

**CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE
INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA
ÁREA DE POSGRADO**

**EFECTO DE MICROORGANISMOS QUITINOLÍTICOS
EN EL DESARROLLO DE SIGATOKA NEGRA
(*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

Roberto González Quesada

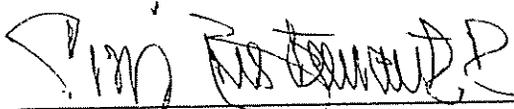
Turrialba, Costa Rica

1995

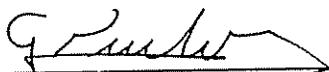
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la jefatura del Area de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:



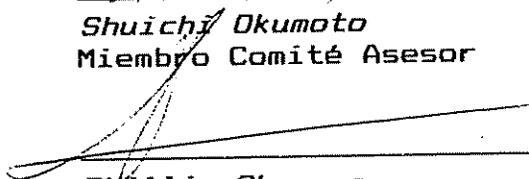
Elkin Bustamante
Profesor Consejero



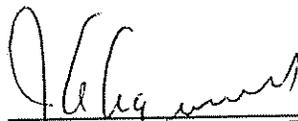
Gregorio Leandro
Miembro Comité Asesor



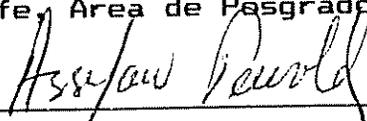
Shuichi Okumoto
Miembro Comité Asesor



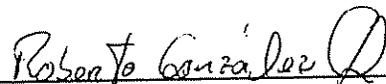
Phillip Shannon
Miembro Comité Asesor



Juan Antonio Aguirre
Jefe, Area de Pasgrado



Assefaw Tewolde
Director, Programa de Enseñanza



Roberto González Quesada
Candidato

DEDICATORIA

A mi esposa Marianela Mata Salazar

A mis hijos Massiel González Mata
 Roberto González Mata
 Fabiola González Mata

A mis padres Bolívar González Salas
 Teresa Quesada Bogantes

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi sincero agradecimiento:

- Al Dr. Elkin Bustamante, por su amistad, apoyo y excelente labor como profesor consejero en el trabajo de tesis.
- Al MSc. Shuichi Okumoto, por sus oportunas orientaciones y sugerencias.
- Al MSc. Phillip Shannon, por sus excelentes correcciones en el documento final.
- Al Dr. Gregorio Leandro, por su apoyo y sugerencias en los trabajos de invernadero y campo.
- A la MSc. Vera Sánchez, por su amistad y cooperación en el trabajo.
- A la MSc. Nelly Vásquez, por su amistad y colaboración durante la investigación
- A mis amigos Ing. Herbert González, Walter Bermúdez, Arturo Gamboa, Mario Cervantes y Manrique González, por sus sugerencias, ayuda y amistad.
- A la Standard Fruit Company, por prestar sus instalaciones de invernadero y las parcelas de campo para la realización del trabajo de tesis.
- Al Proyecto MIP-RENARM del CATIE, por el apoyo financiero brindado durante la ejecución del trabajo de tesis.

INDICE

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
INDICE.....	v
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xi
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1 Aspectos generales sobre el patógeno y la enfermedad.....	4
2.1.1 Clasificación taxonómica de <i>M. fijiensis</i>	4
2.1.2 Sintomatología.....	4
2.1.3 Formación de estructuras reproductivas... ..	6
2.1.4 Importancia de las estructuras reproductivas en la diseminación de Sigatoka Negra.....	8
2.1.5 Condiciones climáticas que favorecen la enfermedad.....	9
2.1.6 Proceso de infección.....	10
2.2 Características ambientales del filoplano.....	12
2.2.1 Físicas.....	12
2.2.2 Químicas.....	13
2.2.3 Biológicas.....	15
2.3 Control biológico de patógenos en la filosfera.....	16
2.3.1 Formas de control biológico.....	18
2.3.1.1 Introducción de antagonistas... ..	18
2.3.1.2 La protección inducida.....	24
2.3.1.3 Manipulación del ambiente.....	26

2.3.1.3.1	El uso de quitina como sustrato.....	27
2.3.1.4	Combate integrado.....	30
2.4	Selección de microorganismos antagónicos.....	32
2.5	Control biológico de Sigatoka Negra.....	34
3.	MATERIALES Y METODOS.....	36
3.1	Localización.....	36
3.2	Selección de microorganismos quitinolíticos....	36
3.2.1	Sitio de selección.....	36
3.2.2	Aplicación de quitina al follaje.....	37
3.2.3	Traslado y procesamiento de muestras....	37
3.2.4	Preparación de medios.....	38
3.2.5	Aislamiento de microorganismos quitinolíticos.....	39
3.2.6	Selección de cepas quitinolíticas.....	40
3.3	Prueba de antagonismo en laboratorio.....	41
3.3.1	Preparación de descargas de ascosporas..	41
3.3.2	Preparación de discos de hoja.....	41
3.3.3	Aplicación de microorganismos.....	42
3.3.4	Prueba de antagonismo.....	42
3.3.5	Variables evaluadas.....	43
3.3.6	Análisis de resultados.....	44
3.4	Identificación de microorganismos.....	44
3.5	Compatibilidad de microorganismos a fungicidas.	44
3.5.1	Procedimiento.....	45
3.5.2	Variable evaluada.....	46
3.6	Prueba de adherencia de microorganismos.....	46
3.6.1	Procedimiento.....	47
3.6.2	Variable evaluada.....	48
3.6.3	Análisis de resultados.....	48
3.7	Prueba de antagonismo en invernadero.....	48
3.7.1	Preparación del material experimental...	49
3.7.2	Prueba de antagonismo.....	49
3.7.3	Procedimiento.....	50
3.7.4	Evaluación de tratamientos.....	51
3.7.5	Análisis de resultados.....	52

3.8	Prueba de antagonismo en campo.....	52
3.8.1	Localización.....	52
3.8.2	Preparación y manejo del material experimental.....	53
3.8.3	Prueba de antagonismo.....	54
3.8.4	Procedimiento.....	54
3.8.5	Evaluación de tratamientos.....	55
3.8.6	Análisis de resultados.....	56
4.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	57
4.1	Selección de microorganismos quitinolíticos....	57
4.2	Prueba de antagonismo a <i>M. fijiensis</i> en laboratorio.....	61
4.3	Identificación de microorganismos.....	64
4.4	Compatibilidad de microorganismos con fungicidas.....	66
4.5	Prueba de adherencia.....	69
4.6	Prueba de antagonismo en invernadero.....	70
4.7	Prueba de antagonismo en campo.....	75
4.7.1	Condiciones climáticas.....	75
4.7.2	Prueba de antagonismo.....	77
5.	CONCLUSIONES.....	83
6.	RECOMENDACIONES.....	85
7.	LITERATURA CITADA.....	86
8.	ANEXOS.....	94

INDICE DE CUADROS

	Página
Número	
Cuadro 1. Número de microorganismos quitinolíticos aislados por sitio de evaluación.....	57
Cuadro 2. Evaluación de microorganismos en AQ y ANQ con respecto a la producción de quitinasas y al sitio de procedencia durante las primeras 48 horas. Turrialba, Costa Rica. 1994.....	59
Cuadro 3. Efecto de diferentes concentraciones de productos químicos sobre la zona de inhibición de algunas cepas bacteriales, Turrialba, Costa Rica, 1994.....	68
Cuadro 5. Análisis de los tratamientos en invernadero, según prueba de contrastes, Turrialba, Costa Rica. 1994.....	72
Cuadro 6. Análisis promedio de los tratamientos en campo, por medio de la prueba de contrastes. Turrialba, Costa Rica, 1994.....	79

INDICE DE FIGURAS

NUMERO	Página
Figura 1. Efecto de algunos microorganismos quitinolíticos sobre la germinación y deformación de ascosporas de <i>M. fijiensis</i>	63
Figura 2. Efecto antagónico de algunos microorganismos quitinolíticos en la longitud del tubo germinativo de ascospora de <i>M. fijiensis</i>	63
Figura 3. Efecto de Silwet L77 y NP7 sobre la persistencia de microorganismos en la superficie de hoja, basado en el número de colonias (ufc) por tratamiento.....	70
Figura 4. Efecto de diferentes tratamientos en el control biológico de Sigatoka Negra en invernadero con respecto al testigo.....	73
Figura 5. Comportamiento promedio semanal de la temperatura, precipitación y de la producción de ascosporas, durante el período de evaluación de los tratamiento en campo.....	76
Figura 6. Efecto promedio de los tratamientos en campo en el control de Sigatoka Negra a través de 4 fechas de aplicación.....	78
Figura 7. Efecto promedio de cada tratamiento con respecto al testigo en el control de Sigatoka Negra, después de eliminar las aplicaciones de microorganismos.....	82

GONZALEZ, R. 1994. Efecto de microorganismos quitinolíticos en el desarrollo de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano.

Palabras claves: Banano, *Mycosphaerella fijiensis*, control biológico, quitina, *Serratia marcescens*, *Bacillus* spp., antagonistas.

RESUMEN

La Sigatoka Negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, es en Costa Rica el mayor problema fitopatológico que presenta el cultivo del banano, en la cual se invierten anualmente alrededor de \$46 millones de dólares correspondientes al valor de aproximadamente 35 aspersiones de fungicidas al año en 45 mil hectáreas.

El objetivo del presente trabajo fue buscar microorganismos antagónicos a *M. fijiensis* y realizar la prueba de su eficacia bajo condiciones de invernadero y campo. La investigación se realizó en el Laboratorio de Diagnóstico del CATIE en Turrialba, Costa Rica, así como en el invernadero y parcelas experimentales de la Standard Fruit Company, en Río Frío, Sarapiquí, Costa Rica.

Ciento veinte aislamientos de microorganismos quitinolíticos se obtuvieron de plantas de Gran Enano, ubicadas en dos sitios: uno con alta incidencia de Sigatoka Negra, considerado como sitio caliente, y el otro con baja incidencia, considerado como no caliente. Se encontró que el sitio no caliente presentó la mayor población, los cuales se evaluaron en los medios Agar-Quitina y Agar Nutriente-Quitina, seleccionando 13 organismos que formaron un halo transparente en las primeras 48 horas.

La prueba de antagonismo en laboratorio se realizó sobre discos de hoja, de donde se seleccionaron cuatro microorganismos: dos *Serratia marcescens*, identificados en el Technical Center, California; más un *Bacillus sp* y una *Serratia entomophyla*, provenientes de tomate y del tracto digestivo de *Costelytra zcalardica*, (Col: Scarabaeidae) respectivamente. Los cuatro microorganismos fueron compatibles con los fungicidas más utilizados en banano. También se realizó una prueba con coadyuvantes, encontrando que afectan los microorganismos evaluados, por lo que no se usaron en las pruebas de invernadero y campo.

En la prueba de invernadero se aplicaron a las plantas los tratamientos de fungicidas y microorganismos, y se les expuso al inóculo natural por un período de siete días. Los

microorganismos probados fueron tan eficientes como el fungicida, presentando un nivel de control de la enfermedad del 84% y 78%, respectivamente.

Para la prueba de campo se realizaron aplicaciones semanales de los microorganismos. Los fungicidas utilizados se aplicaron alternados cada 15 días. Los resultados indicaron un 60% de control por parte de los fungicidas y de un 40.1% por parte de los otros tratamientos con respecto al testigo. No hubo diferencias significativas entre microorganismos.

Estos resultados representan la primera prueba exitosa en condiciones de invernadero y campo de control de Sigatoka Negra con microorganismos quitinolíticos en condiciones de cero coadyuvantes, lo que puede ser una alternativa viable para su control.

SUMMARY

Key words: Banana, *Mycosphaerella fijiensis*, biological control, chitin, *Serratia marcescens*, *Bacillus sp.*, antagonists.

Black Sigatoka, caused by the fungus *Mycosphaerella fijiensis*, is the worst plant pathology problem for bananas in Costa Rica. Annually, approximately \$46 million are invested in 35 fungicide sprayings in 45 thousand hectares.

The objective of this study was to search for antagonistic microorganisms to *M. fijiensis* and conduct tests for their efficacy under greenhouse and field conditions. The study was conducted in CATIE's Diagnostic laboratory in Turrialba, as well as in the greenhouse and experimental plots at the Standard Fruit Company's site at Río Frio, Sarapiquí.

One hundred twenty bacteriae isolates were obtained from the cultivar "Grand Nane" planted at the two sites: one with high Black Sigatoka incidence, called a "hot" location, and the other with less incidence, denominated "not hot" areas. It was found that the "not hot" site showed the highest chitinolytic microorganism population, based on evaluations in Chitin-Agar and Chitin-Nutrient-Agar media. Thirteen organisms which formed a transparent halo in the first 48 hours were selected.

The antagonism laboratory test was conducted on leaf discs, and four microorganisms were selected for further assays: two were *Serratia marcescens* (from banana leaf), one *Bacillus sp.* and, one *Serratia entomophyla* (originally from the midgut of the insect, *Costelytra zcalardica*, (Col: Scarabaeidae). These four microorganisms were compatible with the fungicides most commonly used in bananas. A test of coadyuvants showed that these affect adversely the bacteria evaluated. Therefore, they were not used in the greenhouse and field tests.

In greenhouse tests, the fungicide and microorganism treatments were applied to the plants, and they were exposed to the natural inoculum for seven days. Results indicate that all the microorganisms tested were as efficient as the fungicide, showing a control level of 84% and 78%, respectively. For the field test, weekly applications of the microorganisms were made. Fungicides used were applied alternately every 15 days. Results show 60% control by fungicides and 40.1% by other treatments with respect to the control. There were no significant

differences between microorganisms.

These results represent the first successful tests under greenhouse and field conditions for Black Sigatoka control with chitinolytic microorganisms without coadyuvants, which would be one viable alternative for its control.

Efecto de microorganismos quitinolíticos en el desarrollo de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano.

1. INTRODUCCION

Sigatoka Negra producida por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, es una enfermedad de las musáceas, de amplia diseminación en América Central y que ha aumentado los costos por el uso de los fungicidas (Stover *et al*, 1989). En el pasado, su control se hizo con fungicidas y aceites. A partir de 1970 han sido importantes los aceites en emulsiones con agua y los fungicidas sistémicos, tales como el benomil y el propiconazole. Debido a que han aparecido variantes de *M. fijiensis*, resistentes a benomyl, se ha incrementado el uso de clorotalonil, propiconazole y tridemorf, aumentando la probabilidad de desarrollo de resistencia del hongo a esos productos con las consecuentes pérdidas millonarias y deterioro del ambiente (Stover *et al* 1989).

Esta enfermedad ataca las hojas de las plantas de banano y plátano, produciendo un rápido deterioro del área foliar 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.

En Costa Rica, no solo representa el mayor problema fitopatológico, sino que, individualmente es además, el de mayor incidencia económica. Esta incidencia, está representada por el alto costo de programas de combate y las pérdidas de productividad, ya sea por la limitación del potencial de la planta, o por la eliminación de la fruta que se efectúa para mantener su calidad.

Según datos publicados por CORBANA (1993), el impacto económico de la enfermedad en Costa Rica, sin tomar en cuenta las pérdidas por falta de calidad, muestran que entre los años 1983 y 1993, el área total de banano se incrementó en un 41%, mientras que el aumento en el costo total en fitoprotección fue de un 156%. En otras palabras, solo en control de sigatoka, se invierte anualmente, 46 millones de US\$, con aproximadamente, 35 aplicaciones de fungicidas al año.

Una alternativa al problema es incluir el control biológico dentro de un programa de manejo integrado de plagas, ya que, cuando se tiene éxito y se le asocia con buenas prácticas agrícolas, resulta económico, estable y ecológicamente deseable,

ésto último, porque no tiene efectos colaterales, no causa daños al medio ambiente por su selectividad y seguridad, y por el enriquecimiento de la complejidad faunística del ecosistema (Quesada, 1989).

El objetivo de la investigación fue la búsqueda de microorganismos quitinolíticos antagónicos a *M. fijiensis*, y la prueba de su eficacia bajo condiciones de campo.

La hipótesis se fundamenta en la existencia de microorganismos con habilidad de producir enzimas quitinolíticas que podrían degradar la quitina, presente en las ascosporas del hongo.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Aspectos Generales de la Enfermedad

2.1.1 Clasificación taxonómica de *M. fijiensis*

Pertenece a la clase *Ascomycetes*, sub clase *Loculoascomycetidae*, orden *Dothideales*, familia *Dothideaceae*, género *Mycosphaerella* (Alexopoulos y Mims, 1979).

