

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMAS DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMBATE BIOLÓGICO DE LA MONILIASIS DEL CACAO (Theobroma cacao) CAUSADA POR Moniliophthora roreri MEDIANTE BACTERIAS EPIFITAS EN LA ZONA ATLANTICA DE COSTA RICA

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa Conjunto de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica y el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de:

Magister Scientiae

Por

José Martí Jiménez Mora

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA

Departamento de Producción Vegetal

Turrialba, Costa Rica

1986

DEDICATORIA

A mi hijo José Esteban, a mi esposa Laura y a mis padres, que en todo momento me dieron el apoyo y la inspiración necesaria para concluir esta etapa de la vida.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea dejar constancia de su agradecimiento a las siguientes personas e instituciones:

Al Dr. José J. Galindo, Profesor Consejero, por la orientación y dirección en el desarrollo del trabajo de tesis y por la revisión crítica del manuscrito.

Al Dr. Gustavo Enríquez, por la desinteresada ayuda en la búsqueda de la beca para realizar los estudios de posgrado y al American Cocoa Research Institute por el otorgamiento de la misma.

A los miembros del Comité Consejero, doctores Carlos Ramírez y Elkin Bustamante por sus observaciones y consejos para mejorar la calidad y presentación de esta tesis.

Al Dr. Franklin Jiménez del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Costa Rica por su ayuda en la identificación sistemática de las bacterias antagonistas.

A los señores Guillermo Salazar y Fernando López y al personal de la Finca "La Lola" por la inestimable ayuda que ofrecieron en el transcurso de la presente investigación.

BIOGRAFIA

El autor nació en San José, Costa Rica el 28 de enero de 1960. Realizó sus estudios primarios en la Escuela Elías Jiménez Castro y los secundarios en el Liceo de Costa Rica.

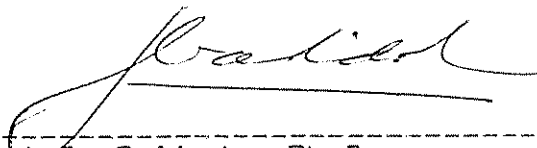
Efectuó los estudios universitarios en la Universidad de Costa Rica, donde obtuvo el grado de Licenciado en Fitotecnia en julio de 1982. Desde 1981 a 1983 realizó cursos en Medicina Veterinaria en la Universidad Nacional de Heredia.

De 1980 a 1983 cooperó con la Universidad de Costa Rica en diversos proyectos de investigación con énfasis en bacteriología.

En 1983 participó como docente de la Escuela de Ciencias Agrarias de la UNA, impartiendo los cursos de Anatomía Vegetal y Fisiología Vegetal.

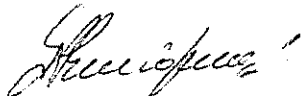
En marzo 1984 ingresó al Programa de Estudios de Posgrado de la Universidad de Costa Rica y el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza en Turrialba, Costa Rica, donde obtuvo el título de Magister Scientiae en diciembre de 1986.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica, para optar el grado de Magister Scientiae.



José J. Galindo, Ph.D.

Profesor consejero



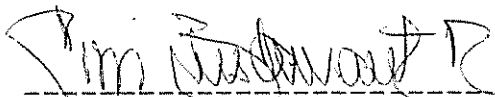
Gustavo A. Enriquez C., Ph.D.

Miembro del Comité



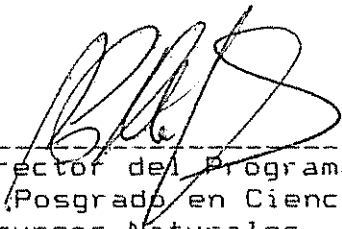
Carlos Ramírez, Ph.D.

Miembro del Comité



Elkin Bustamante, Ph.D.

Miembro del Comité



Director del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales.



Decano del Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad de Costa Rica.



José M. Jiménez M., candidato

CONTENIDO

Página

RESUMEN.....	viii
SUMMARY.....	x
LISTA DE CUADROS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	2
2.1. Etiologia.....	2
2.2. Ciclo de vida del patógeno.....	2
2.3. Epidemiologia.....	4
2.4. Combate.....	5
2.5. Combate biológico.....	7
2.6. Epifitos.....	9
2.7. Caracterización del fitoplano.....	10
a. Ambiente físico.....	10
b. Ambiente químico.....	13
2.8. Estrategias de combate biológico en el fitoplano.....	14
a. Introducción de antagonistas.....	14
b. Manipulación del ambiente.....	20
c. Combate integrado.....	21
2.9. Selección de antagonistas.....	23
2.10. Combate biológico en cacao.....	26
3. MATERIALES Y METODOS.....	28
3.1. Localización.....	28
3.2. Aislamiento de bacterias.....	31
3.3. Evaluación del antagonismo <i>in vitro</i>	31
3.4. Identificación de los aislamientos antagonistas.....	32
3.5. Prueba de acarreadores.....	33

3.6.	Prueba preliminar del antagonismo <u>in vivo</u>	33
3.7.	Evaluación <u>in vivo</u>	34
	a. Procedimiento general.....	34
	b. Tratamientos.....	35
	c. Diseño y unidad experimental.....	36
	d. Variables medias.....	36
	e. Supervivencia de la bacteria.....	37
	f. Análisis estadístico.....	38
4.	RESULTADOS.....	39
4.1.	Evaluación <u>in vitro</u>	39
4.2.	Prueba preliminar <u>in vivo</u>	42
4.3.	Clasificación.....	42
4.4.	Estudios del acarreador.....	43
4.5.	Evaluación <u>in vivo</u>	44
	a. Experimento 1.....	45
	b. Experimento 2.....	50
	c. Experimento 3.....	57
5.	DISCUSION.....	60
5.1.	Prueba <u>in vitro</u>	60
5.2.	Prueba de acarreadores.....	61
5.3.	Prueba preliminar <u>in vivo</u>	62
5.4.	Tipo de bacteria.....	63
5.5.	Mecanismo de antagonismo.....	65
5.6.	Evaluación <u>in vivo</u>	67
5.7.	Estudio poblacional de las bacterias.....	70
5.8.	Futuro del combate biológico de <u>M. roreri</u>	73
6.	CONCLUSIONES.....	76
7.	RECOMENDACIONES.....	77
8.	LITERATURA CITADA.....	78
9.	ANEXO 1.....	90
10.	ANEXO 2.....	103

JIMENEZ MORA, J.M. 1986. Combate biológico de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*) causada por *Moniliophthora roreri* mediante bacterias epifitas en la zona Atlántica de Costa Rica. Tesis. Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, Programa UCR/CATIE. 103 p.

Palabras claves: combate biológico, moniliasis, *Pseudomonas*, epifitas.

RESUMEN

En pruebas *in vitro* y de campo se determinó el potencial de cepas bacteriales aisladas de la superficie del fruto de cacao en el combate biológico de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri*.

Se encontraron tres cepas bacteriales que inhibieron el crecimiento del hongo *in vitro* aparentemente mediante la producción de sustancias antagonistas. De acuerdo con estudios taxonómicos dos de estas son: *Pseudomonas aeruginosa* y la otra *Leuconostoc mesenteroides*. Para evaluar el posible efecto de estas tres cepas se realizó una prueba preliminar en cámara húmeda utilizando mazorcas del cv 'Pound 12' e inoculada con el hongo. Dos de las cepas inhibieron el desarrollo de la enfermedad. Para la evaluación definitiva, bajo condiciones más estrictas, se realizaron tres experimentos en la Finca "La Lola", del CATIE ubicada en Matina, Limón. Se utilizaron los cultivares 'UF-29', altamente susceptible, y 'UF-296' medianamente resistente al hongo.

Con el objeto de determinar la sobrevivencia de las bacterias sobre la superficie del fruto, se utilizó una cepa resistente a estreptomycin en el cv "UF-29" y se realizaron recuentos seriados en un medio de cultivo selectivo que contenía 300 ppm de estreptomycin.

En el primer ensayo con el cv 'UF-29' (mayo-octubre) *P. aeruginosa* redujo la incidencia de la moniliasis de un 48% en el testigo con inóculo natural a un 10.7 y 7.5% con tres y seis aplicaciones de la bacteria repectivamente, comportándose estadísticamente igual a lo obtenido con la aplicación del fungicida clorotalonil (19.5 %). Cuando se aumentó la presión de inóculo, mediante la inoculación artificial del hongo, la incidencia se redujo de un 91.2% a un 6.2% cuando se aplicó la suspensión de bacterias antagonistas. En un segundo experimento con el mismo cultivar y en igualdad de tratamientos se obtuvieron básicamente similares resultados.

La aplicación de seis ciclos de aspersión con la bacteria antagonista fue suficiente para mantener una población bacteriana superior a las 10^8 bacterias/cm² de superficie de mazorca, la cual aparentemente es suficiente para obtener un buen control del hongo. La sobrevivencia estuvo correlacionada en forma negativa con la radiación y temperatura media y en forma positiva con la humedad relativa mínima y la precipitación.

Cuando se utilizó el cv 'UF-296' no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en la incidencia de la enfermedad, pero sí lo hubo en el porcentaje de mazorcas cosechadas las cuales en el testigo sólo alcanzaron el 20.9%, mientras que cuando se aplicó la bacteria 46.9% y 50.4% cuando se asperjó clorotalonil.

JIMENEZ MORA, J.M. 1986. Biological control of moniliasis of cacao (Theobroma cacao) caused by Moniliophthora roreri by means of epiphytical bacterial in the Atlantic zone of Costa Rica. Thesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, UCR/CATIE Program. 103 p.

Key words: Biological control, moniliasis, Pseudomonas, epiphytes, cacao

SUMMARY

The potential of bacterial strains isolated from the surface of the cacao fruit to control moniliasis disease, caused the fungus Moniliophthora roreri was, assessed in vitro and under field conditions.

Three bacterial strains were found inhibitory "in vitro", to the growth of the fungus. According to taxonomical studies, two of these were Pseudomonas aeruginosa and one Leuconostoc mesenteroides. In order to evaluate their possible effect on disease control a preliminary test was conducted in humid chambers; a bacterial suspension was sprayed on cacao pods of the susceptible cultivar 'Pound 12' that were also inoculated with spores of the fungus M. roreri. The P. aeruginosa strains inhibited the development of the disease. For the final evaluation under stricter conditions, three experiments were run on CATIE's experimental farm 'La Lola', Matina, Province of Limón, Costa Rica with one of P. aeruginosa isolates. The cultivars 'UF-29', susceptible and 'UF-296', resistant to the fungus, were used. In order to determine survival of the bacteria on the surface of the fruit, a streptomycine-resistant strain derivate was used on cv 'UF-29' and counts were done on a selective medium containing 300 ug/ml of streptomycin.

In the first test with cv 'UF-29' (May-October) P. aeruginosa reduced the incidence of the moniliasis caused by

natural inoculum from 48% to 10.7 and 7.5% with three and six applications of bacterial suspensions respectively; a lower value thought statistically not significant from that obtained by the application of the fungicide chlorothalonil (19.5%). When the inoculum pressure was increased by inoculating the fungus, disease incidence increased from 48% to 91.3%; nonetheless, the application of the antagonistic bacterial suspension 3 and 6 times reduced the incidence to 9.2% and 6.2% respectively. In a second experiment with the same cultivar and equal treatments, basically the same results were obtained.

Six cycles of spraying with the antagonistic bacteria was good enough to maintain a bacterial population over 10^8 bacteria/cm² on the pod surface, which apparently was sufficient to control fungal infection. Survival of the bacteria was negatively correlated to solar radiation and mean temperatures, and positively to minimum relative humidity and precipitation.

When cv 'UF-296' was used, no significant differences were found between treatments in the incidence of the disease, but this was not the case in regards to the percentage of pods harvested, in the control just 20.9%, 46.9% when the bacteria were applied and 50.4% when chlorothalonil was sprayed.

LISTA DE CUADROS

Cuadro N°		Página
1	Porcentaje de inhibición del crecimiento de <u>Moniliophthora roreri</u> por diferentes cepas de bacterias epifitas.....	40
2	Incidencia de la moniliasis causada por el hongo <u>Moniliophthora roreri</u> en frutos de cacao (<u>Theobroma cacao</u>) cv 'Pound 12' en Turrialba, Costa Rica, 1985.....	42
3	Características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas de la bacteria antagonista M-50 aislada de la superficie de mazorcas de cacao (<u>Theobroma cacao</u>) de 60 días de edad.....	43
4	Supervivencia y reproducción de <u>Pseudomonas aeruginosa</u> en turba estéril y en caldo nutritivo.....	44
5	Efecto de la aplicación de <u>Pseudomonas aeruginosa</u> y clorotalonil sobre el desarrollo de la moniliasis en frutos de cacao (<u>Theobroma cacao</u>).....	46
6	Pruebas de contrastes de los diferentes tratamientos de la aplicación de <u>Pseudomonas aeruginosa</u> y clorotalonil sobre el desarrollo de moniliasis, mazorca negra y mazorcas cosechadas de cacao.....	47
7	Correlación entre las poblaciones de <u>Pseudomonas aeruginosa</u> en la superficie de la mazorca de cacao (<u>Theobroma cacao</u>) y los factores climáticos encontrados en la finca La Lola, Matina, Provincia de Limón, Costa Rica, durante los experimentos efectuados en épocas diferentes.....	51
8	Efecto de la aplicación de <u>Pseudomonas aeruginosa</u> y clorotalonil sobre el desarrollo de la moniliasis en frutos de cacao (<u>Theobroma cacao</u>).....	54

9	Prueba de contrastes de los diferentes tratamientos de la aplicación de <u>Pseudomonas aeruginosa</u> y clorotalonil sobre el desarrollo de moniliasis, mazorca negra y mazorca cosechada de cacao.....	55
10	Efecto de la aplicación de bacterias antagonistas (<u>Pseudomonas aeruginosa</u>) y clorotalonil sobre el desarrollo de la moniliasis en frutos de cv 'UF-296' <u>Theobroma cacao</u> , a nivel de campo.....	58
Anexo 1		
1A	Datos meteorológicos promedio de varios años en la Finca La Lola, Matina, Costa Rica.....	90
2A	Datos meteorológicos en la Finca La Lola, Matina, Limón, del año 1985.....	91
3A	Resumen del Análisis de Varianza (cuadrados medios) para las variables: incidencia de moniliasis, mazorca negra y mazorcas cosechadas en el Experimento 1.....	92
4A	Fluctuación longitudinal de la población de <u>Pseudomonas aeruginosa</u> en la superficie de la mazorca del cv 'UF-29' y elementos climáticos durante el Experimento 1 (1 junio al 2 de octubre, 1985). La Lola, Matina, Limón.....	93
5A	Fluctuación longitudinal de la población de <u>Pseudomonas aeruginosa</u> en la superficie de la mazorca del cv 'UF-29' y de elementos climáticos durante el Experimento 2. (24 julio al 19 noviembre, 1985). La Lola, Matina, Limón.....	94
6A	Resumen del Análisis de Varianza (cuadrados medios) para las variables: porcentaje de mazorcas cosechadas, incidencia de moniliasis y mazorca negra en el Experimento 2.....	95
7A	Resumen del Análisis de Varianza (cuadrados medios) para las variables: porcentaje de mazorcas cosechadas, incidencia de moniliasis, de mazorca negra y marchitez fisiológica en el Experimento 3.....	96

8A	Número inicial de mazorcas, porcentaje de frutos cosechados, incidencia de moniliasis y mazorca negra por cada tratamiento en el Experimento 1 con el cv 'UF-29'.....	97
9A	Número inicial de mazorcas, porcentaje de frutos cosechados, incidencia de moniliasis y mazorca negra por cada repetición y tratamiento en el Experimento 2 con el cv 'UF-29'.....	99
10A	Número inicial de mazorcas, porcentaje de frutos cosechados, incidencia de moniliasis, mazorca negra y marchitez fisiológica por cada repetición y tratamientos en el Experimento 3 con el cv 'UF-296'.....	101

LISTA DE FIGURAS

Figura N°		Página
1	Promedio de radiación solar, precipitación, humedad relativa y temperatura en la Finca La Lola, Matina, Provincia de Limón, Costa Rica, de observaciones realizadas durante 35 años.....	29
2	Promedio de radiación, precipitación, humedad relativa y temperaturas en la Finca La Lola, Matina, Limón, Costa Rica, durante 1985.....	30
3	Porcentaje de mazorcas de cacao (<u>Theobroma cacao</u>) cv 'UF-29' con diferentes tratamientos de <u>Pseudomonas aeruginosa</u> y clorotalonil. La Lola, Matina, Limón, 1985.....	48
4	Incidencia de moniliasis en frutos de cacao (<u>Theobroma cacao</u>) cv 'UF-29' con diferentes tratamientos de <u>Pseudomonas aeruginosa</u> en La Lola, Matina, Limón, 1985.....	49
5	Estudio longitudinal de la población de la bacteria antagonista del hongo <u>Moniliophthora roreri</u> (<u>Pseudomonas aeruginosa</u>) en la superficie de mazorcas de cacao (<u>Theobroma cacao</u>) y diferentes factores climáticos durante mayo-octubre (Experimento 1), La Lola, Matina, Limón, 1985.....	52
6	Estudio longitudinal de la población de la bacteria antagonista del hongo <u>Moniliophthora roreri</u> (<u>Pseudomonas aeruginosa</u>) en la superficie de la mazorca de cacao (<u>Theobroma cacao</u>) y diferentes factores climáticos durante julio-noviembre (Experimento 2), La Lola, Matina, Limón, 1985.....	56
7	Incidencia de moniliasis, mazorca negra, marchitez fisiológica y mazorcas cosechadas de cacao (<u>Theobroma cacao</u>) cv 'UF-296' en diferentes tratamientos de <u>Pseudomonas aeruginosa</u> , La Lola, Matina, Limón, 1985.....	59

1. INTRODUCCION

La moniliasis del cacao causado por Moniliophthora roreri (Cif. & Par.) Evans et al., fue detectada en Costa Rica en 1978 en la zona Atlántica (38) y en dos años alcanzó casi todas las regiones cacaoteras del país, pasando luego a Panamá y Nicaragua (51).

La presencia de la moniliasis en los cacaotales costarricenses afectó drásticamente la producción de cacao y constituye en la actualidad el principal factor limitante del cultivo. En 1978, año en que apareció por primera vez la enfermedad, la producción alcanzó 10,400 ton, mientras en 1983 la producción fue solo de 1,840 ton (Fuente: B.C.C.R.).

Con motivo de la presencia de la moniliasis en Costa Rica, se ha generado una vasta investigación especialmente en la epidemiología de la enfermedad y en la búsqueda de material genético resistente con el fin de reducir las pérdidas causadas por la misma.

Con base en estos estudios de epidemiología, el combate ahora se realiza mediante podas sanitarias y con prácticas culturales que reducen el inóculo primario y proporcionan condiciones ambientales desfavorables para el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, dentro de un sistema de combate integrado, el uso de otras prácticas ayudarían a reducir el inóculo y a proteger la fruta de infección, disminuyendo con ello los costos del combate cultural.

El presente trabajo evaluó las posibilidades del combate biológico del hongo M. roreri mediante bacterias antagonistas.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Etiologia

El agente causal de la moniliasis fue denominado en 1933 Monilia roreri Cif. & Par. (27) en honor a J. B. Rorer, científico que a inicios del siglo realizó los primeros estudios de esta enfermedad. Según esta clasificación el hongo pertenecía a la clase Deuteromicetes y al orden Moniliales.

En 1978, Evans y colaboradores (46) recomendaron incluir el patógeno en un nuevo género: Moniliophthora. (Deuteromicetes). Para ello se basaron en estudios histológicos realizados, que mostraron la presencia de un doliporo en la septa del micelio vegetativo, y a una maduración basípeta de los conidios; características únicas de los basidiomicetes.

En 1986 en la Segunda Conferencia Internacional de Moniliasis, Purdy (94) confirma los resultados de Evans y sugiere que el hongo se siga denominando Moniliophthora roreri. Aunque todavía falta conocer la fase sexual para conocer la ubicación sistemática exacta del patógeno es reconocido en la actualidad que el hongo es un Deuteromycete y pertenece al nuevo género Moniliophthora.

2.2. Ciclo de vida del patógeno

El único órgano de la planta de cacao que aparentemente es infectado por M. roreri es la mazorca (54). La susceptibilidad del fruto depende de la edad (102, 88) y del cultivar (13, 87, 97). Las mazorcas son propensas al ataque

en cualquier edad pero su susceptibilidad decrece al madurar la mazorca (81).

El estado sexual del organismo no ha sido encontrado en el campo o producido in-vitro, solo se conoce en el estado de conidios, que constituye el único propágulo infectivo del hongo (44, 55). Las esporas sobreviven durante las estaciones secas mediante la permanencia en frutos momificados que permanecen en los árboles (45). Aquí los conidios mantienen su viabilidad por períodos de hasta nueve meses, por lo que se considera como la principal fuente de inóculo primario (44).

Según Porras (93), el proceso de germinación y penetración de los conidios es la etapa del ciclo más débil que presenta el hongo; aquí es donde el efecto de las condiciones ambientales pueden ser más detrimenales al patógeno.

Suárez (102), en condiciones naturales, determinó que los conidios germinan a las tres horas después de ser inoculados sobre mazorcas, emitiendo de uno a cinco tubos germinativos. Estos se ramifican sobre la epidermis, originando hifas infectivas muy finas que progresan oblicuamente hasta atravesar la epidermis de la mazorca, principalmente por la base de los pelos glandulares. Para que este proceso ocurra es necesario la presencia de agua libre o de un ambiente saturado de humedad en la superficie de la mazorca. Una vez que atraviesa la epidermis, el hongo emite conidióforos ramificados y conidios que se diseminan intercelularmente. Cuando el hongo ha invadido en forma intercelular un grupo de tejidos y presenta cierto desarrollo, produce nuevas hifas infectivas que penetran el interior de las células, coincidiendo esto con la aparición de los primeros síntomas (102). Luego, en poco tiempo, el hongo provoca la maceración y pudrición de los tejidos y

cuando éstos han perdido agua aparece el micelio que sale por las aperturas estomáticas y heridas de la mazorca.

Los conidios son diseminados principalmente por el viento (88), aunque también pueden ser diseminados por el agua, por animales, insectos y el hombre (56). La liberación de conidios de la superficie de mazorcas enfermas ocurre por medio de cualquier acción física ocasionada por el viento, lluvia, insectos o el movimiento de los árboles durante la labor de cosecha (56, 88).

