

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION
ESCUELA DE POSGRADUADOS

**AISLAMIENTO SELECTIVO Y PRETAMIZADO EN BIOENSAYOS DE
MICOPARASITOS CONTRA *Rosellinia* spp.**

POR

RAMON ARISTIDES MENDOZA GARCIA

CATIE

Turrialba, Costa Rica
2000

DIC 2000

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA

**PROGRAMA DE EDUCACIÓN PARA EL DESARROLLO Y LA
CONSERVACIÓN ESCUELA DE POSGRADUADOS**

**AISLAMIENTO SELECTIVO Y PRETAMIZADO EN BIOENSAYOS DE
MICOPARASITOS CONTRA *Rosellinia* spp.**

Tesis sometida a consideración de la Escuela de Posgraduados, Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza como requisito parcial para optar al grado de:

Magister Scientiae

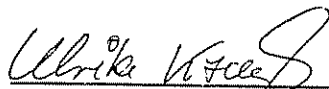
Por

Ramón Aristides Mendoza García

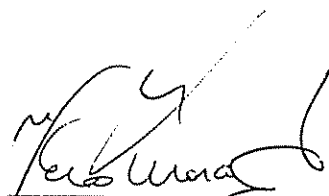
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y la Escuela de Posgraduados del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

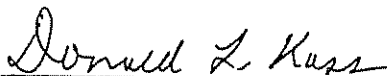
FIRMANTES:



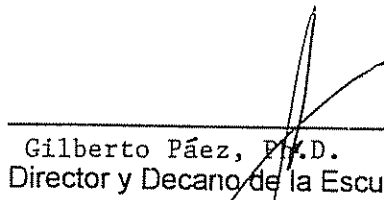
Ulrike Krauss, Ph.D.
Consejero Principal




Vera Sánchez, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



Donald Kass, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



Gilberto Páez, Ph.D.
Director y Decano de la Escuela de Posgraduados



Ramón Aristides Mendoza García
Candidato

DEDICATORIA

***A mi Madre Luisa Amanda Mendoza Sánchez y mi querida Abuelita Isaura
Mendoza Paladino***

***A mi esposa María del Socorro Medina Peralta y mis hijos Elizabeth del
Carmen y Christopher Antonio Mendoza Medina***

A mi Padre y su esposa por su apoyo en mi educación

A toda mi familia Mendoza García

AGRADECIMIENTOS

A Dios por hacerme sentir que esta conmigo en todo momento y permitirme realizar mis sueños.

Al Pueblo y gobierno de Noruega por financiar mis estudios a través del Programa Regional de MIP y Agroforestería en Café de CATIE con sede en Nicaragua.

Mi agradecimiento a cada uno de los miembros de mi comité asesor por su asesoramiento y aportes y culminar con éxito esta tesis. Muy especialmente a la Dra. Ulrike Krauss, consejera principal, por su valiosa asesoría, empeño y dedicación en este trabajo y por ser una verdadera profesora en su enseñanza "Muchas gracias Dra".

A Johnny Perez. Por su valiosa colaboración y asesoramiento durante el análisis e interpretación de los datos de mi tesis, la cual fue muy determinante para llevar a feliz término la fase final de esta maestría

Al Dr. Philippe Vaast, mi gran amigo y maestro con quien inicie mis primeras conversaciones sobre mi trabajo de tesis, y siempre me mostró su disposición y entrega para hacer realidad mi trabajo. "Muchas gracias Dr".

A mis compañeros de trabajo del Programa Regional de MIP y Agroforestería en Café de CATIE con sede en Nicaragua, por motivarme a que este sueño hoy sea una realidad, especialmente el Dr. David Monterroso por sus consejos y orientaciones en este trabajo.

A todo el personal del laboratorio de Fitopatología por su colaboración, en especial a Manrique González y Arturo Gamboa.

A todo el personal de la "Biblioteca Orton" por su apoyo incondicional y la amistad que siempre me brindaron durante mis dos años de estudio en CATIE.

A cada uno de los compañeros y compañeras de maestría. Especialmente a Mauricio Mejía amigo solidario, Gracias por su amistad y dedicación que me brindó durante la estancia en CATIE.

Al Sr. José Antonio Alfaro Pereira por su valioso apoyo durante la fase de campo.

Al Sr. Juan Rojas amigo inolvidable por sus consejos y todo el apoyo que me brindó durante mis estudios, especialmente su esposa e hijos.

Al equipo del laboratorio de control biológico, especialmente Adolfo, Claudio y Martijn, amigos que siempre me brindaron su apoyo de forma incondicional.

Al personal del laboratorio de suelo, especialmente Patricia Leandro, Carlos Fernández y Carlos Castillo por su colaboración durante los análisis de suelo de mi tesis

A todos mis amigos que de una u otra forma me apoyaron, especialmente Otho Argueta, Henry Perla, Tomás Dittel y Mario Cervantes.

CONTENIDO

		N° de Página.
1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Objetivo general.....	3
1.2	Objetivos específicos.....	3
1.3	Hipótesis de trabajo.....	3
2.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1	El género <i>Rosellinia</i>	4
2.1.1.	Importancia de <i>Rosellinia</i>	4
2.1.2.	Descripción de <i>Rosellinia</i> sp.....	4
2.1.3.	Síntomas.....	5
2.1.4.	Signos.....	5
2.1.5.	Epidemiología.....	6
2.2.	Ecología.....	7
2.2.1.	Distribución.....	7
2.2.2.	Efecto de la humedad.....	7
2.2.3.	Efecto del pH.....	8
2.2.4.	Efecto de la materia orgánica.....	9
2.3.	Manejo de la enfermedad.....	9
2.3.1.	Labores culturales.....	9
2.3.2.	Control químico.....	10
2.3.3.	Control biológico.....	10
2.4.	Metodología en control biológico.....	11
2.4.1.	Aislamiento y tamizado de antagonistas en placas precolonizadas.....	11
2.4.2.	Tamizado de antagonistas.....	12
2.4.2.1.	El uso de bioensayos.....	12
2.4.2.2.	Inoculación de patógeno y antagonistas.....	13
2.4.2.3.	Rango de hospedante.....	14