2.1.2 Síntomatología

Meredith y Lawrence (1969) describieron la siguiente secuencia del desarrollo de síntomas de la enfermedad:

a. Estado de mancha inicial: pequeñas manchitas de aproximadamente 0.25 mm, de color pardo rojizo sobre la superficie abaxial de la hoja. Son más abundantes cerca del margen izquierdo de ésta.

b. Primer estado de estría: las manchitas iniciales se extienden lateralmente y se fusionan, formando estrías paralelas a la venación secundaria de la hoja. En este estado, las estrías son más fácilmente visibles sobre

la superficie abaxial de la hoja.

c. Segundo estado de estría: las estrias se alargan ligeramente; se observa un cambio en color: de pardo rojizo a pardo oscuro o casi negro.

d. Primer estado de mancha: las estrias se ensanchan y se vuelven más o menos fusiformes o elípticas. Son de color pardo oscuro y están circundadas por un halo claro, pardo y acuoso.

e. Segundo estado de mancha: el centro de la lesión aparece ligeramente hundido y mantiene el color oscuro. Algunas veces aparece un ligero amarillamiento alrededor de ella.

f. Estado de mancha madura: en este estado el centro de lesión se necrosa, toma una coloración grisácea y aumenta el hundimiento. La mancha es rodeada por un halo angosto de color pardo oscuro o negro y forma bien definida. Al aumentar el número de lesiones, se observa la paulatina coalescencia de éstas sobre la hoja, que toma una coloración oscura. Esto ocurre 3 o 4 semanas después de que aparecen los primeros síntomas.

2.1.3 Formación de estructuras reproductivas

Esta enfermedad se caracteriza porque durante los primeros estados de desarrollo, se forman conidióforos y conidios.

En el campo, los conidióforos de *M. fijiensis* se desarrollan primero sobre la superficie abaxial de pizcas iniciales en el primer estado de estría. Nuevos conidióforos continúan emergiendo hasta el segundo estado de mancha. La producción de conidios es casi continua entre el segundo estado de estría y el segundo estado de mancha. Los primeros conidióforos en terminar la producción de conidios son aquellos situados cerca del centro de la mancha; los cercanos a la periferia son los últimos (Meredith y Lawrence, 1969).

Al poco tiempo de desarrollo de la lesión, cesa la producción de conidióforos y se inicia la formación de espermogonios y pseudotecios (Meredith y Lawrence, 1969).

Los espermogonios de *M. fijiensis* comienzan a desarrollarse, en el segundo estado de estría o primer estado de mancha y son más abundantes sobre la cara abaxial que sobre la adaxial. La primera indicación de

formación de un espermogonio es un agregado de hifas hialinas dentro de la cara subestomática. Sobre la superficie abaxial de la hoja, los espermogonios frecuentemente se desarrollan en la cámara subestomática de la cual uno o más conidióforos han emergido.

Los pseudotecios son anfígenos, pero más frecuentes sobre la superficie adaxial de la mancha (Leach, 1964; Lawrence, 1969; Frossard, 1980). Son dispersos, globosos, inmersos, de 50-85 μm de diámetro y tienen una pared compuesta de tres o más capas de células poligonales oscuras. Las ascas son numerosas, bitunicadas, obclavadas, y con 8 ascosporas; los paráfisos están ausentes. Las ascosporas son biseriadas, con un septo y una ligera constricción en él, de forma clavada fusoide, con una célula más grande orientada más arriba de la asca, hialinas, miden en promedio 13.7 μm de largo x 3.7 μm de ancho (Meredith y Lawrence, 1969).

2.1.4 Importancia de las estructuras reproductivas en la diseminación de Sigatoka Negra

Tanto ascosporas como conidios son capaces de causar infección. El papel de los conidios en el campo no se conoce con claridad; sin embargo, son producidos abundantemente sobre lesiones (Quiñón, 1972). Aparentemente los conidios son importantes en la diseminación entre hojas vecinas, mientras que las ascosporas juegan un papel principal en diseminación a mayores distancias (Stover y Dickson, 1976).

Se considera que una estría de Sigatoka Negra puede producir en promedio, 134 conidióforos cada uno con 6 conidios. Eso implica que cada estría es potencialmente capaz de producir más de 1000 conidios (Quiñón, 1972).

La producción de ascosporas también es alta, y este es el inóculo predominante en tiempo de lluvia. Las ascosporas, bajo condiciones óptimas, se producen dos semanas después de que aparece la pizca fina, y se caracterizan porque pueden sobrevivir más de 6 semanas y aún producirse en hojas separadas de la planta, constituyéndose en la principal fuente de inóculo (Stover, 1972).

Las ascosporas son producidas en los pseudotecios en las hojas fuertemente afectadas, y son liberadas al aire cuando los pseudotecios se humedecen durante el período de lluvia. Ya liberadas, se diseminan a grandes distancias por el aire. En tejido seco, las ascosporas formadas en pseudotecios maduros permanecen viables, y diseminables, por largos períodos. En Sigatoka Negra, el tiempo de supervivencia de las ascosporas, depende del ritmo de descomposición de las hojas. Cada pseudotecio produce sólo una cosecha de ascosporas, pero su maduración no es uniforme, descargando aún después de que cada hoja se ha cortado. Los conteos de ascosporas en plantaciones comerciales de banano, han revelado de 8000 a 32000 ascosporas por metro cúbico de aire durante 24 horas en contraste con solo 4000 en Sigatoka Amarilla (Stover, 1980).

2.1.5 Condiciones climáticas que favorecen la enfermedad

Tres componentes del clima juegan un papel muy importante en el desarrollo y diseminación de la enfermedad: lluvia, rocío y temperatura. En este sentido, una rápida propagación y porcentaje de

infección alto, son favorecidos por una condición de tiempo caluroso y lluvioso, así como por alta humedad en el ambiente (González y Jaramillo, 1979).

De acuerdo con Meredith (1970) y Sastry (1988), el aumento de la Sigatoka durante y después de períodos lluviosos se debe a la presencia de una película de agua sobre la superficie de la hoja, que provee condiciones óptimas para la germinación de conidios y ascosporas, y permite la fertilización de prototecios por las espermacias. Aunque el tubo germinativo disminuye su crecimiento marcadamente durante los períodos secos, reasume la actividad cuando se humedece la hoja.

2.1.6 Proceso de infección

Las ascosporas y conidios de *M. fijiensis*, después de su deposición sobre las hojas, y bajo condiciones favorables de temperatura y humedad, germinan en un período aproximado de 6 horas. El tubo germinativo se alarga durante la noche, favorecido por la película de rocío que se forma sobre la hoja, pudiendo penetrar los tejidos del hospedante entre 12-15 horas después de la inoculación (Vásquez *et al*, 1989).

La infección se da casi en forma exclusiva, a través de la superficie inferior de la hoja y se lleva a cabo vía poro estomático. El hospedante es entonces penetrado por una hifa de infección, la cual forma una vesícula en la cavidad subestomática. De esta vesícula, una fina hifa crece directamente a través de una o más capas de mesófilo hacia el interior de los tejidos de la hoja (Sallé *et al*, 1989).

Una vez que ocurre la infección, las hifas del patógeno salen por el estoma y desarrollan conidióforos, o bien, crecen sobre la superficie de la hoja para luego penetrar los estomas cercanos. Este movimiento de un estoma a otro parece ser corriente en Sigatoka Negra, lo que trae como consecuencia el desarrollo y aparición de más lesiones sobre toda la lámina (Stover, 1980).

2.2 Características ambientales del filoplano

2.2.1 Físicas

Los componentes del ambiente que participan en el microclima de las plantas son la radiación, velocidad del viento, temperatura, humedad y concentración de dióxido de carbono. Estos factores son controlados por las condiciones climáticas prevalecientes, pero son modificados por la estructura de la planta, por la densidad del cultivo y por la forma, tamaño y rugosidad superficial de los órganos vegetales.

En la mayoría de los órganos, el ambiente físico es muy diferente a la rizosfera. La temperatura y la humedad en el filoplano fluctúan en un mayor grado y a una mayor velocidad que en la rizosfera. Además, los colonizadores del filoplano están expuestos a la luz solar, a la radiación ultravioleta y pueden ser removidos del nicho mediante la acción de la lluvia o del viento, factores físicos con influencia en la rizosfera (Baker y Cook, 1974).

La humedad relativa en el filoplano es el factor más importante sobre el crecimiento y la supervivencia de microorganismos. Por la continua transpiración, la humedad superficial es mayor que la del aire

circundante, la diferencia depende del espesor de la cutícula y de la apertura estomática. Para contribuir al crecimiento de la mayoría de microorganismos, la superficie vegetal debe estar húmeda o con una humedad relativa superior al 95%. Tales condiciones tienen lugar durante la caída de lluvia o cuando ocurre condensación por la noche, producto del enfriamiento del órgano vegetal cuando la humedad del aire está cerca de la saturación (Blakeman, 1985).

2.2.2 Químicas

Los microorganismos epífitos colonizan el filoplano gracias a su habilidad de producir sustancias inorgánicas y orgánicas en el agua que está en contacto con la superficie vegetal. Algunas sustancias se originan externamente tal es el caso de partículas minerales, granos de polen y polvo. No obstante, la mayor proporción se origina dentro de la planta por el proceso de difusión a través de los tejidos al filoplano, donde hacen contacto con el agua (Godfrey, 1976). Dentro de las sustancias en difusión existen componentes que actúan como nutrimentos para los microorganismos epífitos, pero al mismo tiempo, existen sustancias que inhiben la germinación o el

crecimiento de estos colonizadores (Blakeman, 1971).

En las etapas iniciales del crecimiento del tejido vegetal, la única fuente de nutrición son los productos que se difunden de los tejidos. Las sustancias difundidas (azúcares y aminoácidos), carbono y nitrógeno, son muy bajas, lo que se refleja en la poca población microbiana que se desarrolla en esta etapa, básicamente constituida por bacterias. Otras sustancias difundidas de los tejidos lo constituyen elementos minerales, hormonas de crecimiento y sustancias inhibitorias de crecimiento tales como fenoles y terpenoides (Blakeman, 1985).

Con el sucesivo crecimiento de los tejidos, la microflora va aumentando progresivamente debido a la llegada de materia orgánica foránea. Al llegar éstas sustancias al filoplano, las bacterias van perdiendo su hegemonía, cediendo ante la proliferación de levaduras y hongos. Las levaduras dominan el filoplano, cuando el órgano presenta un desarrollo de un 50 - 75%, en tanto que los hongos dominan el nicho al llegar el órgano a la senescencia (Collins, 1976; Leben, 1964).

2.2.3 Biológicas

La población de microorganismos en el filoplano es alta, alcanzando un espesor de 22 μm en la superficie de plantas tropicales (Cook y Baker, 1983) y ha sido estimada en millones de células por gramo de tejido (Davenport, 1976).

Baker y Cook (1974) dividieron la flora epífita en microorganismos residente y casuales. Los primeros son los que se multiplican sobre las superficies vegetales sin causar daño alguno a la planta, mientras que los segundos están en el filoplano en forma pasiva, y son incapaces de reproducirse en éste ambiente debido a características genéticas o a la presencia de residuos extraños en el filoplano.

Los microorganismos residentes son por lo general no específicos y ocurren en una gran diversidad de especies. Los principales componentes de esta flora lo constituyen las bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Cook y Baker, 1983). Dentro de las bacterias destacan las gram negativas pigmentadas que incluyen los géneros *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (Blakeman y Fokkema, 1982).

Las bacterias son las más abundantes en las etapas iniciales de crecimiento (Blakeman, 1985), en tanto que las poblaciones de levaduras tiende a aumentar a partir en las etapas intermedias del crecimiento (Last, 1955). Por otra parte, los hongos epífitos permanecen latentes en el filoplano esperando el inicio de la senescencia para germinar y colonizar el hábitat aéreo, tales como *Alternaria*, *Cladosporium* y *Epicoccum* (Blakeman, 1985; Baker y Cook, 1974).

2.3 El control biológico de patógenos en la filosfera

El control biológico en la parte aérea de las plantas está menos desarrollado que en la rizosfera porque los antagonistas pueden disponer de una forma mas estable de supervivencia en este ambiente y por la disponibilidad de fungicidas baratos, efectivos y fáciles de aplicar al follaje, desalentando así el uso de control biológico (Blakeman y Fokkema, 1982).

Los agroquímicos utilizados en el control de plagas pueden reducir las poblaciones de microorganismos en el filoplano (Andrews y Kenerley, 1978). Por lo tanto, un programa de control integrado de enfermedades, debe considerar el espectro de acción del fungicida o

bactericida para que pueda ser útil y compatible con otros factores de manejo (Blakeman y Fokkema, 1982).

Es difícil encontrar el antagonista perfecto para el control de un patógeno particular en la naturaleza, sin embargo, es posible mejorar la capacidad de los organismos para controlar las enfermedades mediante la selección de aquellos con características más efectivas. Tales características, incluyen un aumento del antagonismo contra patógenos, aumentando la capacidad competitiva contra la microflora presente, mayor habilidad para multiplicarse bajo condiciones presentes y persistir bajo condiciones desfavorables en la superficie del hospedero, y mejorar la resistencia a ciertos fungicidas que debe formar una parte del programa de control integrado (Blakeman y Fokkema, 1982).

2.3.1 Formas de control biológico

El combate biológico en el filoplano se ha tratado de realizar de dos formas: la primera, introduciendo un microorganismo antagonista en la superficie vegetal capaz de multiplicarse y colonizar, y la segunda, manipulando el micro-ambiente físico o nutricional (Bravo y Victoria, 1981).

2.3.1.1 Introducción de antagonistas

Un microorganismo antagonista es aquel que interfiere con las actividades de otro microorganismo con el que se está interrelacionando en el mismo microambiente.

Debido a que la estrategia de introducción se basa en la capacidad del antagonista a habitar y colonizar el nicho ecológico del patógeno, se ha preferido utilizar microorganismos residentes que presentan antagonismo al patógeno; estos epífitos antagonistas están daptados a sobrevivir y reproducirse en el filoplano con lo cual la estrategia de combate es aumentar su número en el ambiente a tal punto que anule en forma eficaz la acción del patógeno.

Las bacterias han sido los microorganismos más usados en esta estrategia de combate debido a su fácil manejo, a su alta tasa de reproducción *in vitro* y a que es el primer colonizador del filoplano. A pesar de las ventajas que ofrecen las bacterias, se han obtenido datos contradictorios al llevar posibles bacterias antagonistas a la prueba de campo ya que las bacterias no soportan por períodos largos la exposición a alta radiación solar (Leben, 1964) o a una condición de baja humedad relativa (Leben *et al*, 1965).

Leben *et al* (1965) fue uno de los pioneros en explorar el combate biológico de enfermedades fungosas mediante bacterias. A partir de hojas de pepino aisló 230 cepas bacteriales de las cuales solo una cepa disminuyó significativamente el ataque de antracnosis (*Colletotrichum lagenarium*), explicándose el mecanismo de acción por antibiósisis. Sin embargo, el combate biológico fracasó en el campo debido a que la baja humedad relativa y la luz solar causaron una rápida pérdida de viabilidad de las células bacteriales aplicadas (Leben *et al* 1965).

Swinburne *et al* (1973) aisló *Bacillus subtilis* de la axila de hojas de manzana; en pruebas *in vitro*

(Sánchez, 1982) e *in vivo* (Swinburne *et al* 1975), esta bacteria mostró un alto antagonismo a *Nectria galligena*, patógeno que causa el cáncer del tallo, el cual penetra por las cicatrices que quedan en el tallo al caer la hoja en otoño. La bacteria es capaz de sobrevivir hasta la primavera y fue tan eficiente como la aplicación de nitrato de fenilmercurio. El método de combate no se pudo implantar a nivel comercial debido a que la caída de las hojas es muy irregular y a que la bacteria no puede crecer en la corteza del árbol, con lo cual se hacía imposible combatir el patógeno en una sola aplicación.

El uso de la micoflora epífita en combate biológico se restringe a patógenos necrotróficos que presentan algún crecimiento superficial antes de la penetración (Dennis, 1976; Fokkema y Lorbeer, 1976; Fokkema *et al*, 1979).

Según Blakeman y Fokkema (1982), la estrategia de usar este tipo de organismo es viable cuando se protegen órganos vegetales donde la colonización natural es retardada y donde abundan los nutrimentos tales como en frutos y flores.

En fresa Bhatt *et al*, (1962) demostraron el efecto

antagónico de *Cladosporium* sp. hacia *Botrytis cinerea*. Tres aplicaciones de una suspensión de conidios de *Cladosporium* con 1% de glucosa entre floración y cosecha incrementó la producción. La pudrición de frutas maduras no se redujo con la aplicación del hongo antagonista y el aumento de la producción se explicó con base en la baja incidencia de *Botrytis* en frutos verdes.

Fokkema y Lorbeer (1974) en estudios a nivel de invernadero de la interacción de la micoflora saprofítica sobre el desarrollo de enfermedades foliares en cebolla, concluyeron que *Alternaria pullulans*, *Sporobolomyces roseus* y *Cladosporium herbarum* redujeron en forma significativa la infección de *Alternaria porri* y *Bacillus cinerea*. Se demostró que el efecto de estos microorganismos residentes es sobre el desarrollo superficial del micelio que es necesario antes de la infección. Dicha supresión se explica con base en la competencia de carbohidratos y aminoácidos que ocurre en el filoplano.

