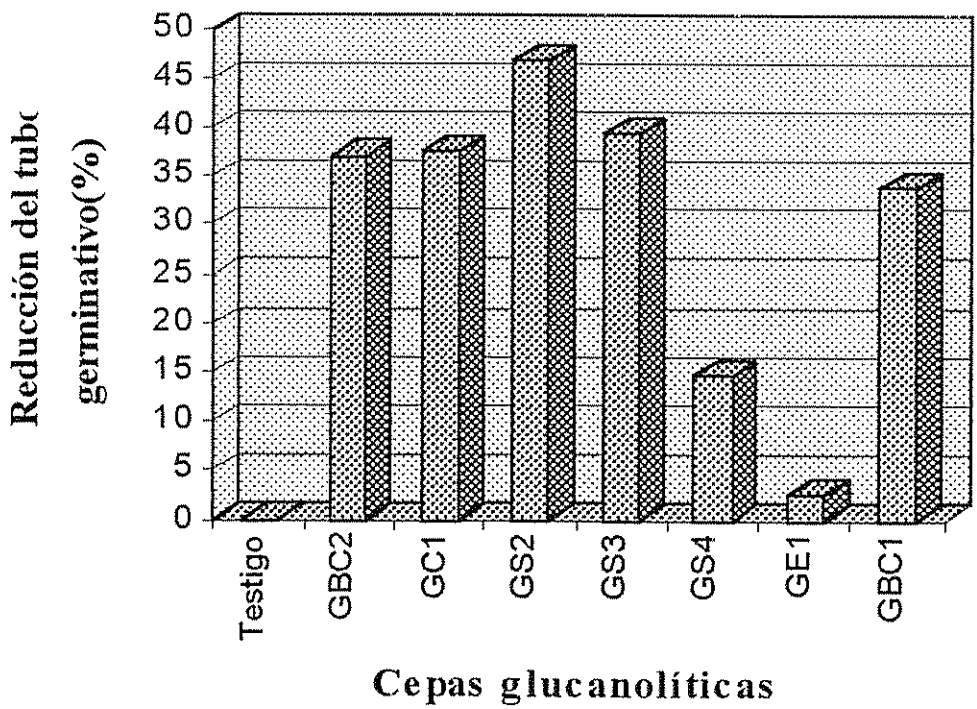

Figura 5. Efecto de cepas glucanolíticas sobre la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*.

De acuerdo al porcentaje de inhibición de la germinación y la inhibición del crecimiento del tubo germinativo, se seleccionaron las cepas GS2, GS3, GBC2 y GC1 para llevar a cabo la siguiente prueba de antagonismo a *M. fijiensis* en campo utilizando plantas en macetas. Esta selección fue debidamente corroborada mediante la aplicación de pruebas Dunnett sucesivas, al 5% de significancia, con las cuales se fue comparando cada uno de los tratamientos que mostraron significancia.

Es importante señalar que las cepas GBC2 y GC1 fueron aisladas de una plantación sometida a la aplicación de productos fungicidas, lo cual representa una ventaja muy importante ya que podrían presentar cierta compatibilidad con estos productos al tratar de implementar su uso a nivel comercial dentro de un programa de manejo integrado.

4.6 Compatibilidad de cepas glucanolíticas a fungicidas.

A nivel de laboratorio, las cepas bacteriales GC1, GBC2, GS2 y GS3 mostraron ser totalmente compatibles con los fungicidas benomyl 50%, tridemorf 75%, propiconazole 25.3% y mancozeb 80%; en cuyos tratamientos no se observó zona de inhibición del crecimiento (Cuadro 6).

También se observó la incompatibilidad de las cepas bacteriales con el agri-mycin 500 44.3%, un bactericida utilizado como testigo. En este caso, la zona de inhibición del crecimiento bacterial se hizo notar en las primeras 24 horas, incrementándose considerablemente a las 48 horas (Cuadro 6).

Estos resultados son muy importantes ya que la introducción de prácticas de control biológico de la Sigatoka negra, como el uso de microorganismos antagonistas, dentro de un programa de manejo integrado es una alternativa para reducir el uso indiscriminado de productos fungicidas y uno de los principales problemas del uso de estos microorganismos es su incompatibilidad con los productos químicos.

Cuadro 6. Efecto de inhibición de productos químicos sobre la zona de crecimiento de las cepas glucanolíticas seleccionadas.

PLAGUICIDA	CEPA BACTERIAL	24 HORAS CONCENTRACION[b]				48 HORAS CONCENTRACION			
		0	10	100	1000	0	10	100	1000
Benomil									
	GC1	0[a]	0	0	0	0	0	0	0
	GBC2	0	0	0	0	0	0	0	0
	GS2	0	0	0	0	0	0	0	0
	GS3	0	0	0	0	0	0	0	0
Tridemorf									
	GC1	0	0	0	0	0	0	0	0
	GBC2	0	0	0	0	0	0	0	0
	GS2	0	0	0	0	0	0	0	0
	GS3	0	0	0	0	0	0	0	0
Propiconazole									
	GC1	0	0	0	0	0	0	0	0
	GBC2	0	0	0	0	0	0	0	0
	GS2	0	0	0	0	0	0	0	0
	GS3	0	0	0	0	0	0	0	0
Mancozeb									
	GC1	0	0	0	0	0	0	0	0
	GBC2	0	0	0	0	0	0	0	0
	GS2	0	0	0	0	0	0	0	0
	GS3	0	0	0	0	0	0	0	0
Agri-mycin									
	GC1	0	1.0	2.0	4.0	0	1.5	3.5	5.0
	GBC2	0	1.0	2.0	4.0	0	1.5	3.0	5.0
	GS2	0	1.0	2.0	3.5	0	1.0	3.0	4.5
	GS3	0	1.0	2.0	4.0	0	1.5	3.0	4.5

a = Zona medida en mm

b = Partes por millón

Estos resultados indican que los microorganismos aquí evaluados podrían ser utilizados en combinación con los fungicidas mas comúnmente usados en el control de la Sigatoka negra.