2.5.	Variabilidad de patógenos e implicaciones para el control biológico.....	15
2.5.1.	Biodiversidad de patógeno y discriminación de cepas.....	15
2.5.2.	Mezclas de cepas de biocontroladores.....	16
2.5.2.1.	Ventajas de las mezclas de cepas.....	16
2.5.2.2.	Compatibilidad de antagonistas.....	17
3.	MATERIALES Y METODOS.....	18
3.1.	Localización.....	18
3.2.	Cultivo del patógeno <i>Rosellinia</i> spp.....	18
3.2.1.	Colección del patógeno <i>Rosellinia</i> spp.....	18
3.2.2.	Metodología de aislamiento.....	19
3.2.2.1.	Papel Kraft.....	19
3.2.2.2.	Siembra Directa.....	19
3.2.2.3.	Vermiculita.....	19
3.2.3.	Identificación de <i>Rosellinia</i> spp.....	21
3.2.4.	Crecimiento de <i>Rosellinia</i> spp.....	22
3.3.	Aislamiento de micoparásitos.....	23
3.3.1.	Fase de campo.....	23
3.3.2.	Fase de laboratorio.....	23
3.4.	Rango de hospedantes de micoparásitos en placas precolonizadas.....	24
3.5.	Compatibilidad de micoparásitos.....	25
3.5.1.	Pruebas preliminar de patogenicidad.....	25
3.5.2.	Preparación de inóculo.....	26
3.5.3.	Bioensayo de compatibilidad de hiperparásitos.....	27
3.5.3.1.	Tratamientos.....	28
3.5.3.2.	Modelo estadístico.....	28
3.5.3.3.	Análisis de la información.....	29
3.6.	Eficiencia de los micoparásitos en función de la Materia orgánica y el Ph del suelo	29

3.6.1.	Diseño experimental.....	30
3.6.2.	Tratamiento evaluados.....	30
3.6.3.	Modelo estadísticos.....	31
3.6.4.	Variabes de respuestas.....	31
3.6.5.	Análisis de la información.....	31
4.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	32
4.1.	Resultados.....	32
4.1.1.	Análisis de suelo.....	32
4.1.2.	Aislamiento de <i>Rosellinia</i> spp.....	32
4.1.2.1.	Comparación de aislamiento entre cultivos.....	32
4.1.2.2.	Métodos de aislamiento.....	33
4.1.2.3.	Tipos de medios.....	34
4.1.2.4.	Crecimiento de <i>Rosellinia</i>	34
4.1.2.5.	Prueba de patogenicidad.....	35
4.1.3.	Aislamiento de micoparásitos.....	37
4.1.4.	Rango de hospedantes de micoparásitos.....	37
4.1.5.	Bioensayos sobre compatibilidad de antagonistas.....	40
4.1.6.	Efecto de las características del suelo materia orgánica y pH sobre la eficiencia de los antagonistas.....	43
4.1.6.1.	Efecto de la materia orgánica sobre la eficiencia de los antagonistas	43
4.1.6.2.	Efecto del pH del suelo sobre la eficiencia de los antagonistas.....	48
4.2.	DISCUSION.....	53
4.2.1.	Aislamiento de <i>Rosellinia</i> spp.....	53
4.2.2.	Crecimiento de <i>Rosellinia</i> spp.....	54
4.2.3.	Aislamiento de micoparásitos.....	55
4.2.4.	Susceptibilidad de cepas de <i>Rosellinia</i>	58

4.2.5.	Control biológico de <i>Rosellinia</i> a nivel de invernadero.....	59
4.2.5.1.	Pruebas de patogenicidad	59
4.2.5.2.	Bioensayos.....	60
4.2.5.3.	Compatibilidad de antagonistas.....	61
4.2.6.	Efecto de las características del suelo materia orgánica y pH sobre la eficiencia de los antagonistas.....	63
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	67
5.1.	Conclusiones.....	67
5.2.	Recomendaciones.....	68
6.	LITERATURA CITADA.....	69
7.	ANEXOS.....	74
7.1.	Salidas de análisis estadísticos.....	75
7.2.	Cronograma de actividades.....	91
7.3.	Cuadro de presupuesto de tesis.....	91

Lista de Cuadros

		N° de página
Cuadro 1.	Tratamientos de antagonistas aplicados de manera individual y en mezcla para el manejo de <i>Rosellinia</i> spp.....	28
Cuadro 2.	Análisis de suelo de dos diferentes localidades, suelo de plantaciones de cacao del CATIE y suelo de cultivo de papa Tierra Blanca de Cartago.....	32
Cuadro 3.	Porcentajes de éxitos de aislamiento de <i>Rosellinia</i> spp. usando tres diferentes métodos.....	34
Cuadro 4.	Porcentajes de éxitos de aislamiento de <i>Rosellinia</i> spp. en diferentes medios de crecimiento.....	34
Cuadro 5.	Promedio de la tasa de crecimiento (en mm/día) ± error estándar de <i>Rosellinia</i> spp. de cacao y papa, bajo condiciones de oscuridad y luz.....	35
Cuadro 6.	Ecuaciones de regresión, relacionando la dosis de inóculo vs. altura, peso seco raíz y peso seco hoja.....	36
Cuadro 7.	Caracterización de micoparásitos aislados de placas precolonizadas de <i>Rosellinia</i> en cacao y papa.....	38
Cuadro 8.	Resultados del análisis de la prueba t student de los datos de crecimiento en mm/día de diferentes antagonista en relación a las cepas de <i>Rosellinia</i> spp.....	40
Cuadro 9.	Eficiencia de los antagonistas aplicados individualmente y en mezcla sobre la supresión de <i>Rosellinia</i> RB0001.....	41
Cuadro 10.	Mortalidad de plantas (%): efecto de diferentes niveles de materia orgánica.....	44
Cuadro 11.	Peso seco de raíces (g): efectos de diferentes niveles de materia orgánica.....	44
Cuadro 12.	Longitud de raíces: efectos de diferentes niveles de materia orgánica.....	45
Cuadro 13.	Area foliar (cm ²): efectos de diferentes niveles de materia orgánica.....	45

Cuadro 14.	Días de sobrevivencia (Máximo 48 días): efectos de diferentes niveles de materia orgánica.....	46
Cuadro 15.	Severidad (ABC): efectos de diferentes niveles de materia orgánica.....	47
Cuadro 16.	Altura de planta (cm): efecto de diferentes niveles de materia orgánica.....	47
Cuadro 17.	Número de hojas: efectos de diferentes niveles de materia orgánica.....	47
Cuadro 18.	Peso seco de hojas (g): efecto de diferentes niveles de pH.....	48
Cuadro 19.	Mortalidad de plantas en porcentajes: efecto de diferentes niveles de pH.....	48
Cuadro 20.	Severidad como (ABC) :efecto de diferentes niveles de pH.....	49
Cuadro 21.	Días de sobrevivencia (Máximo 48) : efecto de diferentes niveles de pH.....	49
Cuadro 22.	Area foliar (cm ²) :efecto de diferentes niveles de pH.....	50
Cuadro 23.	Altura de planta (cm): efecto de diferentes niveles de pH.....	50
Cuadro 24.	Número de hojas: efecto de diferentes niveles de pH.....	51
Cuadro 25.	Peso seco de hojas (g): efecto de diferentes niveles de pH.....	52
Cuadro 26.	Longitud de raíces (cm): efecto de diferentes niveles de pH.....	52
Cuadro 27.	Peso seco de raíz (g) : efecto de diferentes niveles de pH.....	52