El ejemplo más exitoso debido a su gran uso en escala comercial, comprende un hongo que es un típico epífita en pino: *Peniophora gigantea* (Risbeth, 1963). El patógeno afectado es *Heterobasidium annosum* un

basidiomicete que se introduce en los cortes frescos de pino, produciendo una pudrición del sistema radicular que obstruye los retoños. La estrategia de combate se fundamenta en introducir en los cortes frescos a un patógeno débil como *P. gigantea* que no causa daño al árbol sano y que tiene la capacidad de colonizar rápidamente el corte debido a que es muy prolífico y a que está relativamente solo en el nicho. El mecanismo de acción es competencia por espacio.

Aunque el uso de microorganismos epífitos residentes es aparentemente lo más recomendable en el combate de patógenos de órganos vegetales aéreos, existen trabajos (Blakeman y Fokkema, 1982; Dubos, 1984; Thompson *et al*, 1976; Tronsmo y Dennis, 1978; Vargas, 1984) que demuestran que el uso de antagonistas aislados de ambientes foráneos pueden ser una vía de combate igual o mejor, en cuanto a efectividad y residualidad, al uso de antagonistas aislados del filoplano.

Spurr, citado por Blakeman y Fokkema (1982) combatió la cercosporiosis en maní y la alternariosis en tabaco en tres ciclos diferentes, mediante aplicaciones foliares de diferentes bacterias a intervalos de quince días. Las bacterias aplicadas fueron

Pseudomonas cepacia aislada de conidios de *Bipolaris maydis*; *Bacillus mycoides* aislado del suelo y *Bacillus thuringiensis* obtenido a partir de formulaciones comerciales para controlar insectos. Las condiciones climáticas variaron entre los tres diferentes ciclos en que se probó la estrategia, indicando la capacidad de la bacteria para sobrevivir en la superficie foliar dentro de diferentes condiciones.

También Thompson *et al* (1976) demostró el antagonismo de diferentes *Pseudomonas* hacia *Erwinia amylovora* en pera. Las bacterias fueron aisladas a partir de suelos cubiertos de flores de dicho frutal. Se demostró que con tres aplicaciones de estas bacterias en floración, se producía un control de la quema del peral tan buena como la aplicación de bactericidas comerciales.

Los hongos no epífitos son también usados en el control biológico y el representante más exitoso ha sido *Trichoderma spp.* Se ha encontrado una alta efectividad para combatir *Bacillus cinerea* en manzano (Tronsmo y Dennis, 1978), en fresa (Blakeman y Fokkema, 1982) y en uva (Dubos, 1984).

Observaciones de antagonismo en el campo de *Trichoderma spp.* sobre *B. cinerea* en manzanas caídas

por el viento, Tronsmo y Dennis (1978) determinaron cepas que crecían y efectuaban un buen control del patógeno en temperaturas inferiores de 10°C., que son normales de encontrar en condiciones naturales.

2.3.1.2 La protección inducida

La protección inducida ha resultado efectiva bajo condiciones de campo (Caruso y Kuc, 1977), abriendo así nuevas perspectivas para el control de enfermedades. La protección inducida siempre está asociada con cambios bioquímicos en el metabolismo de las plantas tratadas (Kuc, 1983) y puede ser estimulada mediante diferentes métodos.

Chamberlain y Paxton, (1968); Rahe, *et al*, (1969); Yarwood, (1956), han encontrado que plantas previamente estimuladas por razas de hongos o células bacterianas no patogénicas o avirulentas, pueden ser protegidas contra la posterior inoculación con un patógeno.

Esta resistencia inducida puede ser local o sistémica siendo la última más importante porque hace que toda la planta reaccione como una planta resistente y no

solamente el tejido sometido al pretratamiento con el inductor. Además, éste efecto sistémico es no específico, de manera que puede ser efectivo contra hongos, bacterias, virus y viroides (Moraes, 1991).

El material a emplear como inductor no debe representar riesgos para la planta en sí, para el medio ambiente, para otros cultivos o para el hombre (Moraes, 1991).

Martins *et al*, (1985), verificaron que suspensiones de bacterias y *Bacillus* aplicados 72 horas antes de la inoculación de *Hemileia vastatrix*, indujeron protección eficaz en café.

2.3.1.3 Manipulación del ambiente

Este método está basado en modificar las condiciones físicas y nutricionales de filoplano tratando de perjudicar la germinación y desarrollo del patógeno, y favorecer el antagonista.

La alteración del ecosistema nutricional ha mostrado ser exitoso en el combate de bacterias (Morris y Rouse, 1985) y en hongos necrotróficos (Billing, 1976; Blakeman, 1971). Esta estrategia de combate requiere de un profundo conocimiento del ecosistema y es necesario determinar la variable nutricional que favorece o perjudica la acción del antagonista o el patógeno.

Morris y Rouse (1985), trabajando en el combate de *Pseudomonas syringae* y en la caracterización de epífitos de hojas de frijol, determinaron que el patógeno es incapaz de usar la glicina y la maltosa como fuente nutricional y además, encontraron que la mayoría de la comunidad antagonista puede desdoblar estos elementos nutricionales. En estudios de campo, se demostró que aplicaciones semanales de maltosa y glicina hasta la floración, redujeron en un 20 y 30% la incidencia de la enfermedad, explicándose los

resultados con base en la reducción de la población de *P. syringae* respecto a la población total epífita.

Barehil y Cook, citados por Blakeman y Fokkema (1982) observaron que una aspersión de úrea sobre árboles de manzanas, antes de la caída de las hojas, previno la formación de *Venturia inaequalis*. El efecto fue debido a la alteración del balance de la microflora, pues el desarrollo de *Pseudomonas fluorecens* fue aparentemente a expensas de bacterias gram positivas.

2.3.1.3.1 El uso de quitina como sustrato

El uso de quitina como agente de enmienda foliar para modificar la ecología microbial, se ha investigado para el manejo de hongos fitopatógenos en los últimos años.

La adición de quitina al suelo infestado por *Fusarium oxysporum sp. cubense*, estimuló a bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, las cuales controlaron al patógeno debido a la digestión de las paredes del hongo, que también contiene quitina (Mitchell y Alexander, 1961). Los organismos quitinolíticos afectan a los hongos debido a la digestión de la

quitina, presente en la pared de las hifas (Mitchell y Alexander, 1962).

Los microorganismos que producen enzimas y antibióticos, pueden ser estimulados con enmiendas de quitina. Algunos microorganismos que producen quitinasas son capaces de descomponer a hongos susceptibles (Mitchell, 1963).

Estudios recientes muestran que la quitina aplicada en forma de suspensión amorfa (Kokalis-Burelle *et al*, 1991) o como suspensión coloidal, (Ploper *et al*, 1991), aumenta la supervivencia de microorganismos quitinolíticos.

Kokalis-Burelle *et al* (1991), reportaron que al aplicar una suspensión amorfa de quitina al follaje de cacahuate, ocurre un cambio altamente significativo en la población de organismos epífitos, incrementándose los quitinolíticos de menos de 1% hasta más de un 40% en la población total de microorganismos. Bajo condiciones controladas de temperatura y humedad, la aplicación de quitina al follaje de tomate, aumenta la población de microorganismos quitinolíticos (Okumoto, 1992). La aplicación de una cepa quitinolítica de *Bacillus cereus* más quitina al follaje de cacahuates,

produjo un 60% de reducción de manchas foliares causada por *Cercospora arachidicola*. Luego se encontró que la quitina depositada, funcionaba como una barrera física contra la germinación de las esporas y la penetración del tubo germinativo.

Ploper *et al* (1991), indicaron que basado en la actividad quitinolítica, antagonismo *in vitro* e *in vivo* y supervivencia sobre las hojas de tomate no enmendadas, 9 aislamientos seleccionados de bacterias, fueron usados en tomate. La dinámica de la población indicó que la supervivencia de microorganismos mejoró por la adición de quitina, y el tizón temprano junto con la mancha foliar de *Septoria*, fueron controlados o suprimidos con una formulación de quitina.

En el trópico costarricense es posible conseguir cepas de *Bacillus* quitinolíticos de gran capacidad antagónica *in vitro* contra *Alternaria solani* (Okumoto, 1992).

2.3.1.4 Combate integrado

La aplicación de químicos en el filoplano puede reducir o aumentar las poblaciones de organismos

epífitos (Hislop, 1976).

Se ha determinado que los hongos epífitos, son eliminados por fungicidas de amplio espectro como ditiocarbamatos (Blakeman y Fokkema, 1982), dándose un aumento de bacterias epífitas con gran resistencia hacia estos fungicidas.

Lindow (1985) estableció un combate integrado a la quema del peral causada por *Erwinia amylovora* y a las pérdidas ocasionadas por congelamiento de bacterias tales como *Pseudomonas syringae*, *Erwinia herbicola* y *Pseudomonas fluorescens*. Estas enfermedades aparecen luego de que significativas poblaciones bacteriales colonizan el filoplano. El combate integrado se logró mediante cepas de *E. amylovora* no virulentas, las cuales fueron aplicadas al inicio de la primavera junto con el antibiótico estreptomycinina, al cual eran resistentes a una concentración de 100 ug/ml. Debido a la aplicación del antibiótico, la bacteria antagonista en poco tiempo dominó el filoplano, poco colonizado, impidiendo así la proliferación de *E. amylovora* virulenta, o de bacterias activas al congelamiento, con lo cual, hubo un mejor control de las dos enfermedades. El combate integrado fue superior a la aplicación de estreptomycinina y de

oxitetraciclina semanalmente durante en ciclo del cultivo.

Vargas (1984) determinó que *Trichoderma harzianum* más oxiclóruo de cobre fue una alternativa viable y eficaz para combatir *Mycena citricolor* en café. Se hicieron tres espolvoreos con partículas de afrecho de cafeto infectadas con *T. harzianum* y tres aspersiones de fungicidas, una cada mes, al inicio del período húmedo. Este tratamiento fue el que produjo mayor reducción del número de lesiones. El fungicida y el hongo aplicados independientemente, fueron pocos eficientes, debido a que permitió incrementos altos de inóculo y enfermedad. Se desconoce el mecanismo del sinergismo, pero se sospecha que sea por la eliminación de antagonistas de *Trichoderma*.

2.4 Selección de Microorganismos Antagónicos

Blakeman y Fokkema (1982), consideran que el sitio de selección de antagonistas debe ser preferiblemente de lugares donde el combate biológico natural está de manifiesto, aunque no hay que descartar la posible presencia de antagonistas en otros hábitats extraños al patógeno. Después de seleccionar el lugar, Andrews (1985) considera que se deben aislar especies representativas de la comunidad microbiana, usando medios generales para hongos, bacterias y levaduras.

Para que el antagonista realice un efectivo control no solo debe sobrevivir en el nicho del patógeno, sin también ejercer su carácter antagónico en el hábitat (Blakeman y Fokkema, 1982).

En pruebas de laboratorio, las observaciones al microscopio, revelan los efectos morfológicos del antagonista sobre los propágulos del patógeno, tal como inhibición de germinación, desarrollo anormal del tubo germinativo, interferencia con el desarrollo de estructuras infecciosas, etc. (Blakeman y Fokkema, 1982).

Las pruebas *in vivo* bajo condiciones controladas, se

caracterizan por el control estricto de las condiciones tanto ambientales como genéticas y por el seguimiento de la población antagonista en el filoplano (Andrews, 1985).

La prueba de campo se debe dirigir a comparar los efectos sobre el desarrollo del patógeno y el control de la enfermedad que resulta de la aplicación de los antagonistas, así mismo, se debe determinar la microflora, tanto del testigo como de los tratamientos biológicos (Andrews, 1985).

Los antagonistas que fracasan en esta prueba, no deben eliminarse, ya que la causa del fracaso puede ser fácil de corregir mediante aditivos que se pueden agregar en el inoculante del antagonista, tales como sustancias protectoras de la desecación, nutrimentos, y adherentes. Si después de agregar estas ayudas, no hay efecto positivo, el antagonista es aún de valor ya que puede utilizarse como un suplidor de genes a residentes de alta colonización que no presentan las características de antagonismo (Andrews, 1985).

2.5 Control Biológico de Sigatoka Negra

Se entiende por combate biológico, la reducción del inóculo o la actividad de un patógeno en su forma activa o latente por uno o más microorganismos acoplados en forma natural o a través de la manipulación del ambiente, hospedero o por la introducción de uno o más antagonistas (Baker y Cook, 1982). En banano, esta estrategia solo había sido investigada en los patógenos habitantes del suelo como *Fusarium oxysporum* (Cook y Baker, 1982), y *Pseudomonas solanacearum* (Sequeira, 1958).

Jiménez *et al* (1988), realizaron un estudio sobre combate biológico de Sigatoka Negra en conidias, mediante bacterias epífitas, en el cual encontró 12 bacterias que se comportaron como antagonistas *in vitro*. Se identificaron tres cepas, correspondiendo al género de *Pseudomonas sp.*

Esquivel (1992), investigó sobre las características morfológicas y taxonómicas de algunos hongos hiperparásitos de *Mycosphaerella fijiensis*. Identificó 72 hongos a nivel de género y especie, la mayoría de ellos saprófitos, y solo cinco de los hongos fueron hiperparásitos de *M. fijiensis*. El más común fue

Hansfordia pulvinata, asociado a la fase imperfecta del patógeno, el cual recientemente está siendo utilizado en ensayos para el control biológico de enfermedades del tomate en invernadero.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Localización

La investigación se realizó durante los meses de octubre de 1993 a setiembre de 1994, en el laboratorio de Fitopatología del Area de Fitoprotección, ubicado en la sede del CATIE, Turrialba, y en las instalaciones de la Standard Fruit Company en Río Frío, cantón de Sarapiquí, provincia de Heredia.

3.2 Selección de Microorganismos Quitinolíticos

3.2.1 Sitio de selección

Se seleccionaron dos sitios bananeros: el primero con una alta incidencia de Sigatoka Negra, denominado como "sitio caliente", ubicado en la finca El Porvenir de Siquirres, y el segundo, con baja incidencia de la enfermedad, considerado como "sitio no caliente", el cual se ubicó en la finca La Esperanza de Siquirres. Ambas fincas propiedad de Standard Fruit Company.

Las características de los dos sitios fueron similares en cuanto a condiciones climáticas, nutrición y manejo. La principal diferencia visible entre el sitio caliente y el no caliente, es que el primero, presenta una capa freática muy alta durante la mayor parte del año, mientras que en el segundo, la capa freática es mas baja. Además, las aplicaciones de fungicidas fueron mayores en el sitio caliente.

3.2.2 Aplicación de quitina al follaje

Para aumentar y facilitar el aislamiento de microorganismos quitinolíticos, se aplicó una suspensión coloidal de quitina a la planta de banano, a una concentración de 0.2% w/v con un pH entre 7 y 8, el cual se obtiene agregando una solución de 0.1M NaOH. Las aplicaciones se hicieron en la cuarta hoja según escala de Brun (1963).

3.2.3 Traslado y procesamiento de muestras

Las hojas se recolectaron 7 días después de aplicada la quitina y fueron trasladadas al laboratorio en bolsas plásticas estériles, las cuales se colocaron en una

hielera con gelatina refrigerante para mantener la temperatura baja y evitar la pérdida de microorganismos.

El mismo día de cortadas las hojas, con un sacabocados de 10 mm de diámetro se obtuvo 5 g de hojas por muestra en forma al azar y se colocaron en erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de agua destilada estéril agitándose por 45 minutos. Los discos, se obtuvieron de la superficie de la hoja donde la enfermedad aparentemente no estaba presente, siguiendo los principios de Baker y Cook (1974).

3.2.4 Preparación de medios

El agar-quitina (AQ) y agar nutriente-quitina (ANQ) marca Becton Dickinson, se prepararon mezclando 20 g de agar o agar-nutriente en 1 litro de agua destilada en agitación, a una temperatura de 60°C. Una vez disuelto el agar o el agar nutriente, se agregó una suspensión de quitina coloidal al 0.2% w/v, preparada usando el método de Salazar y Okumoto (1992) (Anexo 1) y posteriormente se llevó el pH entre 7 y 8 agregando una solución de 0.1M NaOH. Por último, el medio se esterilizó y se chorreó en platos petri estériles.

3.2.5 Aislamiento de microorganismos quitinolíticos

De las soluciones originales, se tomó de cada una, 1 ml de solución y se colocó en un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril, y se hicieron diluciones decimales hasta 10^{-3} . Posteriormente, con una micropipeta, se tomó 1 gota de 0.20 microlitros y se colocó en un plato con agar-quitina (AQ) incubándose a 28°C, hasta obtener las cepas de microorganismos quitinolíticos. El procedimiento se realizó en forma idéntica para todas las muestras.

Las cepas de *Bacillus* quitinolíticos, se obtuvieron calentando cada dilución en baño maría a 80°C por 10 minutos, para eliminar microorganismos que no tienen esporas resistentes al calor. Después, se sembraron los platos de agar-nutriente-quitina (ANQ), al igual que el paso anterior e incubándose 28°C hasta la aparición de los microorganismos.