4.7 Efecto de microorganismos antagonistas glucanolíticos sobre la severidad de la enfermedad en campo utilizando plantas en macetas.

4.7.1 Condiciones climáticas.

La época en que se desarrollo el presente experimento se caracterizó por presentar una alternancia de tiempo caluroso y lluvioso y una alta humedad relativa, condiciones que son altamente favorables para el desarrollo de la Sigatoka negra (González y Jaramillo, 1979).

La temperatura promedio semanal fue de 22.4 °C, con una temperatura máxima promedio de 29.8°C y una mínima de 18.2 °C (Figura 6). La precipitación promedio semanal fue de 46 mm, con un rango diario que varió desde 0 hasta 77 mm. (Figura 7). La humedad relativa se mantuvo en un promedio semanal de 89.6% (Figura 8).

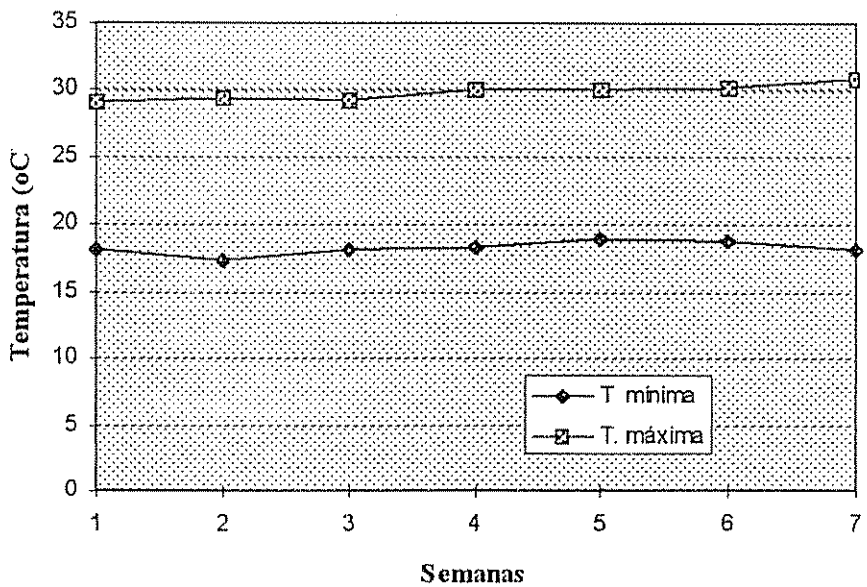

Figura 6. Comportamiento semanal de la temperatura durante el período en que se desarrolló el experimento.

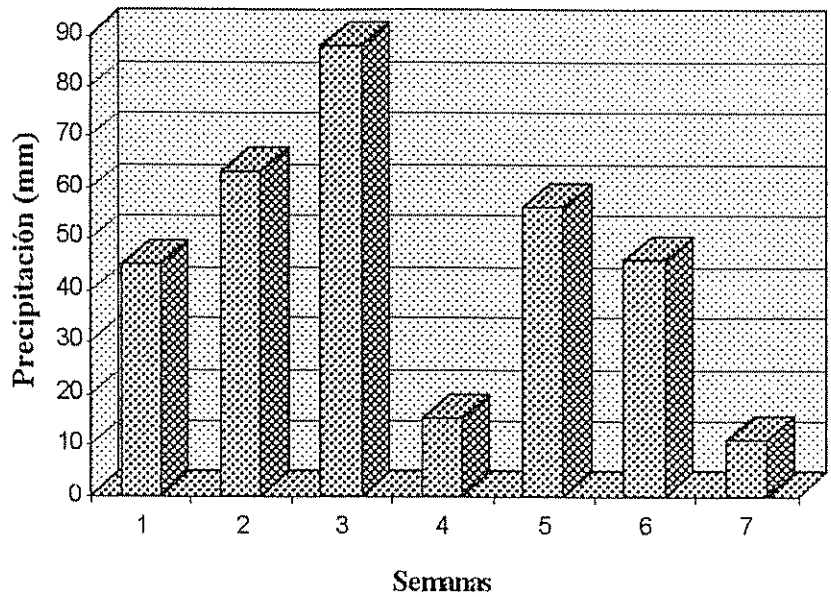

Figura 7. Comportamiento semanal de la precipitación durante el período en que se desarrollo el experimento.