Lista de Figuras

		N° de página
Figura 1.	Tallo de cacao sin la corteza y muestra los signos típico del hongo <i>Rosellinia</i>	6
Figura 2.	Métodos para el aislamiento del patógeno <i>Rosellinia</i> spp.....	21
Figura 3.	Estructuras típicas de <i>Rosellinia</i> sp. Fuente: PROCAFE (1996).....	22
Figura 4.	Presentación esquemática del método de placas precolonizadas.....	24
Figura 5.	Rango de hospedante de micoparásitos en placas Precolonizados.....	25
Figura 6.	Porcentajes de éxitos de aislamiento de <i>Rosellinia</i> spp. en tres cultivos diferentes.....	33
Figura 7.	Inoculación en plantas germinando, de izquierda a derecha 500 g de inóculo y sin inóculo.....	36
Figura 8.	Inoculación en plantas de tres meses de edad de izquierda a derecha 100, 200, 250 g de inóculo y sin inóculo.....	36
Figura 9.	Hongos antagonistas que se aislaron durante el estudio de control biológico de <i>Rosellinia</i>	39
Figura 10.	Crecimiento de hiperparásitos sobre placas precolonizadas por <i>Rosellinia</i>	56

Lista de Anexos

		N° de página
Anexo 1.	ANDEVA, Peso seco de raíces (g): efecto de diferentes niveles de materia orgánica.....	75
Anexo 2.	ANDEVA Longitud de raíces (cm): efecto de diferentes niveles de materia orgánica.....	76
Anexo 3.	ANDEVA, Area foliar (cm ²): efecto de diferentes niveles de materia orgánica.....	77
Anexo 4.	ANDEVA Días de sobrevivencia (máximo 48 días): efecto de diferentes niveles de materia orgánica.....	78
Anexo 5.	ANDEVA Severidad (ABC): efecto de diferentes niveles de materia orgánica.....	79
Anexo 6.	ANDEVA, Altura de plantas (cm): efecto de diferentes niveles de materia orgánica.....	80
Anexo 7.	ANDEVA, Número de hojas: efecto de diferentes niveles de materia orgánica.....	81
Anexo 8.	ANDEVA, Peso seco de hojas (g): efecto de diferentes niveles de materia orgánica.....	82
Anexo 9.	ANDEVA, Severidad expresada como (ABC) : efecto de diferentes niveles de Ph.....	83
Anexo 10.	ANDEVA, Días de sobrevivencia (máximo 48 días): efecto de diferentes niveles de pH.....	84
Anexo 11.	ANDEVA, Area foliar (cm ²): efecto de diferentes niveles de pH.....	85
Anexo 12.	ANDEVA, Altura de plantas (cm): efecto de diferentes niveles de pH.....	86
Anexo 13.	ANDEVA, Número de hojas: efecto de diferentes niveles de pH.....	87
Anexo 14.	ANDEVA, Peso seco de hojas (g) : efecto de diferentes niveles de pH.....	88

Anexo 15	ANDEVA, Longitud de raíces (cm): efecto de diferentes Niveles de pH.....	89
Anexo 16.	ANDEVA, Peso seco de raíces (g) : efecto de diferentes niveles de pH.....	90
Anexo 18.	Cuadro de cronograma de actividades.....	91
Anexo 19.	Cuadro de presupuesto de tesis.....	91

Mendoza, G. R. (2000). Aislamiento selectivo y pretamizado en bioensayos de micoparásitos contra *Rosellinia* spp.

Palabras claves: aislamiento, bioensayo, cacao, compatibilidad, control biológico, fitopatología, *Gliocladium*, hongos del suelo, materia orgánica, mezcla de cepas, micoparásitos, pH del suelo, placas precolonizadas, pretamizado, rango de hospedantes, *Rosellinia* spp. *Theobroma cacao*, *Trichoderma*.

Resumen

El presente estudio se realizó en las instalaciones del CATIE, con el objetivo de establecer en Costa Rica una colección de micoparásitos promisorios para el control biológico de *Rosellinia* spp.

El estudio constó de cuatro fases. 1) Colección del patógeno *Rosellinia* spp. y hongos micoparásitos, 2) Pretamizado de los micoparásitos en el cual se determinó el rango de hospedantes, 3) Se evaluó la compatibilidad entre micoparásitos seleccionados a nivel de bioensayo, 4) Se evaluó la eficiencia de mezclas de los micoparásitos a nivel de bioensayo contra *Rosellinia* dependiendo del pH y el contenido de materia orgánica del suelo. Para las fases dos y tres se utilizó un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA), cinco repeticiones. Para la fase cuatro se utilizó un diseño factorial completamente aleatorizado de la forma 4x3 (factor A = 4 tratamientos: dos testigos y las dos mejores mezclas de antagonistas; factor B = 3 diferentes contenidos de materia orgánica o pH, cinco repeticiones, la unidad experimental consistió en cada planta de cacao. Las variables de respuestas que se evaluaron en todos los experimentos fueron: severidad de los síntomas como el Area Bajo la Curva (ABC), mortalidad de plántulas (%), días de sobrevivencia de plantas, altura de plantas (cm), número de hojas, área foliar (cm²), longitud de raíces (cm), peso seco de hojas (g) y peso seco de raíz (g).

Los datos fueron analizados a través de programa estadístico SAS (Statistical Analysis System). Antes de los análisis se realizaron pruebas univariadas para conocer si los datos se ajustaban a los supuestos del análisis de varianza (ANDEVA). Para las variables como: severidad días de sobrevivencia de planta, altura de planta (cm), número de hojas, área foliar (cm²), longitud de raíces (cm), peso seco de hoja (g) y peso seco de raíz (g), su distribución tendió hacia una distribución normal. Por lo tanto fueron comparados a través del ANDEVA, seguido por la prueba de Tukey (probabilidad 0.05) para hacer separaciones de medias. En cambio, la mortalidad de plantas del ensayo de compatibilidad de antagonistas se analizó según la prueba de Cochran para datos binarios. Para el ensayo con arreglo factorial para materia orgánica y pH, donde tenemos dos factores que constituyen una replicación oculta, los datos de mortalidad de plantas fueron transformados al ARCSEN ($y_2 = \arcseno \sqrt{y_1}$) y luego se realizó un ANDEVA.