Las lecturas se tomaron entre las 24 y 96 horas después de la siembra de los microorganismos, registrando una reacción positiva, aquellos microorganismos donde el borde de la colonia fue transparente indicando que la quitina fue metabolizada por las bacterias.

Para la identificación de *Bacillus* se contó el número de colonias, tomando en cuenta la morfología de la colonia, tinción de Gram y observación de la presencia de esporas (Gordon *et al*, 1973).

Las cepas quitinolíticas seleccionadas se purificaron extrayéndolas de las siembras originales y haciendo cultivos sucesivos hasta tener colonias aparentemente puras. Posteriormente fueron transferidas a tubos con tapas de rosca con AN mas quitina inclinado y sellados con aceite mineral esterilizado para minimizar el crecimiento de las cepas. Estas sirvieron de fuente de inóculo para las pruebas sucesivas. Los tubos se conservaron en el refrigerador a 10°C.

3.2.6 Selección de cepas quitinolíticas

Después de haber extraído el mayor número de cepas quitinolíticas, se procedió a evaluarlas en AN y ANQ seleccionando aquellas en que se observó mayor producción de quitinasa en ámbos medios a las 48 horas. También se analizaron *Bacillus* A30 (colección MIP-CATIE) y *Serratia entomophyla* (colección NRI-CATIE), debido a que presentan excelentes características quitinolíticas (Okumoto, 1992; Starr *et al*, 1981).

3.3 Prueba de Antagonismo en Laboratorio

3.3.1 Preparación de descargas de ascosporas

Siguiendo las indicaciones del Boletín Técnico de Dupont (1982), el material de descarga se seleccionó con lesiones necrosadas jóvenes, después de dos o tres días sin lluvia. Se colocó en cámara húmeda por 2 días. Luego, con la ayuda de un estereoscopio, se seleccionó nuevamente el material de descarga con abundantes pseudotecios, se cortaron trozos de 4 cm² y se pegaron 5 con el haz hacia arriba en papel bond común de 14 cm de diámetro sumergiéndolos en agua destilada por 5 minutos. Posteriormente, se eliminó el exceso de agua y colocó el papel bond con los tejidos de hoja, en las tapas de los platos petri listos para iniciar la descarga de ascosporas.

3.3.2 Preparación de discos de hoja

Se recolectó la hoja 1 de plantas de Gran Enano de zonas que no han sido aplicadas por fungicidas y se cortaron trozos de un 14 cm diámetro, de la parte intermedia de la hoja. En la cámara de flujo laminar, se desinfectaron los trozos con alcohol al 70% por 1 minuto y agua destilada estéril por tres minutos colocándolos sobre papel toalla estéril.

3.3.3 Aplicación de microorganismos

Tres días antes de la inoculación del patógeno, los microorganismos quitinolíticos seleccionados se pusieron a crecer en platos petri con agar-quitina. Después de crecido el microorganismo, se recogieron lavando la superficie del medio con agua destilada estéril ajustanándose concentraciones de 10^9 células bacteriales por ml. Luego, la solución bacterial se colocó en platos petri sumergiendo lo discos de hoja desinfectados por 1 minuto para después, ser ubicados con el envés hacia arriba en la base del plato petri, la cual estaba cubierta con papel bond humedecido.

3.3.4 Prueba de antagonismo

La tapa del plato petri con el material de descarga se colocó sobre la base del plato que contiene el disco de hoja aplicado con el microorganismo, por un período de 1.5 horas y se marcó con un lápiz de cera las zonas de descarga.

Pasado el tiempo se retiró el papel bond con las secciones de tejido necrosado y se incubó los discos de

hoja inoculados a 28°c por 48 horas. Posteriormente, se eliminó el exceso de humedad de los discos de hoja, se identificaron y se sumergieron por 10 segundos en barniz comercial transparente marca Sur, eliminando luego el excedente de barniz colocando el disco de hoja en forma inclinada sobre papel toalla, y secando a temperatura ambiente por 15 minutos. Secado el barniz y con ayuda de un bisturí y unas pinzas, se cortaron las zonas de tejido marcadas previamente, se retiró, la capa de barniz y se colocó inmediatamente sobre un portaobjetos identificado, para teñirla con azul de metileno, y evaluar al microscopio.

3.3.5 Variables evaluadas

Las variables evaluadas fueron número de ascosporas germinadas, porcentaje de ascosporas deformadas y porcentaje de inhibición del tubo germinativo de 50 ascosporas por plato Petri en tres repeticiones. En cada repetición se utilizaron cuatro 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 40X y usando un lente micrométrico dentro de un ocular calibrado previamente con un micrómetro de platina.

3.3.6 Análisis de resultados

Los resultados se analizaron comparando los tratamientos de microorganismos con el testigo absoluto por medio de la prueba de Dunnette (Snedecor *et al*, 1984), de acuerdo a cada categoría de medición.

3.4 Identificación de Microorganismos

Las cepas seleccionadas en la etapa anterior se enviaron a identificar al Technical Center en California, EE.UU. (408) 432-0300 FAX (408) 432-0314, donde se les aplicó la técnica de cromatografía en ácidos grasos.

3.5 Compatibilidad de Microorganismos a Fungicidas

La capacidad de los microorganismos para controlar las enfermedades se puede mejorar mediante la selección de aquellos con algunas características, como por ejemplo la compatibilidad a ciertos fungicidas, que debe formar parte del programa de manejo integrado de enfermedades.

3.5.1 Procedimiento

Se preparó el medio agar-quitina y se chorreó en platos petri estériles. Posteriormente, se sembraron los medios con los microorganismos antagónicos seleccionados. Se cortaron discos de papel bond de 6 mm de diámetro y se esterilizaron. Luego se prepararon suspensiones madres a 1000 ppm en agua destilada estéril de los fungicidas más usados en banano: benomil 50% PM, fabricado por la Dupont, a una concentración de 0.02 g en 10 ml de agua destilada estéril; propiconazole 25.3 % EC, fabricado Giba Geygy, S.A., a una concentración de 0.04 g en 10 ml de agua; tridemorf 75% E.C., fabricado por la anterior casa comercial, a una concentración de 0.013 g en 10 ml de agua; mancozeb 80% PM, fabricado por la Rohm And Haas, a una concentración de 0.013 g en 10 ml de agua; y sulfato de estreptomicina + oxytetraciclina como tetigo, a una concentración de 0.04 g en la ml de agua. Con diluciones decimales se llegó a 100, 10 y 0 ppm y con un lápiz de cera, se dividió el plato petri con el medio en cuatro partes marcando las concentraciones y plaguicida a evaluar. Después, con pinzas estériles se tomó un disco de papel bond estéril y con una micropipeta en el aire, se colocó en el centro del disco, una gota de 0.05 ml del fungicida a evaluar en la concentración requerida, de tal forma que el disco quedara bien impregnado de producto pero evitando excedentes y colocándolo sobre la bacteria

anteriormente sembrada en el medio e introduciendo los platos petri en el incubador por 48 horas a 28°C.

3.5.2 Variable evaluada

Se midió la zona de inhibición ocasionada por el plaguicida, la cual se manifiesta como un halo transparente entre el disco de papel impregnado con el producto, y el crecimiento bacterial, evaluando la distancia desde el centro del disco, hasta el borde de dicha zona.

3.6 Prueba de Adherencia de Microorganismos

El objetivo de ésta prueba fue determinar el tipo de coadyuvante con el cual debería llevar la bacteria al campo para evitar pérdidas por lavado.

3.6.1 Procedimiento

En plantas de invernadero con 2.5 meses de edad se aplicaron cuatro tratamientos con 6 repeticiones cada uno: Bacteria R1 + agua; Bacteria R1 + agua + Silwet L 75

al 0.2%, fabricado por la Bayer, Leverkusen, Alemania ; Bacteria R1 + agua + NP7 al 0.3% fabricado por la Bayer, Leverkusen, Alemania; y agua como testigo. La concentración bacteriana fue de 10^9 células bacterianas / ml, y la dosis de los coadyuvantes la de uso comercial. Las aplicaciones se hicieron en invernadero, con una bomba manual de aspersión, una hora antes de llevar las plantas al campo. En campo, se colocaron totalmente al azar en recipientes de 2 kg y 10 días después se recolectaron las hojas 3 y 4 de cada tratamiento. De las seis plantas por tratamiento se homogenizó una muestra de hoja de 5 g. Posteriormente se procedió a reaislar los microorganismos, de igual forma como se hizo el aislamiento inicial de microorganismos.

En esta prueba se usó la cepa R1 por sus buenas características antagónicas en las anteriores etapas y también, por el pigmento rojo que presenta, el cual hace a la bacteria, fácil de reconocer en los reaislamientos.

3.6.2 Variable evaluada

La variable evaluada fue el número de colonias bacterianas por tratamiento, calculado en número de unidades formadoras de colonia /g de hoja fresca.

3.6.3 Análisis de resultados

En ésta prueba, se realizó un análisis de varianza y la prueba de Dunnett, para comparar los tratamientos contra el testigo haciendo una transformación de datos con el logaritmo natural de diez (\log_{10}).

3.7 Prueba de Antagonismo en Invernadero

En esta etapa se pretende reducir la posibilidad de lavado de microorganismos por acción de la lluvia y poder comparar con los resultados de campo eliminando ese factor.

3.7.1 Preparación del material experimental

Las plantas de Gran Enano, obtenidas de meristemas de rizomas, fueron sembradas en recipientes de 2 kg utilizando tierra desinfectada con bromuro de metilo. Se realizaron tres fertilizaciones. La primera, a base de fósforo (10-30-10), en dosis de 10 g/pta 30 DDT. La segunda y tercera fertilización, a base de nitrógeno (Urea al 46%), en la misma dosis 45 y 60 DDT respectivamente. No se hicieron aplicaciones de fungicidas, y se eliminó la hoja bajera en senescencia. El riego fue frecuente, manteniendo el suelo a capacidad de campo. La edad de las plantas a la hora de la prueba fue de 2.5 meses con una altura promedio de 1.10 m y un promedio de seis hojas verdaderas.

3.7.2 Prueba de antagonismo

Para la prueba en invernadero, se seleccionaron en el laboratorio de acuerdo a la disminución de la longitud del tubo germinativo, las dos mejores cepas quitinolíticas antagónicas, obtenidas de hojas de banano (R1 y A23) y otras dos cepas quitinolíticas antagónicas provenientes de plantas de tomate y exoesqueletos de insectos (A30 y A100).

Se evaluaron 11 tratamientos con 4 microorganismos aplicados con y sin, un tratamiento con agua, uno con fungicida y otro con quitina, asperjados en una sola ocasión. El fungicida utilizado fue el propiconazole al 25.3% de ingrediente activo, en la dosis comercial. La prueba se realizó en el invernadero de la Standard Fruit Company, en Río Frío, Sarapiquí, a una temperatura promedio de 28°C. Se utilizaron 6 repeticiones por tratamiento, donde una planta representaba una repetición.

3.7.3 Procedimiento

Tres días antes de la aplicación, los microorganismos antagonistas se pusieron a crecer en agar-quitina, recolectándose luego con agua destilada, hasta obtener una concentración de 10^9 células bacteriales /ml. Al mismo tiempo se preparó la quitina coloidal al 0.2% w/v en agua destilada. Con cinta plástica, se marcaron las hojas y con bombas de aspersión manual, se asperjaron por el haz y envés de tal forma que quedaran bien cubiertas por el líquido. La aplicación se realizó en el invernadero a toda la planta.

En los tratamientos donde se combinó el microorganismo

con la quitina, ésta última se aplicó por separado, poco antes de la aplicación del microorganismo.

Dos días después de la aplicación, las plantas fueron sacadas al campo, y expuestas al inóculo de *M. fijiensis* por 7 días, ubicándolas a 15 metros de una parcela de banano infectada por el hongo bajo las condiciones climáticas normales de la zona, donde hubieron lluvias y días soleados. Posteriormente, las plantas se llevaron nuevamente al invernadero para ser evaluadas.

3.7.4 Evaluación de tratamientos

Consistió en hacer un conteo de estrias en estado 3 (Mourichón, 1990) de las hojas aplicadas con cada uno de los tratamientos. Estas estrias aparecen aproximadamente 22 días después de haberse expuesto las plantas al inóculo natural, tiempo en el cual se realizó la evaluación.

Para hacer la evaluación, se utilizó un marco de 3 cm², el cual se colocó en el margen derecho de la hoja teniendo la planta de frente, en tres puntos diferentes; el primero, en la punta, cerca de la periferia de la hoja; el segundo, a la mitad de la hoja pero siempre en

la periferia; y el tercero, al final de la hoja. Posteriormente, se promediaron los datos de cada planta por tratamiento para ser analizados.

3.7.5 Análisis de resultados

El diseño experimental fue un completamente al azar con 11 tratamientos y 6 repeticiones por tratamiento. Los resultados se analizaron mediante una prueba de contrastes para observar las diferencias entre tratamientos y entre grupos de tratamientos.

3.8 Prueba de Antagonismo en Campo

3.8.1 Localización, toma de datos climáticos y de presión de inóculo

La prueba se realizó en, Río Frío, en una área aislada y alejada de plantaciones comerciales de banano, entre los meses de junio y setiembre de 1994. El experimento se montó en un suelo profundo y mal drenado, con una alta presión de inóculo ubicado al pie de una parcela de banano sin aplicación de fungicidas. La presión de inóculo se midió colocando una trampa de ascosporas de la

marca Burkard a 2 m de altura sobre la plantas en el experimento, y haciendo conteos semanales de ascosporas en el microscopio. Los datos meteorológicos se tomaron de una estación propiedad de la Standard, colocada a 200 m del sitio del ensayo, donde se promediaron en forma semanal.

3.8.2 Preparación y manejo del material experimental

Las plantas utilizadas fueron de la variedad Gran Enano, provenientes de cultivo de tejidos y desarrolladas en invernadero hasta los 2.5 meses de edad, donde se realizó 1 aplicación de fertilizante a base de fósforo al inicio (10-30-10) 30 DDT y posteriormente, dos aplicaciones de fertilizante a base de nitrógeno (Urea 46%) 45 y 60 DDT respectivamente. Las plantas fueron transplantadas al campo donde fueron manejadas en forma comercial con deshierbas y aplicaciones de fertilizantes. La deshoja se aplicó solo para aquellas donde el tejido afectado fuese mayor de un 50 %.

3.8.3 Prueba de antagonismo

Se utilizaron 11 tratamientos con 4 cepas de

microorganismos con quitina y sin quitina, 1 tratamiento de fungicidas, 1 de quitina y 1 tratamiento de agua como testigo. El diseño utilizado fue un completamente al azar con 6 repeticiones por tratamiento. La parcela experimental correspondió de una planta.

Los fungicidas utilizados fueron el propiconazole al 25.3% , tridemorf al 75% y mancozeb M45 al 80% PM en rotación y en ese mismo orden, aplicados cada 15 días en las dosis comerciales, al igual como se evaluaron en la prueba de compatibilidad de los microorganismos a fungicidas.

3.8.4 Procedimiento

Dos días antes de sembrar las plantas en el campo, se realizó la primera aplicación de los tratamientos, por el haz y envés de las hojas en toda la planta utilizando bombas de aspersión manual. Después del transplante, las aplicaciones se hicieron en forma semanal, excepto, el tratamiento con fungicidas, el cual se realizó cada 15 días.

Los tratamientos se aplicaron sin adherentes, al igual que en la etapa de invernadero y siguiendo la misma

técnica.

3.8.5 Evaluación de tratamientos

Después de que las plantas se aclimataron bien en campo y desarrollaron follaje nuevo en forma constante, se inició la medición del 'índice de enfermedad' en forma semanal, aplicando la metodología de Stover modificada por Gauhl (1989) la cual consiste en una estimación visual del porcentaje de área foliar afectada en todas las hojas de la planta excepto la hoja candela y las hojas agobiadas.

El índice de enfermedad o promedio ponderado de infección (PPI) se obtiene de multiplicar el número de hojas de cada grado en la escala de Stover modificada por el grado. Cada resultado se suma y el total se divide entre 100.

$$ID = \frac{\text{Sumatoria } (n*r)}{N}$$

n= número de hojas en cada grado de Stover

r= grado de Stover

N= número total de hojas

ID= índice de enfermedad

3.8.6 Análisis de resultados

El diseño experimental fue un completamente al azar con 11 tratamientos y 6 repeticiones por tratamiento. Los resultados se analizaron por medio de una prueba de contrastes para determinar diferencias entre tratamientos y entre grupos de tratamientos.

microorganismos con quitina y sin quitina, 1 tratamiento de fungicidas, 1 de quitina y 1 tratamiento de agua como testigo. El diseño utilizado fue un completamente al azar con 6 repeticiones por tratamiento. La parcela experimental correspondió de una planta.

Los fungicidas utilizados fueron el propiconazole al 25.3% , tridemorf al 75% y mancozeb al 80% PM en rotación y en ese mismo orden, aplicados cada 15 días en las dosis comerciales, al igual como se evaluaron en la prueba de compatibilidad de los microorganismos a fungicidas.