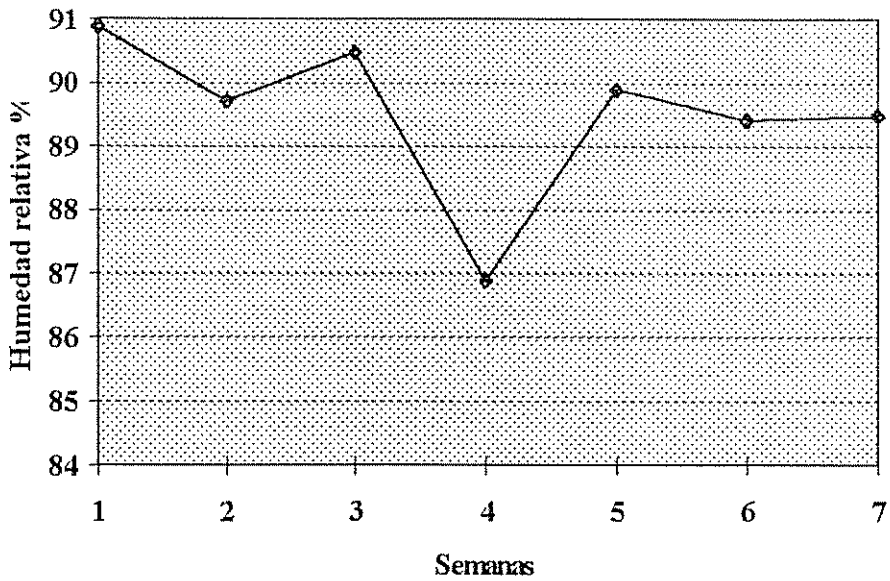

Figura 8. Comportamiento semanal de la humedad relativa durante el período en que se desarrollo el experimento.

Estas condiciones meteorológicas sin duda favorecieron al patógeno, lo cual se expresó en el nivel de infección observado en las plantas inoculadas con el mismo.

4.7.2 Prueba de antagonismo.

Los tratamientos controlaron la enfermedad en un 58.5% en promedio. De acuerdo al análisis de los datos a través de la prueba de contrastes, existieron diferencias altamente significativas al 5% entre el testigo y todos los tratamientos, entre el testigo y el glucano aplicado solo y entre el testigo y los microorganismos aplicados con y/o sin glucano.

No se encontraron diferencias significativas entre el glucano aplicado solo y los demás tratamientos, ni entre los tratamientos aplicados con glucano y los aplicados sin glucano (cuadro 7).

La prueba de Tukey al 5% detectó diferencias significativas para los tratamientos GS3 + glucano, GS2 + glucano, cepa GS2 sola y Glucano solo(Cuadro 8), los cuales redujeron la severidad de la enfermedad en un 67, 66.2, 65.4 y 65 porciento, respectivamente, siendo estos los mejores tratamientos (Figura 9).

Cuadro 7. Análisis del efecto antagónico de los tratamientos sobre *Mycosphaerella fijiensis* en campo utilizando plantas en macetas, según prueba de contrastes ortogonales.

Contraste	Pr > F
Testigo Vrs Tratamientos	0.0002**
Testigo Vrs Glucano	0.0014**
Testigo Vrs MCG	0.0002**
Testigo Vrs MSG	0.0007**
Glucano Vrs Tratamientos	0.6190ns
Glucano Vrs MCG	0.7694ns
Glucano Vrs MSG	0.5157ns
MCG Vrs MSG	0.5716ns

** = altamente significativo al 1%
ns = no significativo

Cuadro 8. Resultados de la prueba de Tukey para el efecto antagónico de los tratamientos sobre la severidad de la enfermedad.

Tratamiento	Media	
Testigo	0.1540	A*
GC1 + G	0.1180	A B
GC1	0.1100	A B
GBC2	0.1040	A B
GS2	0.0920	A B
GBC2 + G	0.0900	A B
Glucano	0.0880	B
GS3	0.0880	B
GS2 + G	0.0840	B
GS3 + G	0.0760	B

* Tratamientos con la misma letra no presentaron diferencia significativa

El hecho de no haber encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos aplicados con y/o sin glucano y entre el glucano aplicado solo y el resto de los tratamientos puede atribuirse principalmente a dos causas:

El glucano aplicado pudo haber estimulado el crecimiento rápido de la población de los microorganismos presentes en la filosfera, principalmente de aquellos con actividad glucanolítica, provocando una mayor competencia para los microorganismos aplicados, pero a la vez, ejerciendo un buen efecto antagónico sobre el desarrollo de *Mycosphaerella fijiensis*. Por otro lado, el ß-glucano es un inductor de fitoalexinas en la planta y se ha comprobado su efecto como inductor de resistencia a varias enfermedades cuando es aplicado exógenamente (Lyon *et al.*, 1995). También se ha documentado que la aplicación de ß-glucano activa e induce la producción de ß-glucanasas (Sirvan y Chet, 1989), enzimas que degradan el glucano y que están

presentes en un gran número de plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (Clarke y Stone, 1962).

Estos hechos sugieren la posibilidad de que el glucano aplicado solo pudo haber estimulado las defensas de la planta, especialmente la producción de ß-glucanasas capaces de metabolizar el glucano presente en las paredes celulares del patógeno y de esa forma haber ejercido un buen control de la enfermedad.