Se presentan protocolos mejorados para el aislamiento y manipuleo de *Rosellinia* spp. Los resultados demuestran que *Rosellinia* es un hongo que presenta una alta variabilidad entre diferentes cepas, incluso en cuanto a la susceptibilidad a antagonistas. La mezcla de tres antagonistas presentó mejor eficiencia en cuanto al control biológico de *Rosellinia* a nivel de invernadero en comparación cuando son aplicado individualmente o en mezclas de dos. Además su respuesta fue más consistente en todas las variables evaluadas. La enfermedad fue más severa en suelos con alto contenido de materia orgánica y pH ácido. El control biológico fue más eficiente en suelos con bajo contenido de materia orgánica y niveles más alto de pH. Se discute las implicancias para el manejo integrado de *Rosellinia* spp. en relación a prácticas agrícolas comunes.

Mendoza, G. R. (2000). Selective isolation and pre-screening in bioassays of mycoparasites against *Rosellinia* spp.

Key words: Bioassay, biocontrol, cocoa, compatibility, *Gliocladium*, host range, isolation, mycoparasites, organic matter, plant pathology, precolonized plates, prescreening, host ranges, *Rosellinia* spp., soil pH, soilborne fungi, strain mixtures, *Theobroma cacao*, *Trichoderma*.

Summary

This study was carried out in the facilities of CATIE with the objective to establish a collection of promising mycoparasites for the biological control of *Rosellinia* spp. in Costa Rica.

The study consisted of four phases: 1) collection of the pathogen *Rosellinia* spp. and mycoparasitic fungi, 2) prescreening of the mycoparasites to determine their host ranges, 3) the compatibility of selected mycoparasites was tested in a bioassay, 4) the efficiency of mixtures of the mycoparasites against *Rosellinia* depending on soil pH and organic matter content was tested in bioassays. For phases two and three, the Completely Randomized Design (CRD) with five repetitions was used. For phase four, a completely randomized factorial design with a 3x4 arrangement was employed (factor A = 4 treatments: two controls and the two best antagonist mixtures; factor B = three different organic matter contents or pH values; five replications; the experimental units were individual cocoa plants). The response variables which were evaluated in all experiments were: disease severity measured as area under the disease progress curve, seedling mortality (%), days of plant survival, plant height (cm), number of leaves, leaf surface area (cm²), root length (cm), dry weight of leaves (g) and dry weight of roots (g).

Data were analyzed using the statistical program SAS. Prior to analysis, univariate tests were carried out to determine whether the data fulfilled the requirements of analysis of variance (ANOVA). The distribution of the variables: severity, days of plant survival, plant height (cm), number of leaves, leaf surface area (cm²), root length (cm), dry weight of leaves (g) and dry weight of roots (g) approached normality. Therefore, they were compared by ANOVA, followed by the Tukey-test (probability 0.05) for the differentiation of means. Seedling mortality in the compatibility assay was analyzed with the Cochran-test for binary data. In the experiments for soil pH and organic matter with factorial design, where the two factors constitute a hidden replication, percentage seedling mortality was arcsine-transformed ($y_2 = \arcsin \sqrt{y_1}$) prior to ANOVA.

Improved protocols for the isolation and handling of *Rosellinia* spp. are presented. The results indicate that *Rosellinia* exhibits a high variability between different strains, including with regards to its susceptibility to antagonists. The mixture of three antagonists was more efficient in controlling *Rosellinia* at the greenhouse level than a mixture of two or individually applied antagonists. Furthermore, it resulted in more consistent response in all the different variables measured. Disease was most severe in acid soils with a high organic matter content. Biocontrol was more efficient in soils of low organic matter content and high pH values. The implications for the integrated management of *Rosellinia* are discussed in relation to common agricultural practices.

1. INTRODUCCIÓN

El manejo de las enfermedades de plantas ocasionadas por patógenos del suelo, son un reto para la agricultura mundial ya que por su complejidad requieren un trato diferente a las causadas por patógenos en el follaje (Castro 1995).

Rosellinia spp. son hongos habitantes naturales del suelo, con un amplio rango de hospedantes, y con capacidad para sobrevivir en madera en descomposición. Actualmente sus daños se han incrementando en forma alarmante en áreas agrícolas, a causa de las grandes pérdidas debido a la muerte de plantas en plena producción. Principalmente en cultivos de gran importancia económica como: cacao, café, frutales, hortalizas y árboles de sombra (Castro 1995).

A pesar de los daños causados por *Rosellinia* spp debido a la muerte de muchos árboles en plantaciones comerciales de varios países productores de cacao, café y hortalizas, no se tienen datos sobre la magnitud de las pérdidas causadas por este patógeno (Aránzazu *et al.* 1999). Estudios realizados en El Salvador y Colombia demuestran, que el impacto económico de *Rosellinia* está representado por la muerte progresiva de árboles productivos. Y por lo tanto la reducción substancial de los volúmenes de producción, los costos directos de control, debido a la eliminación de árboles enfermos y así como el costo de no poder resembrar cacao u otros cultivos susceptibles en suelos contaminados por el patógeno (PROCAFE 1996; Aránzazu *et al.* 1999). Un estudio realizado por Chaves (1996) en Costa Rica encontró que de 67 cafetales estudiados, un 51 % presentaban problema de mortalidad de plantas y se estimó como pérdida un 22 % del total 80 hectáreas sembradas.

Aunque este patógeno esta adquiriendo mucha importancia en varios sistemas de producción, aún no se cuenta con métodos eficiente para controlarlo. Excepto por su manejo tradicional basado en aplicaciones de productos químicos dirigido al suelo como fumigantes, los cuales en su mayoría son productos de alto riesgo para la salud humana y la contaminación al ambiente. Así como la implementación de algunas practicas culturales como eliminación de plantas enfermas distanciamiento de zonas enfermas, entre otras pero aún con resultados no satisfactorios (Aránzazu 1997).

Por lo tanto, en las ultima década se ha despertado mucho interés por encontrar nuevas

opciones de manejo. Entre ellos el uso de biocontroladores que forman parte de la riqueza potencial de la flora benéfica del suelo, y que tienen cualidades como organismos antagónicos o micoparásitos (Castro 1995; Elad y Katan 1980). Hongos como *Trichoderma*, *Micorrizas* (vesiculares, arbustivas) y bacterias fluorescentes del genero *Pseudomonas* compiten por espacio, nutrientes y pueden formar parte de un programa de control integrado de enfermedades causada por organismos antagónicos que normalmente habitan en el suelo (López *et al.* 1998).

Se considera que los costos del control biológico pueden resultar menores, respecto al uso de practicas tradicionales, aunque su acción puede ser más lenta, puede ser más estable y duradera que el control químico y con menos daños al ambiente (Borda y Arbelaez 1985).

Bajo este contexto y dado la importancia de cultivos como: cacao, café, cítricos y hortalizas en el ámbito social, principalmente como fuente de empleo y generar divisas para la economía de los países y productores que dependen de estos cultivo. En este sentido, se considera necesario continuar las investigaciones para encontrar métodos más eficientes y sostenible para el manejo de *Rosellinia* spp. como es el uso de organismos antagonistas como son los micoparásitos.