2.3. Epidemiología

La incidencia de moniliasis fluctua en función de los factores climáticos, la presión del inóculo y el origen genético de la planta (93).

En cuanto a los parámetros climáticos, se ha encontrado correlación positiva entre la incidencia de la enfermedad y la humedad relativa (88), lo mismo que con el balance calórico (88) y con la precipitación pluvial caída dos (81) o cuatro meses (35) anteriores a la cosecha.

El proceso de liberación de esporas es favorecido por condiciones de alta temperatura (mayor de 26°C) y una humedad relativa inferior a 80% (89). Se ha determinado que los conidios pueden ser transportados por el aire a una distancia que varía de 30 a 375 metros (45,54), aunque el transporte de conidios infectivos es hasta los 30 metros.

Porras y Galindo (90), estudiando la importancia de la cantidad de inóculo en el desarrollo de la enfermedad, determinaron mediante pruebas de inoculación artificial, que la incidencia y la severidad de la enfermedad aumentan

conforme se incrementa el nivel de inóculo de 20.000 a 100.0000 conidios/ml.

2.4. Combate

La remoción semanal de frutos enfermos ha mostrado, hasta el momento, ser la forma más efectiva y económica de combatir a M. rozeri (9,55). El fin de esta práctica es inducir a reducciones cada vez más drásticas en el inóculo de la enfermedad. Los frutos eliminados se dejan en el suelo en donde por mecanismos aparentemente biológicos el hongo se inactiva (59).

Como complemento se utiliza un número de prácticas culturales con el fin de lograr la reducción de la humedad dentro la plantación con el objeto de desfavorecer el desarrollo de la enfermedad. Estas prácticas son: combate de malezas, regulación de sombra, poda y deschupón del árbol de cacao (8, 79).

El combate químico de la enfermedad es poco viable debido a la relación costo-beneficio (93). El costo del fungicida y del número excesivo de aplicaciones necesarias para lograr una cobertura adecuada de las mazorcas en los periodos de alta precipitación y rápido crecimiento (80) hacen que la vía química sea antieconómica, además se ha demostrado que no es eficaz.

Se ha demostrado (58, 82,103) que el uso de clorotalonil disminuye significativamente la incidencia de moniliasis y que aumenta en forma significativa el rendimiento, pero por la relación costo-beneficio no es aconsejable la aplicación del fungicida. Sin embargo, Murillo (82) recomienda el uso de clorotalonil y óxido cuproso en plantaciones de alta

producción en los periodos de máxima formación de frutos ya que podría aumentar en forma significativa los ingresos de la explotación.

El uso de materiales resistentes a M. royeri ha sido poco estudiado, pero diferentes autores (43, 55, 103) concuerdan en que es el método más barato para combatir la enfermedad por el agricultor.

Con la detección en 1978 de M. royeri en Costa Rica, el combate por resistencia ha tenido un fuerte impulso y gracias a investigaciones realizadas mediante inoculaciones artificiales (19, 87, 97) se ha obtenido una serie de cultivares promisorios entre los que destacan 'UF-296', 'UF-273', 'EET-75', 'EET-183', 'EET-67'. Además se ha demostrado (86) que la expresión de la resistencia en estos cultivares es sensible a factores ambientales y que puede operar diferencialmente en ciertas estaciones y localidades. Según lo anterior Porras (93) concluyó que la resistencia que presenta la especie Theobroma cacao a M. royeri es del tipo horizontal.

En la actualidad estos cultivares se están incluyendo en programas de producción de híbridos con lo cual a mediano plazo el agricultor tendrá a su disposición material tolerante a la enfermedad.

Según Galindo y Enriquez (55), el uso de cultivares resistentes a moniliasis son la base de un programa de combate integrado de la enfermedad, cuyos otros componentes serán el combate sanitario, cultural y ciertas condiciones de manejo intensivo y el combate por protección. El establecimiento de este sistema intensivo y el combate por protección en forma generalizada logrará el mejoramiento del cultivo y el aumento de ganancias por los agricultores.

2.5 Combate biológico

Se entiende por combate biológico la reducción de la cantidad de inóculo o las actividades de un patógeno tendientes a causar enfermedad, mediante la acción de uno o más organismos diferentes al hombre (29).

El objetivo del combate biológico de patógenos en plantas es la reducción de la enfermedad mediante (30):

1. Reducción del inóculo a través de la pérdida de propágulos infectivos activos entre cosechas o disminuyendo la producción de estos propágulos mediante la reducción del crecimiento micelial.
2. Reducción de la infección del hospedante por el patógeno.
3. Reducción de la severidad del ataque por el patógeno.

Los diferentes métodos de combate se pueden agrupar en tres estrategias (30): combate biológico del inóculo, protección biológica de la superficie vegetal y combate a través de la inducción de resistencia.

El primer método envuelve destruir, inhibir o evitar la formación del inóculo. El fin primordial es el control biológico de la población del patógeno. Esta estrategia puede darse sobre o en los tejidos del hospedante antes o después de la infección. Esto último puede hacerse mediante el uso de virus no virulentos o por medio del uso de hiperparásitos o colonizadores secundarios de lesiones. Comúnmente, esta estrategia es usada lejos del hospedante como una medida para destruir el inóculo primario.

Las rotaciones a largo plazo son una forma de atacar el inóculo, ya que permite la destrucción biológica del inóculo por antagonistas residentes en el suelo. También puede darse el caso de introducir antagonistas dentro del habitat del patógeno como agentes de destrucción de propágulos; ejemplo de ellos son Trichoderma, Coniiothyrium, Sporidesmium, Bacillus (30).

La protección biológica de la superficie de plantas es la estrategia más nueva y en la cual se ha logrado los resultados más exitosos mediante introducción de antagonistas. Aquí, un agresivo microorganismo coloniza la superficie de la planta antes de la llegada del patógeno o antes que se presenten las condiciones ambientales para el desarrollo de la enfermedad con lo cual interfiere con las actividades del patógeno. Ejemplos de esta estrategia son los siguientes:

- Combate de Heterobasidium annosum por aplicación en cortes frescos de pino con Peniophora gigantea (95).
- Combate de Mycena centricolor mediante Trichoderma harzianum (110).
- Combate de Agrobacterium tumefaciens mediante una raza no virulenta de la misma bacteria (30).
- Combate de Pseudomonas syringae que promueven el congelamiento mediante Erwinia herbicola (78).
- Biocontrol de Gaeumannomyces graminis y Pythium en trigo mediante P. fluorecens que coloniza la raíz (6, 29, 30).

La tercera estrategia tiene que ver con el papel que juega el hospedante en el desarrollo de la enfermedad. Es usada contra virus y patógenos vasculares. La metodología del combate consiste en introducir a la planta razas avirulentas del patógeno que inducen al hospedero a desarrollar resistencia al ataque del patógeno. Un ejemplo típico, es el éxito logrado con inoculaciones de razas avirulentas del virus de la tristeza de los cítricos que protege a los árboles al ataque de las razas más severas de dicho virus (31).

2.6. Epífitos

Se entiende por microorganismos epífitos aquellos miembros de microflora que son observados sobre o son cultivados de la superficie vegetal. Al actuar esta superficie como hábitat ha sido llamada aerosfera (62), fitosfera (33, 72) o fitoplano. El término filosfera (69, 96) fue usada al principio como el ambiente alrededor de la hoja, pero en la actualidad se ha generalizado para cualquier órgano aéreo vegetal.

La población de microorganismos en el fitoplano es alta, alcanzando un espesor de 22 μm en la superficie de plantas tropicales (29) y ha sido estimada en millones de células por gramo de tejido (33).

Baker y Cook (6) dividen en dos grupos la flora epífita: los residentes y los casuales. Los primeros son los microorganismos que se multiplican sobre la superficies vegetales sin causar daño alguno a la planta, mientras que los segundos están en el fitoplano en forma pasiva, son incapaces de reproducirse en este ambiente debido a características genéticas o a la presencia de residuos extraños en el fitoplano.

Los microorganismos residentes son por lo general no específicos y ocurren en una gran cantidad de especies. Los principales componentes de esta flora lo constituyen las bacterias, levaduras y hongos filamentosos (29). Dentro de las bacterias destacan las gram negativas pigmentadas que incluyen los géneros Erwinia, Pseudomonas y Xanthomonas (16).

Las bacterias son más abundantes en las etapas iniciales de crecimiento (17), en tanto que las poblaciones de levaduras tiende a aumentar a partir de las etapas intermedias del crecimiento (69). Dentro de las levaduras destacan las familias Cryptococcaceae y Sporobolomycetaceae (17). Por otra parte, los hongos epifitos permanecen latentes en el fitoplano esperando el inicio de la senescencia para germinar y colonizar el hábitat aéreo (17), tales como Alternaria, Cladosporium y Epicoccum (6).

2.7 Caracterización del fitoplano

a. Ambiente físico

El ambiente en la superficie de órganos aéreos es muy diferente a la rizosfera. La temperatura y la humedad en el fitoplano fluctúan en un mayor grado y a una mayor velocidad que en la rizosfera. Asimismo, los colonizadores del fitoplano están expuestos a la luz solar, a la radiación ultravioleta y están propensos a ser removidos del nicho mediante la acción de la lluvia o del viento (6), características físicas que no se presentan o son mínimas en la rizosfera.

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

En cultivos de dosel alto tal como cacao, la radiación absorbida por los órganos vegetales de las partes superiores reducen la cantidad de energía recibida por los órganos localizados en estratos inferiores. La reducción depende principalmente de la configuración del follaje, del área y del ángulo de las hojas.

En la noche la planta pierde o gana radiación de acuerdo con la presencia de nubosidad en la atmósfera. En una noche clara la planta irradia la energía capturada en el día ocasionando que las superficies vegetales sean más frías que el aire circundante. Mientras en una noche oscura hay una pequeña ganancia de energía con lo cual la temperatura de la superficie es superior al aire (22).

Alvim (2), al investigar el microclima en plantaciones de cacao híbrido de ocho años de edad en dos densidades diferentes, determinó que la radiación es interceptada en un 90-97% siendo el coeficiente de extinción de 0,62 a una densidad de 2 x 2 m y 0,57 a una densidad de 3 x 3 m. Además determinó que el ángulo foliar varía con la altura del follaje, a alturas superiores de 3,5 m el ángulo promedio fue de $42,6 \pm 18^\circ$, entre 2,5 - 3,5 m fue de $32,5^\circ \pm 15^\circ$ y abajo de 2,5 fue de $26,2 \pm 3^\circ$. Con base en estas mediciones y el índice de área foliar (LAI) Alvim (2) determinó que, a dos metros sobre la superficie del suelo, la cantidad de radiación recibida era apenas un 5-10% de la radiación total

que estaba incidiendo sobre la plantación de cacao híbrido. Con estos resultados, se demostró que el microclima dentro del follaje es estable y muy adecuado para el crecimiento de microorganismos.

La humedad relativa (H.R.) en el fitoplaneo es el factor más importante sobre el crecimiento y la sobrevivencia 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 soportar el crecimiento de la mayoría de microorganismos, la superficie vegetal debe estar húmeda o con una H. R. superior al 95 por ciento. 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 está cerca de la saturación (17).

Durante el día, el perfil de presión de vapor muestra un decrecimiento con la altura con respecto al nivel de suelo, indicando una pérdida de agua del suelo y del follaje. Por la noche el gradiente se ve reducido y en ocasiones de alta nubosidad, la pérdida de presión de vapor dentro del follaje es cerca de la superficie del suelo, indicando un movimiento general de vapor dentro del cultivo (22).

La velocidad del viento cerca de la superficie del dosel generalmente sigue un perfil logarítmico con la altura. Dentro del follaje la velocidad sigue el mismo perfil, pero en menor magnitud debido a la presencia de centros de dispersión gobernados por la distribución de los órganos vegetales dentro del dosel (22).

b. Ambiente químico

Los microorganismos epifitos colonizan el fitoplano gracias a la acumulación de sustancias inorgánicas y orgánicas en el agua que está en contacto con la superficie vegetal. Algunas de estas sustancias se originan externamente como depósitos de la atmósfera tales como partículas minerales, granos de polen y polvo. No obstante la mayor proporción se origina dentro de la planta que por un proceso de difusión a través de los tejidos al fitoplano donde hacen contacto con el agua (57). Dentro de las sustancias en difusión existen componentes que actúan como nutrimentos para los epifitos pero, al mismo tiempo, existen sustancias que inhiben la germinación o el crecimiento de estos colonizadores (14).

En las etapas iniciales de crecimiento, la única fuente de nutrición son los productos que se difunden de los tejidos. Las sustancias difundidas (azúcares y aminoácidos) y por ende las cantidades de carbono y nitrógeno son muy bajas, lo cual se refleja en la poca población microbial 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 inhibitoras de crecimiento tales como fenoles y terpenoides (17).

Con el sucesivo crecimiento de los tejidos, la microflora va aumentando progresivamente debido a la llegada de materia orgánica foránea, tales como polen y miel de áfidos. Al llegar estas sustancias al fitoplano, las bacterias van perdiendo su hegemonía, cediendo ante la proliferación de levaduras y hongos. Las levaduras, según diferentes autores (28,70), dominan el fitoplano, 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.

2.8. Estrategias de combate biológico en el fitoplano

El combate biológico en el fitoplano ha sido enfocado bajo dos estrategias, la primera que trata sobre la introducción de un microorganismo antagonista en la superficie vegetal capaz de multiplicarse y colonizar el fitoplano. Y la segunda, que consiste en la manipulación del micro-ambiente ya sea físico o nutricional (18).

a. Introducción de antagonistas

Debido a que la estrategia 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 totalmente adaptados a sobrevivir y reproducirse en el fitoplano 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.

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

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 fitoplano. A pesar de las ventajas que

ofrecen las bacterias, se han obtenido datos contradictorios (67) al llevar a la posible bacteria antagonista a prueba de campo debido a que las bacterias no soportan por períodos largos la exposición a alta radiación solar (70) o una condición de baja humedad relativa (73,74).

Lindow (76, 77) demostró que P. fluorescens, aislada de hojas de papa, inhibe tanto in vitro como in vivo la acción de P. syringae y E. herbicola, las cuales, en condiciones de bajas temperaturas, se cristalizan ocasionando daños severos al cultivo. Este tipo de bacterias fue tan efectivo en reducir el "daño del frío" en la papa como el uso de bactericidas o inhibidores de la cristalización.

Otro ejemplo de antagonismo bacteria-bacteria, es el control del daño que ocasiona E. amylovora en los botones florales del manzano. Se ha demostrado (11, 60) que aplicaciones tempranas de razas avirulentas de la misma especie reducen significativamente el ataque de razas virulentas, explicándose el mecanismo mediante producción de bacteriocina (11) y por competencia de nutrimentos (60).

Leben (70, 72, 73) 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 antibiosis. Sin embargo, el combate biológico fracasó en el campo (72) debido a que la baja humedad relativa y la luz solar causaron una rápida pérdida de viabilidad de las células bacteriales aplicadas.

Swinburne (104) aisló Bacillus subtilis de la axila de hojas de manzana; en pruebas in vitro (97) e in vivo (105) esta bacteria mostró un alto antagonismo a Nectria galligena,

patógeno que causa el cáncer del tallo, él cual penetra por las cicatrices que quedan en el tallo al caer la hoja en otoño. La prueba in vivo se realizó mediante suspensiones de esporas y células vegetativas (10^{10} UCB*/ml) de la bacteria a las cicatrices foliares. 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 las caídas 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 con una sola aplicación.

Aunque se ha dado gran énfasis al uso de bacterias epifitas residentes en combate biológico, también se tienen investigaciones con buenos resultados mediante el uso de levadura y hongos epífitos (12, 37, 50, 112).

En fresa (12) se ha demostrado 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 de 20,4 a 26,7 ton/ha. La pudrición de frutas maduras no se redujo con la aplicación del hongo antagonista, el aumento de la producción se explicó con base en la baja incidencia de Botrytis en frutos verdes.

Fokkema y Lorbeer (506) 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 A. porri y B. 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

*Células bacteriales capaces de formar una colonia

competencia de carbohidratos y aminoácidos que ocurre en el fitoplano.

Warren (112), en estudios sobre la interacción de Phoma betae con la micoflora de la hoja de remolacha azucarera, observó que cuando se inoculaba el patógeno junto con Aerubasidium pullulans o con Torulopsis candida, la infección se reducía de un 100 a un 10 por ciento. Además, se demostró mediante estudios con granos de polen, que el efecto de éstos hongos era aparentemente mediado por una alta competencia por nutrimentos que restringían el desarrollo superficial de P. betae y por ende de la infección.

El uso de la micoflora epífita en combate biológico se restringe a patógenos necrotróficos que presentan algún crecimiento superficial antes de la penetración (34,51,52). Según Blakkeman y Fokkema (16), la estrategia de usar este tipo de organismos es viable cuando se protegen órganos vegetales donde la colonización natural es retardada y donde abundan los nutrimentos tales como en frutos y flores.

A pesar de lo anterior, el ejemplo más exitoso debido a su gran uso en escala comercial, comprende un hongo que es un típico epífita en pino: Peniophora gigantea (95). 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 el retoñamiento de nuevos hijos. La estrategia de combate se fundamenta en introducir en los cortes frescos a un patógeno débil (P. gigantea) que no causa daño al árbol sano y que tiene la capacidad de colonizar rápidamente el corte debido a que es muy profílico y a que está relativamente solo en el nicho. El mecanismo de acción es competencia por espacio. En Inglaterra, hasta el año 1973, se habían tratado con este hongo 62.000 ha. En la actualidad su uso está muy difundido en Canadá y Finlandia (5). El hongo se distribuye en envases

de 1 ml que contienen una suspensión de 5×10^6 esporas/ml; este volumen se diluye en 5 litros de agua, más 5 g de tinta y se aplica con un cepillo. Con una ampolla se pueden tratar 100 cortes, saliendo a un costo de \$0.02 por corte, igual que el costo químico (29).

Aunque el uso de microorganismos epífitos es lo más recomendable en el combate de patógenos de órganos vegetales aéreos, existen algunos trabajos (16, 40, 107, 108, 110) 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 fitoplano.

Spurr, citado por Blakeman y Fokkema (16) 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: P. cepacia aislada de conidios de Bipolaris maydis; Bacillus mycoides aislado del suelo y B. 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 las bacterias para supervivir en la superficie foliar dentro de diferentes condiciones.

Por otra parte Thompson et al. (107) demostró el antagonismo de diferentes Pseudomonas hacia E. 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.

En cuanto a hongos no epífitos, Trichoderma sp. es el representante más exitoso. Se ha encontrado una alta efectividad para combatir B. cinerea en manzano (108, 109), en fresa (16) y en uva (40). Además se ha observado su utilidad en combatir M. centricolor (110).

Gracias a observaciones del antagonismo en el campo de Trichoderma sp. sobre B. cinerea en manzanas caídas por el viento, Trosno y Dennis (108) determinaron cepas del género que crecían y efectuaban un buen control del patógeno en temperaturas inferiores de 10° C, que son normales de encontrar en condiciones naturales. Con la cepa que se comportó mejor en estas condiciones (T. harzianum), Trosno e Ystass (111) realizaron aspersiones de conidios con 0,1% extracto de malta a una frecuencia semejante que la aplicación corriente de fungicidas, observándose la gran eficacia del combate en campo, el cual se explicó con base en el crecimiento del hongo en el fruto y el alto grado de antibiosis hacia B. cinerea.

Dubos (40) en estudios realizados durante cinco años consecutivos en viñedos franceses observó que cuatro aplicaciones de T. viride a una concentración de 10⁹ conidios/ml, desde el comienzo de floración hasta tres semanas antes de cosecha redujeron significativamente el porcentaje de uva infectada (del 93 al 70%) y el porcentaje de uva podrida (32 al 9%). El autor consideró que la acción del hongo consiste en colonizar residuos vegetales tales como flores que sirven de alimento básico para las infecciones de B. cinerea.

b. Manipulación del ambiente

Esta estrategia se basa en variar las condiciones físicas y nutricionales del fitoplano tratando de perjudicar la germinación y desarrollo del patógeno y/o favorecer la proliferación de antagonistas.

La alteración del microclima en la superficie vegetal no tiene mucha aceptación dentro de la estrategia de combate biológico de fitopatógenos aunque se han obtenido éxitos relativos con el "mildiu" polvoso en condiciones de humedad o de agua libre en el fitoplano que favorece la proliferación de antagonistas reduciendo el efecto del patógeno. Sin embargo en ciertas condiciones, este aumento de la humedad relativa trae consigo severos ataques de patógenos necrotróficos y de royas (16).

La alteración del ecosistema nutricional ha mostrado ser exitoso en el combate de bacterias (81) y en hongos necrotróficos (13,14). 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 antagonismo o del patógeno.

Morris y Rousse (81), trabajando en el combate de P. 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 (16), observaron que una aspersión de urea sobre árboles de manzanas, antes de la caída de hojas, previno la formación de Venturia inaequalis. El efecto fue debido a la alteración del balance de la microflora, pues el desarrollo de P. fluorecens fue aparentemente a expensas de bacterias gram positivas.

c. Combate integrado

Es factible unir el combate químico y biológico de un patógeno gracias a que el agente químico no tiene efecto sobre el biológico, con lo cual se ahorra dinero al reducirse el número de aplicaciones de químicos y se logra un combate más eficaz que cuando se aplica solo una estrategia. También al integrar los métodos de combate, hay una reducción sustancial en la contaminación ambiental.

La aplicación de químicos en el fitoplasma puede reducir o fomentar las poblaciones de microorganismos epífitos (63). El uso en gran escala de benzimidazoles ha ocasionado el aumento de la incidencia de enfermedades causadas por patógenos que pertenecen a los ficomicetes o a géneros tales como Cochliobolus y Alternaria, los cuales no son sensibles a la acción del fungicida (51). La microflora saprofítica sobre flores de tomate y fresa que controla las infecciones de B. cinerea son severamente reducidos con la aplicación de Ferbam, Thiram o Captan (12). Asimismo, se ha determinado que los hongos epífitos son eliminados por fungicidas de amplio espectro tales como ditiocarbamatos (16) dándose un aumento de bacterias epífitas con gran resistencia hacia estos fungicidas.