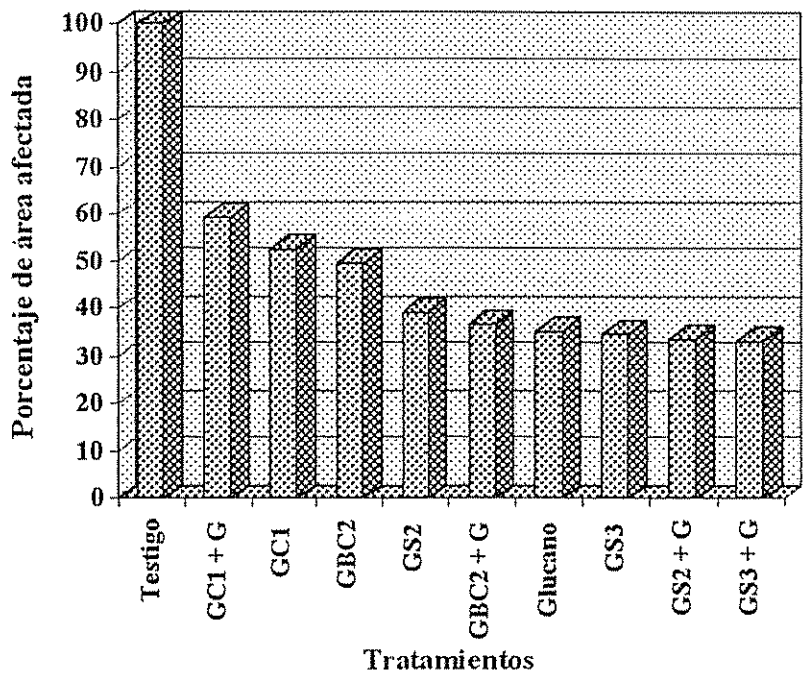

Figura 9. Efecto promedio de los tratamientos sobre la severidad de la enfermedad en campo utilizando plantas en macetas.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se concluyó lo siguiente:

1. Al analizar cada substrato en su estado original, se encontró que la avena comercial posee el mayor contenido de ß-glucano.

2. El desecho de levadura de cerveza posee un contenido apreciable de ß-glucano, lo cual aunado a su amplia disponibilidad en nuestro medio, facilidad de manejo y bajo costo, lo convierten en una excelente fuente de glucano para cubrir los requerimientos en el desarrollo de investigaciones relacionadas con microorganismos glucanolíticos.

3. El método de extracción modificado para el desecho de levadura de cerveza, por su simplicidad, bajo costo y eficiencia en la recuperación de ß-glucano, es el procedimiento adecuado a utilizar en nuestro medio.

4. El sitio II (libre de la aplicación de productos químicos) presentó la mayor población de microorganismos glucanolíticos con un 53% del total de aislamientos, en contraste con los sitios I y III (sometidos a la aplicación de productos químicos) los cuales presentaron poblaciones mas bajas, aportando el 23 y 24% del total de aislamientos, respectivamente.

5. Los microorganismos seleccionados (GC1, GBC2, GS2 y GS3) producen glucanasas antes de las 24 horas, presentando además una rápida multiplicación y en consecuencia un buen crecimiento de la colonia.

6. Las cuatro cepas bacteriales evaluadas mostraron un alto antagonismo a ascosporas de *M. fijiensis*, *in vitro*, reduciendo su germinación y la longitud del tubo germinativo.

7. En pruebas de laboratorio, los microorganismos evaluados son compatibles con los principales fungicidas (hasta 1000 ppm) utilizados en la actualidad para el control de la Sigatoka negra.

8. A nivel de campo, utilizando plantas en macetas, todos los tratamientos mostraron un buen nivel de control de la enfermedad, siendo significativamente superiores al testigo. Sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre grupos de tratamientos.

9. El glucano solo, aplicado como substrato, ejerció un buen control de la enfermedad en campo, reduciendo en un 65% el área afectada.

10. Los tratamientos GS3 + glucano, GS2 + glucano, la cepa GS2 aplicada sola y el glucano aplicado solo fueron los mejores tratamientos a nivel de campo, reduciendo el nivel de infección en un 67.0, 66.2, 65.4 y 65.0 porciento, respectivamente.

6. RECOMENDACIONES

1. Llevar a cabo estudios destinados a la identificación de otras posibles y mejores fuentes de glucano, de ocurrencia común en nuestro medio.

2. Repetir la investigación en condiciones de invernadero para comprobar la efectividad de los microorganismos aislados y el glucano en el control de la enfermedad.

3. Evaluar a nivel de campo la persistencia de los microorganismos sobre el tejido foliar cuando estos son sometidos a las condiciones naturales del medio ambiente.

4. Realizar pruebas adecuadas para determinar con precisión el posible efecto de inducción de resistencia del glucano a la Sigatoka negra.

5. Probar la efectividad de tratamientos que incluyan la mezcla de los microorganismos evaluados para tratar de aprovechar un posible efecto sinergístico entre los mismos.

6. Desarrollar ensayos que permitan definir adecuadamente las dosis y frecuencia de aplicación de los diferentes tratamientos.

7. Efectuar la investigación a nivel de campo para comprobar la efectividad de los tratamientos haciendo uso de aplicaciones sucesivas de los mismos a lo largo del período productivo del cultivo.

8. Probar, a nivel de campo, la efectividad de los microorganismos antagonistas glucanolíticos evaluados dentro de un programa de manejo integrado, que incluya la aplicación de los fungicidas mas usados en banano.

7. LITERATURA CITADA

ALEXOPOULUS, C.J.; MIMS, C.W. 1979. Introductory mycology. 3 ed. Wiley and Sons., New York. 632 p.

ANDERSON, J. ; STORY, L. ; SIELING, B. ; CHEN, W. ; PETRO, M. ; STORY, J. 1984. Hypocholestrolemic effects of oat-bran or bean intake for pypercholesterolemic men. Am. J. Clin. Nutr., 40: 1146-1155.

BAKER, K.F.; COOK, R.J. 1982. Biological control of plant pathogens. Minnesota, U.S.A. The American Phytopathological society. 433 p.

BENHAMOU, N. ; LAFONTAINE, P. ; NICOLE, M. 1994. Induction of sistemic resistance to fusarium crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. Phytopathology, 84 (12): 1432-1444.