1.1. OBJETIVOS GENERAL

- Establecer en Costa Rica una colección de micoparásitos promisorios para el control biológico de *Rosellinia* spp.

Objetivos específicos:

- Establecer una colección representativa, de la variabilidad de *Rosellinia* spp. presente en los cultivos afectados.
- Establecer una colección de micoparásitos con actividad hiperparasítica hacia cepas de *Rosellinia* spp.
- Conocer el efecto de las características del suelo (pH y materia orgánica) sobre el control biológico del patógeno con micoparásitos.

1.2. Hipótesis

- Existe variabilidad marcada entre aislamientos de *Rosellinia* spp. obtenido en zona de diferentes cultivos.
- Los micoparásitos afectan en forma diferente a *Rosellinia* spp.
- Mezclas de micoparásitos mejoran el control de diversas poblaciones de *Rosellinia* spp.
- Mezclas de micoparásitos se adaptan a suelos con diferentes características.
- Las características del suelo (pH y Materia Orgánica) afectan no solo la severidad de *Rosellinia* sino también la eficiencia de los micoparásitismo.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. El género *Rosellinia* spp.

2.1.1. Importancia de *Rosellinia*

Las pudriciones radiculares causada por especies del hongo *Rosellinia*, amenazan con la producción de muchos cultivos. La enfermedad es causada por un hongo habitante natural del suelo, es considerado una especie altamente polífago con capacidad para infectar un amplio rango de hospederos. Aunque estos patógenos pueden infectar y causar la muerte a la mayoría de las especies cultivadas, su ataque es más notorio y preocupantes en cultivos perennes como árboles maderables y de sombra, *Inga* spp. *Erythrina* spp. cultivos de importancia económica como frutales, cítricos *Citrus* spp. aguacate *Persea gratissima* cacao *Theobroma cacao*, café (*Coffea arábica* L.) macadamia *Macadamia integrifolia* yuca *Manihot esculenta*, papa *Solanum tuberosum* y algunas malezas como *Petiveria alliacea*, *Iresine* spp. *Solanum nigrum*, también se reportan especies con alta resistencia a las dos especies de *Rosellinia* como: pasto guinea *Panicum maximun* Jacq, mango *Mangifera indica*, caña de azúcar *Saccharum offinarum* y especies aparentemente inmunes como el cocotero *Cocus nuciferas* (Waterston 1941; Merchán 1993).

2. 1. 2. Descripción de *Rosellinia* spp.

El genero *Rosellinia*, pertenece a la clase de ascomycetos esta ubicados dentro del grupo de parásitos facultativos o hemiparásitos con característica de ser más saprofito que parásitos (Waterston 1941).

Posee filamentos "tabicados" de color café claro a oscuros, se diferencia de otros hongos del suelo porque presenta en un extremo del "tabique" un abultamiento en forma de "pera" o hueso el cual varia de tamaño de acuerdo a la especie. En condiciones de alta humedad relativa forma estructuras de fructificación en forma de "tallitos" erguidos, en cuyos extremos produce las esporas. El hongo infecta las raíces de las plantas a través de filamentos que penetran la cáscara de la raíz por medio de estructuras especializadas conocidas como apresorios, posteriormente invade la madera a través de las partes blandas del tejido (PROCAFE 1996).

2. 1. 3. Síntomas

Los árboles atacados por *Rosellinia* presentan en la parte aérea síntomas similares a los causados por otras enfermedades radiculares. No obstante, la enfermedad se caracteriza por manifestarse en focos o parches dentro de las plantaciones y generalmente alrededor de los árboles de sombra infectados. Progresivamente se presenta amarillamiento de hojas, marchitamiento, defoliación, secamiento de ramas y muerte del árbol (Merchán 1990).

La invasión del sistema radical puede ser rápida algunas veces, pero en la mayoría de los casos es lenta y progresiva. En el primer caso, la muerte sobre viene abruptamente, manteniendo el árbol sus hojas por algunas semanas. Este colapso súbito se origina por la destrucción del sistema radical, pudrición de la corteza o de los tejidos a la altura del cuello de la planta y pierde anclaje en el suelo. En el caso de la muerte lenta, ésta es precedida por la declinación y estancamiento de la planta; la parte aérea se debilita poco a poco y se observa marchitamiento, clorosis, caída del follaje de las ramas superiores, amarillamiento del follaje y disminución o ausencia de nuevos brotes. En cultivos como café y cacao los frutos verdes tienden a madurar prematuramente y quedan vanos en su mayoría; cuando la cosecha ya esta establecida, los frutos se tornan negros, se secan y quedan prendidos en las ramas (PROCAFE 1996; Aránzazu *et al.* 1999).

2. 1. 4. Signos

Al levantar la corteza del tallo y raíces se aprecian formaciones de micelio grueso en forma de estrella, abundantes y de color blanco, que semeja una maraña de hilo, fácil de apreciar a simple vista (figura 1). Estas estructuras están adheridas en la parte interna de la corteza y la madera de la raíz y es la forma como el hongo sobrevive. Durante la época lluviosa, cuando existen condiciones ambientales favorables, el hongo se activa y crece invadiendo la raíz, se observa de color negro, lo que da origen al nombre de "podredumbre negra". El micelio avanza entre el colchón de materia orgánica y llega hasta las raíces de otras plantas donde inicia la infección; penetra la corteza y avanza en forma envolvente hasta llegar cubrir toda la raíz pivotante y las raíces principales (PROCAFE 1996; Hernández 1967)