Sandheim y Amoundsen, citados por Blakeman y Fokkema (16), desarrollaron un combate integrado para "mildiu"

polvoso usando el hiperparásito Ampelomyces quisqualis y fungicidas. El método utilizable en invernaderos donde se mantiene alta humedad, el crecimiento del hongo se reduce con la aplicación de triforina, al cual es insensible el hiperparásito. Cuando se usa en combinaciones con el agente biológico se reduce la tasa de aplicación, manteniéndose el control semejante a las aplicaciones normales de fungicida.

Lindow (78) estableció un combate integrado a la quema del peral causada por E. amylovora y a las pérdidas ocasionadas por el congelamiento de bacterias a temperaturas superiores a 0 °C tales como P. syringae, E. herbicola y P. fluorescens. Estas enfermedades aparecen luego que significativas poblaciones bacteriales colonizan el fitoplano. El combate integrado se logró mediante cepas de E. amylovora no virulentas, las cuales fueron aplicadas al inicio de 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 fitoplano, 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 el ciclo del cultivo.

Vargas (110) determinó que T. harzianum más oxiclóruo de cobre fue una alternativa viable y eficaz para combatir M. centricolor 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 y total de cabecitas debido a que se dió 8,6 cabecitas en solo 7,3 lesiones por bandola,

mientras que el testigo alcanzó 202,8 cabecitas en 31,6 lesiones. El fungicida o 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.

2.9 Selección de antagonistas

Para seleccionar antagonistas no existe una metodología definida o preestablecida, sino por el contrario, existe una gran diversidad en cuanto a los métodos de aislamiento, y de selección del antagonista buscado.

A pesar de lo anterior, con base en diferentes investigaciones de combate biológico que han conducido a identificar y demostrar la efectividad de antagonistas a fitopatógenos (4, 16, 17), existen normas que garantizan cierta probabilidad de éxito en la determinación de un antagonista eficiente para el patógeno en estudio.

Según Blakeman y Fokkeman (16), el sitio de selección de antagonistas deben 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.

Luego de la selección del lugar, se da la interrogante si aislar especies representativas de la comunidad microbiana o por el contrario, aislar microorganismos con requerimientos nutricionales o ambientales específicos. Según Andrews (4), la primera opción es la más aconsejable, por lo cual deben usarse medios de aislamiento generales para hongos, bacterias y levaduras. Algunos investigadores (4, 62) para evitar

trabajar con un gran número de microorganismos hacen preselección antes de comprobar su antagonismo; esta preselección se debe hacer preferentemente cuando se tienen los siguientes antecedentes:

a. El microorganismo está presente en el fitoplasma donde el control debería aplicarse.

b. Presenta alta estabilidad y gran capacidad de crecimiento y esporulación in vitro.

c. Se trata de microorganismos que son miembros de especies o géneros conocidos por su capacidad antagonista.

d. Se trata de microorganismos que por sus características morfológicas y fisiológicas pueden establecerse o sobrevivir dentro de diferentes condiciones.

Para que el antagonista realice un efectivo biocontrol no solo debe supervivir en el nicho del patógeno, sino también ejercer su carácter antagónico en el hábitat. Estas propiedades se reducen dentro de los métodos de selección que evidencian la interferencia con el patógeno (16), o que reduzca la enfermedad. La interferencia implica alguna forma de inactivación y puede ser evaluada a nivel de laboratorio o en la superficie vegetal mediante impresiones usando acetato de celulosa (38). La reducción de la enfermedad puede ser medida mediante incidencia o severidad, evaluándose primero en condiciones controladas y luego en condiciones de campo.

Para la selección de individuos in vitro, dos procedimientos son usados:

a. El cultivo en agar del patógeno y el posible antagonista en un mismo plato Petri. Esto permite detectar zonas de inhibición.

b. Observaciones microscópicas del desarrollo del patógeno en presencia del antagonista sobre "láminas" de agar (3,48).

Las pruebas en agar da información sobre el mecanismo de interacción entre el patógeno y antagonista (producción de antibióticos o parasitismo). En esta fase no hay que descartar los organismos que no producen zonas de inhibición debido a que la prueba no determina competencia por nutrientes. 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. (16).

Las pruebas de antagonismo sobre superficie vegetales creciendo dentro de condiciones controladas son las "pruebas maestras" en la selección de agentes antagonistas. Los microorganismos que no inhiben al patógeno en agar pueden ser detectados por este método. Inversamente algunos candidatos pueden ser eliminados de pruebas futuras si no actúan sobre estas superficies vegetales caracterizadas por estar libres de competidores (4, 51).

Las pruebas in vivo bajo condiciones controladas se caracterizan por un control estricto de las condiciones tanto ambientales como genéticas y por el seguimiento de la población del antagonista en el fitoplano. Los primeros signos de un efecto antagonista se observan cuando las poblaciones alcanzan 1×10^4 células de levadura o 1×10^5 UCB/cm² en el momento que se va a dar la infección (4). Esto normalmente se logra cuando el antagonista es aplicado algunos días antes que el patógeno. Esta prueba no debe considerarse como la definitiva, ya que no contempla la

microbiana ni las condiciones ambientales normales del cultivo bajo condiciones de campo.

En la última prueba, del proceso de selección, se trata de conocer el comportamiento del posible antagonista cuando se introduce en la comunidad microbiana natural, donde está sujeto a cambios en las condiciones ambientales.

El experimento 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, asimismo, se debe determinar la microflora tanto del testigo como de los tratamientos biológicos (4). Por otra parte, y debido a la alta variabilidad de las condiciones ambientales, es necesario repetir la evaluación por diversas épocas y localidades antes de dar una decisión final.

Los antagonistas que fracasan en esta prueba final necesariamente 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, adherentes, etc. Si después de agregar estas "ayudas" no hay efecto positivo, el antagonista es aún de valor ya que puede actuar como suplidor de genes a residentes de alta colonización que no presentan las características de antagonismo (4).

2.10. Combate biológico en cacao

Existe poca investigación sobre el combate biológico de enfermedades de órganos aéreos en cacao. La literatura cita organismos antagónicos contra Crinipellis perniciosa (10), Phytophthora palmivora (7, 48, 49) y contra M. roreri (18).

De los diferentes organismos antagónicos solo Cladobotryum amazonense, hiperparásito de Crinepellis, es epifito de cacao.

De estos estudios de biocontrol, solamente con mazorca negra (7,83) y moniliasis (18) se han llevado a cabo experimentos in vivo, en donde el ambiente ha sido controlado. Odijie e Ikotun (83) demostraron que aspersiones de B. subtilis y B. cereus sobre mazorcas de cacao a una concentración de 10^6 UCB/ml previenen el desarrollo de mazorca negra; la inoculación se hizo con discos de micelio con heridas de la mazorca. Por otra parte Bailey y Espinoza (7) en México, determinaron in vitro el efecto antagónico de 15 organismos destacándose Aspergillus terreus, A. flavipes y A. flavus - oryzae. Cuando estos hongos se llevaron a prueba in vivo, usando como fuente de inóculo zoósporas, no pudieron inhibir la infección de P. palmivora. Se explicó el fracaso a la baja persistencia de los antagonistas en el fitoplano.

En lo que se refiere a moniliasis, Bravo y Victoria (18) demostraron la posibilidad del combate biológico por medio de la técnica de inocular mazorcas del cv 'SCA-6' con cepas bacteriales no epifitas y suspensión de conidias del hongo en cámara húmeda. Ellos encontraron en los tratamientos en los cuales el tiempo entre la aplicación de la suspensión bacteriana y la siembra del hongo era más largo, ocurría la menor incidencia de la enfermedad, siendo el mejor tratamiento la aplicación de las bacterias (1.10^8 UCB/ml) 15 días antes de la inoculación de M. rozeri. Estos autores concluyeron que la aplicación de antagonistas (posiblemente del género Bacillus sp.) a la mazorca en forma preventiva constituye una buena alternativa para el combate de M. rozeri.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio y en el campo; la parte in vitro se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Producción Vegetal del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) y en el Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica (CIA-UCR).

Las pruebas in vivo se localizaron en la Finca Experimental "La Lola" del CATIE, en el Distrito de Bataan, Cantón Matina, Provincia de Limón, a 83° 25' de longitud Oeste y 10° 06' de latitud Norte, a una altitud de 40 msnm. La zona pertenece al bosque tropical húmedo, transición a muy húmedo, según la clasificación de zonas de vida de Holdrige (64).

Según Jiménez (66), el clima de "La Lola" se puede definir como cálido, muy lluvioso, con una época seca definida, de humedad relativa alta, bastante nubosidad, pocas horas de brillo solar, y con exceso de agua la mayor parte del año. La precipitación promedio anual es de 3.534 mm, la temperatura media máxima y mínima son de 29,9°C y 20,3°C y la humedad relativa media general y mínima de 85,7 y 60,8% respectivamente. En la Figura 1 se resumen los datos climatológicos de los últimos 35 años y en la Figura 2 los elementos de 1985.

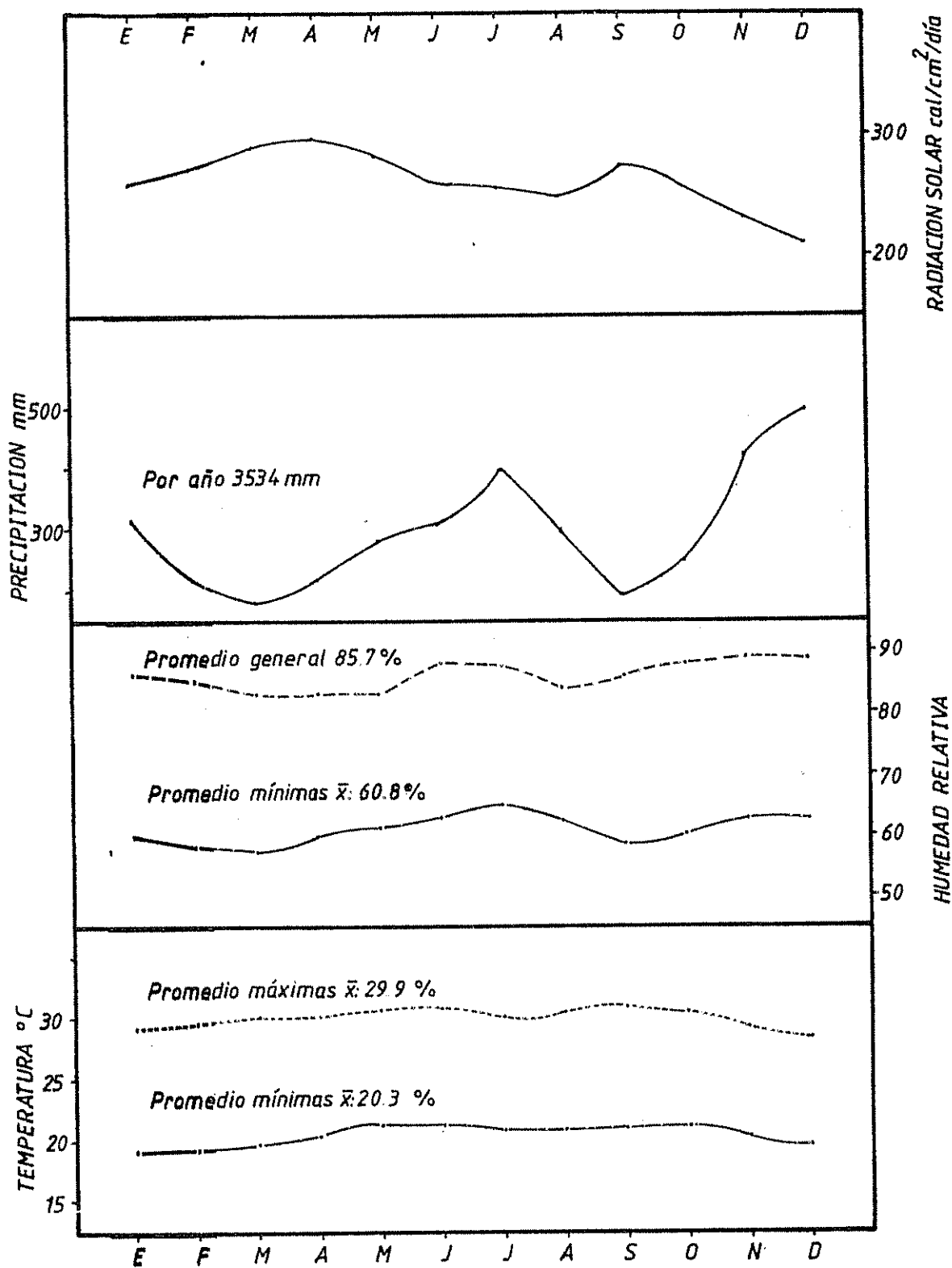


Figura 1. Promedio de radiación solar, precipitación, humedad relativa y temperatura en la Finca La Lota, Matina, Provincia de Limón, Costa Rica, de observaciones realizadas durante 35 años.

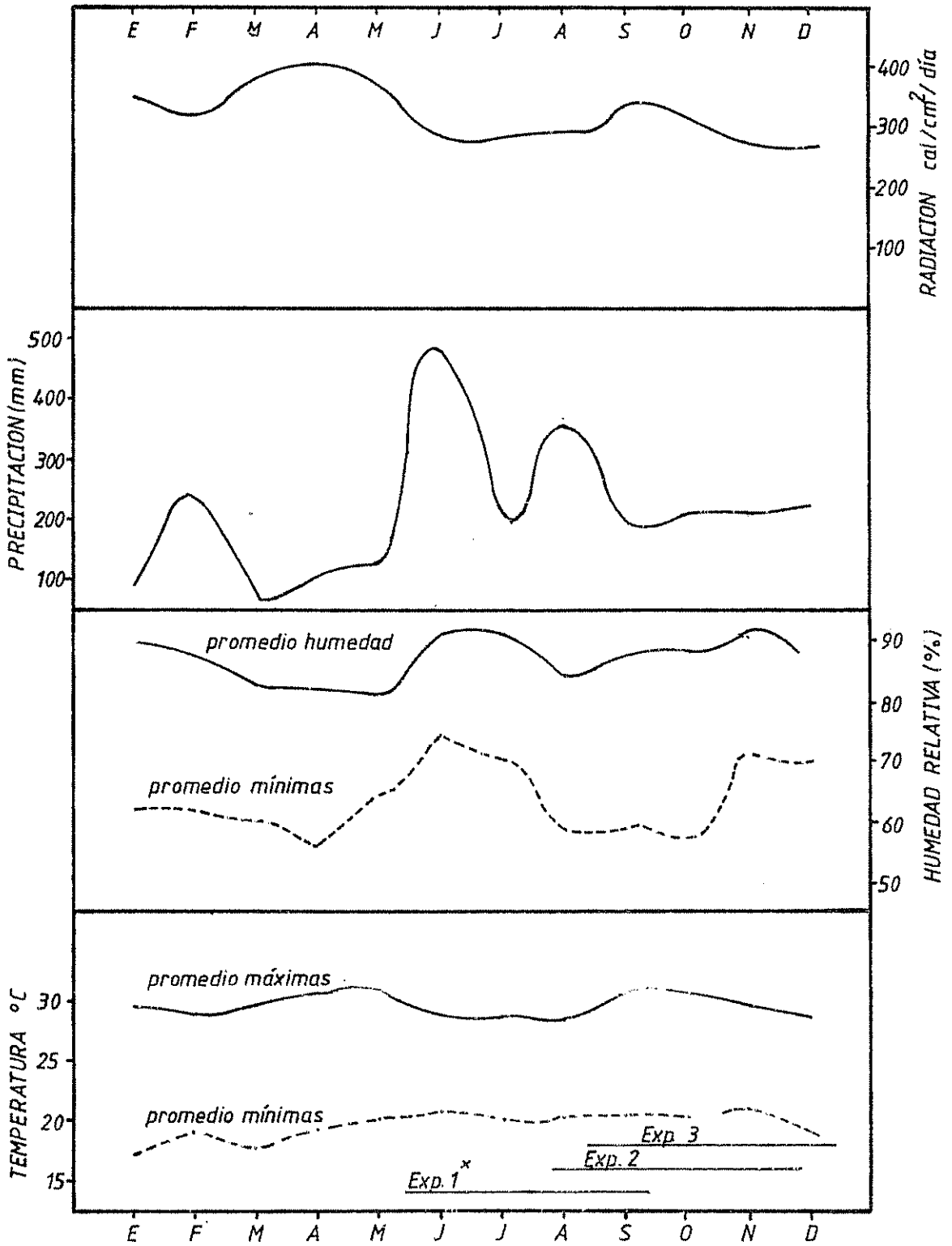


Figura 2. Promedio de radiación, precipitación, humedad relativa y temperaturas en La Lola, Matina, Limón, Costa Rica, durante 1985

* Período de tiempo que comprendieron los tres experimentos de campo realizados

3.2. Aislamiento de bacterias

Las posibles bacterias antagonistas fueron aisladas en cacaotales abandonados ubicados en el cantón de Matina, Limón, donde había una alta presión de inóculo del hongo. Para tal efecto, la superficie de mazorcas de cacao de 50 a 100 días que no presentaban síntomas visibles de moniliasis fueron lavadas, utilizando un atomizador DeVilbis No. 15 y una solución de peptona dextrosa-Na Cl estéril (0.1-0.1-0.85%), la cual se recogió. Seguidamente mediante la técnica de dilución (111) y rayados en agar-nutriente (AN), (anexo 2), se seleccionaron y purificaron las cepas bacteriales. Seguidamente se transfirieron a tubos de 16 x 25 mm con tapa de rosca con AN inclinado. Estos sirvieron de fuente de inóculo para pruebas sucesivas. Se hicieron repiques mensuales y los tubos se conservaron en el refrigerador a 10°C. Luego las cepas más promisorias se liofilizaron en el Laboratorio del Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica, San José, (CIA).

3.3. Evaluación del antagonismo in vitro

Se inocularon las posibles bacterias antagonistas por estría al centro de platos de Petri que contenían 25 ml agar-avena modificado (AA), (ver anexo 2). Seguidamente se transfirieron discos del hongo obtenidos con sacabocados de 10 mm de diámetro a partir de aislamientos recientes del hongo obtenidos de la Finca La Lola y crecidos a 25°C e incubados por 12 días, los cuales se colocaron a 2.5 cm del centro del plato y en posición opuesta.

El efecto antagonista se evaluó a los 12 días midiendo la distancia de separación de los crecimientos radiales del micelio a partir de los discos del hongo sembrados al mismo tiempo que la bacteria. Este crecimiento se comparó con el

testigo absoluto cultivado en ausencia de la bacteria. Con base en este parámetro se obtuvo el porcentaje de inhibición para cada cepa bacteriana mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(5 - X_1)}{5 - X_2} \cdot 100$$

X_1 = distancia (cm) de separación de los discos de crecimiento del hongo en presencia de las bacterias.

X_2 = distancia (cm) de separación de los discos de crecimiento del hongo en ausencia de bacterias.

Se hizo cuatro repeticiones por aislamiento bacteriano, considerándose como bacteria antagonista aquella que inhibiera en un 90% el crecimiento micelial del hongo.

3.4. Identificación de los aislamientos antagonistas

Los aislamientos que mostraron efecto antagonista fueron sometidos a diferentes pruebas de tipo morfológicas, bioquímicas, fisiológicas, en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Microbiología de la UCR. Se realizaron las siguientes pruebas: tinción de gram, motilidad, flagelos, catalasa, oxidasa, deshidrogenasa de la arginina, hidrólisis de la gelatina y el almidón, crecimiento a 42°C, utilización de glucosa y trehalosa y la prueba de desnitrificación (47, 111).

La posición taxonómica de las bacterias se logró determinar con la ayuda del manual Bergey de nomenclatura y clasificación. (21).

3.5. Prueba de acarreadores

Se escogió suelo de turba proveniente de la zona de Los Chiles, Upala, Costa Rica como acarreador debido a los excelentes resultados obtenidos con bacterias del género Rhizobium sp. (75).

Se prepararon 20 bolsas plásticas de 10 x 15 cm con 10 g de turba previamente autoclavada a 121°C durante 15 minutos. A cada bolsa se le agregó 5 ml de una solución de bacteria antagonista (M-50) con una concentración de 7×10^9 UCB/ml. Las bolsas fueron selladas con cinta plástica; como testigo sirvieron 20 tubos de rosca que contenían 5 ml de caldo nutritivo (ver anexo 2) que fueron inoculados con 5 ml de la solución concentrada de la bacteria antagonista. Cada tres días durante un mes se tomaron dos tubos y dos bolsas con inóculo y, por medio de la técnica de dilución (47) y cultivo por 48 h en AN, se obtuvo la población bacteriana en ese momento.

3.6. Prueba preliminar del antagonismo in vivo

En los meses de marzo-abril de 1985 se realizó una prueba preliminar con el cv 'Pound 12' de la Colección del CATIE, Turrialba; el objetivo fue determinar la estabilidad y efectividad del carácter antagonista de las bacterias seleccionadas de acuerdo con las pruebas in vitro.

Se utilizó este cultivar debido a que presentaba en ese momento la mayor cantidad de fruta con una edad de 60-70 días y a que es altamente susceptible a M. royeri (97). Las características de este cv son: fruto inmaduro de color verde, de forma amelonada y con rugosidad ligera, es amazónico seleccionado en Perú (41), resistente a

Ceratocystis fimbriata pero susceptible a P. palmivora y a C. pernicioso (19,97).

3.7. Evaluación in vivo

Se trabajó con dos cultivares, uno resistente y el otro susceptible a M. roreri. El susceptible fue el cv 'UF-29' de 15 años de edad, cuyas características son: fruto inmaduro de color verde, tamaño mediano de forma amelonada, cáscara con pocas rugosidades y de mediano grosor, resistente a P. palmivora y a C. fimbriata pero susceptible a C. pernicioso (97).

El cv resistente lo constituyó el 'UF-296' de ocho años de edad, las características de este cv son: origen trinitario, seleccionado en Costa Rica, de fruto inmaduro de color rojo, amelonado y con ligeras rugosidades, resistente a M. roreri (19, 93) y a C. fimbriata (97) pero susceptible a P. palmivora (97).