BLAKEMAN, J.P. 1985. Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. *In* C.E. Windels y S.E. Lindow, eds. Biological control on the phylloplane. Minnesota, U.S.A. The American Phytopathological Society. pp. 6-30.

BLAKEMAN, J.P. ; FOKKEMA, N.J. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. Annual review of phytopathology (U.S.A.) 20: 167-192.

BROGLIE, R.; BROGLIE, K.; BEUAN, M.W.; HARRISON, B.D.; LERVER, C.J. 1994. Chitinase gene expression in transgenic plants: a molecular approach to understanding plant defense responses. *In* The production and uses of genetically transformed plants. London, U.K., Chapman and Hall. pp. 77-82.

BRUN, J. 1963. La cercosporiose du bananier. Thesis de doctorado, Universidad de París, Francia. 198 p.

BUCHELI, P. ; BUCHALA, A. ; MEIER, H. 1987. Autolysis *in vitro* of cotton (*Gossypium hirsutum*) fibre cell walls. Physiol. Plantarum (Denmark) 70 (4): 633-638.

BUREAU, E.; MARIN, D.; GUZMAN, J.A. 1992. El sistema de preaviso para el combate de la Sigatoka negra en Banano y Plátano. Unión de Países Exportadores de Banano (UPEB), Panamá. 41 p.

CALVO, S. ; VARGAS, E. 1989. Efecto de diferentes adherentes y formulaciones de una bacteria parasítica en elcombate del ojo de gallo, *Mycena citricolor* (Bert and Curt) Sacc. en el cafeto. Turrialba (C.R.) 39 (3): 328-334.

CARR, J. ; GLATTER, S. ; JERACI, J. ; LEWIS, B. 1990. Enzymatic determination of beta-glucan in cereal based food products. Cereal chemistry., 67: 226.

CERVANTES, I. J.; GALINDO, J. J.; ESCALANT, J. V. 1991. Efecto de las condiciones climáticas en el comportamiento de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en plátano (Musa AAB c.v. 'Falso cuerno'). *In* Revisión interna anual 1990. Resúmenes. CATIE, Turrialba, Costa Rica,. p. 37.

CLARKE, A.E. ; STONE, B.A. 1962. B-1,3-Glucan hydrolases from the grape vine (*Vitis vinifera*) and other plants. Phytochemistry (England) 70 (1):175-188.

COOK, J.R.; BAKER, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. Minnesota, U.S.A. The American Phytopatological Society. 539p.

CORPORACION BANANERA NACIONAL. 1993. El combate de la sigatoka negra. Boletín técnico #4. Departamento de Investigaciones. 21 p.

DAVIDSON, M. ; DUGAN, L. ; BURNS, J. ; BOVA, J. ; STORY, K. ; DRENNAN, K. 1991. The hypocholestrolemic effects of ß-glucan in oatmeal and oat bran. J. Am. Med. Assn. (U.S.A.) 265: 1833-1839.

DAWKINS, N. ; NNANNA, I. 1993. Oat gum and ß-glucan extraction from oat bran and rolled oats: temperature and pH effects. Journal of food science, 58: 562-566.

DEVERALL, B. J. ; DANN, E. K. 1995. Induced resistance in legumes. *In* R. Hammerschmidt y J. Kuc, eds. Induced resistance to disease in plants. The Netherlands, Kluwer academic publishers. pp. 152-168.

DU PONT. 1982. Sigatoka negra y amarilla: técnicas mejoradas para manejo e identificación. Boletín técnico. Du pont Latin America, E-55786. Florida, U.S.A. 17p.

DUMAS-GAUDOT, E. ; GRENIER, J. ; FURLAN, V. ; ASSELIN, A. 1992. Chitinase, chitosanase and β-1,3-glucanase activities in Allium and Pisum roots colonized by *Glomus* species. Plant science: 84. pp.17-24.

EL GHAOUTH, A. ; WILSON, C. ; WISNIEWSKI, M. 1995. Sugar analogs as potential fungicides for postharvest pathogens of apple and peach. Plant disease (U.S.A.) 79 (3): 254-258.

ESQUIVEL, R. 1992. Algunos deutoromicetos hiperparásitos de *M. fijiensis* Morelet. Panamá. Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Panamá(IDIAP). 12 p.

FAGES, O. ; JIMENEZ, F. 1995. El control de la sigatoka negra en el cultivo del plátano. Hoja técnica MIP, No. 14. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 4p.

FOURÉ, E. 1992. Leaf spot diseases of banana and plantain caused by *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella fijiensis*. pp. 37-46.

FULLERTON, R. A. 1991. Status of banana diseases in the south pacific islands. *In* INIBAP. Banana diseases in Asia and the pacific. Brisnane, Australia. pp. 66-72.

FULLERTON, R. A. ; OLSEN, T. L. 1991. Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *In* INIBAP. Banana diseases in Asia and the pacific. Brisbane, Australia. pp. 105-114.

GAUHL, F. 1990. Epidemiología y ecología de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*, MORELET) en plátano (*Musa* sp.), en Costa Rica. Unión de Países Exportadores de Banano (UPEB), Panamá. 126 p.

GAUHL, F. 1992. Epidemiología y ecología de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*, MORELET) en plátano (Musa sp.) en Costa Rica. UPEB, Panamá. 114 p.

GONZALEZ, M.; JARAMILLO, R. 1979. Enfermedades de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet var. *difformis* Mulder y Stover). ASBANA. pp. 3-8.