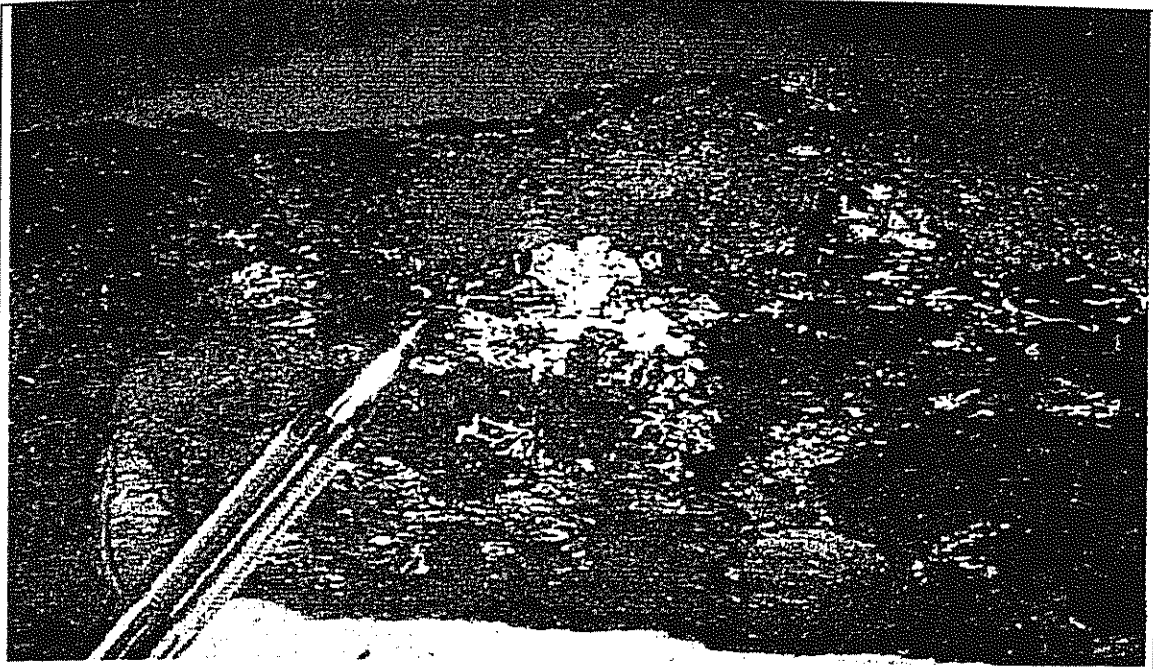


Figura 1. Tallo de cacao sin la corteza que muestra los signos típicos del hongo *Rosellinia*

2. 1. 5. Epidemiología de la enfermedad

En el campo la enfermedad generalmente inicia en pequeños focos aislados y en plantas débiles, sin embargo, si no se toma medida de control para prevenir su avance, la enfermedad avanza en la finca. Observaciones en plantaciones establecidas de café y cacao han demostrado, que el inicio e irradiación de las pudriciones radicales, causadas por *Rosellinia* spp. tiene su origen primordial a partir de troncos y raíces de árboles de sombra eliminados a través de anillamiento o por podas severas. Dicha práctica, que debilita los árboles, los hace susceptibles a *Rosellinia*, el cual es un hongo que se ve favorecido cuando se rompe el equilibrio biológico del suelo, y por las grandes reservas de carbohidratos acumuladas en el sistema radical que queda de los árboles (Aránzazu *et al.* 1999).

La enfermedad se propaga comúnmente siguiendo el radio de las raíces de los árboles. La única forma de propagación natural en cultivos establecidos, es por contacto de raíces sanas con raíces de árboles enfermos, que facilita la colonización micelial. No se ha encontrado evidencia de propagación de la enfermedad a través de herramientas o propágulos como conidios o ascósporas. Sin embargo, la enfermedad puede también propagarse por el transporte de material vegetal o suelo infestado hacia zonas que estén

libres del problema (Aránzazu *et al.* 1999).

Rosellinia spp. se considera un organismo con habilidades más saprofiticas que parasíticas, por la resistencia que ofrecieran las raíces vivas a la infección; por lo que se ha calificado como un parásito facultativo. Por ejemplo se ha comprobado que *R. pepo* con el transcurso del tiempo, pierde paulatinamente su poder patogénico; por lo que los substratos más apetecidos para su invasión, e infestación, lo constituyen las raíces recién muertas, más que aquellas que poseían un grado de deterioro o pudrición (Aránzazu 1996).

Cuando el hongo penetra al interior de los tejidos de la raíz, comienza a colonizar y toma sus nutrientes a partir de ella, esto permite al patógeno un crecimiento acelerado, extendiéndose rápidamente sobre la parte externa de la raíz, cuello de la planta y el suelo que se encuentra alrededor de la base del tallo, donde forma cordones filamentosos de color negro (PROCAFE 1996).

2. 2. Ecología

2. 2. 1. Distribución

La enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en los países tropicales donde se produce cacao, café y otros cultivos de importancia, favorecida por las características agro ecológicas que le permiten crecer en diferentes tipo de suelo y tipografía, observándose ataques con más frecuencia en áreas húmedas y ricas en materia orgánica (Waterston 1941).

2. 2. 2. Efecto de la humedad

Duque y Borrero (1966) consideran que la llaga negra del cafeto causada por *R. pepo* se encuentra con mayor frecuencia en suelos pesados, ricos en materia orgánica, con alto contenido de humedad y pH ácidos. Estudios realizados por Waterston (1941) y Merchán (1990) encontraron que al correlacionar la incidencia de *Rosellinia* con la fertilidad del suelo, observaron que el patógeno prevaleció más en suelos pobres en fósforo disponible en cantidades menores de 40 ppm.

Duque y Borrero (1966) realizaron un estudio con el propósito de conocer el efecto de la humedad del suelo sobre el comportamiento de *R. pepo* (Pat.) y *R. bunodes* (Berk. y Br.) y encontraron que suelos con rango de humedad entre 50–70 % fueron los mas favorables para el desarrollo de ambos organismos. En relación a la infección, *R. bunodes* produjo 100 % de mortalidad de chapolas de plántulas café de 90 días en todos los niveles de humedad ajustado a 60, 70, 80, 90, 100 y 110 % de su capacidad de retención de agua. *R. pepo* produjo mortalidad en todos los niveles de humedad ensayados, sin embargo, la proporción de plántulas muertas fue mayor en los niveles de (70, 80, 90 y 100 %) de humedad. Por lo que se deduce que el exceso de humedad en el suelo predispone a la planta y favorece un mayor desarrollo del hongo y éste penetra la parte leñosa de las raíces de las plantas.

Otras factores ambientales que aceleran la predisposición de las plantas y favorecen el desarrollo del hongo son: deficiencias nutricionales, plantas con sistema radical dañados por nematodos o insectos, exceso de sombra, presencia de hospederos silvestre como malezas y el establecimiento de nuevas siembras en áreas infectadas por el hongo (Herrera y Grillo 1989).

2. 2. 3. Efecto del pH

Con respecto al pH, Waterston (1941) y Merchán (1990) trabajando con *Rosellinia pepo*, en cacao, no encontraron correlación entre la concentración del ion hidrógeno en el suelo y la incidencia de la enfermedad. Duque y Borrero (1966) en estudios a nivel de laboratorio encontraron que con *R. pepo* y *R. bunodes* fueron capaces de crecer satisfactoriamente en medio de papa maltosa agar a pH entre 3.0 y 9.0, con intervalos de 0.5. Aunque las diferencias en crecimiento no fueron significativas, se observó una zona de máximo desarrollo comprendida entre los pH 5.5 y 7.0. También inocularon el patógeno en suelos con pH entre 4.0 y 7.0 y sembraron plántulas de café, observaron que en todos los rangos de pH se presentó infección, aunque el mayor porcentaje de plantas muertas ocurrió en el suelo con pH de 5.2.