3.8.4 Procedimiento

Dos días antes de sembrar las plantas en el campo, se realizó la primera aplicación de los tratamientos, por el haz y envés de las hojas en toda la planta utilizando bombas de aspersion manual. Después del transplante, las aplicaciones se hicieron en forma semanal, excepto, el tratamiento con fungicidas, el cual se realizó cada 15 días.

Los tratamientos se aplicaron sin adherentes, al igual que en la etapa de invernadero y siguiendo la misma técnica.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Selección de microorganismos quitinolíticos

Los lavados de microorganismos de hoja de banano, indican que la población epífita en la hoja 4, en zonas comerciales, es aparentemente baja, ya que las diluciones para obtener colonias separadas, oscilaron entre 10^0 y 10^{-1} , a consecuencia probablemente a las aplicaciones de químicos foliares. Hislop (1976), considera que las aplicaciones de químicos en el filoplano podría reducir las poblaciones de microorganismos epífitos.

De los sitios evaluados, se observó que el sitio con menor incidencia de la enfermedad (sitio no caliente), presentó mayor población de microorganismos quitinolíticos, a diferencia del sitio caliente, donde la población de microorganismos quitinolíticos fue baja (Cuadro 1).

Cuadro 1. Número de microorganismos quitinolíticos aislados por sitio de evaluación. Turrialba, Costa Rica, 1994.

Sitio	Aislamientos
Caliente	26
No caliente	94

Se aislaron y purificaron 120 cepas de microorganismos

quitinolíticos dentro de las que se encontraban *Actynomicetes*, *Bacillus* y otras bacterias, éstas últimas en mayor cantidad, lo que coincide con lo reportado por Blakeman (1982), quien considera que las bacterias colonizan el filoplano casi en un 100% en los primeros estadios de desarrollo de los órganos, debido a su capacidad para utilizar nutrimentos en éste nicho que provienen por difusión de los tejidos de las plantas.

Los microorganismos quitinolíticos, se evaluaron en AQ y ANQ, encontrando 13 bacterias pigmentadas, las cuales mostraron mayor producción de quitinasas en 48 horas (Cuadro 2), presentando las características de ser colonias planas, pequeñas, redondas y de color rojo cambiando a azul violeta, anaranjado o blanco. Además, mostraron el mayor crecimiento *in vitro*, lo que tiene importancia a la hora de producir el organismo en forma masiva, ya que la alta masa bacterial puede ser indispensable en la colonización del filoplano. También la pigmentación de las bacterias epífitas es importante ya que actúa como protector contra los rayos ultravioleta (Starr, *et al* 1981).

Las bacterias pigmentadas se encontraron en el sitio no caliente, aisladas de superficie de hoja donde la enfermedad no estaba presente. Este resultado podría deberse a que la enfermedad no se había desarrollado bien

en esa parte de la hoja, debido probablemente a que las ascosporas fueron incapaces de desarrollarse por la presencia de algún agente antagónico en el filoplano.

Cuadro 2. Evaluación de microorganismos en AQ y ANQ con respecto a la producción de quitinasas y al sitio de procedencia durante las primeras 48 horas. Turrialba, Costa Rica, 1994.

Cepa	Procedencia	Evaluación (horas)	
		24	48
A22	Sitio no caliente	-	+
R1	Sitio no caliente	-	+
A7	Sitio no caliente	-	+
A18	Sitio no caliente	-	+
A21	Sitio no caliente	-	+
B22	Sitio no caliente	-	+
B23	Sitio no caliente	-	+
B7	Sitio no caliente	-	+
A20	Sitio no caliente	-	+
B12	Sitio no caliente	-	+
24	Sitio no caliente	-	+
B18	Sitio no caliente	-	+
A23	Sitio no caliente	-	+
A30	Colección MIP-CATIE	-	+
A100	Colección NRI-CATIE	-	+

+: Producción de quitinasas

La habilidad de producir quitinasas en AQ y ANQ, tiene gran importancia debido a que aseguramos un organismo con capacidad de sobrevivir en medios ricos al igual que en medios pobres, similares a las condiciones que se presentan en la naturaleza. Okumoto y Bustamante (1992, datos sin publicar), encontraron que los *Bacillus* perdían su

habilidad quitinolítica dependiendo del nivel nutritivo del medio de cultivo.

De los organismos residentes en la hoja de banano, se seleccionaron de acuerdo a la producción de quitinasa en las primeras 48 horas, 13 cepas bacteriales, las cuales se utilizaron en la siguiente prueba. Los códigos utilizados para la identificación de las cepas bacteriales quitinolíticas seleccionadas para la prueba de antagonismo en el laboratorio fueron: A22, R1, A7, A18, A21, A22, B23, B7, A20, B12, A24, B18 y A23. Todos se encontraron en el sitio no caliente (Cuadro 2). Blakeman y Fokkema (1982), consideran que la selección del sitio para aislar los posibles antagonistas, debe ser donde el combate natural esté de manifiesto.

Otros organismos no residentes en hoja de banano que presentaron buenas características quitinolíticas en ámbos medios fueron el A30 extraído de hojas de tomate y el A100 extraído del tracto digestivo de *Costelytra zcalardica*, los cuales podrían tener un buen efecto antagónico de acuerdo a los reportes de Blakeman y Fokkema (1982), sobre organismos no residentes.

Los organismos seleccionados produjeron quitinasas en las

primeras 48 horas de haberse cultivado, lo que se consideró podría permitirles actuar rápido sobre las ascosporas del hongo, antes de su penetración en los estomas de la hoja.

4.2 Prueba de antagonismo a *M. fijiensis* en laboratorio

La germinación de *M. fijiensis* mostró diferencias significativas entre el testigo absoluto y las cepas bacteriales A23, B22, R1 y A100, según la prueba de Dunnett al 5% de significancia (Anexo 2).

El porcentaje de inhibición de la germinación de ascosporas fue de 32.6% para la cepa A23, 17.4% para las cepas B22 y A100, y 16.6% para la cepa R1. La cepa A30 inhibió la germinación en un 10%. Algunas de las cepas de microorganismos, no produjeron ningún efecto antagónico en la germinación de ascosporas (Fig.1).

La deformación de ascosporas fue significativa al 5% para el 100% de los organismos evaluados (Anexo 2). Los microorganismos que presentaron el mayor porcentaje de deformación de ascosporas fueron las cepas B12, A24, B18 y A20, los cuales deformaron en un 100% de incidencia las ascosporas evaluadas, sin embargo fueron las mismas que

presentaron un porcentaje de cero en relación a la inhibición de la germinación (Fig.1). Lo que puede estar sucediendo es que los microorganismos trabajan sobre la germinación o sobre el desarrollo del tubo germinativo. Si las ascosporas escapan al antagonista en la etapa de germinación, podrían ser atacadas antes de penetrar al estoma.

La evaluación de la longitud del tubo germinativo por medio de la prueba de Dunnett, muestra que existen diferencias significativas al 5% entre los tratamientos con respecto al testigo absoluto, exceptuando las cepas B18 y B7, las cuales no presentaron significancia (Anexo 2). Las dos mejores cepas de microorganismos antagónicos extraídos de la hoja de banano son la R1 y la A23 las cuales presentan un antagonismo del 74.2 y 71.4% respectivamente. La cepa A100 y la A30, presentaron un antagonismo mayor al 60% cada uno (Fig.2).

Basado en la inhibición del tubo germinativo, se seleccionó las cepas R1 y A23 para las siguientes pruebas, debido a que éste efecto influye probablemente en la capacidad de la ascospora para penetrar los estomas. Además éstos microorganismos mostraron un buen antagonismo de acuerdo a la inhibición de la germinación.

Porcentaje de antagonismo

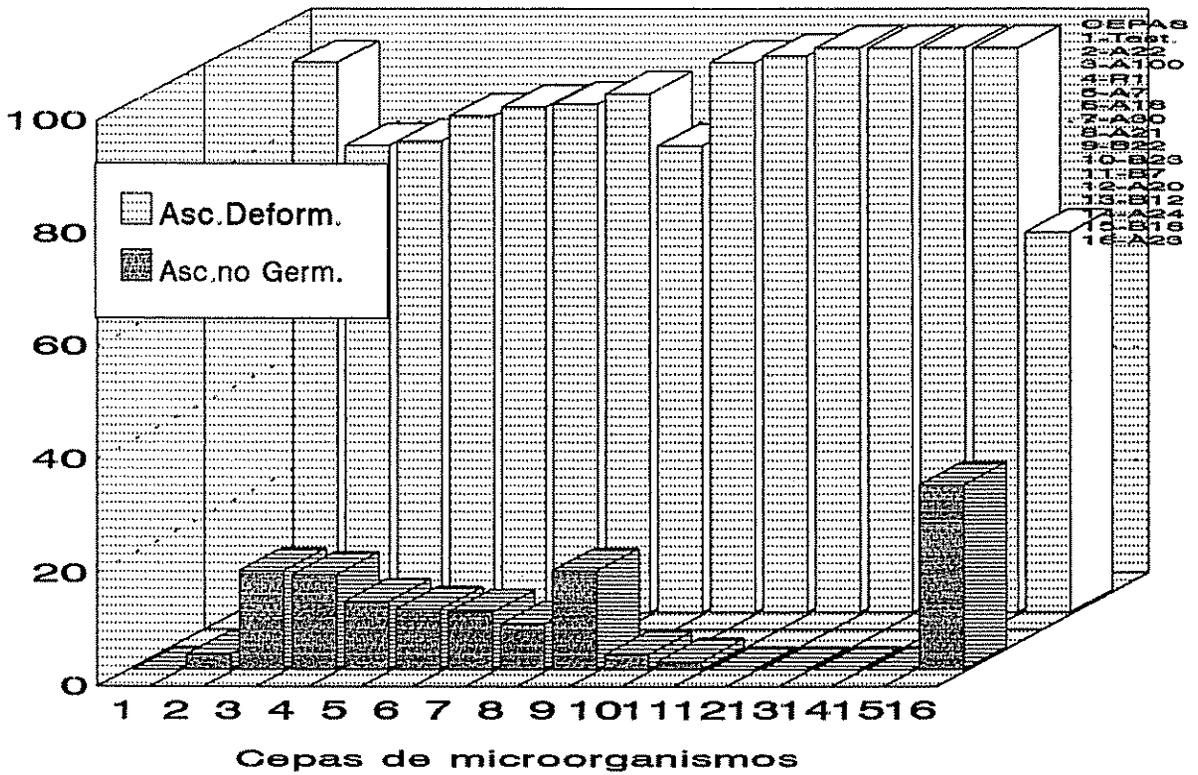


Fig.1. Efecto de algunos microorganismos quitinolíticos sobre la germinación y deformación de ascosporas de *M. fijiensis*.

Porcentaje de inhibición

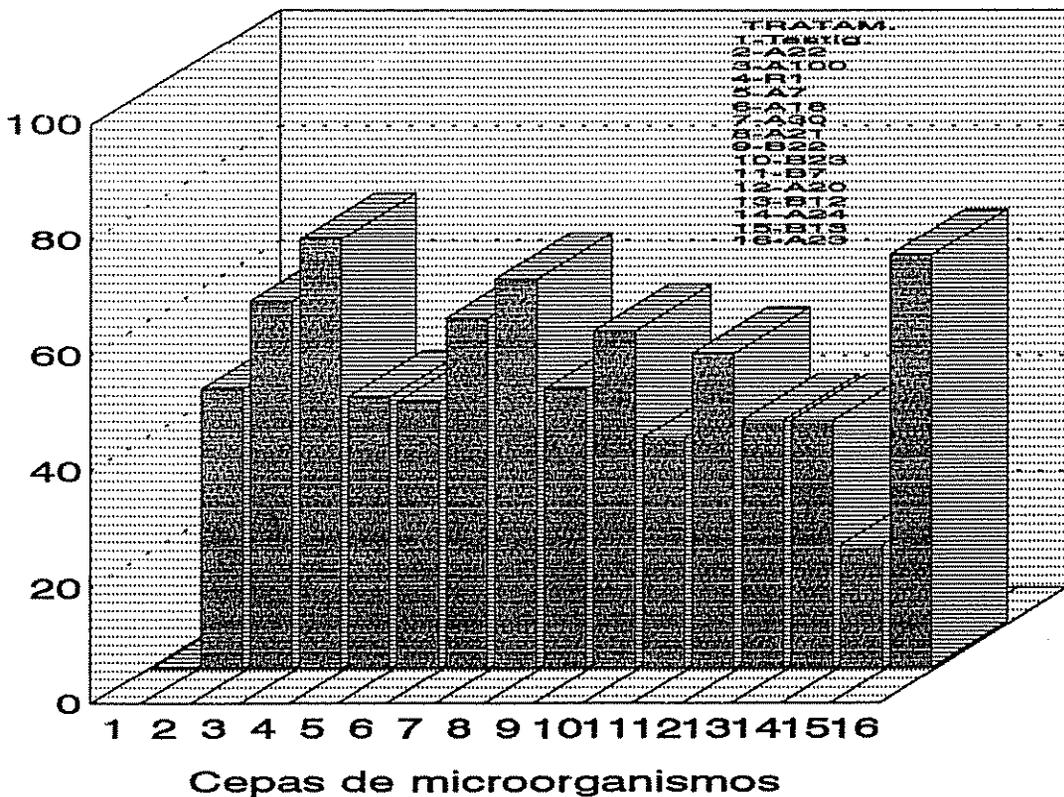


Fig.2. Efecto antagónico de algunos microorganismos quitinolíticos en la longitud del tubo germinativo de ascospora de *M. fijiensis*.

También, se seleccionaron las cepas A30 y la A100 debido a que presentaron buen antagonismo en laboratorio, y son los únicos organismos evaluados no residentes en la hoja de banano. Aunque aparentemente, el uso de microorganismos epífitos residentes es lo más recomendable en el combate de patógenos de órganos vegetales aéreos, existen trabajos (Blakeman y Fokkema, 1982; Dubos, 1984; Thompson, *et al*, 1976; Tronsmo y Dennis, 1978; Vargas, 1984), que demuestran que el uso de antagonistas aislados de ambientes foráneos, pueden ser una vía de combate igual o mejor, en cuanto a efectividad y residualidad, al uso de antagonistas aislados del filoplano.

4.3 Identificación de microorganismos

Las cepas R1, A23, A21 y B22, se identificaron en el Tehnical Center en California, Estados Unidos, resultando que las cuatro cepas pigmentadas son *Serratia marcescens*, donde A21 y A23 pertenecen a un mismo grupo mientras que R1 y B22 a un segundo grupo, ámbos grupos no reportados en la literatura (Gherna *et al*, 1992). Se utilizó la técnica de cromatografía de ácidos grasos en la identificación de los microorganismos.

Serratia marcescens es una enterobacteriacea, la cual

aparece comunmente en la naturaleza y ocasionalmente en pacientes de hospitales, aunque no se le ha asociado a infecciones importantes (Starr *et al*, 1981). Es conocida como un potencial patógeno de insectos, por su habilidad de producir entre otras enzimas, lectinasas, proteasas y quitinasas (Starr *et al*, 1981). Generalmente se presenta en el tracto digestivo de los insectos donde no es patogénica.

Trevor Jackson (1994, comunicación personal) considera que el riesgo para humanos de trabajar con *S. marcescens* es practicamente nulo.

Varias especies de *Serratia* se han encontrado en la rizosfera de diferentes cultivos. Muchas de ellas presentan antagonismo a hongos patogénicos de suelo y algunas producen sustancias que estimulan el crecimiento de las plantas (Starr *et al*, 1988).

Serratia marcescens, se encontró en sitios no calientes. Las pruebas de antagonismo sobre discos de hoja, muestran en general, alto porcentaje de antagonismo de éstos microorganismos contra las ascosporas del hongo.

4.4 Compatibilidad de microorganismos a fungicidas

Uno de los mayores problemas, dentro de un manejo integrado de enfermedades, es la incompatibilidad de los microorganismos utilizados en el control, con los plaguicidas aplicados en el campo (Andrews y Kenerly, 1978).

En condiciones de laboratorio, las cepas A23, A30, R1 y A100, fueron altamente compatibles con los fungicidas mancozeb 80%, propiconazole 25.3%, tridemorf 75% y benomyl 50%, evaluados a 0, 10, 100 y 100 ppm. Se observó también, la incompatibilidad de los microorganismos con sulfato de estreptomycin + oxitetraciclina (Agrimicin 100) que es un bactericida, el cual funcionó como testigo (Cuadro 3).

Con el uso de fungicidas, no se observó zona de inhibición bacterial, sin embargo, si la hubo con Agrimicin 100, bactericida que impidió el crecimiento de las cepas bacteriales (Cuadro 3), lo cual indica que la aplicación de los fungicidas más comúnmente utilizados en el control de Sigatoka Negra, se puede combinar con las aplicaciones de éstas cepas bacteriales.