Con el cv 'UF-29' se realizaron los dos primeros experimentos; el primero se inició el 1 de junio concluyendo el 2 de octubre, 1985. El segundo experimento comenzó el 24 de julio terminando el 19 de noviembre del mismo año. Mientras tanto con el cv 'UF-296' se realizó el experimento No. 3 el cual se inició el 27 de agosto y concluyó el 19 de diciembre de 1985. Todos se realizaron en la Finca La Lola.

a. Procedimiento general

Para la obtención de frutos uniformes se realizó una polinización manual 15-22 días antes de iniciar cada uno de los experimentos; se polinizó hasta una altura de 2 m para

que los frutos quedaran fácilmente al alcance de la bomba de aspersión. Los frutos que estuvieron a mayor altura se eliminaron y como práctica sanitaria se removieron semanalmente los frutos de moniliasis y mazorca negra de los árboles que no estaban en el experimento, pero que se encontraban dentro del lote experimental, así como la remoción de frutos formados posteriormente a la polinización.

b. Tratamientos

Los tratamientos que se evaluaron en el cv 'UF-29' fueron los siguientes:

- T1. Testigo sin inocular (infección por inóculo natural de M. roseri).
- T2. Testigo inoculado artificialmente con M. roseri.
- T3. Cepa M-50 aplicada seis veces + inóculo artificial de M. roseri.
- T4. Clorotalonil aplicado seis veces (3,0 g IA/l)**
- T5. Cepa M-50 aplicada seis veces (10^7 UCB/ml).
- T6. Cepa M-50 aplicada tres veces.

Para el cv 'UF-296' por falta de frutos se redujeron los tratamientos en un 50%:

- a. Testigo (bajo presión natural de inóculo)
- b. Aplicación de clorotalonil seis veces (3.0 g IA/l)
- c. Aplicación de cepa M-50 seis veces (10^7 UCB/ml).

La aplicación del clorotalonil y la bacteria se iniciaron cuando las mazorcas tenían entre 15-22 días de edad. El intervalo de aplicación fue de dos semanas en los tratamientos en que se aplicaron seis veces. En aquellos

**Ingrediente activo por litro

tratamientos en donde la bacteria se aplicó únicamente en tres ocasiones, el intervalo se alargó a tres semanas. Para las aplicaciones se usó una aspersora de espalda de presión normal, marca Carpi, la aplicación fue dirigida hasta el punto de escurrimiento.

Para preparar la suspensión de bacterias, se suspendió 50 g de turba, previamente inoculada e incubada por ocho días con la cepa antagonista en el laboratorio, en 15 litros de agua, la concentración bacteriana final osciló entre 10^7 - 10^8 UCB/ml en todas las aplicaciones.

c. Diseño y unidad experimental

Se empleó el diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones y seis tratamientos para los experimentos 1 y 2. Para el experimento 3, se aplicó el mismo diseño pero se aumentó a cinco repeticiones y se redujo a tres tratamientos.

En los experimentos 1 y 3 la unidad experimental estuvo formada por dos árboles, mientras en el experimento 2 por un árbol. El número de frutos por unidad varió entre 18 a 80 mazorcas, como se puede observar en los cuadros 8A, 9A y 10A.

d. Variables medidas

La incidencia de moniliasis, mazorca negra y marchitez fisiológica se determinó quincenalmente desde el inicio de las aplicaciones en cada uno de los tratamientos hasta el momento de finalizar el experimento (cuando el 70% de los frutos tratados estaban maduros). Todos los frutos cosechados se abrieron con el propósito de eliminar la posibilidad de infección interna en aquellos frutos que no mostraban síntomas externos.

Para el cv 'UF-29' las variables dependientes que se determinaron fueron el porcentaje de mazorcas cosechadas, la incidencia de moniliasis y mazorca negra durante el período comprendido entre la polinización a la cosecha; con el cv 'UF-296' además de las variables mencionadas se analizó la alta incidencia de marchitez fisiológica de los frutos.

e. Supervivencia de la bacteria

En el laboratorio se obtuvo un mutante de *P. aeruginosa* M-50 resistente a 300 ppm de estreptomina, para tal efecto se inoculó 10 ml de una suspensión bacteriana concentrada a 500 ml de caldo nutritivo con 300 ppm de dicho antibiótico. Se incubó por seis días, al cabo de los cuales se aisló el mutante en el medio selectivo.

Para demostrar la resistencia, la cepa lograda se comparó con una mezcla de bacterias epífitas en platos de Petri con AN más 300 ppm de estreptomina y en AN.

La cepa M-50 fue asperjada a dos árboles en los Experimentos 1 y 2. La primera aplicación se realizó a los 15 días después de la polinización y se siguió aplicando quincenalmente hasta los tres meses de edad asperjándose en seis ocasiones. La bacteria se aplicó a una concentración de 10^7 UCB/ml más 3,5 g de turba/l. Las mazorcas no se cubrieron con bolsa plástica, es decir se mantuvieron en condiciones naturales.

Para el seguimiento de la supervivencia de la bacteria cada 15 días se realizaron lavados a dos mazorcas (una de cada árbol) con una solución salina estéril (0.85% Na Cl), usando entre 50-200 ml dependiendo del tamaño de la mazorca. Para determinar la concentración bacteriana se usó la técnica

de dilución y para conocer el área superficial de la mazorca, se cubrió con cinta "Scotch" transparente cuidadosamente la superficie de la mazorca y luego se pasó a un cartón en donde se determinó aproximadamente el área superficial.

f. Análisis estadístico

Debido a que las variables dependientes presentan una distribución binomial se aplicó la transformación de arcsen \sqrt{x} para cambiar las variables a una distribución normal, condición necesaria para analizar estadísticamente los resultados (101).

Después de la transformación se realizó análisis de varianza y prueba de ámbito múltiple de Duncan en el experimento 3. En los experimentos 1 y 2 luego del análisis de varianza se aplicó una prueba de contrastes.

Los tratamientos comparados fueron:

T1 versus T3
T1 versus T2
T1 versus T4 - T5 - T6
T4 versus T5 - T6
T5 versus T6

Por último, las lecturas de supervivencia en el fitoplano fueron correlacionadas con diferentes elementos climáticos.

4. RESULTADOS

4.1. Evaluación in vitro

Los lavados de bacterias epifitas de mazorca jóvenes (50-100 días), indican que la población epifita en este grado de desarrollo es baja, ya que las diluciones para obtener colonias separadas oscilaron entre 10^{-4} y 10^{-5} .

Se aislaron y purificaron 42 cepas bacteriales en AN; de ellas diez eran de color blanco, 17 de color crema que al envejecer se tornaban de color anaranjado, diez de color amarillo y cinco de color rosado.

De las cepas aisladas, 30 mostraron algún efecto antagonista a M. rozeri, pero solo tres fueron consideradas antagonistas a M. rozeri, debido a que inhibieron el desarrollo del hongo en un ámbito superior al 90% con respecto al testigo. Las doce cepas que no mostraron efecto antagónico comprendían bacterias de color amarillo y rosado (Cuadro 1).

En la zona de acción de las bacterias, se observó que la L-29 permitió un pequeño margen de desarrollo miceliar que presentó esporulación; mientras que M-50 y M-75 permitió un escaso desarrollo miceliar sin esporulación en el margen del crecimiento de la colonia del hongo.

Las tres cepas antagonistas se caracterizaron por crecer en forma puntiforme y rápidamente (en 24 horas de incubación se visualizaban las colonias), por presentar margen entero y una superficie colonial lisa. Al iniciar el crecimiento las colonias eran de color crema que al envejecer se cambiaban a un color anaranjado.

Cuadro 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento de Moniliophthora roreri por diferentes cepas de bacterias epífitas.

No. cepa	Repetición				Promedio
	I	II	III	IV	
L ₁	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L ₂	23,3	20,0	23,0	15,0	20,3
L ₃	58,0	57,0	38,0	43,0	46,5
L ₄	30,0	20,0	10,0	13,0	18,3
L ₅	27,0	37,0	18,0	41,0	30,8
L ₆	23,0	26,0	24,0	25,0	24,3
L ₇	42,0	17,0	28,0	34,0	30,3
L ₈	26,0	35,0	18,0	29,0	27,0
L ₉	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L ₁₀	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L ₁₁	12,0	9,0	13,0	16,2	12,5
L ₁₂	32,0	15,0	34,0	24,0	26,3
L ₁₃	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L ₁₄	26,0	26,0	12,0	20,0	21,0
L ₁₅	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L ₁₆	48,0	34,0	26,0	20,0	32,0
L ₁₇	30,0	26,0	18,0	24,0	24,5
L ₁₈	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L ₁₉	17,0	40,0	34,0	40,0	32,8
L ₂₀	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L ₂₁	14,0	12,0	8,0	32,0	16,5

La prueba se realizó en placas de Petri con agar-avena modificado. Los datos son el resultado de la diferencia de crecimiento con presencia y ausencia de bacterias.

Cuadro 1. Continuación. Porcentaje de inhibición del crecimiento de Moniliophthora roreri por diferentes cepas de bacterias epífitas.

No. cepa	Repetición				Promedio
	I	II	III	IV	
L _{2 2}	25,0	28,0	26,0	20,0	24,8
L _{2 3}	4,0	5,0	3,0	2,0	3,5
L _{2 4}	36,0	48,0	39,0	44,0	41,8
L _{2 5}	36,0	49,0	29,0	41,0	38,8
L _{2 6}	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L _{2 7}	19,0	15,0	12,0	22,0	17,0
L _{2 8}	40,0	39,0	34,0	46,0	39,8
L _{2 9}	90,0	94,0	92,0	89,0	91,3
L _{3 0}	22,0	36,0	18,0	17,0	23,3
M _{5 0}	95,0	94,0	98,0	94,0	95,3
M _{5 1}	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
M _{5 2}	12,0	8,0	6,0	4,0	7,5
M _{5 3}	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
M _{5 4}	46,0	42,0	58,0	62,0	49,5
M _{5 5}	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
M _{7 0}	38,0	54,0	42,0	46,0	45,0
M _{7 1}	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
M _{7 2}	35,0	65,0	30,0	30,0	40,0
M _{7 3}	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
M _{7 4}	50,0	60,0	50,0	50,0	52,5
M _{7 5}	94,0	96,0	96,0	90,0	94,0

La prueba se realizó en placas de Petri con agar-avena modificado. Los datos son el resultado de la diferencia de crecimiento con presencia y ausencia de bacterias.

4.2. Prueba preliminar in vivo

Como se observa en el Cuadro 2, únicamente la cepa M-50 ejerció un 100% de eficiencia en controlar M. roreri; la cepa L-29 mostró ser ineficiente in vivo, por lo cual se descartó su utilización en los ensayos realizados en "La Lola".

Todos los frutos con moniliasis, al momento de la evaluación, presentaron los síntomas característicos de la enfermedad y en algunos se observó crecimiento miceliar.

Cuadro 2. Incidencia de la moniliasis causada por Moniliophthora roreri en frutos de cacao (Theobroma cacao) cv 'Pound 12' en Turrialba, Costa Rica, 1985.

Tipo de Antagonista	Número de Frutos	Frutos con Moniliasis	Incidencia Moniliasis (%)
L-29	10	6	60
M-50	10	-	0
M-75	10	1	10
Testigo	10	8	80

4.3. Clasificación

Los estudios realizados por el Dr. Franklin Jiménez de la Facultad de Microbiología de la UCR mostraron que L-29 corresponde a la especie Leuconostoc mesentoroides (Tsenkowskii) y las cepas M-50 y M-75 a Pseudomonas aeruginosa (Schroeter).

El Cuadro 3 muestra las principales características de la cepa M-50.

Cuadro 3. Características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas de la bacteria antagonista M-50 aislada de la superficie de mazorcas de cacao (Theobroma cacao) de 60 días de edad.

PRUEBA	REACCION
Tinción de gram	Negativa
Motilidad	Positiva
Flagelos	Uno, polar
Catalasa	Positiva
Oxidasa	Positiva
Deshidrogenasa de la arginina	Positiva
Hidrólisis de gelatina	Positiva
Hidrólisis del almidón	Negativa
Crecimiento a 42°C	Positiva
Cápsula en medio con glucosa	Positiva
Utilización de glucosa	Positiva
Utilización de trehalosa	Negativa
Pigmentos	Piocianina y fluorescente
Desnitrificación	Positiva

4.4. Estudios del acarreador

La reproducción de la cepa M-50 en turba aumento 10 veces con respecto al crecimiento observado en caldo nutritivo; además en turba se observó que después de un mes de haberse realizado la inoculación, la viabilidad de la bacteria se mantenía, lo cual no sucedió en caldo nutritivo. La viabilidad de la bacteria en el caldo nutritivo después de 15 días, comenzó a descender rápidamente, pasando en menos de dos semanas de 10^9 a 10^6 , tal como se observa en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Supervivencia y reproducción de Pseudomonas aeruginosa en turba estéril y en caldo nutritivo.

Días de inoculación	bacterias/g de turba x 10 ⁴	bacterias/ml de caldo nutritivo x 10 ⁴
0	3,5 *	3,5
3	55	8,0
6	42	4,5
9	60	7,0
15	35	2,5
18	40	0,01
24	50	0,001
27	40	0,001
30	36	0,001

* Promedio de ocho repeticiones

4.5 Evaluación in vivo

El uso de dos cultivares con reacción opuesta a M. roreri evaluó eficientemente las posibilidades de P. aeruginosa a prevenir el ataque de M. roreri. En los experimentos realizados con el cv 'UF-29' los tratamientos biológicos redujeron significativamente el porcentaje de mazorcas cosechadas. Por otra parte en el cultivar resistente, 'UF-296' el combate biológico no mostró respuesta significativa, ya que el nivel de incidencia que se presentó fue muy bajo (menos del 4%) debido a las características genéticas del cultivar que impidió mostrar las bondades de los tratamientos.

a. Experimento 1

En este experimento con el cv 'UF-29' realizado en los meses de mayo a octubre de 1985 la presión de inóculo no fue muy alta, ya que se presentó una incidencia de 48% de moniliasis en el testigo natural. Sin embargo, el análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) entre los tratamientos, en relación con la incidencia de moniliasis y mazorcas cosechadas. Además, hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en la reacción a mazorca negra entre los tratamientos. (Cuadro 3 A).

La aspersión de una suspensión celular sobre la superficie del fruto de P. aeruginosa en tres y seis ocasiones redujeron significativamente la incidencia de la moniliasis. Estos tratamientos se comportaron superiores al que incluyó la diferencia, aunque estadísticamente las diferencias no fueron significativas. (Cuadros 5, 6 y Figuras 3 y 4).

El mejor tratamiento biológico fue con inóculo artificial (6.25% moniliasis). En este tratamiento las mazorcas se cubrieron por todo el ciclo con una bolsa plástica. Le siguió en eficiencia, la aplicación de la bacteria en tres ocasiones y por último, la aplicación de P. aeruginosa en seis ocasiones.

En cuanto a P. palmivora solo en un tratamiento se redujo significativamente la incidencia: la aspersión de seis ocasiones de la bacteria bajo inóculo artificial. La aplicación de clorotalonil como los tratamientos bacteriales se comportaron igual que el testigo natural.

El estudio de la fluctuación poblacional de la bacteria en la superficie de la mazorca en este período, mostró que la bacteria es capaz de sobrevivir y colonizar este nicho

Cuadro 5. Efecto de la aplicación de Pseudomonas aeruginosa y clorotalonil sobre el desarrollo de la moniliasis en frutos de cacao (Theobroma cacao)¹.

Tratamiento	Mazorcas		Incidencia		Incidencia	
	Cosechadas	%	Moniliasis	%	Mazorca Negra ²	%
Testigo bajo inóculo artificial de <u>M. roleri</u>	6,3 ^x		91,3		2,8	
Testigo bajo inóculo natural de <u>M. roleri</u>	28,5		48,0		18,5	
Aspersión de <u>P. aeruginosa</u> (3 veces)						
bajo inóculo natural de <u>M. roleri</u>	77,8		7,5		10,0	
Aspersión de <u>clorotalonil</u> (6 veces)						
bajo inóculo natural de <u>M. roleri</u>	63,3		19,5		15,0	
Aspersión de <u>P. aeruginosa</u> (6 veces)						
bajo inóculo natural de <u>M. roleri</u>	71,0		10,8		14,5	
Aspersión de <u>P. aeruginosa</u> (6 veces)						
bajo inóculo artificial de <u>M. roleri</u>	81,3		6,3		7,5	

x Promedio de cuatro repeticiones; los datos de cada repetición se encuentran en el cuadro 8 A.

- 1 El ensayo se llevó a cabo de julio a noviembre de 1985 (Experimento 1), en la finca La Lola, Cantón de Matina, Provincia de Limón, Costa Rica.
El fungicida clorotalonil se aplicó a una concentración de 3 g. l. A/l y la población bacteriana aplicada osciló entre 10^7 y 10^8 UCB/ml.
- 2 Se incluye la evaluación de Mazorca Negra causada por Phytophthora palmivora debido al efecto interesante de los tratamientos sobre la inoculación de M. roleri.

Cuadro 6. Prueba de contrastes de los diferentes tratamientos de la aplicación de Pseudomonas aeruginosa y clorotalonil sobre el desarrollo de moniliasis, mazorca negra y mazorcas cosechadas de cacao .

Contraste	DF	Mazorcas cosechadas		Moniliasis		Mazorca Negra	
		Valor F	PR > F	Valor F	PR > F	Valor F	PR > F
2 v 3	1	126,67	0,0001	101,51	0,0001	0,31	0,5835
1 v 4-5-6	1	46,60	0,0001	25,99	0,0001	0,57	0,4633
4 v 5-6	1	3,21	0,0984	0,27	0,6109	0,00	0,9511
5 v 6	1	0,60	0,4498	0,06	0,8088	0,19	0,6729
1 v 2	1	17,00	0,0009	27,64	0,0010	5,50	0,0332

El ensayo se llevó a cabo de julio a noviembre de 1985 (Experimento 1).

1 = Testigo bajo inóculo natural de M. roerei.

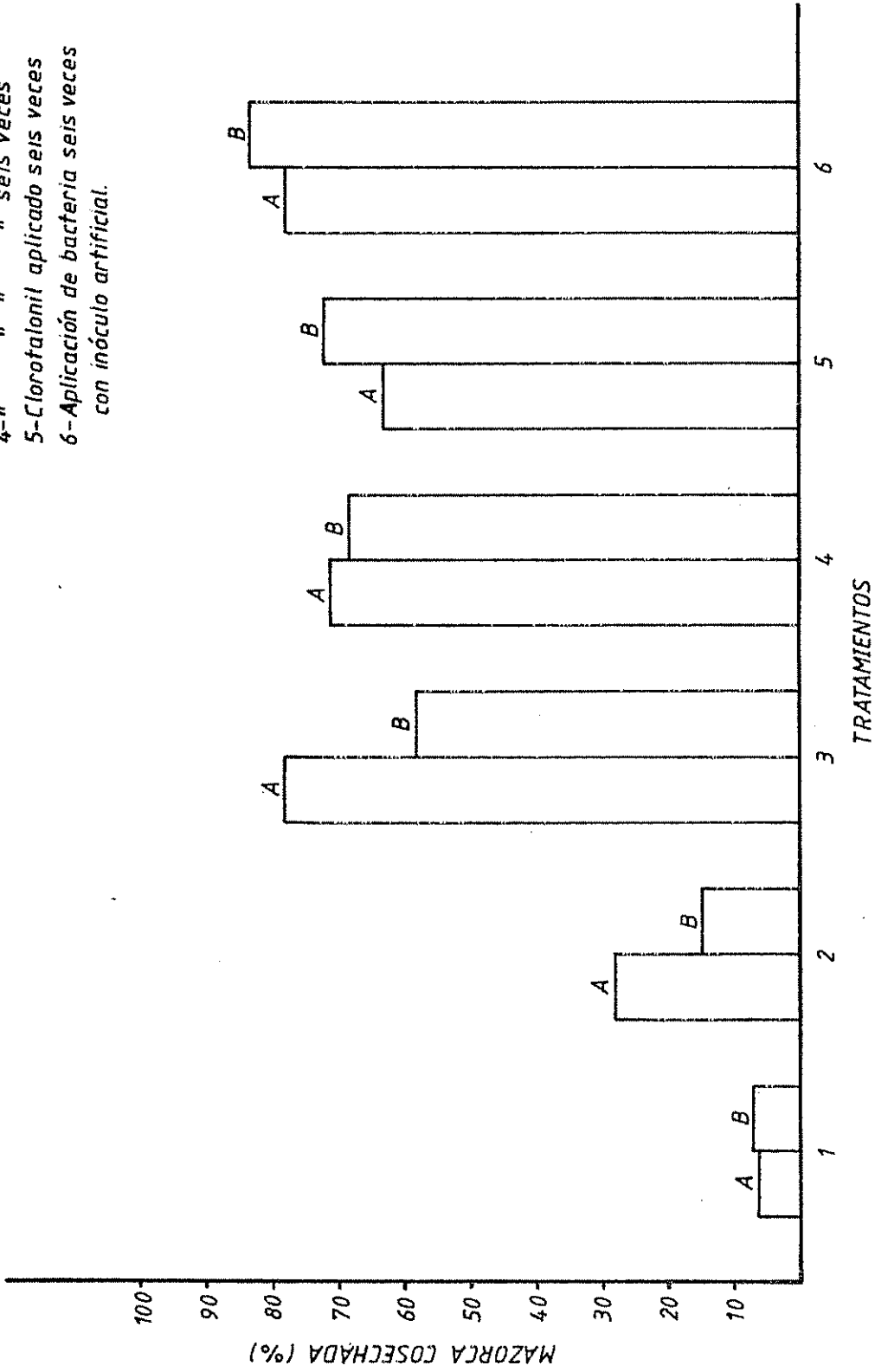
2 = Testigo bajo inóculo artificial de M. roerei.

3 = Tratamiento de P. aeruginosa bajo inóculo artificial de M. roerei.

4 = Tratamiento de Clorotalonil bajo inóculo natural.

5 = Tratamiento de P. aeruginosa (6 aspersiones) bajo inóculo natural.

6 = Tratamiento de P. aeruginosa (3 aspersiones) bajo inóculo natural.



A= mayo-octubre, 1985
 B= julio noviembre, 1985

1-Testigo con inoculación artificial
 2-Testigo con inoculo natural
 3-Bacteria aplicada tres veces
 4-Testigo con inoculo natural
 5-Clorotatonil aplicado seis veces
 6-Clorotatonil aplicado seis veces con inoculo artificial.