GONZALEZ, Q. R. ; BUSTAMANTE, E. ; SHANNON, P. ; OKUMOTO, S. ; LEANDRO, G. 1996. Selección de microorganismos quitinolíticos en el control de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 40: 6-11.

GONZALEZ, Q. R. ; BUSTAMANTE, E. ; SHANNON, P. ; OKUMOTO, S. ; LEANDRO, G. 1996. Evaluación de microorganismos quitinolíticos antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis* en casa de mallas y campo. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 40: 12-16.

GONZALEZ, Q. R. 1995. Efecto de microorganismos quitinolíticos en el desarrollo de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Tesis de MsC. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 94 p.

HANSON, P.; HILJE, L. 1993. Control biológico de insectos. Turrialba, Costa Rica,CATIE. pp. 1-2.

HEAT, M. C. 1995. Thoughts on the role and evolution of induced resistance in natural ecosystems, and its relationship to other types of plant defenses against disease. *In* R. Hammerschmidt y J. Kuc, eds. Induced resistance to disease in plants. The Netherlands, Kluwer academic publishers. pp. 141-151.

HESSELMAN, K. 1983. Effects of ß-glucanase supplementation to barley based diets for broiler chickens. Ph.D. thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, department of animal husbandry. Report 112, 1-32.

HESSELMAN, K. ; AMAN, P. 1986. The effect of ß-glucanase on the utilization of starch and nitrogen by broiler chickens fed on barley of low- or high- viscosity. Anim. Feed Sci. Technol., 15: 83-93.

HIRANO, S.S. ; UPPER, CH.D. 1983. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. Annual review of phytopathology (U.S.A.) 21: 243-269.

JIMÉNEZ, J. ; GALINDO, J. ; RAMIREZ, C. 1985. Estudios sobre combate biológico de *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* mediante bacterias epífitas. *In* reunión ACORBAT (7, 1985, San José, C. R.). Memorias. Turrialba, Costa Rica, CATIE. Serie técnica, boletín No. 121. 503 p.

KAHLON, T.S.; CHOW, F.I.; KNUKLES, B.E.; CHIU, M.M. 1993. Cholesterol-lowering effects in hamsters of beta-glucan-enriched barley fraction, dehulled whole barley, rice bran, and oat bran and their combinations. Cereal chemistry (USA): 70(4). pp. 435-440.

KLOPFENSTEIN, C. 1988. The role of cereal ß-glucans in nutrirtion and health. Cereal food world, 33: 865-869.

KOMBRINK, E. ; SOMSSICH, I. E. 1995. Defense responses of plants to pathogens. *In* J. H. Andrews y I. C. Tommerup, eds. Advances in botanical research, incorporating advances in plant pathology. Vol. 21. London, U.K., academic press limited. pp. 1-34.

KOPP, M. ; ROUSTER, J. ; FRITIG, B. ; DARVILL, A. ; ALBERSHEIM, P. 1989. host pathogen interactions: a fungal glucan preparation protects nicotianae against infection by viruses. Plant physiology, 90: 208-216.

LEACH, R. 1964. A new form of banana leaf spot in Fiji, black leaf streak. World Crops. 16: 60-64.

LYON, G.D. ; REGLINSKI, T. ; NEWTON, A.C. 1995. Novel disease control compounds : the potential to 'immunize' plants against infection. Plant pathology (U.K.) 44: 407-427.

MARIN, D. ; ROMERO, R. 1992. El combate de la sigatoka negra en banano. departamento de investigaciones agrícolas, Corporación Bananera Nacional, S.A. Boletín N° 4. 21 p.

MAUCH, F.; HADWIBER, J.A.; BOLLER, T. 1984. Ethylene: Symptom, not signal for the induction of chitinase an B-1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. Plant Physiology (U.S.A.): 76 pp. 607-611.

McCLEARY, B.V. ; CODD, R. 1991. Measurement of (1-3) (1-4)-ß-D-glucan in barley and oats: a streamlined enzymic procedure. Journal of the science of food and agriculture, 51: 303-312.

McCLEARY, B.V. ; GLENNIE-HOLMES, M. 1985. Enzymic quantification of (1-3), (1-4)-ß-D-glucan in barley and malt. Journal of the institute of brewing, 91: 285-295.

McCLEARY, B.V. ; NURTHEN, E.J. 1986. Measurement of (1-3) (1-4)-ß-D-glucan in malt, wort and beer. Journal of the institute of brewing, 92: 168-173.

MCNEIL, M. ; DARVILL, A. ; FRY, S. ; ALBERTSHEIM, P. 1984. Structure and function of the primary cell wall of plants. Ann. Rev. Biochem., 53: 625-663.

MEGAZYME. 1996. Mixed-linkage beta-glucan: Assay procedure (McCleary method); AACC method 32-23; AOAC method 995.16; EBC methods 3.11.1, 4.16.1 and 8.11.1 Sydney, Australia. 15p.

MEREDITH, D. S. ; LAWRENCE, J. 1969. Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*) : symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. Trans. Br. Mycol. Soc. (U.K.) 52(3): 459-476.

MEREDITH, D. S. ; LAWRENCE, J. 1973. Ascospore release and dispersal in black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*). Trans. Br. Mycol. Soc. (U.K.) 60(3): 547-554.

MILLER, S.S.; FULCHER, R.G. 1994. Distribution of 1,3, 1,4 -beta-D-glucan in kernels of oat and barley using microspectrofluorometry. Cereal chemistry (USA): 71(1). pp. 64-68.