Estos resultados son los esperados ya que los microorganismos, de acuerdo a la metodología, se extrajeron

de zonas comerciales con altas aplicaciones de fungicidas, y según Blakeman y Fokkema (1982), se ha determinado que los hongos epífitos, son eliminados por fungicidas de amplio espectro, dándose un aumento de bacterias epífitas con gran resistencia a esos fungicidas.

La importancia del combate integrado de plagas es demostrada por algunos autores (Leben, 1985; Vargas, 1984), en los que se sospecha algún mecanismo de sinergismo entre el fungicida y el organismo. Pero sobre todo, la importancia radica en la capacidad del microorganismo de resistir las aplicaciones de fungicidas en el campo, sin bajar las poblaciones, cuando las condiciones favorezcan la enfermedad e impidan la acción antagónica.

Cuadro 3. Efecto de diferentes concentraciones de productos químicos sobre la zona de inhibición de algunas cepas bacteriales, Turrialba, Costa Rica, 1994.

Plaguicida	Concentración (ppm)	Cepa Bacterial			
		A23	R1	A100	A30
Propiconazole	0	0 [†]	0	0	0
	10	0	0	0	0
	100	0	0	0	0
	1000	0	0	0	0
Tridemorph	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
	100	0	0	0	0
	1000	0	0	0	0
Mancozeb	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
	100	0	0	0	0
	1000	0	0	0	0
Benomyl	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
	100	0	0	0	0
	1000	0	0	0	0
Agrimicin	0	0	0	0	0
	10	2.0	2.0	2.0	2.0
	100	3.0	3.0	3.0	3.0
	1000	4.5	4.5	4.5	4.5

*: Zona de inhibición bacterial producida por el químico (mm).

4.5 Prueba de adherencia

Sequeira, Okumoto y Bustamante (1994, comunicación personal) consideran que uno de los mayores problemas del control biológico con bacterias, es el establecer y mantener las poblaciones de éstos microorganismos sobre la superficie de las hojas.

Existen diferencias altamente significativas entre el tratamiento Agua+R1 (*Serratia marcescens*), con los demás tratamientos (Anexo 3). Este tratamiento logró mantener en la superficie de la hoja, el mayor número de colonias bacteriales, alcanzando en promedio 3672 colonias por plato petri (Fig.3), lo que significa 1.8×10^6 unidades formadoras de colonias por gramo de hoja.

En el tratamiento, Agua+R1+NP7, no se recuperó la bacteria después de los lavados para reaislarla, y en el tratamiento Agua+R1+Silwet, se extrajo en promedio, 3.6 colonias por plato petri (Fig.3), lo que significa, 1800 unidades formadoras de bacteria por gramo de hoja.

Estos resultados indican que la cepa R1 de *Serratia marcescens* presenta gran capacidad de adherencia por si sola, la cual se ve reducida cuando se aplica junto con coadyuvantes químicos, en éste caso, Silwet L75 y NP7.

ufc (log10/plato petri)

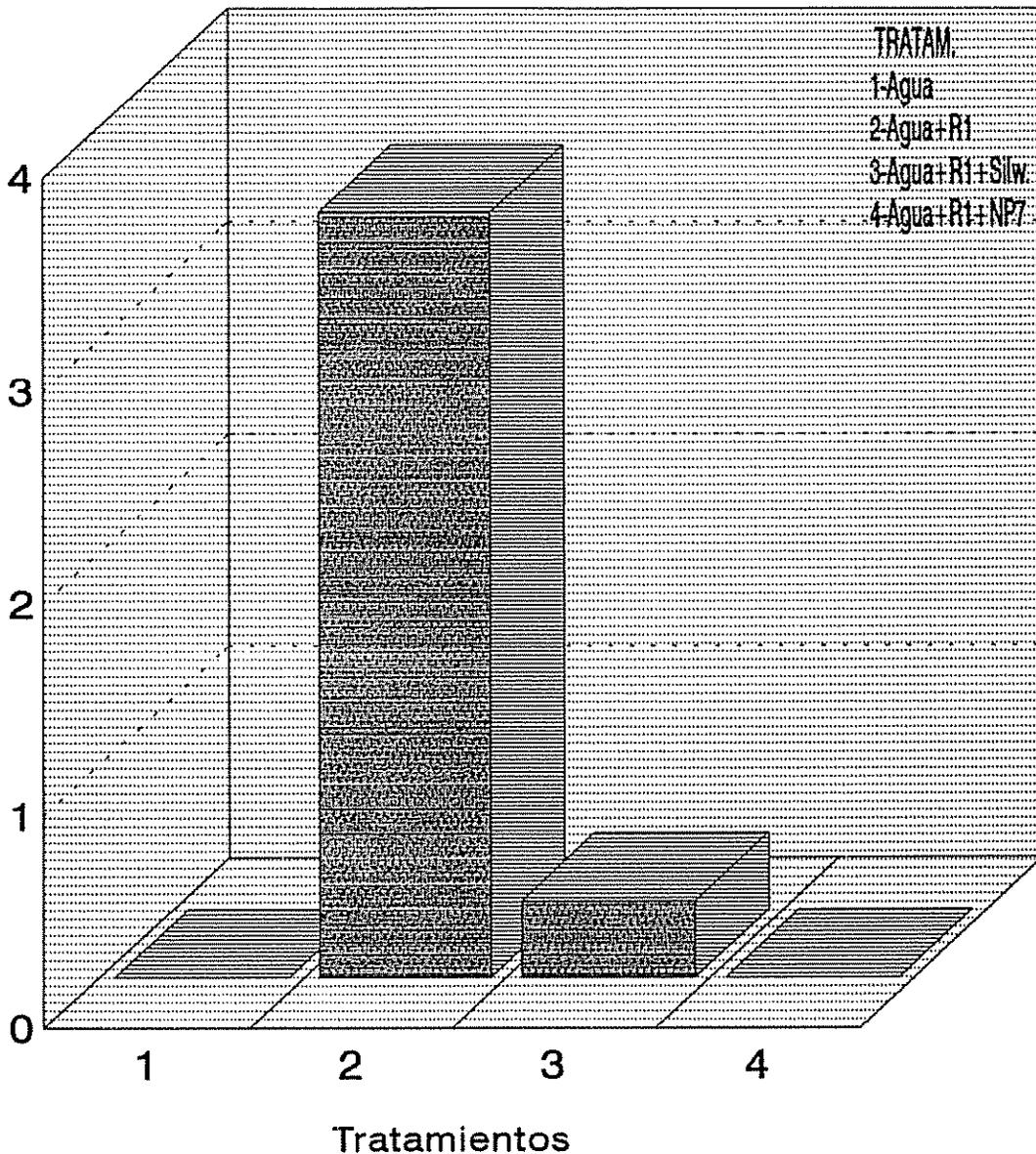


Fig.3. Efecto de Silwet L77 y NP7 sobre la persistencia de microorganismos en la superficie de la hoja, basado en el número de colonias (ufc) por tratamiento.

En el testigo aplicado con agua, no aparecieron colonias de *S. marcescens* (Fig. 3), lo que indica que ésta bacteria no es un habitante común de variedad Gran Enano en la finca La Montaña en Turrialba, y que solamente se encuentra en ciertos sitios, bajo determinadas condiciones ambientales y de manejo.

4.6 Prueba de antagonismo en invernadero

El análisis de los tratamientos por medio de la prueba de contrastes, indica que existen diferencias altamente significativas entre el testigo y los tratamientos individuales, y entre el testigo y grupos de tratamientos. No existen diferencias entre los tratamientos, ni entre grupos de tratamientos. Tampoco existen diferencias entre el tratamiento con fungicidas y los tratamientos individuales, ni entre el tratamiento con fungicidas y grupos de tratamientos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de los tratamientos en invernadero, según prueba de contrastes, Turrialba, Costa Rica, 1994.

Contraste	Probabilidad
Testigo vrs tratamientos	0.0001
Testigo vrs bacteria sin quitina (BSQ)	0.0257
Testigo vrs bacteria con quitina (BCQ)	0.0432
Testigo vrs quitina	0.0354
BSQ vrs BCQ	0.1416
Quitina vrs BSQ	0.8715
Quitina vrs BCQ	0.3680
Quitina vrs fungicida	0.5191
Fungicida vrs BSQ	0.3603
Fungicida vrs BCQ	0.9466

En invernadero, los tratamientos controlaron la enfermedad en promedio en un 84%, mientras que el testigo con fungicida lo hizo en un 78%. El mejor tratamiento fue la quitina sola, la cual logró inhibir la enfermedad en un 90% (Fig.4), sin embargo, la diferencia con los otros tratamientos fue tan pequeña que estadísticamente no fue significativa. Lo importante es que todos los tratamientos funcionan, basados principalmente en la acción quitinolítica de los agentes de control contra el patógeno.

La *Serratia* sp. y el *Bacillus* lograron obtener un mayor control que el tratamiento con fungicida cuando se aplicaron separados, no así cuando se aplicaron en mezcla con la quitina (Fig.4).

Porcentaje de infección

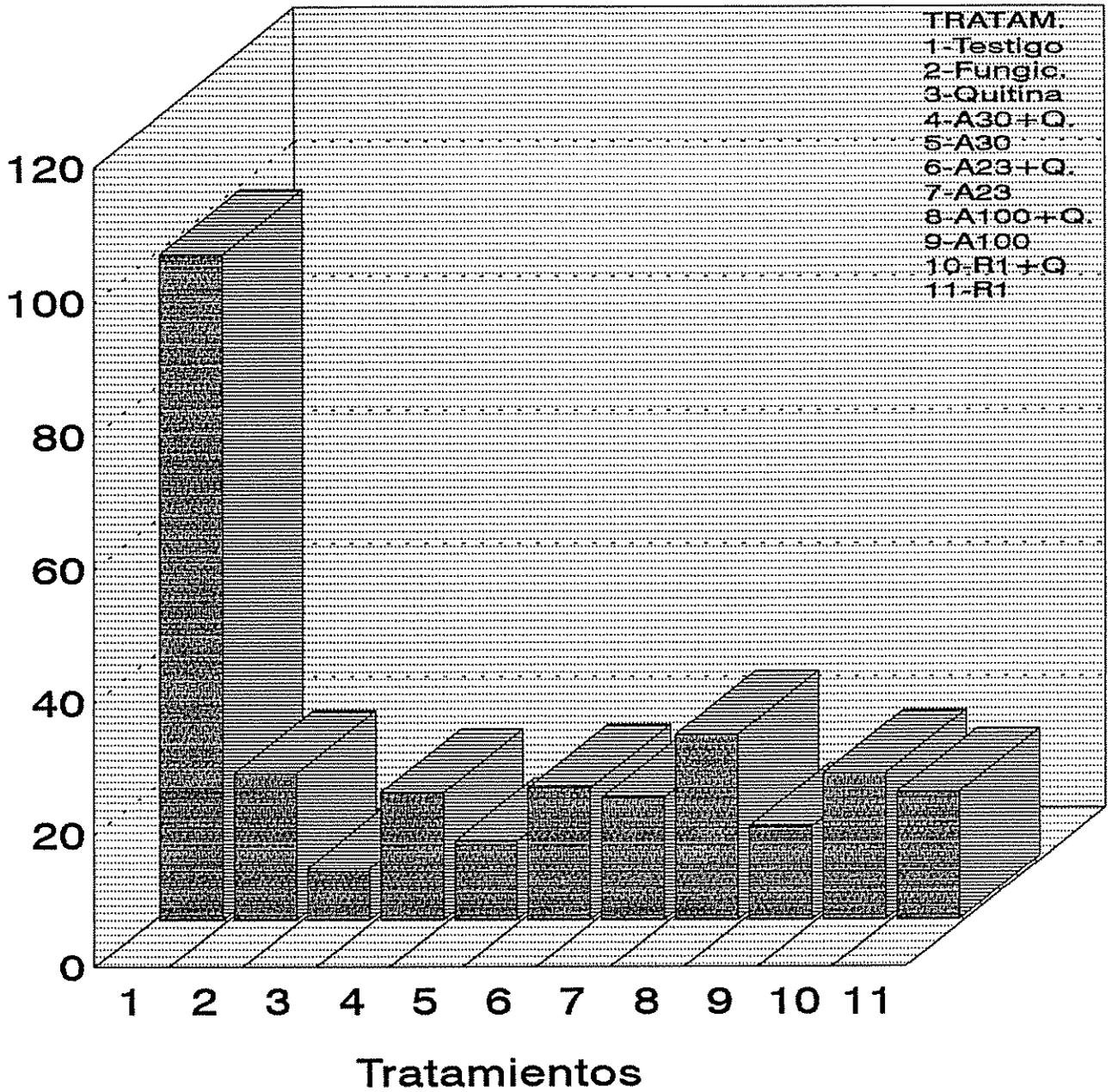


Fig.4. Efecto de diferentes tratamientos en el control biológico de Sigatoka Negra en invernadero con respecto al testigo.

Las pocas diferencias de los tratamientos con quitina y los sin quitina podrían deberse a dos factores: estimulación de microorganismos quitinolíticos y/o producción de una barrera física que impide la penetración de patógenos en la superficie de la hoja, confirmando lo reportado por algunos autores (Mitchell y Alexander, 1961; Mitchell, 1963; Kokalis-Burelle *et al*, 1991; Ploper *et al*, 1991; Okumoto, 1992), en donde muestran en sus estudios, que quitina aplicada en forma de suspensión amorfa o como suspensión coloidal, aumenta la supervivencia de microorganismos quitinolíticos, los cuales pueden controlar el hongo, debido a la digestión de las paredes, que también contiene quitina, o puede producir una barrera física contra los patógenos.

Por otra parte, la combinación de quitina con los microorganismos antagónicos no tiene mayor efecto que cuando el microorganismo o la quitina se aplican solos (Cuadro 4), lo que podría deberse a que la quitina está cumpliendo la doble función de estimulación de microorganismos quitinolíticos, los cuales trabajan contra el hongo, y de barrera física, ésta última, no solo afectando al patógeno, sino también, a los microorganismos que se aplican con ella.

4.7 Prueba de campo

4.7.1 Condiciones meteorológicas y producción de ascosporas

La época de aplicación y evaluación de los tratamientos, se caracterizó por presentar fuertes variaciones en la precipitación, con descargas de lluvia promedio de 192 mm por semana. La temperatura máxima promedio fue de 28.9°C y la mínima de 22°C (Fig.5), correspondiendo a condiciones favorables para el desarrollo de Sigatoka Negra, donde las mayores infecciones corresponden a épocas lluviosas, con temperaturas entre 21 y 28°C (Stover, 1982).

González y Jaramillo (1979), indican que la rápida propagación y el porcentaje alto de infección de ésta enfermedad, son favorecidos por una condición de tiempo caluroso y lluvioso, así como por alta humedad en el ambiente. El desarrollo de las lesiones y las infecciones severas son favorecidos por lluvias frecuentes y temperaturas altas.

La presión de ascosporas en el campo fue en promedio de 35235 ascosporas $m^{-3} día^{-1}$ en la época de aplicación de los tratamientos y de 11476 durante

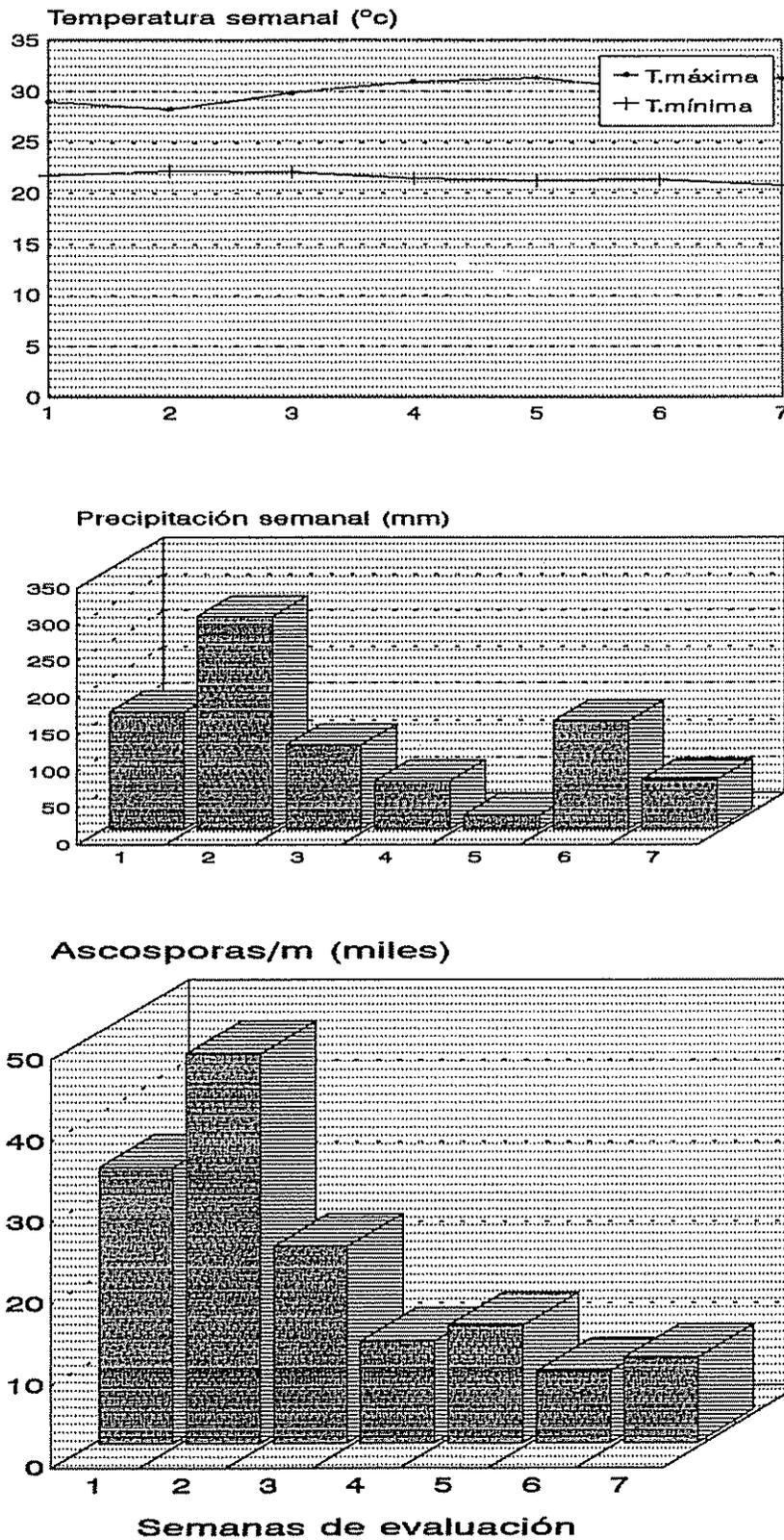


Fig.5. Comportamiento promedio semanal de la temperatura, precipitación y de la producción de ascosporas, durante el período de evaluación de los tratamientos en campo.

las siguientes cuatro semanas de evaluación (Fig.5). Stover (1980) reportó de 8000 a 32000 ascosporas por m³ de aire durante 24 horas, lo que indica, que este ensayo estuvo sometido a una alta presión de ascosporas durante la época de aplicación y evaluación de los tratamientos.