Figura 3. Porcentaje de mazorcas de cacao (*Theobroma cacao*) cv 'UF-29' con diferentes tratamientos de *Pseudomonas aeruginosa* y clorotatonil. La Lola, Matina, Limón, Costa Rica, 1985.

A = mayo - octubre, 1985

B = julio - noviembre, 1985

- 1= Inóculo artificial
- 2= Inóculo natural
- 3= Bacteria aplicada 3 veces
- 4= Bacteria aplicada 6 veces
- 5= Clorotalonil 6 veces
- 6= Bacteria 6 veces + inóculo artificial.

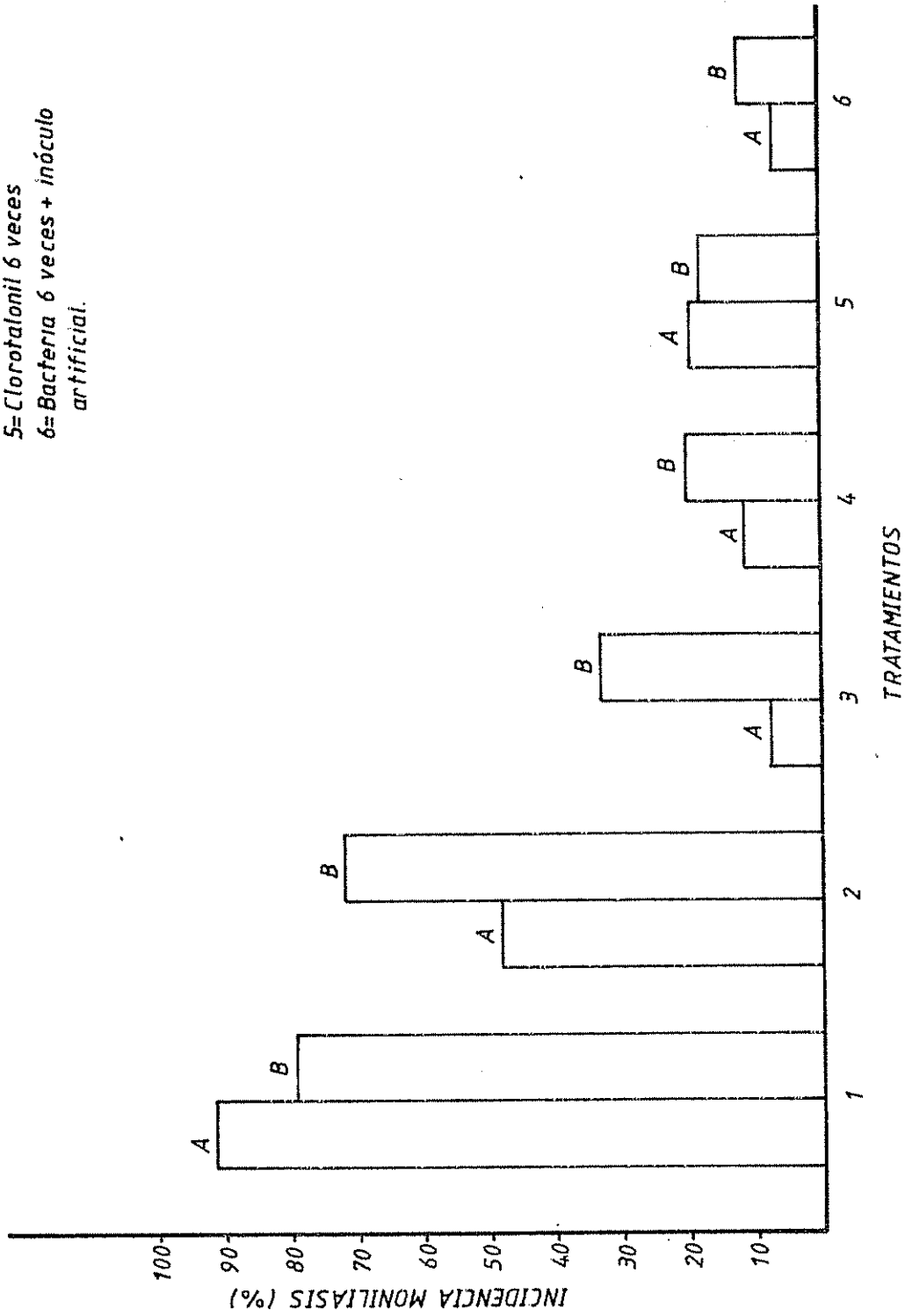


Figura 4. Incidencia de moniliasis en frutos de cacao (*Theobroma cacao*) cv. 'UF-29' con diferentes tratamientos de *Pseudomonas aeruginosa* en La Lola, Matina, Limón, Costa Rica, 1985.

ecológico. La población osciló entre 4×10^4 a 5×10^4 UCB/cm² (Cuadro 4 A); esta fluctuación correlacionó en forma positiva y significativa ($P \leq 0.05$) con la humedad relativa mínima y la precipitación. Mientras que con la radiación solar y la temperatura promedio correlacionó en forma negativa. Con los demás elementos climáticos no hubo correlación significativa (Cuadro 7 y Figura 5).

b. Experimento 2

En este segundo ensayo con el cv 'UF-29' de cacao susceptible a la moniliasis, realizado en el segundo semestre de 1985, la presión de inóculo de M. rozeri aumentó en 50% con respecto al Experimento 1; la incidencia en el testigo con inóculo natural fue de 73 por ciento. Aunque aparentemente las condiciones climáticas no fueron muy adecuadas para el establecimiento de la bacteria (hubo 30 días de baja precipitación, Cuadro 5 A), su aplicación logró reducir significativamente la incidencia de moniliasis con respecto al testigo.

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) entre los tratamientos para mazorca cosechada e incidencia de moniliasis. Para mazorca negra, no hubo respuesta significativa (Cuadro 6 A).

El mejor tratamiento fue la aplicación de P. aeruginosa en seis ocasiones con inóculo artificial del hongo, la bacteria al estar en cámara húmeda permanente (debido a que estuvieron cubiertas con bolsas plásticas) ejerció el control más eficaz hacia M. rozeri, permitiendo una incidencia de 3.8% y con 84.3% de mazorca cosechada. En segundo lugar se ubicaron los tratamientos de bacteria asperjada en seis ocasiones con inóculo natural) y el tratamiento con el

Cuadro 7. Correlación entre las poblaciones de Pseudomonas aeruginosa en la superficie de la mazorca de cacao (Theobroma cacao) y los factores climáticos encontrados en la finca La Lola, Matina, Provincia de Limón, Costa Rica, durante los experimentos efectuados en dos épocas diferentes.

Factor Climático	Coeficiente de correlación con el log, del número de bacterias/cm ² de superficie de mazorca.	
	Exp. 1 ^a	Exp. 2 ^b
Temperatura		
Máxima	-0,3397	-0,2314
Promedio	-0,8321**	-0,7066**
Mínima	0,3864	-0,8776**
Humedad relativa		
Mínima	0,6975**	0,5162
Promedio	0,3673	0,1731
Precipitación	0,5734**	0,7048**
Radiación	-0,7441*	-0,5487

* : Mayo-octubre, 1985

^b : Julio-noviembre, 1985

** : Significativo al 5 %

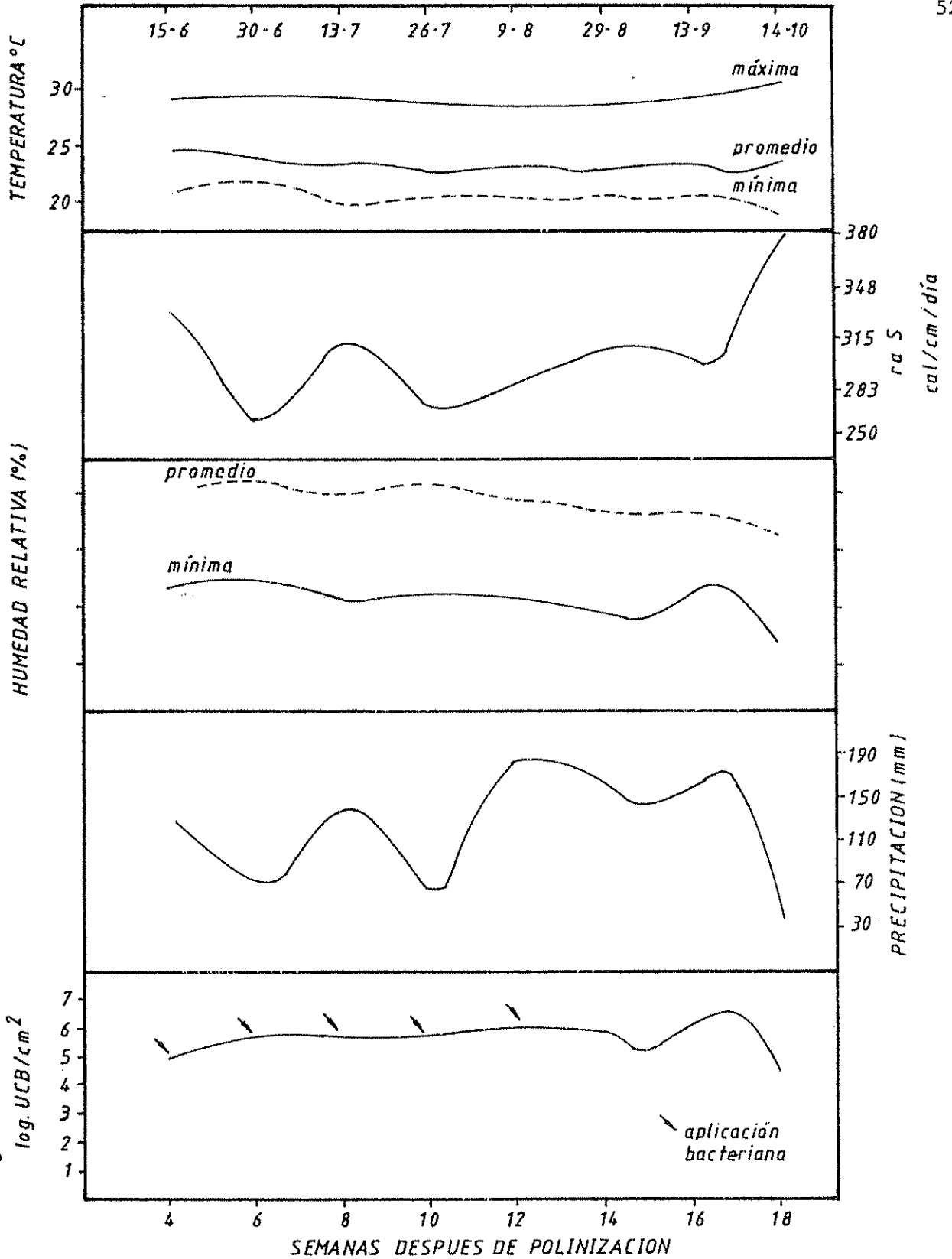


Figura 5. Estudio longitudinal de la población de la bacteria antagonista del hongo *Moniliophthara rozeri* (*Pseudomona aeruginosa*) en la superficie de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao*) y diferentes factores climáticos durante mayo-octubre (exp.1), La Lola, Matina, Limón, 1985.

fungicida (Cuadros 8 y 9). La aplicación de la bacteria en tres ocasiones no dio los resultados del Experimento 1; el periodo seco que coincidió después de la segunda aplicación afectó severamente la población bacteriana ya que en este periodo de sequía no hubo aplicación de bacterias que podría haber compensado la mortalidad de P. aeruginosa por efectos climáticos. A pesar de estos inconvenientes redujo la incidencia de la enfermedad en un 50% con respecto al testigo.

La fluctuación de la población bacteriana osciló entre 8×10^4 y 7×10^4 UCB/cm² (Cuadro 5 A y Figura 6), muy semejante al Experimento 1. La variación bacteriana a través del tiempo correlacionó positivamente y en forma significativa ($P \leq 0.05$) con la precipitación y en forma negativa y significativa con el promedio mínimo y general de temperatura. Con los otros elementos climáticos no hubo correlación significativa (Cuadro 7).

Cuadro 8. Efecto de la aplicación de Pseudomonas aeruginosa y clorotalonil ¹ sobre el desarrollo de la moniliasis en frutos de cacao (Theobroma cacao) ².

Tratamiento	Mazorcas		Incidencia		Incidencia	
	Cosechadas	%	Moniliasis	%	Mazorca Negra	%
Testigo bajo inóculo artificial de <u>M. royeri</u>	6,8 ^x		78,9		14,2	
Testigo bajo inóculo natural de <u>M. royeri</u>	15,2		72,8		11,2	
Aspersión de <u>P. aeruginosa</u> (3 veces) bajo inóculo natural de <u>M. royeri</u>	57,1		32,6		8,6	
Aspersión de Clorotalonil (6 veces) bajo inóculo natural de <u>M. royeri</u>	73,0		18,2		7,4	
Aspersión de <u>P. aeruginosa</u> (6 veces) bajo inóculo natural de <u>M. royeri</u>	67,5		20,0		9,9	
Aspersión de <u>P. aeruginosa</u> (6 veces) bajo inóculo artificial de <u>M. royeri</u>	84,3		3,8		12,0	

x Promedio de cuatro repeticiones; los datos de cada repetición se encuentran en el cuadro 9 A.

1 El ensayo se llevó a cabo de julio a noviembre de 1985 (Experimento 2), en la finca La Lola, Cantón de Matina, Provincia de Limón, Costa Rica.

El fungicida clorotalonil se aplicó a una concentración de 3 g.l.a/l y la población bacteriana aplicada osciló entre 10 y 10 UCB/ml.

2 Se incluye la evaluación de Mazorca Negra causada por Phytophthora palmivora debido al efecto interesante de los tratamientos sobre la inoculación de M. royeri.

Cuadro 9. Prueba de contrastes de los diferentes tratamientos de la aplicación de Pseudomonas aeruginosa y clorotalonil sobre el desarrollo de moniliasis, mazorca negra y mazorca cosechada de cacao .

Contraste	OF	Mazorcas cosechadas			Moniliasis			Mazorca Negra		
		Valor F	PR > F	Valor F	PR > F	Valor F	PR > F	Valor F	PR > F	
2 v 3	1	73,43	0,0001	79,97	0,0001	0,13	0,7219			
1 v 4-5-6	1	40,95	0,0001	37,79	0,0001	0,17	0,6880			
4 v 5-6	1	1,65	0,2180	2,48	0,1364	0,04	0,8458			
5 v 6	1	0,97	0,3412	1,68	0,2144	0,09	0,8628			
1 v 2	1	2,24	0,1551	0,54	0,4733	0,49	0,4964			

El ensayo se llevó a cabo de julio a noviembre de 1985 (Experimento 2).

- 1 = Testigo bajo inóculo natural de M. roseri.
- 2 = Testigo bajo inóculo artificial de M. roseri.
- 3 = Tratamiento de P. aeruginosa bajo inóculo artificial de M. roseri.
- 4 = Tratamiento de Clorotalonil bajo inóculo natural.
- 5 = Tratamiento de P. aeruginosa (6 aspersiones) bajo inóculo natural.
- 6 = Tratamiento de P. aeruginosa (3 aspersiones) bajo inóculo natural.

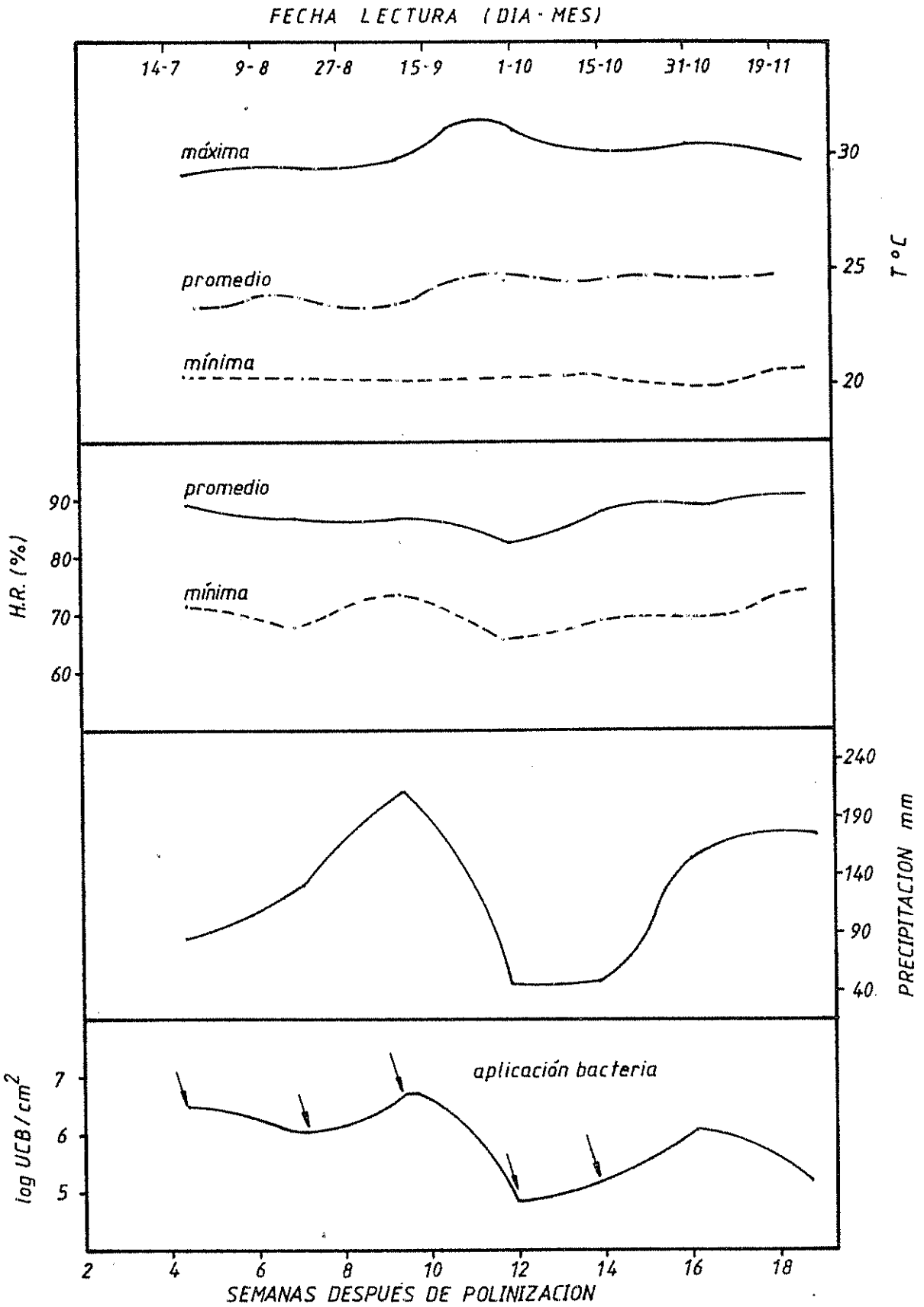


Figura 6. Estudio longitudinal de la población de la bacteria antagonista del hongo *Moniliophthora roreri* (*Pseudomonas aeruginosa*) en la superficie de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao*) y diferentes factores climáticos durante julio-noviembre (exp. 2), La Lola, Matina, Limón, 1985.

c. Experimento 3

En este ensayo, realizado en los meses de agosto a diciembre de 1985, solo se pudo montar tres tratamientos (biológico, químico y testigo) debido a que el número de mazorcas disponibles no fue suficiente para probar los seis tratamientos evaluados en el cv 'UF-29'.

Las características de alta resistencia del cv 'UF-296' impidió que se observaran diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto a la incidencia de moniliasis; por otra parte se encontró diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el porcentaje de mazorcas cosechadas (Cuadro 7 A). Estas diferencias entre tratamiento se explican por la incidencia de mazorca negra (Cuadro 10 y Figura 7). La aplicación de P. aeruginosa y clorotalonil redujeron significativamente la incidencia de mazorca negra y la incidencia de marchitez fisiológica, aunque está en forma no significativa.

Cuadro 10. Efecto de la aplicación de bacterias antagonistas (Pseudomonas aeruginosa) y clorotalonil sobre el desarrollo de la moniliasis en fruto del cv 'UF296' (Theobroma cacao), a nivel de campo ³.

Tratamiento	Mazorcas cosechadas ² %	Incidencia Moniliasis %	Incidencia Mazorca Negra ⁴ %
Aspersión de Clorotalonil 6 veces	50,4 ^{a1}	4,3 ^a	26,7 ^a
Aplicación de <u>P. aeruginosa</u> 6 veces	47,0 ^a	2,6 ^a	36,0 ^{a,b}
Testigo	20,9 ^b	3,8 ^a	51,8 ^c

¹. Promedio con letras iguales no difieren estadísticamente entre si según la prueba de ámbito múltiple de Duncan para una probabilidad de 0,05.

². Promedio de cinco repeticiones, los datos de cada repetición se muestra en el cuadro 10 A.

³. El ensayo se llevó a cabo de agosto a diciembre de 1985, en la finca La Lola, Cantón de Matina, Provincia de Limón, Costa Rica. El clorotalonil se aplicó a una concentración de 3 g 1A/l y la población de bacterias osciló entre 10⁷ y 10⁹ UCB/ml.

⁴. Se incluye la evaluación de mazorca negra causada por Phytophthora palmivora y marchitez fisiológica debido al efecto interesante de los tratamientos sobre la inoculación de esta enfermedad.