MIRANDA, J. E. 1996. Evaluación de microorganismos antagonistas al hongo *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet), colocados en el interior y exterior de la planta de banano. Tesis M.Sc., CATIE. Turrialba, Costa Rica. 101 p.

MORRIS, C.E. ; ROUSE, D.I. 1985. Role of nutrients in regulating epiphytic bacterial populations. *In* C.E. Windels y S.E. Lindow, eds. Biological control on the phylloplane. Minnesota, U.S.A. The American Phytopathological Society. pp. 63-82.

MOURICHON, X. 1990. Developpement de *M. musicola* (maladie de sigatoka) et *M. fijiensis* (maladie de raies novies) sur les bananiers et plantains. Etude du cas particular des productions d'albitude. Fruits 45(1).

MOURICHON, X. ; FULLERTON, R.A. 1990. Geografical distribution of the two species *Mycosphaerella musicola* Leach (*Cercospora musae*) and *Mycosphaerella fijiensis* (*Cercospora fijiensis*), respectively agents of sigatoka disease and black leaf streak disease in bananas and plantains. Fruits (Francia) 45(3): 213-218.

NETO, J.S.A.; DIAZ, J.A.M. 1994. Extraction and evaluation of crude glucan from saccharomyces cerevisiae cells. Revista de microbiología (U.S.A.) 25(4):270-273.

NEVINS, D. ; YAMAMOTO, R. ; HARBER, D. 1978. Cell wall ß-D-glucans of five grass species. Phytochemistry, 17: 1503-1505.

OKUMOTO, S. ;BUSTAMANTE, E. 1993a. Efecto de enmiendas foliares sobre el desarrollo del tizón temprano causado por *Alternaria solani* y sobre la población bacterial en tomate (*Lycopercicon esculentum* MILL). Manejo Integrado de Plagas (C.R.) No. 28: 1-6.

PETTERSSON, D. ; AMAN, P. 1992. Production responses and serum lipid concentration of broiler chickens fed diets based on oat bran and extracted oat bran with and without enzyme supplementation. J. Sci. Food Agric. 58: 569-576.

ROPEROS, N. I. 1991. Status of banana diseases in the Philippines. *In* INIBAP, banana diseases in Asia and the pacific. Brisbane, Australia. pp. 52-66.

RUIZ, C. A. 1995. Efecto de sustratos sobre bacterias antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis* en banano. Tesis M.Sc., CATIE. Turrialba, Costa Rica. 115 P.

SALLE, G. ; PICHARD, V. ; MOURICHON, X. 1989. Cytological study of the interaction betwen *Mycosphaerella fijiensis* Morelet and cultivars of *Musa* presenting different levels of resistance. *In* Sigatoka leaf spot diseases of bananas. Proceedings of an international workshop held at San José, Costa Rica. International network for the improvement of banana and plantain (INIBAP). pp. 180-190.

SAUMA, J. 1995. CORBANA preocupada por baja productividad bananera del país. La República. San José, C.R. 23 de marzo. p. 5c.

SAUTER, M.; KENDE, H. 1992. Levels of beta-glucan and lignin in elongating internodes of deepwater rice. Plant and Cell Physiology (USA) 33(2): 1089-1097.

SIRVAN, A. ; CHET, I. 1989. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. Journal of general microbiology (U.K.) 135: 675-682.

STEEL, R. ; TORRIE, J. 1985. Bioestadística: principios y procedimientos, 2da. ed. México, McGraw Hill. 300 p.

STINARD, P. ; NEVINS, D. 1980. Distribution of non-cellulosic ß-D-glucans in grasses and other monocots. Phytochemistry. 19: 1467-1468.

STOVER, R.H. 1989. Sigatoka spots: Thirty years of changing control strategies: 1959-1989. *In* R.H. Stover y R.A. Fullerton. Sigatoka leaf spot disease of bananas. INIBAP, 1990. Proceedings of an international workshop held at San José, Costa Rica. 374 p.

STOVER, R.H. 1987. Producción de plátano en presencia de la sigatoka negra. In Plagas y enfermedades de carácter epidémico en cultivos frutales de la región centroamericana. J. Pinochet. Turrialba, Costa Rica, CATIE. pp. 27-36.

STOVER, R.H. 1983. The effect of temperature on ascospore germ tube growth of *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. Fruits (Francia) 38: 625-628.

STOVER, R. H. 1980. Sigatoka leaf spots of bananas and plantains. Plant disease (U.S.A.) 64 (8): 750-756.

TAPIA, A.C. ; MATA, R. 1993. Estudio de la asociación de *Mycosphaerella musicola* y *Mycosphaerella fijiensis* en *Musa* sp. *In* Semana Científica (Vol. 1, 1993, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). R. Salazar. Turrialba, Costa Rica, CATIE. pp. 149-151.

TUZUN, S. ; KLOEPPER, J. 1995. Practical aplication and implementation of induced resistance. *In* R. Hammerschmidt y J. Kuc, eds. Induced reistance to disease in plants. The Netherlands, Kluwer academic publishers. pp. 152-168.

VARGIE, T.; MRSA, V. 1994. Detection of exo-B-1,3-glucanase activity in polyacrylamide gels after electrophoresis under denaturing or nondenaturing conditions. Electrophoresis (ratia), 15:903-906.

VÁSQUEZ, N. ; TAPIA, A. ; GALINDO, J. 1989. Ultrastructural studies of the infection process of *Mycosphaerella fijiensis* on Musa cultivars. *In* sigatoka leaf spot diseases of bananas. Proceedings of an international workshop. INIBAP, San José, Costa Rica. 374 p.