4.7.2 Prueba de campo

Existen diferencias altamente significativas al 5% entre los tratamientos con respecto al testigo. También existen diferencias significativas entre el tratamiento con fungicidas con respecto a los demás tratamientos (Cuadro 5 y Figura 6).

No se obtuvo diferencias entre los tratamientos con quitina y los tratamientos sin quitina. Tampoco, existieron diferencias entre la quitina aplicada sola, y los tratamientos de bacterias con y sin quitina (Cuadro 5), debido posiblemente, que al combinar la quitina con los microorganismos, ésta produce una barrera física, que impide no solo la penetración del patógeno sino también la acción del antagonista aplicado en conjunto (Kokalis-Burelle, *et al*, 1991). Otra posible explicación a la poca

Porcentaje de infección

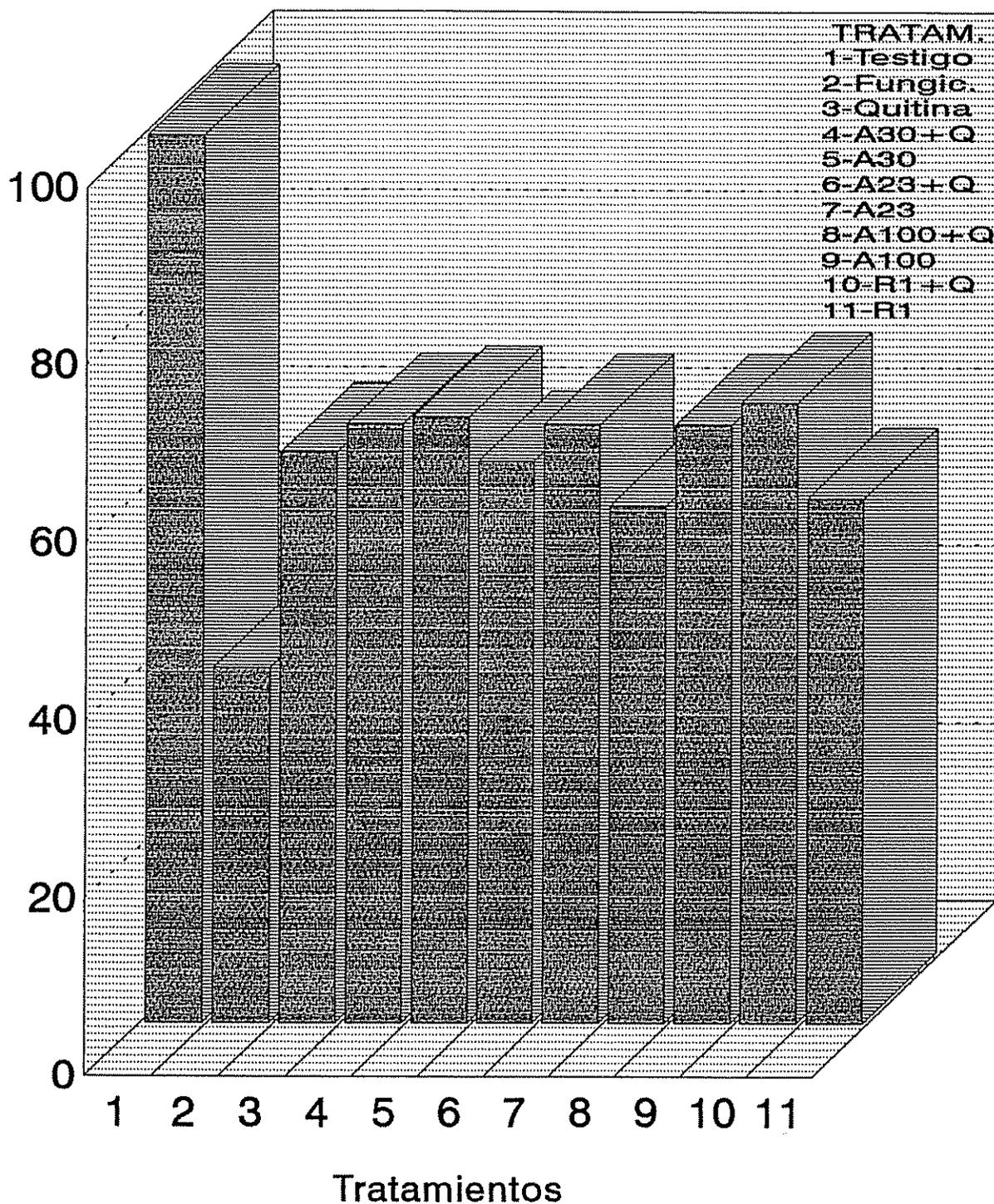


Fig.6. Efecto promedio de los tratamientos en campo en el control de Sigatoka Negra a través de 4 fechas de aplicación.

diferencia entre los tratamientos es el problema de deriva, la cual, debido al tamaño de las plantas y la disposición del diseño experimental favorecieron el traslape de productos entre tratamientos, lo que permitió un testigo más sano de lo normal. Esta observación se refuerza comparando las parcelas tratadas con un testigo absoluto, cuya procedencia, edad, suelo, fertilización, manejo, condiciones climáticas y ubicación, fueron semejantes a las del experimento. Al comparar los resultados de los tratamientos con los resultados de ésta parcela (Standar Fruit Company, 1994, datos no publicados), indican un control del 92% de los fungicidas y de un 72% de los tratamientos en promedio.

Cuadro 5. Análisis promedio de los tratamientos en campo, por medio de la prueba de contrastes Turrialba, Costa Rica, 1994.

Contraste	Probabilidad
Testigo vrs tratamientos	0.0003
Testigo vrs bacterias sin quitina (BSQ)	0.0327
Testigo vrs Bacterias con quitina (BCQ)	0.0256
Testigo vrs quitina	0.0464
BSQ vrs BCQ	0.1529
Quitina vrs BSQ	0.9028
Quitina vrs BCQ	0.3811
Quitina vrs fungicida	0.0350
Fungicida vrs BSQ	0.0447
Fungicida vrs BCQ	0.0491

Las aplicaciones de fungicidas controlaron la enfermedad en un 60%, mientras que los tratamientos lo hicieron en promedio en un 40.1%, lo que representa un 19.9% menos control de los tratamientos con respecto a los fungicidas (Fig.6).

Considerando las altas precipitaciones en la zona donde se llevó a cabo el experimento, la aplicación de los microorganismos en agua, y el buen funcionamiento que éstos realizaron en la etapa de invernadero, se podría pensar que las diferencias entre el tratamiento con fungicidas y los demás tratamientos en campo, es debido a la falta de un adherente compatible con los microorganismos el cual pueda ayudar aún más a su supervivencia en la superficie de la hoja.

Dos semanas después de la última aplicación de los tratamientos, las diferencias entre el químico y los tratamientos, se acortaron en un 11%, representado por la disminución en la efectividad de los fungicidas de un 4% y un aumento en la efectividad de los tratamientos de un 7%. Posteriormente, el control de la enfermedad se volvió menos efectivo por parte del testigo con fungicidas y de los tratamientos, hasta que las diferencias entre testigos y tratamientos desaparecieron (Fig.7).

Aparentemente, los tratamientos en condiciones de precipitación alta, y sin el uso de adherentes, tienen una persistencia de aproximadamente 15 días, muy parecido a la persistencia de los fungicidas con sus adherentes (Fig.7).

El uso de quitina como sustrato después de varias semanas de de la última aplicación, estimula aparentemente el desarrollo de Sigatoka Negra, ya que los tratamientos que llevaron quitina, presentaron a los 15 y 30 días después de la última aplicación, los mayores porcentajes de infección (Fig.7), sucediendo probablemente que los residuos de la quitina en la hoja fueron lo suficientemente ricos para favorecer el desarrollo de *M. fijiensis*.

Porcentaje de infección

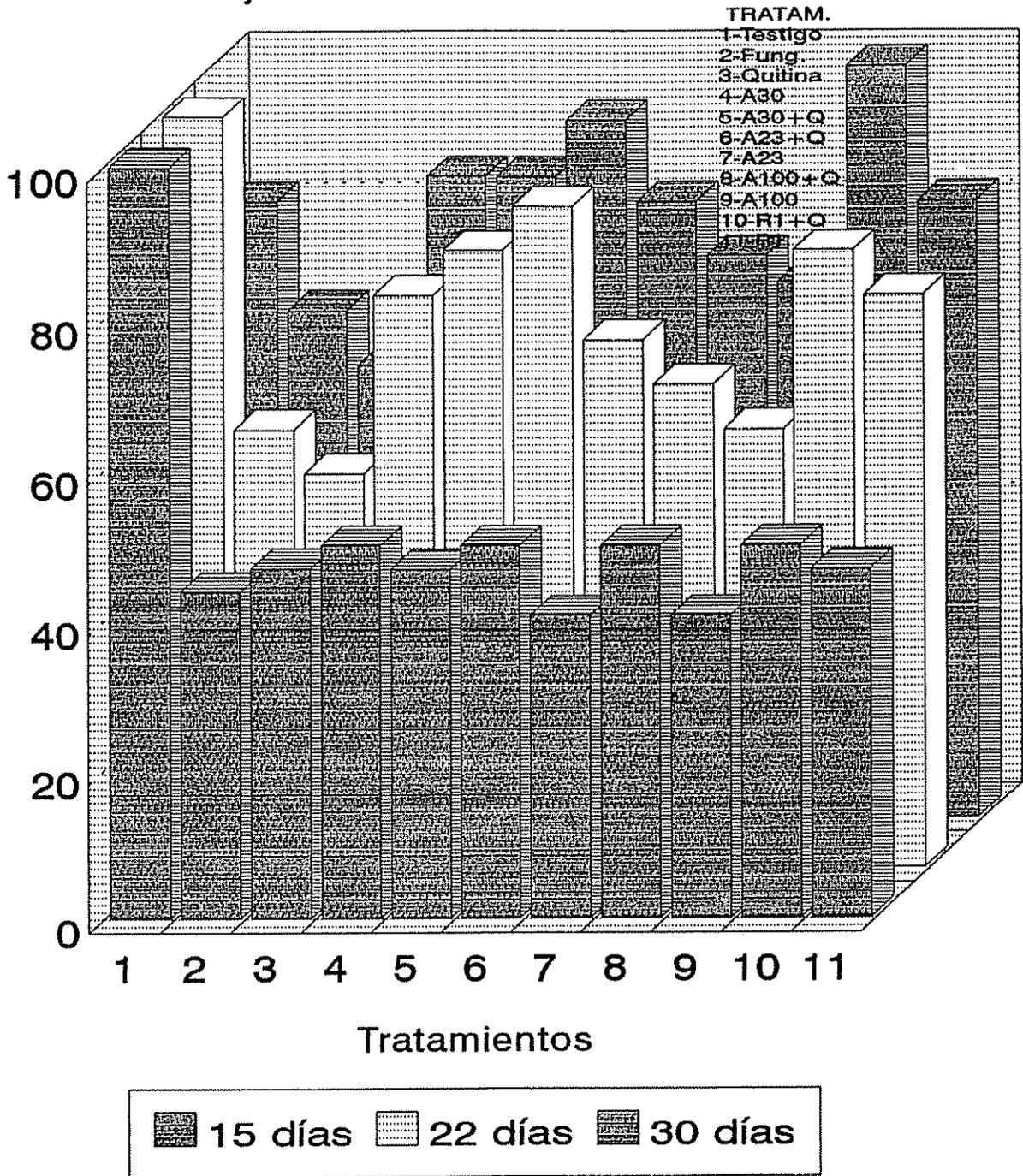


Fig.7. Efecto promedio de cada tratamiento con respecto al testigo en el control de Sigatoka Negra, después de eliminar las aplicaciones de microorganismos.

5. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos de ésta investigación, se presentan las siguientes conclusiones:

1. El sitio no caliente presentó mayor cantidad de microorganismos quitinolíticos en la superficie de las hojas.
2. *Serratia marcescens* se encontró solamente en el sitio no caliente.
3. Los microorganismos *Serratia sp.*, *Serratia marcescens* y *Bacillus sp.* son quitinolíticos y antagónicos a ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*.
4. Las cepas de microorganismos utilizados en las etapas de invernadero y campo (*Serratia sp.*, *Serratia marcescens* y *Bacillus sp.*), son compatibles con los fungicidas propiconazole, tridemorf, benomil y mancozeb.
5. Bajo las condiciones de campo del experimento, el uso de coadyuvantes sintéticos, afecta negativamente las poblaciones de los antagonistas en la superficie de la

hoja.

6. La mezcla de quitina con los microorganismos no presenta un mejor efecto antagónico que la quitina aplicada sola o los microorganismos solos.
7. En invernadero, los tratamientos no presentaron diferencias de antagonismo significativas con respecto al fungicida pero si la hubo con el testigo absoluto.
8. En el campo, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, aunque si la hubo con el fungicida y el testigo absoluto.
9. Las altas precipitaciones fueron aparentemente el factor determinante para que se dieran las diferencias de control entre los tratamientos y los fungicidas en el campo.

6. RECOMENDACIONES

Basado en los resultados del experimento, se recomienda lo siguiente:

1. Repetir la investigación de invernadero y campo para verificar la consistencia de los resultados.
2. Profundizar en las investigaciones de coadyuvantes, utilizando no solo sintéticos, sino naturales.
3. Evaluar la alternancia de los microorganismos con los fungicidas más utilizados en banano.
4. Evaluar la acción de los microorganismos sobre pseudotecios.

7. LITERATURA CITADA

- ALEXOPOULUS, C. J.; Mims, C. W., 1979. Introductory Micology. 3Ed. Wiley, New York. 632 p.
- ANDREWS, J.H.; KENERLEY, C.M., 1978. The effects of a pesticide program on non-target epiphytic microbial population of apple leaves. *Can. J. Microbiology*. 24: 1058-1078.
- ANDREWS, J.H. 1985. Strategies for selecting antagonistic microorganisms from the phylloplane. *In* Biological control on the phylloplane. Ed. by C. E. Windels, S. E. Lindow. & Paul, Mn, APS. 31-44 p.
- BAKER, K. F.; COOK, R. J., 1982. Biological control of plant pathogens. Minnesota, APS. 365 p.
- BAKER, K. F.; COOK, R. J., 1974. Biological control of plant pathogens. San Francisco, California, Freeman. 433 p.
- BILLING, E., 1976. The taxonomy of bacteria on the aerial part of plants. *In* Microbiology of aerial plant surfaces. Ed. by C. H. Dickinson; T. F. Preece. New York, Academic Press. 223-274 p.
- BHATT, D. D.; VANGHAN, E. K., 1962. Preliminary investigations on biological control of gray mould (*Botrytis cinerea*) of strawberries. *Plant disease reporter*, EE.UU., 46:342-345.
- BLAKEMAN, J. P., 1985. Ecological succession el leaf surface microorganisms in relation to biological control. *In* Biological control on the phylloplane. Ed. by C. Windels; S. E. Lindow. St. Paul, Mn, APS. 6-31 p.
- BLAKEMAN, J. P., 1971. The chemical environment of the leaf surface in relation to growth of pathogenic fungi. *In* Ecology of leaf surface micro-organic sms. Ed. by T. F. Preece; C. H. Dickinson. London, Academic Press. 255-278 p.
- BLAKEMAN, J. P.; FOKKEMA, N. J., 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Ann. Rev. Phytopathology*. 20: 167-192.
- BRAVO, N.; VICTORIA, J. 1981. Posibilidades del control biológico de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Evans) del cacao. *Acta Agronómica (Col.)* 31 (1/4): 133-141 p.