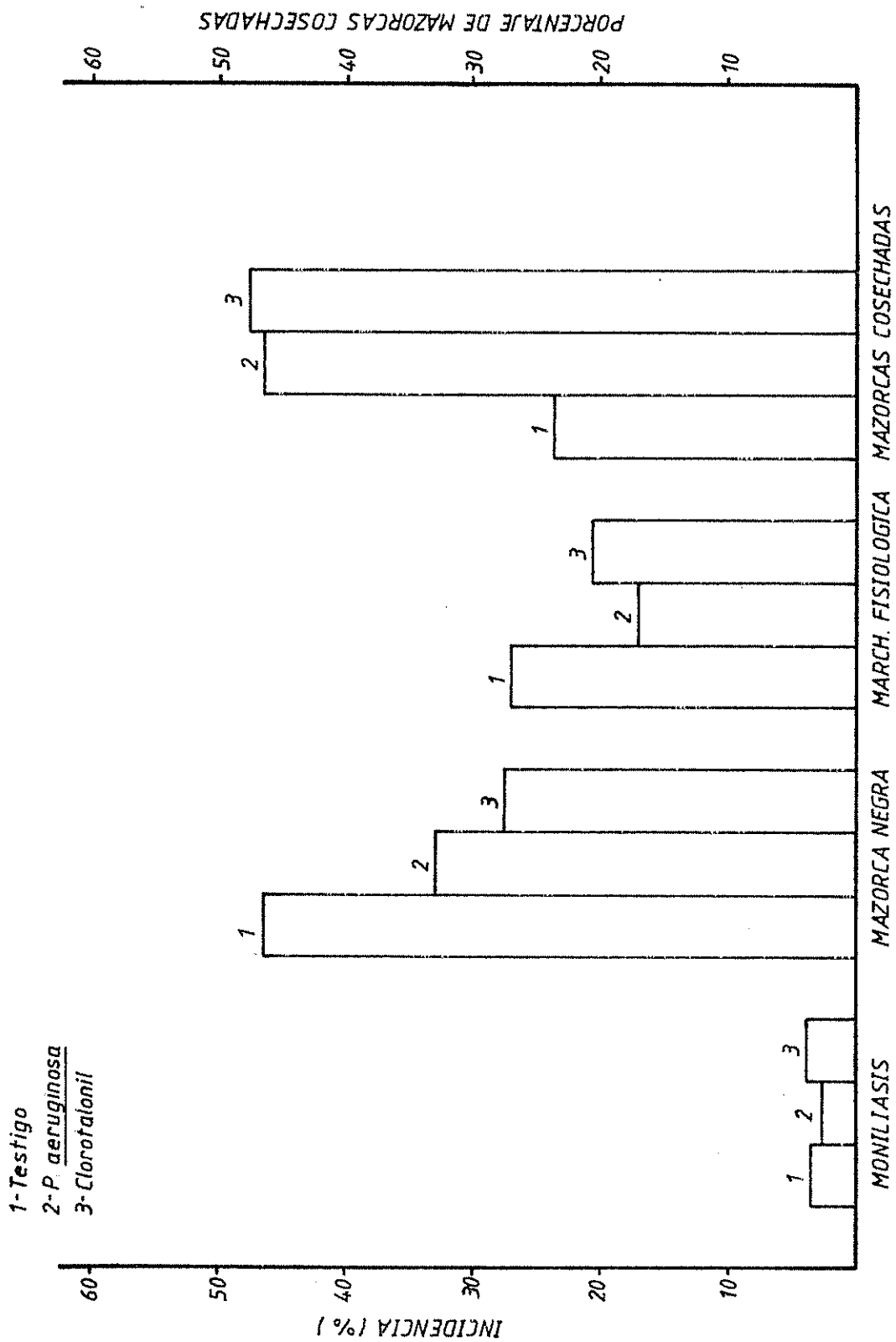


Figura 7. Incidencia de moniliasis, mazorca negra, marchitez fisiológica y mazorcas cosechadas de cacao (*Theobroma cacao*) cv 'UF-296' en diferentes tratamientos de *Pseudomonas aeruginosa*, La Lota, Matina, Limón, 1985.

5. DISCUSION

5.1. Prueba in vitro

Se encontró que el fitoplano de la mazorca de cacao en sus primeros estadios de desarrollo (40-70 días) está colonizada en gran parte por bacterias debido a que en los varios muestreos realizados y usando diferentes medios de aislamiento no se aisló otro tipo de microorganismos.

Estos resultados estan de acuerdo con las observaciones de Blakeman (17), quien encontró que las bacterias colonizan casi un 100% del fitoplano en los primeros estadios de desarrollo del órgano, debido a su capacidad para supervivir utilizando nutrimentos en este nicho, que provienen por difusión de los tejidos de la planta.

Uno de los criterios de selección de las cepas bacteriales promisorias fue el buen crecimiento y la presencia de pigmentos in vitro. Esto se debe a que las bacterias epífitas por lo general presentan pigmentos que actúan como protección contra la radiación; y segundo, que era indispensable para obtener éxito con la posible estrategia a desarrollar, que la bacteria seleccionada tuviera una alta tasa de reproducción in vitro que facilitara la producción de la masa bacteriana antagonista que sería usada para colonizar el fitoplano.

Para la selección del sitio donde se aislaron las bacterias se siguió el principio de Baker y Cook (6): "seleccionar las posibles antagonistas donde la enfermedad no ocurra o donde declina o no puede desarrollarse"

Los lavados se hicieron en mazorcas sanas en cacaotales abandonados con alta incidencia de la enfermedad, con alta deposición de esporas en la superficie de la mazorca

(incidencia superior al 90%). Esto podría ocurrir porque la enfermedad no se había desarrollado en estas mazorcas debido a que las esporas habían sido incapaces de desarrollarse por la presencia de algún agente en el fitoplano. Esta posibilidad toma fuerza al determinar que tres de 40 cepas bacteriales aisladas mostraron un alto antagonismo in vitro y que dos de ellos controlaron eficazmente la enfermedad a nivel de campo.

Los resultados de diferentes investigaciones en el campo del combate biológico de patógenos del suelo (6) y de órganos aéreos (4, 51) han demostrado que no hay una correlación significativa entre antagonismo in vitro y efectividad en el campo. Según Andrews (4), frecuentemente organismos que muestran antagonismo en platos de agar no controlan la enfermedad cuando se aplican a plantas. Y menos frecuente que el organismo se comporte como efectivo agente de control en el campo, pero no muestre propiedades inhibitorias in vitro, como es el caso de las levaduras blancas citadas por Fokkema (52).

En el caso de M. roreri, los resultados muestran que dos especies bacteriales que mostraron un alto antagonismo in vitro una mostró ser efectiva en el campo. Debido al pequeño número de aislamientos probados y a que no se probó la eficiencia del combate de las bacterias que no mostraron antagonismo in vitro, es necesario incluir en el proceso de selección de pruebas in vivo para descartar un buen antagonista.

5.2. Prueba de acarreadores

En el combate biológico es muy importante el acarreador o portador del agente biológico al sitio de acción. Este no debe ser tóxico para el agente biológico, debe permitir la

reproducción y la supervivencia del agente para aumentar la viabilidad del posible producto a llevar al agricultor.

Cuando las bacterias son los agentes biológicos, el acarreador recomendado ha sido la turba, la cual se usa en gran escala para la preparación de inoculantes de Rhizobium en diferentes cultivos de leguminosas (23).

Por lo anterior, las pruebas con P. aeruginosa únicamente se hicieron con turba y caldo nutritivo como testigo.

Los resultados encontrados en esta investigación son similares a los observados por Burton (23) y León et al (75). La turba permite a la bacteria reproducirse en mayor cantidad y a permanecer viable por un periodo de tiempo mayor con respecto al cultivo en líquido.

P. aeruginosa a los 30 días después de la inoculación se encontraba a una concentración superior a 10^7 UCB/ml, lo cual está por encima del límite óptimo de inóculo (10^6 UCB/ml); mientras tanto en caldo nutritivo estaba en una concentración 1000 veces menor.

Los resultados logrados no dan respuesta a diferentes interrogantes que es necesario responder para establecer un sistema de combate biológico en gran escala; tales interrogantes se relacionan con la viabilidad del inóculo luego de las cuatro semanas de incubación y la temperatura óptima para incubar y almacenar el inoculante.

5.3. Prueba preliminar in vivo

Se siguió el método sugerido por Bravo y Victoria (18) en sus estudios sobre el combate biológico de moniliasis

usando Bacillus sp., modificándose únicamente la variable a evaluar; estos autores usaron la cantidad de área afectada por mazorca cuando se presentaban los primeros síntomas de la enfermedad, mientras que en esta investigación se usó la incidencia de moniliasis sin determinar el área afectada, debido a que una mazorca infectada con moniliasis, se considera perdida.

De las dos especies probadas, P. aeruginosa demostró su gran capacidad de antagonismo in vivo puesto que la cepa M-50 no permitió la infección en las mazorcas tratadas, que contrastó con el testigo (80% incidencia) y con L. mesenteroides (60% incidencia). Por otra parte, Bravo y Victoria (18) encontraron que Bacillus sp. aplicado preventivamente redujo el área afectada de un 100 a un 70 por ciento.

Estos resultados preliminares mostraron que la estrategia de usar bacterias epífitas podría resultar en un combate biológico efectivo del hongo y están de acuerdo con las conclusiones de Bravo y Victoria (18) sobre la aplicación de la bacteria en forma preventiva.

No fue posible explicar el fracaso de L. mesenteroides como agente de combate biológico aunque pudo ocurrir porque en la superficie de la mazorca hay factores nutricionales o biológicos que impidieron la aparición del mecanismo antagonista de la bacteria hacia el hongo, tal como fue encontrado por Jiménez et al. (67) al estudiar el combate biológico de P. palmivora en cacao.

5.4. Tipo de bacteria

Pseudomonas, junto con Xanthomonas y Erwinia han sido descritas como los principales géneros colonizadores del

fitoplano y asimismo se ha encontrado que Pseudomonas es el principal género (6, 13, 29, 98) utilizado como agente biológico en dicho micro ambiente.

La cepa M-50 encontrada en el presente estudio pertenece al género Pseudomonas y a la especie P. aeruginosa, la cual no ha sido citada como agente de combate biológico en el fitoplano, aunque si se ha encontrado como componente de este ambiente (21). P. aeruginosa pertenece al grupo de Pseudomonas fluorescentes, el cual comprende las especies más citadas como agentes de combate biológico: P. fluorescens (16, 68, 78, 100) y P. cepacia (29, 160).

Se cita a P. aeruginosa como agente infeccioso al hombre (24, 25) en casos de personas que tienen cáncer y/o un sistema inmunológico bajo (nivel bajo de anticuerpos). El 20% de las infecciones que se dan en los hospitales en casos como los citados es debido al ataque de P. aeruginosa. Esta característica de diferentes cepas de P. aeruginosa no se debe generalizar para toda la especie, debido a que la misma es muy heterogénea.

Debido al riesgo potencial que representa la aplicación masiva de esta bacteria, es necesario seguir realizando selecciones bacteriales a nivel de fitoplano, con el fin de aislar una cepa bacterial que presente los rasgos de antagonismo y adaptación de la M-50 pero sin tener el riesgo que conlleva P. aeruginosa.

La cepa M-50 también puede utilizarse en trabajos de recombinación genética tratando de transferir el poder antagónico a una bacteria adaptada al nicho ecológico y que no presente los riesgos, tal como P. fluorescens.

5.5. Mecanismo de antagonismo

Las pruebas in vitro revelan que la acción de la bacteria sobre el hongo es del tipo de antibiosis, debido a la ocurrencia de zonas de inhibición, como se observó en este caso, son comúnmente considerados como resultado de la producción de antibióticos (51).

Observaciones realizadas en forma adicional usando el microscopio de luz y soluciones de conidios y bacterias incubadas por 48 horas mostraron que los conidios en presencia de la bacteria son incapaces de germinar y que algunas de estos sufrieron lisis en el substrato donde se colocaron. Estos resultados confirman la correlación entre zona de inhibición observada y antibiosis.

Es riesgoso extrapolar estos resultados de mecanismo de acción sobre lo que sucede a nivel de fitoplano de la mazorca, porque no existe una evidencia directa del papel de los antibióticos in vivo. Blakeman y Brodie (15) afirman que la habilidad para producir un antibiótico en cultivo no implica necesariamente que el antibiótico es producido in vivo y aún si es formado in vivo no es necesariamente el responsable de la protección vegetal de una bacteria particular hacia un patógeno. El antibiótico por puede ser degradado por otros epifitos o inactivado por la adsorción a la superficie vegetal.

Para determinar realmente el papel del antibiótico, es necesario aislarlo en el laboratorio y probar su capacidad de control del hongo en la superficie de la mazorca como demostraron Teliz-Ortiz y Burkholder (106) al estudiar la acción de P. fluorescens sobre P. phaseolicola en frijol. El antibiótico producido por la bacteria mostró la propiedad de ser transportado dentro de la planta, de tal manera que cuando P. fluorescens fue inoculada a plántulas, las hojas

por encima del punto de inserción fueron protegidas de la infección. P. fluorescens no pudo ser recobrada de las hojas protegidas por este método de protección sistemática. Asimismo se ha demostrado (36, 39) que diferentes especies patogénicas y epifitas del género Pseudomonas tales como P. syringae, P. glycinea y P. phaseolicola producen antibióticos proteicos denominados bacteriocinas, que son activos contra la mayoría de los microorganismos epifitos incluyendo hongos y bacterias.

Diferentes investigaciones (85, 86) sobre la relación de formación de pigmentos (fluorescentes y piocianina) con la nutrición, concluyeron que la formación de ellos dependen en gran parte de la absorción de hierro y azufre por la bacteria; por lo general algunos de estos pigmentos le sirven como protección contra otros microorganismos. Esto sugiere la posibilidad de que el mecanismo de antibiosis de la cepa M-50 sea por sideroforos, o sea que la bacteria secreta una sustancia al medio para inmovilizar el hierro el cual es indispensable para la formación de los pigmentos que la caracterizan.

Por el tipo de penetración de M. roreri es muy posible que además de antibiosis, la bacteria tenga otro mecanismo de antagonismo como la competencia por nutrimentos. Suárez (102) observó que el hongo necesita un crecimiento previo a la infección, para el cual posiblemente se nutre del fitoplano compitiendo con los microorganismos que colonizan dicho ambiente. Blakeman (14) demostró este efecto con B. cinerea que tiene características de penetración semejante a M. roreri. En su estudio reconoció que la presencia de bacterias epifitas en el punto de infección produjeron un efecto adverso sobre la germinación del conidio de B. cinerea. Además se observó la marcada influencia de los patrones de difusión de nutrimentos de la hoja y los

conidios, sobre el número de bacterias y la cantidad de inhibición de la germinación de los conidios. Al envejecer la planta, las cantidades de aminoácidos y carbohidratos que se difunden van en aumento, lo cual estuvo correlacionado con el alto número total de bacterias y la estimulación selectiva de un aislamiento de Pseudomonas, la cual inhibió la germinación de esporas sobre hojas de remolacha. (14).

5.6. Evaluación in vivo

Según Andrews (4) la prueba definitiva en la evaluación de un agente biológico es realizarla en condiciones naturales del cultivo. P. aeruginosa (M-50) fue sometida a las pruebas de selección (16) hasta la evaluación in vivo con lo cual se comprobó su acción como un agente de control efectivo contra M. royeri y abre la posibilidad del combate biológico de esta enfermedad crítica en varias regiones tropicales húmedas de América.

La efectividad del combate biológico se puede explicar con base en dos factores; los rasgos del agente biológico y el microambiente de la mazorca de cacao. La bacteria aislada presenta gran capacidad de adaptación en los primeros estadios del desarrollo de la mazorca y es altamente antagonista a M. royeri; además se aplicó en una etapa muy joven de desarrollo de la mazorca en donde posiblemente los microorganismos epifitos competidores fueron escasos y cada aplicación bacteriana iba acompañada de un suministro de nutrimentos adicionales (turba). Estos factores quizá permitieron que la bacteria colonizara y ocupara en altas concentraciones el fitoplano en la época crítica para moniliasis, lo cual se demuestra en los estudios poblacionales efectuados y en la reducción significativa de la incidencia de la moniliasis con los tratamientos biológicos efectuados.

Las condiciones del microambiente de la mazorca en cacaotales del trópico húmedo son ideales para la supervivencia de la bacteria; según Alvim (2) la luz que llega a la mazorca es apenas un 5-10% de la luz que incide sobre el cacaotal, con lo cual los efectos de radiación solar son amortiguados casi totalmente por el follaje del árbol de cacao y de la sombra. En cuanto a la humedad, crítica para la supervivencia, Fulton (53) afirma que la mazorca está cubierta por una película de agua al menos por 16 horas diarias; por la mañana por efecto de condensación y protección solar del follaje, persiste una película de agua en el fitoplano que permitiría la distribución efectiva de la bacteria, la difusión del antibiótico y la competencia por nutrimentos entre la bacteria y los propágulos del hongo.

El efecto de humedad se observa al analizar la efectividad del combate biológico del tratamiento con tres aplicaciones; en el Experimento 1 este tratamiento fue tan efectivo como la aplicación de clorotalonil y la bacteria en seis ocasiones (Cuadro 5), mientras que en el Experimento 2 quedó en un grado intermedio (Cuadro 8), debido quizá a que durante el período del experimento hubo un mes de sequía (Cuadro 9) después de la segunda aplicación y durante este período crítico no se aplicó la bacteria, mientras que en el tratamiento biológico con seis aspersiones se aplicó una vez. Estas circunstancias produjeron que la bacteria no colonizara en la cantidad necesaria para prevenir la germinación y penetración de los conidios de M. rozeri y posiblemente hubo períodos cortos ideales para la infección.

No es conveniente extrapolar los resultados obtenidos con el cv 'UF-29' a todos los cultivares de cacao, tal como ocurre con el combate químico (82); los exudados de la mazorca y los residuos que llegan a ella pueden variar de

cultivar a cultivar, que puede afectar la eficiencia del agente biológico, debido a que no podría trabajar por falta de colonización, por la inactivación del principio antagonista o por la proliferación de otros microorganismos antagonistas al agente biológico. Jiménez *et al* (67) al trabajar con una bacteria antagonista (Pseudomonas sp) a P. palmivora, encontraron que fue excelente antagonista en cinco de los seis cultivares de cacao evaluados. Sin embargo, no previno el ataque del hongo en el cv 'UF-296'.

Estos autores (67) al tratar de explicar el comportamiento de Pseudomonas sp en el cv 'UF-296' señalaron que i) el principio antagónico no se produce en el fitoplano de la mazorca del 'UF-296' por aspectos nutricionales; ii) el principio se produce pero es inactivado por las sustancias o microorganismos que interactúan con la bacteria; iii) la bacteria al interactuar con diferentes microorganismos es incapaz de ejercer su efecto antagónico hacia P. palmivora.

Los resultados del Experimento mostraron el nivel de resistencia del cv 'UF-296' hacia M. rozeri; no hubo diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo, se obtuvo diferencias significativas en el porcentaje de mazorcas cosechadas, las cuales se pueden explicar por la incidencia diferencial de mazorca negra en los diferentes tratamientos. Tanto el tratamiento biológico como el químico redujeron significativamente la incidencia de esta enfermedad, a pesar de que la bacteria M-50, no tuvo *in vitro* efecto antagonista hacia P. palmivora.

La prueba realizada con el cv 'UF-296' se realizaron con el propósito de evaluar la posibilidad de que la resistencia de este cultivar hacia M. rozeri se dieron en gran parte por la existencia de una microflora en su fitoplano altamente antagonista hacia este hongo. Los resultados logrados descartan esta posibilidad y confirman los resultados

recientes de resistencia horizontal (93) que presenta el cultivar hacia M. royeri.

El tratamiento químico redujo en forma significativa la incidencia de moniliasis, comportándose en forma semejante al tratamiento biológico y confirmando la eficacia de este fungicida. A pesar de que en todas las investigaciones realizadas en Costa Rica (32, 58, 61, 84, 92) se ha usado 7.5 g I.A./litro de clorotalonil en este trabajo se aplicó a una concentración de 3.0 g I.A./l. Los resultados muestran que a esta concentración, el fungicida trabaja eficientemente. En el cv 'UF-29' se redujo la incidencia de moniliasis de un 60 a un 19 por ciento. Mientras que Palacios (84) al evaluar combate químico de M. royeri usando el cv 'Pound 7', susceptible a moniliasis como el cv 'UF-29', encontró que seis aplicaciones quincenales de clorotalonil a 7.5 g I.A./l redujeron la incidencia de un 76 a un 19 por ciento. Es necesario realizar una investigación para determinar el umbral de control de la concentración del fungicida.

5.7. Estudio poblacional de las bacterias

La técnica usada para observar la variación de P. aeruginosa en el fitoplano mostró ser efectiva y permitió encontrar correlaciones con fluctuaciones climáticas citadas en la literatura (18, 62) críticas para la supervivencia bacterial, tales como humedad relativa y la precipitación. La población bacteriana declinó con una mayor temperatura promedio; esto se puede explicar por su relación con una menor humedad relativa, sequedad y con la alta radiación, que son factores altamente nocivos para la supervivencia de la bacteria.

Solamente en el Experimento 1 hubo correlación significativa radiación solar con la población bacterial.

Probablemente la respuesta se encuentra en el nivel de sombra que presentan las parcelas donde se realizaron los experimentos. En el Experimento 1 el nivel de sombra oscilaba entre 30-40 por ciento mientras que el segundo experimento se localizó en árboles que tenían una sombra más densa, oscilando entre 50-60 por ciento.

La cepa bacterial usada para determinar la fluctuación no presentó las mismas características antagónicas de la cepa M-50 utilizada en el combate biológico. En pruebas posteriores se observó que la cepa resistente a estreptomycin perdió en un 50 por ciento sus propiedades antagónicas a M. royeri; no se puede afirmar con certeza que la cepa M-50 silvestre tenga el mismo comportamiento que la M-50 resistente al antibiótico.

A pesar de los inconvenientes de la técnica, los resultados logrados concuerdan con diferentes investigaciones en el fitoplano. Dennis (34) al estudiar la microflora en diferentes frutos suaves como la frambuesa y fresa encontró que las bacterias colonizan este tipo de frutas entre 1×10^{10} a 1×10^6 UCB/g. El autor sugiere que la microflora bacterial en estos frutos no es alta debido a que el fitoplano está colonizado por una serie de hongos, que compiten en forma exitosa con las bacterias epífitas.

Spurr y Knudsen (100) afirman que las bacterias epífitas por lo general están en un rango entre 10^3 - 10^4 UCB/cm² y que para tener éxito contra un patógeno es necesario que la bacteria antagonista colonice el fitoplano en una forma agresiva que permita colonizar el tejido al menos con 10^5 UCB/m². Según los resultados logrados en esta investigación, P. aeruginosa es capaz de colonizar el fitoplano de la mazorca de cacao en el periodo crítico del ataque de M. royeri durante los primeros tres meses, en los cuales la población no bajó de 10^7 UCB/cm², esto ayuda a explicar

porque la bacteria logró controlar eficientemente la enfermedad.