2. 2. 4. Efecto de la materia orgánica

Según Ruiz y Caycedo (1996), hay una relación proporcional entre el porcentaje de materia orgánica y el porcentaje de infección del patógeno. Ambos autores encontraron que suelos con un contenido de materia orgánica de 8.9 % fue donde se presentó el mayor porcentaje de infección de *Rosellinia*. Los menores porcentajes de infección se obtuvieron en suelos con un contenido de materia orgánica 6.2 y 3.3 %. Por lo tanto se sugiere que el patógeno tiene un mejor desarrollo en suelos ricos en materia orgánica. *Rosellinia* es un hongo que prospera en ambiente sombreado; terrenos donde hay abundantes troncos y ramas podridas, acumulación de mucha hojarasca y detritus orgánico que cubren el suelo (PROCAFE 1996).

2. 3. Manejo de la enfermedad

En la actualidad se carece de métodos eficaces de control y solo existen algunas medidas que tienden a frenar el desarrollo de la enfermedad. Merchán (1989) afirma que el mejor método de control de *Rosellinia* lo constituye la reducción de inóculo del suelo, y que las plantas que presentan los síntomas deben ser arrancadas y destruidos.

2. 3. 1. Labores culturales

Se ha observado que cuando aparecen los primeros focos de plantas afectadas, la medida más eficaz e importante consiste en eliminar completamente los tallos y raíces de las plantas enfermas. Esta medida reduce la posibilidad de que *Rosellinia* se desarrolle y se propague a otras plantas (Herrera y Grillo 1989). De igual modo con las plantas que se encuentran cerca de los focos y muestren los primeros síntomas de estar enfermas. También se recomienda en el lugar donde se localizan las plantas enfermas, cavar una zanja de 50 cm de profundidad y aplicar cal en las paredes interna. No es recomendable en estas áreas replantar antes de transcurrido 6-12 meses; ya que frecuentemente las nuevas plantas son afectadas por el hongo. Debe evitarse el exceso de humedad del suelo, asegurando un buen drenaje, dado que la acumulación de agua es un factor que predispone a la planta para el ataque de este patógeno (Herrera y Grillo 1989; Kannan 1986).

2.3.2. Control químico

A la fecha no se cuenta con un control químico eficaz para controlar *Rosellinia* spp. Merchán (1993) evaluó diferentes frecuencias y dosis de productos químicos como: Captan, Carboxin + Captan, Cyproconazole, Metil thiofanato, Oxicarboxin, Thiabendazole, Triadimefon, y Tridimorph. Después de dos años de estudio observó que en promedio los valores más bajos de incidencia y severidad correspondieron a los árboles no tratados con fungicidas, indicando que estos productos probablemente favorecieron el desarrollo del patógeno mediante la reducción de la microflora antagonista, y ninguno de los productos utilizado previno ni controló la enfermedad.

3.3.3 Control biológico

El control biológico se define como la reducción de la densidad del inóculo o de su actividades productoras de enfermedad de un organismo patógeno o parásitos en su estado activo o de dormancia, por uno o más organismos que ocurren naturalmente o a través de la manipulación del medio ambiente, hospedante, o antagonistas o por la introducción masiva de uno o más antagonistas. (Baker y Cook 1982).

En las últimas décadas, el control biológico esta recibiendo mucha atención, como ejemplo es la adición de microorganismos antagonistas, que presentan un gran potencial para controlar patógenos que habitan en el suelo (Johnson y Dileone 1999). Principalmente por el énfasis en la sostenibilidad de los sistemas de producción agrícola, ya que se presenta como una alternativa de bajos costos al reducir el uso de agroquímicos, ofrece soluciones a problemas como la persistencia de los plaguicidas y reduce el deterioro de la microflora del suelo (Rincón *et al.* 1992; Jacobsen y Backman 1993).

En la naturaleza se encuentran suficientes antagonistas, no obstante, la búsqueda y evaluación es un proceso fundamental y necesario para iniciar los programas de control biológico (Krauss *et al.* 1999).

En diversos estudios se ha demostrado el efecto antagonista de *Trichoderma* spp. El cual es uno de los hongos antagonista más estudiados ya que presenta un gran potencial como agente de control biológico. Además es un hongo que prolifera en varios tipos de suelos, especialmente los que tienen un alto contenido de materia orgánica (Papavizas 1973; Lewis y Papavizas 1984; Freeman *et al.* 1986).

Rojas *et al.* (1992) establecen que el control biológico de *R. bunodes* con la utilización del antagonista *Trichoderma* tiene muchas posibilidades de aplicación en los sistemas de producción, ya sea como componente de sistemas integrales de manejo de enfermedades o mediante el desarrollo de biopesticidas con base en este microorganismo.

2. 4. Metodología en control biológico

2. 4. 1. Aislamiento y tamizado de antagonistas en placas precolonizadas

El aislamiento de un gran número de biocontroladores potenciales es relativamente fácil. Sin embargo, es necesario realizar un proceso de tamizado para descartar la mayoría y seleccionar las cepas más promisorias. La importancia del tamizado radica en que las evaluaciones de campo son más confiables, pero son más caras por lo que deben probarse en el campo solo un número de antagonistas preseleccionados (Krauss *et al.* 1999).

Muchos estudios publicados presentan resultados, donde se usan pruebas *in vitro* en las cuales el patógeno y el antagonista son ubicados en lados opuestos de platos petri con medios de cultivos (laboratorio) ricos en nutrientes y se mide la inhibición del crecimiento del patógeno. La inhibición *in vitro* en muchos casos es producto de la producción de antibióticos que dependen fuertemente del substrato usado (Whipps 1987). La mayoría de los medios usados no son representativos de los substratos naturales, por lo tanto, la inhibición *in vitro* en medios altamente nutritivos no correlaciona con la eficacia del biocontrolador en el campo (Huber & Watson 1966); tampoco la ausencia de inhibición bajo tales condiciones artificiales, debería ser usada como un criterio para descartar un agente candidato como biocontrolador en un proceso de pretamizado.

En realidad, la mayoría de los micoparásitos no producen zonas de inhibición substancial porque su modo de alimentación parasítica requiere contacto físico con el hospedero, el cual sería, con menor posibilidad, inactivado si el patógeno ha sido inhibido antes de entrar en contacto. La antibiosis es solo uno de los muchos mecanismos posibles para el antagonismo y su importancia relativa es controversial (Fravel 1988). Sin embargo juega un papel en algunas interacciones y su involucramiento debe ser probado en los substratos naturales respectivos.

Krauss *et al.* (1999), afirmaron que las interacciones *in vitro* no son apropiadas, con el propósito de seleccionar agentes biocontroladores efectivos, pero pueden ser útiles para detectar la habilidad principal de un organismo para producir antibióticos. Esto es de gran interés en estudios de toxicología por ejemplo, si el agente de biocontrol va a ser aplicado a productos comestibles o para registro de un agente de biocontrol. A pesar de estas limitantes las interacciones *in vitro* siguen siendo utilizadas ampliamente en la selección de agentes de control biológico.