- BRUN, J. 1963. La Cercosporiose du bananier. Thesis de doctorado, Univiversidad de París, Francia. 198 p.
- CARUSO, F. L. and KUC, J. 1977. Field protection of cucumber, watermelon nd muskmelon against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. *Phytopathology* 67: 1290-1292.
- CHAMBERLAIN, D. W. and PAXTON, J. 1968. Protection al Soybean plants by phytoalexin. *Phytopathology*, 58: 1349-1350.
- CORPORACION BANANERA NACIONAL, 1993. El combate de la Sigatoka Negra. Boletín Técnico #4. Departamento de Investigaciones, 21 p.
- COOK, R. J.; BAKER, K. F., 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, Mn, APS. 539 p.
- COLLINS, M. A., 1976. Colonisation of leaves by phylloplane saprophytes and their interactions in this environment. In *Microbiology of aerial plant surfaces*. Ed. by C. H. Dickinson; T. F. Preece. New York, Academic Press. 401-418 p.
- DAVENPORT, R. R., 1976. Ecological concept in studies of microorganisms on aerial plant surfaces. In *Microbiology of aerial plant surfaces*. Ed. by C. H. Dickinson; T. F. Preece. New York, Academic Press. 199-216 p.
- DENNIS, C., 1976. The microflora on the surface of soft fruits. In *Microbiology of aerial plant surfaces*. Ed. by C. H. Dickinson; T. F. Preece. New York, Academic Press. 419-432 p.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J.B., 1985. Basic plant pathology methods. Boca Ratón, FL. CRC p
- DUBOS, B., 1984. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grapevines by an antagonistic strain of *Trhichoderma harzianum*. In *Currents perspectives in microbial ecology*. Ed. by M. S. Klug; L. A. Riddy. Washington, American Society of Microbiology. 370-373 p.
- DU PONT, 1982. Sigatoka Negra y Amarilla. Técnicas mejoradas para el manejo e identificación. Boletín Técnico. E- 55786, EEUU. 17p.
- ESQUIVEL, R., 1992. Algunos deuteromicetos hiperparásitos de

M. fijiensis Morelet, Panamá. Institutos de Investigaciones Agropecuarias de Panamá (IDIAP). 12 p.

FOKKEMA, N. J., 1976. Antagonism between fungal saprophytes and pathogens on aerial plant surfaces. *In* Microbiology of aerial plant surfaces. New York. Academic Press. 487-506 p.

FOKKEMA, N. J.; LORBEER, J. W., 1974. Interactions between *Alternaria porri* and the saprophytic mycoflora of onion leaves. *Phytopathology* (EE.UU.) 64:1128-1133.

FOKKEMA, N. J.; DEN HOUTER, J. G.; KOSTERMAN, S.; NELIS, A. L., 1979. Manipulation of yeasts on field grown wheat leaves and their antagonistic effect on *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum*. *Transaction of the British Mycological Society* (G.B.) 72:19-29.

FRAVEL, E. D.; SPURR, H.W.Jr., 1977. Biocontrol of tobacco brown-spot disease by *Bacillus cereus subsp mycoides* in controlled environment. *Phytopathology* 67: 930-932.

FROSSARD, P., 1980. Apparition d' une nouvelle et grave maladie foliaire des bananiers et plantains au Gabon: la maladie des raies noires: *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Fruits*. 35(9):519-527.

GHERNA, R.; PIENTA, P., 1992. American Type Culture Collection Catalogue of Bacteria and Phages, Ed. Nº 18. American Type Collection, Maryland. 123- 128 p.

GODFREY, B. E., 1976. Leachater from aerial parts of plants and their relation to plant surfaces microbial populations. *In* Microbiology of aerial plants surfaces. Ed. by C. H. Dickinson; T. F. Preece. New York, Academic Press. 433-440 p.

GONZALEZ, M.; JARAMILLO, R., 1979. Enfermedades de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet var. *difformis* Mulder y Stover). ASBANA. 3-7-8 pgs.

GORDON, R.E.; HAYNES, W. C.; HOR-NAY PANG, C., 1973. The genus *Bacillus*. Agriculture Handbook No. 427. Ed. Agricultural Reseach Service. United States Department of Agriculture. 283p.

HISLOP, E. C., 1976. Some effects of fungicides and other agro chemicals on the microbiology of the aerial surfaces of

- plants. *In* Microbiology of aerial plant surfaces. Ed. by C. H. Dickinson; T. F. Preece. New York, Academic Press. 41-74 p.
- JIMENEZ, J. M.; GALINDO, J. J.; RAMIREZ, C., 1986. Estudio sobre combate biológico de *Micosphaerella fijiensis* var. *difformis* mediante bacterias epífitas. CATIE, Turrialba. UCR, San José, Costa Rica. 28-30 p.
- KOKALIS-BURELLE, N.; BACKMAN, D. A.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; PLOPER, L. D., 1992. Chitin as foliar amendment to modify microbial ecology and control disease. *In* 1991 APS Annual Meeting. August 17-21, 1991. St. Louis, Missouri. APS.
- KUC, J. 1983. Induced systemic resistance on plants to diseases caused by fungi and bacteria. *In*: The Dynamics of Host Defense. E. by Bailey, J. A. and Deverall, B.J. Academia Press, Sidney. 191-221 p.
- LAST, F. T., 1955. Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves. Transactions of the British Microbiological Society (G.B.) 38:221-239.
- LEACH, R., 1964. A new form of banana leaf spot in Fiji, black leaf streak. World Crops 16:60-64.
- LEBEN, C., 1961. Microorganisms on cucumber seedlings. Phytopathology 51: 553-557.
- LEBEN, C., 1964. Influence of bacteria isolated from healthy cucumber leaves on two leaf diseases cucumber. Phytopathology (EE.UU.) 54:405-408.
- LEBEN, C., 1965. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. Annual Review of Phytopathology (EE.UU.) 3:209-230.
- LEBEN, C.; DAFT, G. C., 1965. Influence of an epiphytic bacterium on cucumber anthracnose, early blight of tomato, and northern leaf blight of corn. Phytopathology (EE.UU.) 55:760-762.
- LINDOW, S. E., 1985. Integrated control and role of antibiosis in biological control of fireblight and frost injury. *In* Biological control on the phylloplane. Ed. by C. E. Windels; S. E. Lindow. St. Paul, Mn, APS. 83-115 p.
- MARTINS, E. M., *et al.* 1985. Comparative induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants by non-specific

inducers from different fungal and bacterial origins. *Fitopatologia Brasileira* 10: 521-529.

- MEREDITH, D. S., 1970. Banana leaf spot disease (Sigatoka) caused by *Mycosphaerella musicola* Leach. *Phytopathological Papers* Nº 11. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 165-198 p.
- MEREDITH, D. S.; LAWRENCE, J. S., 1970. Morphology of the conidial state of *Mycosphaerella musicola* in the Pacific region. *Trans. Brycol. Soc. (U.K.)* 54(2): 265-281.
- MEREDITH, D. S. and LAWRENCE, J. S. 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. Brycol. Soc. (U.K.)* 52(3): 459-476.
- MITCHELL, R. 1963. Addition of fungal cell-wall compounds to soil for biological disease control. *Phytopathology*. 53: 1068-1071.
- MITCHELL, R. M.; ALEXANDER, M., 1962. Microbiological processes associated with the use of chitin for biological control. *Proc. Soil. Sci. Soc. Amer.* 26: 556-558.
- MITCHELL, R. M; ALEXANDER, M., 1961. The mycolytic phenomenon and biological control of *Fusarium* in soil. *Nature* 190: 109-110.
- MORAES, W. B. C. 1991. Bioquímica de la resistencia. Un control alternativo de la roya del cafeto. *In: La roya del cafeto.* GTZ. 65-204 p.
- MORRIS, C. E.; ROUSE, D. I., 1985. Role of nutrients in regulating epiphytic bacterial populations. *In Biological control on the phylloplane.* Ed. by C. E. Windels; S. E. Lindow. St. Paul, Mn. APS.
- 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 particulier des productions d'altitude. *Fruits* 45(1).
- OKUMOTO, S., 1992. Efecto de enmiendas sobre bacterias antagónicas a *Alternaria solani* en tomate. Tesis de MSc., CATIE, Turrialba, Costa Rica. 114p.

- PLOPER, L. D.; BACKMAN, P. A.; CUNNINGHAM, S. D.; MARTIN, M. J., 1991. Effect of chitin amendments and added chitinolytic microorganisms on foliar disease of tomato. In 1991 APS Annual Meeting. August 17-21, 1991. St. Luis, Missouri. APS.
- QUESADA, J.R. 1989. Utilización del control biológico clásico. In: Manejo integrado de plagas insectiles en la agricultura. Honduras, 195-211p.
- QUIÑON, V. L., 1972. Epidemiology and control of black leaf track disease of bananas caused by *Mycosphaerella fijiensis*. Thesis requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Botanical Sciences Plant Pathology. Universidad de Hawaii. 139 p.
- RAHE, J. E., et al. 1969. Induced resistance in *Phaseolus vulgaris* to bean anthracnose. *Phytopathology* 59: 1641-1645.
- RISBETH, J., 1963. Stump-Protection against *Fomes annosus*. 3. *Annals of Applied Biology* (G.B.) 52:63-67.
- ROMERO, R. 1986. Observaciones sobre la incidencia de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*) en el cultivo del banano en la zona Atlántica de Costa Rica. *CORBANA* 10(25): 22-35.
- RYTTER, J. L.; LUKEZIC, F. L.; GRAIG, R.; MOORMAN, G.W., 1989. Biological control of geranium rust by *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*. 79: 367-370.
- SALLE, G.; PICHARD, V.; MOURICHON, X., 1989. Cytological study of the interaction between *Mycosphaerella fijiensis* Morelet and cultivars of *Musa* presenting different levels of resistance. In Sigatoka leaf spot diseases of bananas. Proceedings of an international workshop hold. International Network for the improvement, of banana and plantain (INIBAP). San José, Costa Rica. 374 p.
- SASTRY, P. S., 1988. Agrometeorology of the banana crop. *Agricultural Meteorology* Nº 29. 85 p.
- SEQUEIRA, L. 1958. Bacterial wilt of bananas: dissemination of the pathogen and control of the disease. *Phytopathology* 48:64-69.
- STARR, M. P.; STOLP, H. G.; TRUPER, A.B.; SCHLEGEL, H. G., 1981. *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria*, V.2. Springer-Verlag. New York. 388 p.

- STOVER, R. H. 1983. Effect du *Cercospora* noir sur les plantains en Amerique Centrale. *Fruits (Francia)*, 38(4): 326-329.
- STOVER, R. H. 1980. Sigatoka leaf spots of bananas and plantains. *Plant Disease (E.U.U.)*, 64(8): 750-756.
- STOVER, R. H.; DICKSON, J. D. 1976. Bananas leaf spot caused by *Mycosphaerella musicola* and *M. fijiensis*; a comparison of first Central American epidemics. *Plant Protection Bulletin. FAO.* 24:36-42.
- STOVER, R. H.; FULLERTON, R. A., 1989. Sigatoka leaf spots of bananas. INIBAP, 1990. Proceedings of an international workshop held at San José, Costa Rica, 373p.
- STOVER, R. H. and SIMMONDS, N. W. 1987. Bananas, 3 ed. (U.K.), Longman and Technical, 468p.
- SWINBURNE, T. R., 1973. Microflora of apple leaf sers in relation to infection by *Nectria galligena*. *Transaction of the British Mycological Society (G.B.)* 60:389-403.
- SWINBURNE, T. R.; BAU, J. G.; BROWN, A. E., 1975. Production of antibiotics by *Bacillus subtilis* and their effect on fungal colonists of apple leaf sers. *Transaction of the British Mycological Society (G.B.)* 85:211-217.
- THOMPSON, S. V.; SCHROTH, M. N.; MOLLER, W. J.; REIL, W. O., 1976. Efficacy of bactericides and saprophytic bacteria in reducing colonization and infection of pearflowers by *Erwinia amylova*. *Phytopathology (E.U.U.)* 66:1457-1459.
- TRONSMO, A.; DENNIS, C., 1978. Effect of temperature on antagonistic properties of *Trichoderma* species. *Transactions of the British Mycological Society (G.B.)* 71:469-474.
- VARGAS, E. 1984. Interacción del tratamiento biológico y químico en el combate de ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en el cafeto. *Agronomía Costarricense (C.R.)*. 12-15 p.
- VASQUEZ, N.; TAPIA, A. C.; GALINDO, J. 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 held. International Network for the

improvement of banana and plantain (INIBAP), San José,
Costa Rica. 374 p.

YARWOOD, C. 1956. Cross protection with two rust fungi.
Phytopathology 46: 540-544.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Metodología para obtener quitina a partir de caparazones de camarones. Salazar y Okumoto, (1992).

1. Sumergir los caparazones en una solución de NaOH al 10% durante un período de 12 a 24 horas.
2. Secar a un horno a 70°C.
3. Colocar 800 g en un recipiente con 5 l de NaOH y HCL a una concentración normal por períodos de cuatro horas en forma alterna.
4. Reducir el volúmen a 4 l y continuar la limpieza de material por 24 horas.
5. Lavar tres veces con alcohol al 95% a intervalos de 15 minutos, agitando y restregando bien antes de cada cambio.
6. Después de decantado el último volúmen de alcohol, trasladar al horno para el secado.
7. Pesar 200 g de material seco, añadir 2.66 l de HCL a una concentración de 36 y 38%, agitar bien cuidadosamente hasta que el material este bien mojado y tenga un aspecto gelatinoso de color oscuro.
8. Agregar agua destilada hasta completar ocho litros aproximadamente, agitar fuertemente varias veces, y dejar en reposo durante doce horas.
9. Si hay separación de fases, decantar el sobrenadante cuidadosamente de no perder el precipitado. En el caso de que esto se dificulte, se puede usar una cámara de vacío accionada por agua acoplada a una manguera provista de un tubo de vidrio o plástico con el extremo en forma de U de tal forma que permita la succión de líquido de arriba hacia abajo para evitar el arrastre del precipitado.
10. En caso que no haya separación de fases, proceder en forma similar al procedimiento usado para la eliminación del sobrenadante.
11. Colocar 200 ml de suspensión en tubos de centrifugas y pesarlos para evitar el riesgo de pérdida del material y deterioro del equipo.
12. Centrifugar a 2600 RPM durante 10 minutos.

13. Decantar el sobrenadante y agregar aproximadamente 100-150 ml de agua destilada según el volumen del precipitado y agitar fuertemente.
14. Pesar otra vez y centrifugar. Esto se repite tres veces a intervalos de 5 minutos.
15. Recoger el material decantado en botellas para recuperar parte de la suspensión.
16. Después del tercer lavado, medir el pH para corregirlo y dejarlo en valores mayores de 2.
17. Suspender el precipitado de los tubos usando una mínima cantidad de agua destilada y licuarlo bien durante 30 segundos.
18. Colocar la suspensión en frascos y guardarlo bajo refrigeración a 4°C.
19. La concentración de la suspensión coloidal de quitina se puede calcular mediante liofilización.

Anexo 2. Efecto de microorganismos quitinolíticos sobre la germinación, deformación y longitud del tubo germinativo de ascospora de *M. fijiensis*, Turrialba, Costa Rica, 1994.

Cepa	Germinación (% de inhibición)	Deformación %	Tubo germinativo (% de inhibición)
Testigo	0	0	0
A22	2.6	97.4 *	48.3 *
A100	17.4 *	82.6 *	63.5 *
R1	16.6 *	83.4 *	74.2 *
A7	12.0	88.0 *	47.0 *
A18	10.6	89.4 *	46.0 *
A30	10.0	90.0 *	60.6 *
A21	8.0	92.0 *	70.3 *
B22	17.4 *	82.6 *	61.8 *
B23	2.6	97.4 *	58.3 *
B7	1.4	98.6 *	40.0
A20	0	100.0 *	54.4 *
B12	0	100.0 *	42.9 *
A24	0	100.0 *	42.9 *
B18	0	100.0 *	21.4
A23	32.6 *	67.4 *	71.4 *

*: Significancia al 5%.

Anexo 3. Evaluación de la mezcla de coadyuvantes con bacterias, Turrialba, Costa Rica, 1994.

Tratamiento	Nº de colonias bacteriales
Testigo	0
Agua+R1	3672 **
Agua+R1+Silwet	3 ns
Agua+R1+NP7	0 ns

** : Altamente significativo al 5%

ns: No significativo