En estudios efectuados por Knudsen en pino, citados por Spurr y Knudsen (100), encontraron que la bacteria antagonista (P. fluorescens) del hongo Gremmemella abietina al ser inoculada sobre plántulas de pino, no declinan en concentración durante la noche, pero sí durante el día siguiente, soleado y cálido; en determinaciones que realizaron mediante recuentos horarios utilizando un medio selectivo.

Los estudios de Knudsen concuerdan con los resultados de combate biológico de M. roreri de la presente investigación las condiciones del cacao, la forma y el número de veces que se incorporó la bacteria (seis veces en turba por los primeros tres meses) y la característica de ser epífita, dan bases para esperar una alta supervivencia de P. aeruginosa en condiciones de campo. Además, según Fulton (53), la mazorca de cacao puede permanecer con una película de agua al menos 16 horas por día en condiciones del bosque trópico húmedo, lo cual permite que la bacteria esté colonizando en alto porcentaje la superficie de la mazorca y que los mecanismos de antagonismo estén activos.

Los estudios de población se hicieron en mazorcas en que la bacteria fue aplicada quincenalmente en los primeros tres meses de vida de la mazorca utilizando la técnica de lavado. Es necesario realizar nuevos estudios para confirmar los resultados presentados aquí para observar la población bacterial, por ejemplo si se aplica la bacteria 2, 3 ó 4 veces, tratando de evaluar la capacidad de residualidad o supervivencia de la bacteria en mazorcas por períodos mayores a 15 días. Además es necesario otros métodos de extracción y de recuento, porque se ha demostrado que la metodología de

lavado usada en la presente investigación extrae entre el 60-80% de la población epífita (62).

Entre los métodos de estudios la población bacteriana que podrían desarrollarse e implantarse está, el uso de un medio selectivo para *P. aeruginosa*, con lo cual se evitaría usar una bacteria diferente a la silvestre y segundo usar la centrifugación, la trituration o la agitación con un artefacto que realiza presión sobre la mazorca para lograr extraer la mayor cantidad de microorganismos epífitos. Además es necesario conocer la distribución de la bacteria en las mazorcas, tratando de uniformizar el lugar de muestreo para la metodología de extracción por centrifuga o con un agitador de vidrio. Estos estudios de distribución espacial de mazorcas podrían ayudar a identificar bacterias antagonistas más eficientes que la M-50 porque estudios citados por Fulton (53) han determinado que las esporas de *M. roreri* se acumulan en mayor proporción en el ecuador de la mazorca. Esto sugiere la búsqueda de microorganismos antagonistas que tengan una alta adaptación a esta zona de la fruta.

5.8. Futuro del combate biológico de *M. roreri*

Se deben realizar otras investigaciones antes de hacer la transferencia de este tipo de combate al agricultor. Pero se debe determinar el tipo de plantaciones de cacao donde se puede aplicar este combate.

Debido a las características de la bacteria, el combate biológico es factible en regiones del bosque tropical húmedo en plantaciones de productividad intermedio o alta y con un nivel de tecnología intensiva adecuada. Además, el combate debería ser aplicado en los picos de producción, como lo

sugiere González (58, 59) en la utilización de combate químico para M. roreri.

Para implementar el combate biológico es necesario primero confirmar los resultados obtenidos; realizar el mismo ensayo en diferentes cultivares y llevar recuentos de la bacteria antagonista, utilizando métodos más eficaces de detección (100) en cada uno de los tratamientos biológicos. Esta investigación contestará la pregunta sobre la estabilidad de la bacteria en los cultivares más usados e indicará el número de aplicaciones necesarias para efectuar un combate adecuado.

Por los problemas de patogenicidad de P. aeruginosa y para evitar depender de un solo microorganismo es necesario realizar nuevos aislamientos de bacterias epífitas altamente antagonistas a M. roreri. La posibilidad de manipulación genética de la bacteria debe estar presente si es difícil aislar una bacteria de otra especie que presente las características de antagonismo y adaptación de la M-50.

Al mismo tiempo que se realiza la anterior investigación, es necesario realizar estudios básicos de ecología microbiana en el fitoplano de la mazorca de cacao para determinar los diferentes microorganismos epífitos, así como sus requerimientos nutricionales, interrelaciones y distribución espacial en este microambiente. Estos estudios básicos abrirán otras vías de combate biológico que pueden ser aplicados a M. roreri; como por ejemplo, la manipulación nutricional del fitoplano. Lindow (78), Spurr y Knudsen (100) han mostrado que esta vía es efectiva en pera, manzana y pino, conociendo los requerimientos nutricionales de los principales microorganismos epífitos, para manipular la población al agregar un determinado nutrimento. Con esta manipulación un microorganismo que está en minoría pasa a dominar completamente el ambiente y con ello controla la

acción de un determinado patógeno. Pseudomonas fluorescens son activadas por la aplicación de urea en el fitoplano (16), con lo cual, en forma preliminar se pueden hacer pruebas sobre el efecto de la aplicación de este nutrimento en la superficie de la mazorca.

El combate biológico debe ser un componente del combate integrado de la moniliasis del cacao, donde los otros componentes lo constituyen el combate sanitario, cultural y químico. Para establecer un combate de este tipo se debe de estudiar la susceptibilidad de la bacteria ante los agentes químicos más usados con la moniliasis: clorotalonil y cobre. Por diversos estudios citados por Hislop (63) posiblemente el cobre tenga un efecto detrimental sobre la bacteria, por lo cual el único componente químico de este combate integrado es el clorotalonil. La tarea, consistiría en determinar el número de aplicaciones necesarias de la bacteria y el agente químico y asimismo su rentabilidad.

Por último se debe investigar la reproducción rentable de la bacteria, y su formulación para el agricultor. El desarrollo y uso de formulaciones para agentes de combate biológico pueden determinar el éxito o fracaso, debido a que las formulaciones facilitan la aplicación, dispersión y supervivencia del antagonista (100). Existe evidencia que sugiere que la introducción exitosa de antagonistas y del combate biológico depende más de la formulación y de la aplicación que del tipo antagonista seleccionado. Por tal motivo se debe poner atención al material que acompañe al agente biológico.

6. CONCLUSIONES

1. En los primeros estadios de desarrollo de la mazorca de cacao, el fitoplano está colonizado principalmente por bacterias.
2. Las bacterias, por su capacidad de adaptación a condiciones pobres de nutrición, son microorganismos aptos para el combate biológico de M. royeri.
3. Una mínima proporción (5 por ciento) de la microflora aislada del fitoplano de la mazorca presentó alto antagonismo in vitro hacia M. royeri.
4. De 42 aislamientos realizados solo el M-50 caracterizado como Pseudomonas aeruginosa (Schroeter), presentó un alto antagonismo a nivel de laboratorio y campo.
5. La cepa M-50 asperjada de tres a seis veces en los primeros tres meses de desarrollo de mazorcas en el cv 'UF-29' previenen el ataque de M. royeri; comportándose estadísticamente igual a la aspersión en seis ocasiones de clorotalonil.
6. Para que exista combate biológico sobre M. royeri es necesario que el agente biológico colonice el fitoplano al menos con 10^8 UCB/cm² en la época crítica del ataque del hongo.
7. La fluctuación poblacional de P. aeruginosa sobre la superficie de azorcas de cacao se correlacionó positivamente con la precipitación y humedad relativa mínima en forma negativa con la radiación solar, y con el promedio mínimo y general de temperatura.

8. El mecanismo de antagonismo de P. aeruginosa hacia M. roreri se basa en competencia por nutrimentos y antibiosis, posiblemente del tipo sideroforos.

7. RECOMENDACIONES

1. Es necesario seguir seleccionando cepas bacteriales epifitas antagonistas a M. roreri, tratando de seleccionar aquellas que tengan las propiedades antagonistas de la M-50, pero sin los riesgos sobre el hombre que tiene dicha cepa.
2. Explorar diversas metodologías de selección de antagonistas.
3. Validar los resultados encontrados en diferentes cultivares, épocas y zonas, determinando con ello el ámbito de acción de este combate biológico.
4. Estudiar la fluctuación poblacional de la bacteria en el fitoplano usando diferentes metodologías tales como cultivos selectivos, aplicando agitación o fuerza de gravedad para separar las bacterias del fitoplano.
5. Realizar estudios básicos de ecología microbiana dándole énfasis a los componentes nutricionales, físicos e interrelación de los microorganismos en el fitoplano de la mazorca de cacao.
6. Investigar formulaciones, tiempo y temperaturas de incubación, condiciones de almacenaje del inoculante, lo cual permitirá conocer los parámetros para optimizar el inóculo del agente biológico.

B. LITERATURA CITADA

1. ALEXANDER, M. 1971. Microbial Ecology. New York, John Wiley. 511 p.
2. ALVIM, P. T. 1977. Cacao. In Ecophysiology of tropical crops. Ed. by T. T. Koslowski. New York, Academic Press. p. 279-310.
3. ANDREWS, J. H.; BERBEE, F. M.; NORDHEIM, E. V. 1983. Microbial antagonism to the imperfect stage of the apple scab pathogen, Venturia inaequalis. Phytopathology (EE.UU) 73:228-234.
4. _____. 1985. Strategies for selecting antagonistic microorganisms from the phylloplane. In Biological control on the phylloplane. Ed. by C. E. Windels, S. E. Lindow. St. Paul, Mn, APS. p. 31-44.
5. ARTMAN, J. D. 1973. Further test in Virginia using chain saw-applied Peniophora gigantea in loblolly pine stump inoculation. Plant Disease Reporter (EE.UU.) 56:958-960.
6. BAKER, K. F.; COOK, R. J. 1974. Biological control of plant pathogens. San Francisco, Calif., Freeman. 433 p.
7. BAILEY DE I., A. M.; GARCIA ESPINOZA, R. 1978 Algunos organismos antagonicos a Phytophthora palmivora causante de la pudrición negra de la mazorca del cacao. Fitopatología (Chile) 13(2):97-102.
8. BARROS, O. 1977. Investigaciones sobre el hongo Monilia rozeri Cif. y Par. causante de la pudrición acuosa de la mazorca del cacao: sus daños y su control. Cacaotero Colombiano (Col.) no. 3:42-51.
9. _____. 1982. Avances en la represión de la moniliasis del cacao. In International Cacao Research Conference. 48 th, Cartagena, Colombia, 1981). Proceedings. Lagos, Nigeria, Cocoa Producers' Alliance. p. 401-405.
10. BASTOS, C. N.; EVANS, H. C.; SAMSON, R. A. 1981. A new by perparasitic fungus, Cladobotryum amazonense, with potential for control of fungal pathogens of cocoa. Transactions of the British Mycological Society (G. B.) 77(2):273-278.

11. BEER, S. V.; RUNDLE, J. R. 1980. Inhibition of Erwinia amylovora by bacterocin like substances. *Phytopathology (EE.UU.)* 70:459.
12. 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.
13. 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. p. 223-274.
14. BLAKEMAN, J. P. 1971. The chemical environment of the leaf surface in relation to growth of pathogenic fungi. *In* *Ecology of leaf surface microorganisms*. Ed. by T. F. Preece; C. H. Dickinson. London, Academic Press. p. 255-268.
15. _____.; BRODIE, I. D. 1976. Inhibition of pathogens by epiphytic bacteria on serial plant surfaces. *In* *Microbiology of aerial plant surfaces*. Ed. C. H. Dickinson; T. F. Preece. New York, Academic Press. p. 529-558.
16. _____.; FOKKEMA, N. J. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annual Review of Phytopathology (EE.UU.)* 20:167-192.
17. _____. 1985. Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. *In* *Biological control on the phylloplane*. Ed. by C. E. Windels; S. E. Lindow. St. Paul, Mn, APS. p. 6-31.
18. BRAVO, N.; VICTORIA, J. 1981. Posibilidades del control biológico de la moniliasis (Moniliophthora roreri Evans) del cacao. *Actas agronómicas (Col.)* 31(1/4): 133-141.
19. BRENES, D. 1983. Evaluación de la resistencia a Monilia roreri y su relación con algunas características morfológicas del fruto de cultivares de cacao (Theobroma cacao L.). Tesis Mag. Sc. Turrialba, C. R.; UCR/CATIE. 60 p.

20. BRENES, O; SANCHEZ, J. A.; ENRIQUEZ, G. A. 1984. Incidencia natural y artificial de moniliasis en cultivares de cacao. In Congreso Agronómico Nacional (6, 1984, San José, C. R.). Resúmenes. San José, C. R.; Colegio de Ingenieros Agrónomos. p. 186-187.
21. BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. E. (Editors). 1974. Bergey's Manual of determinative bacteriology. 8th edition. Baltimore, Williams y Williams. 1208 p.
22. BURRAGE, S. W. 1976. Aerial microclimate around plant surfaces. In Microbiology of aerial plant surfaces. Ed. by C. H. Dickinson; T. F. Preece. New York, Academic Press. p. 173-184.
23. BURTON, J. C. 1981. Rhizobium inoculants for developing countries. Tropical Agriculture (Trinidad) 58(4): 291-295.
24. CHO, J.J.; GREEN, S.K.; SCHROTH, M. and KOMINOS, S. 1973. Potted ornamental plants as a possible source for the introduction of Pseudomonas aeruginosa into the hospital. Phytopathology. 63:1215.
25. CHO, J. J.; PANOPoulos, N. J. and SCHROTH, M. N. 1975. Genetic transfer of Pseudomonas aeruginosa. R Factor, to plant pathogenic Erwinia species. Journal of Bacteriology 122(1):192-198.
26. CHON LONG, L. E. 1977. Evaluación de fungicidas en el control de la podredumbre negra de la mazorca (Phytophthora palmivora (Butler Butler) del cacao (Theobroma cacao L.) en Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, UCR-CATIE. 64 p.
27. CIFERRI, R.; PARODI, E. 1934. Descrizione del fungo che causa de "Moniliase" del cacao. Review of Applied Mycology (EE.UU.) 13:291-292.
28. 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. p. 401-418.
29. COOK, R. J.; BAKER, K. F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, MN, APS. 539 p.

30. COOK, R. J. 1985. Biological control of plant pathogens: Theory to application. *Phytopathology* (EE.UU.) 75(1):25-29.
31. COSTA, A. S.; MULLER, G. A. 1984. Tristeza control by cross protection: A U.S. - Brasil cooperative success. *Plant disease* (EE.UU.) 64:538-541.
32. CRUZ, C.; PORRAS, V.; GALINDO, J. J. 1986. Evaluación de la remoción de frutos, la polinización artificial y la aplicación de fungicidas sobre la incidencia de la moniliasis y la producción de cacao. *In* Congreso Agronómico Nacional (7., 1986, San José, C.R.). Resúmenes. San José, C.R., Colegio de Ingenieros Agrónomos de Costa Rica/Sociedad Americana de Ciencias Hortícolas. *Región Tropical*. v. 1, p. 23-24.
33. 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. p. 199-216.
34. 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. p. 419-432.
35. DESROSIERS, R. BUCHWALD, A. VON; BOLANOS, C. 1955. Efectos de la precipitación pluvial sobre los casos de moniliasis del cacao en el Ecuador. *Boletín Fitosanitario de la FAO* 3(11):161-164.
36. DEVAY, J. E.; LUKEZIC, F. L.; SINDEN, S. L.; ENGLISH, H.; COPLIN, D. L. 1968. A biocide produced by pathogenic isolates of *Pseudomonas syringae* and its possible role in the bacterial canker disease of peach trees. *Phytopathology* (EE.UU.) 58:95-101.
37. DICKINSON, C. H. 1976. Fungi on the aerial surface of higher plants. *In* *Microbiology of aerial plant surfaces*. Ed. by C. H. Dickinson; T. F. Preece. New York, Academic Press. p. 293-324.
38. DICKINSON, C.; WATSON, J.; WALLACE, B. 1974. An impression method for examining epiphytic microorganisms and its application to phylloplane studies. *Transactions of the British Mycological Society* (G.B.) 63:616-19.
39. DOWLER, W. M.; WEAVER, D. J. 1975. Isolation and characterisation and fluorescent *Pseudomonas* from

apparently healthy peach trees. *Phytopathology* (EE.UU.) 65:233-236.

40. DUBOS, B. 1984. Biocontrol of Botrytis cinerea on grapevines by an antagonistic strain of Trichoderma harzianum. In Currents perspectives in microbial ecology. Ed. by M. S. Klug; L. A. Riddy. Washington, American Society of Microbiology. p. 370-373.
41. ENRIQUEZ, g. A.; SORIA, V. J. 1967. Catalogo de cultivares de cacao. Turrialba, Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. p. irr.
42. _____.; SUAREZ, C. 1978. Monilia disease of cocoa in Costa Rica. *Turrialba (C.R.)* 28(4):339-340.
43. _____.; SORIA, A. J. 1981. Mejoramiento genético para la resistencia a cinco enfermedades del cacao. CATIE. Serie materiales de enseñanza no. 9. 35 p.
44. _____. 1983. El cultivo de cacao: curso corto. Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Departamento de Producción Vegetal. 162 p.
45. EVANS, H. C. 1981. Pod rot of cacao caused by Moniliophthora (Monilia) roreri. Commonwealth Mycological Institute. *Phytopathological papers* no. 24. 44 p.
46. EVANS, H. C.; STALPERS, J. A.; SAMSON, R. A.; BENNY, G. L. 1978. On the taxonomy of Monilia u=roreri, an important pathogen of Theobroma cacao in South America. *Canadian Journal of Botany (Can)* 56(20):2528-2532.
47. FERNANDEZ, B.; BRUNKER, T.; SALGADO, E. 1980. *Microbiología básica y aplicada: Manual de laboratorio*. 2 ed. San José. Universidad de Costa Rica. 154 p.
48. FIGUEIREDO, J. M.; SANTOS, A. L.; BASTOS, C. N. 1975. Inhibition of P. palmivora Butl, in vitro and in vivo with the active principle of Aspergillus tamarri (kitii), partially purified. *Boletim do Instituto Biológico de Bahía (Bra.)* 14(1):36-43.

49. FIGUEIREDO, J. M.; MEDEIROS, A. G. 1977. Algunos hongos antagonicos a Phytophthora palmivora Butl comun en planta de cacao. In Centro de Pesquisas do Cacau, Ilheus, Brasil. Informe técnico 1976. Ilhéus, Bahía. p. 78-79.
50. FOKKEMA, N. J.; LORBEER, J. W. 1974. Interactions between Alternaria porri and the saprophytic mycoflora of onion leaves. *Phytopathology* (EE.UU.) 64:1128-33.
51. _____. 1976. Antagonism between fungal saprophytes and pathogens on aerial plant surfaces. In *Microbiology of aerial plant surfaces*. New York. Academic Press. p. 487-506.
52. _____.; DEN HOUTER, J. G.; KOSTERMAN, S.; NELIS, A. L. 1979. Manipulation of yeasts on field grown wheat leaves and their antagonistic effect on Cochliobolus sativas and Septaria nodorum. *Transaction of the British Mycological Society* (G.B.) 72:19-29.
53. FULTON, L. H. 1986. Combate de la moniliasis por medios quimicos. In Seminario sobre moniliasis del cacao, 2., 1986, Turrialba, C. R.). Turrialba, Costa Rica, CATIE. (en prensa).
54. GALINDO, J. J.; ENRIQUEZ, G. 1983. Investigaciones realizadas sobre la moniliasis del cacao en Centro y Sur América. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 28 p. (Presentado en: Reunión Anual de la American Phytopathological Society, Caribbean Division, 23, Panamá, 1983).
55. _____.; ENRIQUEZ, G.A. 1984. Estrategias para el combate de la moniliasis del cacao. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 30 p.
56. _____. 1985. Enfermedades del cacao de importancia económica en América. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 26 p. (Presentado en: Reunión Anual de la American Phytopathological Society, Caribbean Division, 25; Guanajuato, México, 1985).
57. GODFREY, B. E. 1976. Leachater from aerial parts of plants and their relation to plant surface microbial populations. In *Microbiology of aerial plants surfaces*. Ed by C. H. Dickinson; T. F. Preece. New York, Academic Press. p. 433-440.

58. GONZALEZ, L. C.; SANCHEZ, J. A.; PORRAS, V. H.; UMAÑA, S.; MURILLO, D. 1983. Evaluación del fungicida clorotalonil y de la destrucción de mazorcas enfermas en el combate de la moniliasis del cacao. *Agronomía Costarricense*, (C.R.) 7(1/2): 1-7.
59. _____. 1984. Avances en el combate de la moniliasis del cacao en Costa Rica. In *Congreso Agronómico Nacional* (6, 1984, San José, C.R.). Sesiones de actualización y perspectivas. San José, C. R. Colegio de Ingenieros Agrónomos. v. 3, p. 177-188.
60. GOODMAN, R. N. 1967. Protection of apple stem tissue against *Erwinia amylovora* by avirulent strains and three other bacterial species. *Phytopathology* (EE.UU.) 57:22-24.
61. GUEVARA, C.; PORRAS, V.; GALINDO, J. J. 1986. Evaluación de sistemas integrados para combate de moniliasis e incremento de la producción de cacao. In *Congreso Agronómico Nacional* (7., 1986, San José, C. R.). 1986. Resúmenes. San José, C. R. Colegio de Ingenieros Agrónomos de Costa Rica/Sociedad Americana de Ciencias Hortícolas. Región Tropical. v. 1, p. 24-25.
62. HIRANO, S. S.; UPPER, C. D. 1983. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* (EE.UU.) 21:243-264.
63. 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. p. 41-74.
64. HOLDRIDGE, L. R. 1979. Ecología basada en zonas de vida. San José, Costa Rica, IICA. 216 p.
65. HOLLIS, J. P. 1952. On the origin of diseases in plants. *Plant Disease Reporter* (EE.UU.) 36:219-27.
66. JIMENEZ, F. 1986. Caracterización climática de la Finca "La Lola". Turrialba, CATIE. 21 p. (mimeografiado).