WELCH, R. ; LLOYD, J. 1989. Kernel (1-3)(1-4)-B-D-glucan content of oat genotypes. J. Cereal Sci. 9: 35-40.

WILSON, G. F. 1985. The threat of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) to banana/plantain production. *In* Proceedings of banana production and research in Eastern and Central Africa, # 114 e. Ibadan, Nigeria, IITA. pp. 102-104.

WINDELS, C E. ; LINDOW, S.E. 1985. Preface. *In* C.E. Windels y S.E. lindow, eds. Biological control on the phylloplane. Minnesota, U.S.A. The American Phytopathological Society. pp.v-vi.

WOOD, P. ; WEISS, J. 1984. Use of calcofluor in analisis of oat B-D-glucan. Cereal Chem. 61: 73.

ZENTMYER, G.A. 1983. The world of *Phytophthora*. *In* Erwin, P.C., Bartnicri-Garcia, S. y Tsan, P.H. *Phytophthora*: Its biology, taxonomy, ecology and pathology. Minnesota, U.S.A., The American Phytopatological Society. 392 p.

ZYGMUNT, L.C.; PAISLEY, S.D. 1993. Enzymatic method for determination of (1-3)(1-4)-Beta-D- glucans in grains and cereals: a collaborative study. Journal of AOAC International (USA), 76(5): 1069-1081.

ANEXOS

ANEXO 1. Recomendaciones a considerar en el proceso de determinación de ß-glucano.

A) Con cada serie de determinaciones debe incluirse por duplicado el blanco (testigo) y el estándar de glucosa de 50μg y/o 100μg.

B) Con cada serie de determinaciones, al menos un estándar de beta-glucano debe ser incluido.

C) El estándar de glucosa consiste de 0.1 ml de buffer de acetato de sodio más 0.1 ml del estándar de glucosa (50μg/0.1 ml o 100μg/0.1 ml) más 3 ml del reactivo glucosa oxidasa/peroxidasa (GOPOD).

D) Se debe evitar el contaminar la preparación de la enzima lichenasa con la preparación de la beta-glucosidasa (lo contrario no es problema).

ANEXO 2. Resultados de la prueba de Dunnett para el efecto antagónico de cepas glucanolíticas sobre la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*.

Tratamiento	Diferencia significativa con relación al testigo[a]
Cepa GS3	***
Cepa GBC2	***
Cepa GS2	***
Cepa GBC1	***
Cepa GS4	***
Cepa GC1	***
Cepa GE1	ns

a → Testigo = agua destilada estéril

*** = significativo al 5%

ns = no significativo

Anexo 3. Resultados de la prueba de Dunnett para el efecto antagónico de cepas glucanolíticas sobre la germinación de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis.*

Tratamiento	Nivel de significancia con respecto al testigo[a]
Cepa GS3	***
Cepa GBC2	***
Cepa GS2	***
Cepa GBC1	***
Cepa GS4	ns
Cepa GC1	***
Cepa GE1	ns

a ⟶ Testigo = agua destilada estéril

*** = significativo al 5%

ns = no significativo

ANEXO 4. Método de preparación del estándar de beta- glucano (cebada).

Método enzimático de McCleary, compañía Megazyme (1996).

1. Disolver la muestra (1g) en agua destilada (2 mg/ml), en un recipiente con tapa.

2. Tapar el recipiente y agitar la mezcla en forma vigorosa por 2 min. para dispersar el contenido.

3. Destapar el vial y calentarlo en un plato caliente a 150 °C hasta que la solución tome un color claro (aproximadamente 2 min), la solución alcanza unos 60°C de temperatura.

4. Tapar inmediatamente el recipiente para minimizar la evaporación y dejar enfriar a temperatura ambiente.

5. La concentración de beta-glucano en la solución estándar se determinará de la siguiente forma:

A) Diluir una alícota de la solución estándar en un volumen igual de agua destilada.

B) Colocar alícotas (0.1 ml) de la solución estándar diluida en el fondo de tres tubos de prueba.

C) Agregar 0.1 ml (5 U) de lichenasa a cada uno de los tubos e incubarlos por 10 min. a 40°C.

D) A dos de los tubos agregar 0.1 ml (0.2U) de beta-glucosidasa e incubarlos a 40°C por 15 min. Al tercer tubo (blanco) agregar buffer de acetato de sodio (0.1 ml, 100mM, pH 4) e incubar de la misma forma.

E) A cada tubo agregar 3 ml de glucosa oxidasa/peroxidasa e incubarlos a 40°C por 20 min. Incluir en este paso los estándar de glucosa (100μg) y el blanco.

F) Leer la absorbancia a 510 nm y calcular la concentración de beta-glucano usando la siguiente ecuación:

Concentración de beta-glucano (mg/ml) ;

$= \Delta E \times F \times 162/180 \times 10 \times 1/1000 \times$ dilución

$= \Delta E \times F \times 0.018$

donde:

ΔE = Absorbancia muestra - absorbancia blanco

F = 100 (μg de glucosa)/absorbancia de 100 μg de glucosa

162/180 = Ajuste de la glucosa libre a la anhydroglucosa (como ocurre en el beta-glucano).

10 = Conversión de 0.1 ml (como en la prueba) a 1.0 ml.

1/100 = conversión de μg a miligramos.

Dilución = 2 (la alícota original se disolvió en una cantidad igual de agua destilada).