67. JIMENEZ, J. M.; GALINDO, J. J.; RAMIREZ, C. 1986. Estudios preliminares sobre combate biológico de Phytophthora palmivora mediante bacterias epifitas en Costa Rica. In Congreso Agronómico Nacional (7., 1986, San José, C. R.). 1986. Resúmenes. San José, C. R., Colegio de Ingenieros Agrónomos de Costa Rica. Sociedad Americana de Ciencias Hortícolas, Región Tropical. v. 1.; p. 28-30.
68. JOHNSON, D. E. 1931. The antibiosis of certain bacteria to smuts and some other fungi. *Phytopathology (EE.UU.)* 2: 843-63.
69. LAST, F. T. 1955. Seasonal incidence of Sporobolomyces on cereal leaves. *Transactions of the British Microbiological Society (G. B.)* 38:221-239.
70. LEBEN, C. 1964. Influence of bacteria isolated from healthy cucumber leaves on two leaf diseases cucumber. *Phytopathology (EE.UU.)* 54:405-408.
71. LEBEN, C. 1965. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. *Annual Review of Phytopathology (EE.UU.)* 3:209-230.
72. _____.; DAFT, G. C.; WILSON, J. D.; WINTER, H. F. 1965. Field tests for disease control by an epiphytic bacterium. *Phytopathology (EE.UU.)* 55:1375-1376.
73. _____.; 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.
74. _____. 1985. Introductory remarks biological control strategies in the phylloplane. In *Biological control on the phylloplane*. Ed. by C. E. Windels; S. E. Lindow. St. Paul, Mn, APS. p. 1-6.
75. LEON, E.; ACUÑA, O. y RAMIREZ, C. 1986. Evaluación de la reproducción y sobrevivencia de bacterias del género Rhizobium en suelo de turba de la zona de Medio Queso, Los Chiles, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 10 (1/2) 33:41.
76. LINDOW, S. E. 1979. Frost damage to potato reduced by bacteria antagonistic to ice nucleation-active bacteria. *Phytopathology (EE.UU.)* 69:1036.
77. LINDOW, S.E. 1983. Methods of preventing frost injury through control of epiphytic ice nucleation active

bacteria. Plant Disease Reporter (EE.UU.) 67:327-333.

78. 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. p. 83-115.
79. MERCHAN, V. 1981. Avances de la investigación de la moniliasis del cacao en Colombia. Cacaotero Colombiano (Col.) 16:14-26.
80. _____. 1982. Avance en la investigación de la moniliasis del cacao en Colombia. In La moniliasis del cacao; compendio. Ed. por G. A. Enríquez. Turrialba, C. R., CATIE. p. 53-69.
81. MORRIS, C. E. and 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. p. 63-82.
82. MURILLO, D. 1983. Evaluación de nuevos fungicidas para el combate de Monilia roreri, causante de la moniliasis del cacao. Tesis Ing. Agr. San José, C. R., Universidad de Costa Rica. 42 p.
83. ODIGIE, E.; IKOTUN, T. 1978. In vitro and in vivo inhibition of growth of Phytophthora palmivora Butl. by antagonistic microorganisms. Fitopatologia Brasileira 7(2):157-167.
84. PALACIOS, J. R.; PORRAS, V. H.; GALINDO, J. J. 1986. Evaluación de fungicidas para el combate de Monilia roreri y Phytophthora palmivora en clones de cacao de conocida resistencia. In Congreso Nacional (13, 1986, Chiapas, Méx.). Memorias. s.l.s.n. p. 65.
85. PALUMBO, S. 1973. Role of iron and sulfur in pigment and slime formation by Pseudomonas aeruginosa. Journal of Bacteriology 111(2): 430-436.
86. _____. 1973. Influence of sulfite on growth, slime, and fluorescent pigment formation by Pseudomonas aeruginosa. Canadian Journal Microbiology 19:505-511.
87. PHILLIPS, W.; GALINDO, J. J. 1985. Reaction of cacao cultivares to inoculation with Monilia roreri Cif y Par.) Phytopathology (USA) 76:375.

88. PORRAS, V. H.; GONZALEZ, L. C. 1984. Epifitiología de la moniliasis del cacao (Monilia rozeri Cif y Par.) y su relación con el ciclo de producción en la zona de Matina, Costa Rica. *Fitopatología (Chile)* 19(2):78-84.
89. _____.; GONZALEZ, L.C. 1982. Capacidad de liberación de mazorcas enfermas dejadas en el árbol de cacao. In Congreso Agronómico Nacional (5, 1982, San José). Resúmenes. San José, Costa Rica, Colegio de Ingenieros Agrónomos. v. 1. p. 57-58.
90. _____.; GALINDO, J. J. 1984. Efecto de niveles de inóculo y uso de "cámara húmeda" para evaluar la resistencia de cacao a Monilia rozeri Cif. y Par. *Phytopathology (USA)* 75:1178.
91. _____. 1982. Epifitiología de la moniliasis (Monilia rozeri) del cacao y su relación con la producción del árbol en la zona de Matina. Tesis Ing. Agr. San José, C. R., Universidad de Costa Rica, Facultad de Agronomía. 47 p.
92. _____.; GALINDO, J. J. 1985. Effect of fungicide and pod removal on moniliasis and black pod incidence and hand pollination on cacao yield. *Phytopathology (USA)* 76:376.
93. _____. 1985. Determinación de la estabilidad de la resistencia a Monilia rozeri Cif. y Par. en cultivares de cacao en dos zonas de Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, UCR/CATIE. 124 p.
94. PURDY, L. H. 1986. Situación del patógeno causante de la moniliasis. In Seminario sobre Moniliasis del cacao, 2, 1986, Turrialba, Costa Rica). Turrialba, CATIE. (en prensa).
95. RISBETH, J. 1963. Stump-Protection against *Fomes annosus*. 3. *Annals of Applied Biology (G. B.)* 52:63-67.
96. RUINEN, J. 1961. The phyllospere. 1. An ecologically neglected mileu. *Plant and Soil* (Holanda) 15:81-109.
97. SANCHEZ, J. A. 1982. Reacción de cultivares de cacao a la inoculación artificial con Monilia rozeri. Tesis Mag. Sc. Turrialba, C. R., UCR/CATIE. 55 p.

98. SCHROT, M. N.; LOPEZ, J. E.; HILLDEBRAND, D. C.
Bacteria as biocontrol agent of plant disease. In
current perspective in microbial ecology. Ed. by
M.S. Klug; L.A. Riddy. Washington, American
Society of Microbiology. p. 362-364.
99. SKIDMORE, A. M. 1976. Interactions in relation to
biological control of plant pathogens. In
Microbiology of aerial plant surfaces. Ed. by C.
H. Dickinson; T. F. Preece. New York, Academic
Press. p. 507-528.
100. SPURR, H. W.; KNUDSEN, G. 1985. Biological control of
leaf diseases with bacteria. In Biological control
on the phylloplane. Ed. by C. E. Windels; S. E.
Lindow. St. Paul, Mn, APS. p. 45-62.
101. STEEL, R. y TORRIE, J. 1985. Bioestadística:
Principios y Procedimientos. II ed. México,
McGraw-Hill. 525 p.
102. SUAREZ, C. 1971. Estudio del mecanismos de penetración
y del proceso de infección de Monilia rozeri Cif.
and Par. en frutos de cacao (Theobroma cacao L.).
Tesis Ing. Agr. Guayaquil, Ecuador, Universidad.
54 p.
103. _____. 1982. El problema de la moniliasis y su combate
en el Ecuador. In La moniliasis del cacao,
compendio. Ed. por G. A. Enriquez. Turrialba, C.
R.; CATIE. p. 70-87.
104. SWINBURNE, T. R. 1973. Microflora of apple leaf scars
in relation to infection by Nectria galligena.
Transaction of the British Mycological Society (G.
B.) 60:389-403.
105. _____.; BAU, J. G.; BROWN, A. E. 1975. Production of
antibiotics by Bacillus subtilis and their effect
on fungal colonists of apple leaf scars.
Transaction of the British Mycological Society (G.
B.) 85:211-217.

106. TELIS-ORTIZ, M.; BURKHOLDER, W. H. 1960. A strain of Pseudomonas fluorescens antagonistic to Pseudomonas phaseolicola and other bacterial plant pathogens. Phytopathology (EE.UU.) 50:119-123.
107. THOMSON, 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 amylovora. Phytopathology (EE.UU.) 66:1457-1459.
108. 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.
109. _____.; YSTASS, J. 1980. Biological control of Botrytis cinerea on apple. Plant Disease (EE.UU.) 64:1009.
110. VARGAS, E. 1984. Interacción del tratamiento biológico y químico en el combate de ojo de gallo (Mycena centricolor) en el cafeto. Agronomía Costarricense (C. R.)
111. VARGAS, R. 1981. Combate biológico del mal del talluelo causado por el hongo Rhizoctonia solani en algodón (Gossypium hirsutum) mediante el uso de bacterias antagonistas. Tesis Ing. Agr. San José, C.R., Universidad de Costa Rica. 113 p.
112. WARREN, R. C. 1972. Interference by common leaf saprophytic fungi with the development of Phoma betae lesions on sugarbeet leaves. Annals of Applied Biology (G. B.) 72:137-144.
113. _____. 1976. Microbes associated with buds and leaves: some recent investigations on deciduous trees. In Microbiology of aerial plant surfaces. New York, Academic Press. p. 361-374.

Cuadro 1 A. Datos meteorológicos promedio de varios años en la Finca La Lola, Matina, Costa Rica (66)

Elemento	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	X
Lluvias mm	306	211	171	221	279	308	397	290	189	245	417	499	3534
Brillo Solar													
Horas/día	4,4	5,1	5,0	4,9	4,7	3,8	3,5	4,3	4,8	4,6	4,0	3,8	4,4
Temperatura C													
Promedio	23,6	23,8	24,3	24,8	25,5	25,5	25,1	25,2	25,3	25,1	24,5	23,9	24,7
Máxima	28,9	29,1	29,7	30,0	30,7	30,6	30,0	30,3	30,8	30,4	29,4	28,9	29,9
Mínima	19,1	19,2	19,7	20,4	21,2	21,2	21,0	21,0	20,6	20,6	20,4	19,7	20,3
H.R. %													
Promedio	86	85	83	83	83	87	88	87	84	86	88	88	85,7
Mínimas	60	58	57	60	61	63	65	62	58	60	63	63	60,8
Radiación Solar													
Cal/cm /día	223	271	288	296	283	259	253	246	269	255	227	206	259

Los datos de lluvia y radiación solar comprenden desde el año 1949 y 1968 respectivamente; los demás elementos climáticos desde 1952 hasta 1985.

Cuadro 2 A. Datos meteorológicos en la finca "La Lola", Matina, Limón, del año 1985 (66).

Mes	Temperatura C			pptación mm	Radiación Cal/cm /día	Humedad Relativa %	
	Prom.	Max.	Min.			Prom.	Mínima
Enero	22,2	29,5	17,5	89,0	350,7	89,9	61,8
Febrero	23,7	29,1	19,0	238,9	367,1	89,2	62,0
Marzo	23,8	30,0	18,2	69,4	390,5	86,9	60,4
Abril	24,8	30,7	19,6	104,6	411,8	86,9	58,8
Mayo	25,2	30,8	20,2	131,6	-	86,5	64,3
Junio	24,3	29,0	21,0	488,8	282,9	91,8	74,4
Julio	23,6	28,8	20,1	200,0	291,9	91,0	71,6
Agosto	23,7	28,7	20,2	351,1	299,3	87,1	68,3
Setiembre	24,3	30,8	20,2	180,6	336,9	89,7	69,8
Octubre	24,8	30,6	20,1	202,6	318,2	89,4	68,8
Noviembre	24,5	30,0	20,9	209,8	285,7	91,1	72,6
Diciembre	24,4	29,6	19,7	231,7	282,4	90,5	70,0

Cuadro 3 A. Resumen del Análisis de Varianza (Cuadrados Medios) para las variables:
 incidencia de moniliasis, mazorca negra y mazorcas cosechadas en el
 Experimento 1.

F. de Variación	G.L	Cuadrados Medios		
		Moniliasis	Mazorca Negra	Mazorcas Cosechadas
Bloques	3	79,5	197,4	80,7
Tratamiento	5	2333,9 ^{xx}	307,8 ^x	1614,4 ^{xx}
Error	15	53,5	97,1	39,5
Total	23			
Coef. de Variación		23,3	48,3	13,1

x : significativo con un $\alpha \leq 0,05$

xx : altamente significativo con un $\alpha \leq 0,01$

Cuadro 4 B. Fluctuación longitudinal de la población de Pseudomonas aeruginosa en la en la superficie de la mazorca de cv 'UF-29' y elementos climáticos durante el Exp. 1 (1 de junio al 2 de octubre, 1985) "La Loíla", Matina, Limón.

Fecha	Log UCB/cm	pptación mm	H.R. %	H.R. promedio	Radiación cal/cm /día	T C		T C mínima
						promedio	máx.	
1-15 junio	5,0	121,7	73,5	90,9	331,6	24,4	29,0	20,8
15-30 junio	5,7	66,3	75,2	92,5	255,7	24,2	29,1	21,2
1-13 julio	5,8	131,9	71,0	90,5	308,1	23,7	29,0	20,0
14-26 julio	5,8	56,4	72,5	91,7	267,4	23,5	28,4	20,2
27-9 agosto	6,0	187,6	71,3	89,5	283,1	23,3	28,4	20,1
10-29 agosto	5,3	145,3	68,2	86,9	302,9	23,8	28,8	20,3
30-13 setiembre	6,5	174,2	74,6	86,5	298,6	23,6	29,6	20,2
14-20 octubre	4,6	36,3	64,1	83,0	361,5	24,9	30,1	19,0

Cuadro 5 A. Fluctuación longitudinal de la población de Pseudomonas aeruginosa en la superficie de la mazorca del cv 'UF-29' y de elementos climáticos durante el Exp. 2 (24 de julio al 19 de noviembre, 1985) "La Lola", Matina, Limón.

Fecha	Log UCB/cm	precipitación -mm-	H.R. mínima %	H.R. promedio %	Radiación cal/cm /día	T C promedio	T C máx.	T C mínima
24 de julio a 9 de agosto	6,5	87,1	71,6	89,8	281,4	23,3	28,3	20,2
10-27 agosto	6,1	129,0	68,8	86,9	307,7	23,9	28,7	20,3
27-15 set.	6,7	215,9	73,2	86,6	276,9	23,6	29,6	20,1
14-1 oct.	4,8	43,6	67,5	83,0	360,1	24,9	31,8	20,1
2-15 oct.	5,2	46,6	68,4	89,0	291,4	24,7	30,4	20,5
16-31 oct.	6,1	154,1	68,8	89,6	341,6	25,0	30,8	19,9
1-19 nov.	5,3	174,2	74,5	91,5	270,5	24,6	29,7	21,3

Cuadro 6 A. Resumen del Análisis de Varianza (Cuadrados Medios) para las variables: porcentaje de mazorcas cosechadas, incidencia de moniliasis y mazorca negra en el Experimento No.2.

F. de Variación	G.L.	Cuadrados Medios		
		Mazorca Cosechada	Moniliasis	Mazorca negra
Bloques	3	60,3	53,3	101,0
Tratamientos	5	1829,9 xx	1718,2 xx	70,4
Error	15	70,6	57,1	157,4
Total	23			
Coef. de Variación		18,5	20,5	61,1

xx : altamente significativo ($P \leq 0.01$)

Cuadro 7 A. Resumen del Análisis de Varianza (Cuadrados Medios) para las variables: porcentaje de mazorca cosechadas, incidencia de moniliasis de mazorca negra y marchitez fisiológica en el Experimento No. 3.

F. de Variación	G.L	Cuadrados Medios			
		Moniliasis	Mazorca negra	Mazorca cosechada	Marchitez Fisiológica
Bloques	4	24,6	159,5	71,6	14,0
Tratamientos	2	2,8	326,6	517,0 x	74,9
Error	8	20,4	95,5	67,1	292,8
Total	14				
Coef. de variación		38,5	25,1	21,1	61,5

x : significativo con un α - 0,05.

Cuadro 9 A. Número inicial de mazorcas, porcentaje de frutos cosechados, incidencia de moniliasis y mazorca negra por cada repetición y tratamiento en el Exp. 1 con el cv 'UF-29' .

Tratamientos	No. Mazorcas Iniciales	Repetición 1			Repetición 2			
		Porcentaje (x)			Porcentaje (x)			
		C	M	P	C	M	P	
Testigo natural	20	37,0	37,0	18,5	20	10,0	50,0	40,0
Testigo + art.	20	5,0	90,0	5,0	20	10,0	90,0	0,0
Biológico + art.	20	65,0	10,0	5,0	20	90,0	10,0	0,0
Clorotalonil	20	60,0	15,0	10,0	20	65,0	0,0	35,0
Biológico 6 veces	31	74,0	13,0	13,0	20	60,0	0,0	90,0
Biológico 3 veces	20	80,0	10,0	10,0	20	75,0	10,0	5,0

(x) C = Mazorca cosechada (%)

M = Monilophthora roreri

P = Phytophthora palmivora

Cuadro 8 A. Continuación. Número inicial de mazorcas, porcentaje de frutos cosechados, incidencia de moniliasis y mazorca negra por cada repetición y tratamiento en el Exp. 1 con el cv 'UF-29'.

Tratamientos	Repetición 3						Repetición 4					
	No. Mazorcas Iniciales	Porcentaje (%)			No. Mazorcas Iniciales	Porcentaje (%)						
		C	M	P		C	M	P				
Testigo natural	20	40,0	50,0	10,0	33	27,0	45,0	6,0				
Testigo + art.	20	10,0	85,0	5,0	20	0,0	100,0	0,0				
Biológico + art.	20	80,0	0,0	0,0	20	70,0	5,0	25,0				
Clorotalonil	22	68,0	18,0	0,0	20	60,0	25,0	15,0				
Biológico 6 veces	20	90,0	5,0	5,0	30	60,0	16,0	10,0				
Biológico 3 veces	20	75,0	5,0	10,0	20	80,0	5,0	15,0				

(x) C = Mazorca cosechada (%)

M = Monilophthora roseri

P = Phytophthora palmivora

Cuadro 9 A. Número inicial de mazorcas, porcentaje de frutos cosechados, incidencia de moniliasis y mazorca negra por cada repetición y tratamiento en el Exp. No. 2 con el cv 'UF-29'.

Tratamientos	Repetición 1				Repetición 2			
	No. Mazorcas	Porcentaje (%)			No. Mazorcas	Porcentaje (%)		
		Iniciales	C	M		P	Iniciales	C
Testigo nat.	30	23,3	76,7	0,0	37	18,9	64,9	16,2
Testigo + artif.	28	7,1	75,0	17,9	23	7,7	84,6	7,7
Biológico + art.	27	80,9	0,0	11,1	28	67,9	7,1	25,0
Clorotalonil	30	56,7	30,0	10,0	30	90,0	0,0	10,0
Biológico 6 veces	30	73,3	16,7	6,7	30	53,3	20,0	23,3
Biológico 3 veces	30	76,7	16,7	6,7	30	40,0	46,7	6,7

(x) C = Mazorca cosechada (%)
M = Monilophthora roseri
P = Phytophthora palmivora

Cuadro 9 A. Continuación. Número de mazorcas, porcentaje de frutos cosechados, incidencia de moniliasis y mazorca negra por cada repetición y tratamiento en el Exp. No. 2 con el cv 'UF-29'.

Tratamientos	Repetición 3						Repetición 4					
	No. Mazorcas Iniciales	Porcentaje (%)			No. Mazorcas Iniciales	Porcentaje (%)						
		C	M	P		C	M	P				
Testigo nat.	38	5,3	76,3	18,4	30	13,3	73,3	10,0				
Testigo + inoc. art.	19	0,0	89,5	10,5	24	12,5	66,7	20,8				
Biológico + art.	25	84,0	8,0	8,0	27	96,3	0,0	3,7				
Clorotalonil	31	67,7	19,4	9,7	30	76,7	23,9	0,0				
Biológico 6 veces	30	70,0	26,7	0,0	30	73,9	16,7	10,0				
Biológico 3 veces	30	63,3	36,7	0,0	33	48,5	30,3	21,2				

(x) : C = Mazorcas cosechadas (%)
 M = Moniliophthora roerei
 P = Phytophthora palmivora

Cuadro 10 A. Número inicial de mazorcas, porcentaje de frutos cosechados, incidencia de de moniliasis, mazorca negra y marchitez fisiológica por cada repetición y tratamientos en el Exp. No.3 con el cv 'UF-296'.

Tratamientos	No. Mazorcas Iniciales	Repetición 1				No. Mazorcas Iniciales	Repetición 2			
		Porcentaje (x)					Porcentaje (x)			
		C	M	P	CW		C	M	P	CW
Testigo	42	30,9	2,4	33,3	33,3	19	15,8	0,0	73,7	10,5
Clorotalomil	21	52,4	9,5	19,1	19,1	45	22,2	0,0	31,1	46,7
Bacteria	80	53,8	3,8	27,5	15,0	65	53,4	3,1	20,0	21,5

Cuadro 10 A. Continuación

Tratamientos	No. Mazorcas Iniciales	Repetición 3				No. Mazorcas Iniciales	Repetición 4			
		Porcentaje (x)					Porcentaje (x)			
		C	M	P	CW		C	M	P	CW
Testigo	18	5,6	5,6	68,8	0,0	30	30,0	0,0	30,0	40,0
Clorotalomil	35	57,2	5,7	31,4	5,7	27	70,4	3,7	25,9	0,0
Bacteria	79	34,2	2,5	46,8	16,5	60	40,0	1,7	33,3	25,0

Cuadro 10 A. Continuación. Número inicial de mazorcas, porcentaje de frutos cosechados, incidencia de moniliasis, mazorca negra y marchitez fisiológica por cada repetición y tratamientos en el Exp. No. 3 con el cv 'UF-296'.

Repetición 5

Tratamientos	No. Mazorcas Iniciales	Porcentaje (x)			
		C	M	P	CW
Testigo	18	22,2	11,1	39,3	93,4
Clorotalonil	42	50,0	2,4	26,2	21,4
Bacteria	45	51,1	2,4	42,2	4,5

(x) C = Mazorcas Cosechadas

M = M. roreni

P = Phytophthora palmivora

CW = Marchitez Fisiológica

ANEXO 2

Medios usados

1. Agar nutrimento

8 g dextrosa
10 g peptona
20 g agar
1000 ml. agua destilada

2. Agar avena

50 g avena
20 g dextrosa
20 g agar
1000 ml. agua destilada

3. Agar avena modificado

50 g avena
20 g dextrosa
10 g peptona
1000 ml. agua destilada

4. Caldo nutrimento

8 g dextrosa
10 g peptona
1000 ml. agua destilada