2. 4. 2. Tamizado de antagonistas

2. 4. 2. 1. El uso de bioensayos

Los bioensayos son simulaciones a pequeña escala que representan condiciones naturales específicas. Los cuales son llevados a cabo en el laboratorio o invernadero y por eso, normalmente no toman en cuenta las variabilidad climáticas, las cuales juegan un papel importante en el campo. Dependiendo del propósito, los bioensayos pueden usar plantas producidas a partir de cultivo de tejidos, plántulas que son particularmente útiles para patógenos del suelo o varias partes extraídas de la planta (frutos desprendidos, hojas, discos de cáscara, discos de hoja o raíces, etc.). El marchitamiento se simula bien en ensayos con plántulas para enfermedades de suelo (Krauss *et al.* 1999).

Los bioensayos, correctamente empleados e interpretados, son la mejor simulación de las condiciones naturales con que contamos en el presente para el tamizado de agentes de control biológico, pero se debe tener en mente que partes separadas de plantas, plántulas o tejido vegetal producido *in vitro*, difieren marcadamente de las condiciones naturales (Krauss 1996).

2. 4. 2. 2. Inoculaciones con patógenos y antagonistas

La eficacia del control biológico depende del equilibrio entre patógenos y el antagonista(s). La mayoría de los "antagonistas" pueden hacerse lucir como promisorios si se aplican en niveles altamente superiores a los del patógeno. No hay reglas fijas que expliquen el nivel de inóculo que se debe usar en el campo. Sin embargo, muchos patógenos como *Phytophthora* spp. y *Colletotrichum musae* son ejemplos en cacao y banano, respectivamente, que pueden inducir síntomas a concentraciones de 10^3 ufc ml^{-1} . Otros necesitan mayores niveles de inóculo para causar una enfermedad consistente. Antagonistas aplicados a niveles más bajos que los del patógeno, raramente funcionan (Krauss *et al.* 1999).

Krauss *et al.* (1999), establecieron que los buenos antagonistas deberían dar una protección significativa a niveles de inóculo iguales al del patógeno (50:50), y es una prueba estricta de selección que puede eliminar candidatos mediocres. Niveles del antagonista 1000 veces más altas que las del patógeno son frecuentemente usadas para producir un biocontrol consistente y deberían ser consideradas como máxima diferencia para antagonistas de hongos. Diferencias excediendo este máximo darían una ventaja irreal al agente de control biológico, porque es improbable que una dosis tan alta pueda ser mantenida en el campo, incluso con aplicaciones repetidas y/o reforzadas con nutrimento en la formulación.

Las curvas dosis-efecto usualmente son logarítmicas. Incrementando la concentración 10 veces doblará la respuesta, incrementando 100 veces aumenta 3 veces el nivel de respuesta etc. Por eso deben usarse series de diluciones en base a 10 en pruebas preliminares para determinar concentraciones sensibles (Krauss *et al.* 1999).

Otra consideración principal en el tamizado de agentes de control biológico, es el tiempo de aplicación de patógeno(s) y antagonista(s). Muchos antagonistas funcionan bien si se aplican antes que el patógeno pero no si se aplican simultáneamente o después del patógeno. Dado que en el campo siempre existe una presión de enfermedad casi constantemente, un investigador crítico buscará seleccionar agentes de biocontrol que controlen la enfermedad cuando se inoculen simultáneamente (Krauss *et al.* 1999).

Un último punto de importancia es el grado de condiciones estériles que deberían ser utilizadas en el pre-tamizado. Aunque las condiciones asépticas dan resultados más definidos, y por ende más fáciles de interpretar, también son menos representativas de las condiciones naturales. Un buen agente de control biológico dará resultados claros en condiciones no estériles. Similarmente, usando condiciones estériles, podemos seleccionar un antagonista débil creyéndolo promisorio, pero este funciona bien solo cuando los competidores han sido eliminados. Este candidato es poco probable que funcione en el campo y es mejor descartarlo durante un pre-tamizado estricto. Por esto, los bioensayos bajo condiciones no estériles (suelo no estéril para plántulas, no-esterilización de superficie para partes desprendidas de la planta) deben ser considerados al menos en etapas avanzadas del proceso de tamizado (Krauss *et al.* 1999).

2. 4. 2. 3. Rango de hospedante

Durante el trabajo con micoparásitos, es muy importante determinar el rango de hospedantes de los antagonistas promisorios. Para esto es necesario comparar los hospedantes, y no los antagonistas. Es decir, la tasa absoluta de crecimiento no es relevante, sino la variabilidad de las tasas de crecimiento entre hospedantes. Uno puede comparar géneros diferentes de un complejo de enfermedad para seleccionar hiperparásitos de amplio rango de hospedante, o comparar cepas diferentes de una especie de patógenos para estimar el efecto de biodiversidad del patógeno en el control biológico, o inocular hongos benéficos con el antagonista para eliminar antagonistas con efecto negativo a estos hongos (Krauss *et al.* 1999).

Estudios de rangos de hospedantes para patógenos de la parte aérea, han permitido identificar varios micoparásitos de amplio rango que atacan tres géneros de patógenos diferentes de cacao: *Crinipellis perniciososa*, un basidiomicete, *Moniliophthora roreri*, un basidiomicete imperfecto y *Phytophthora spp*, un oomicete. El hecho de que muchos micoparásitos fueron capaces de parasitar estos tres géneros, incluyendo las diferentes cepas probadas y que fueron originadas en diferentes zonas, ofrece un ámbito considerable para su explotación como agentes de control biológico. Por esto, es importante evaluar los micoparásitos contra una población representativa del patógeno. Debido a la diversidad del patógeno, sería irrealista esperar que un agente de

biocontrol compuesto por una sola cepa, garantice un control consistente contra una población diversa de patógenos y bajo condiciones ambientales variables. Por eso, es recomendable trabajar con mezclas de cepas de antagonista (Krauss *et al.* 2001).

2. 5. Variabilidad de patógenos e implicaciones para el control biológico

3.5.1 Biodiversidad de patógenos y discriminación de cepas

Cepas de las mismas especies de patógenos pueden presentar diferencias significantes. Esto se ha demostrado para diferentes patógenos incluyendo *Colletotrichum* spp. *Fusarium* spp. y *Phytophthora* spp. Por eso, es importante trabajar con varias cepas representativas de la especie del patógeno. Las cuales deben ser originadas en las diferentes áreas en donde se espera que el biocontrolador controle al patógeno. También debe tomarse consideraciones eco fisiológico, como adaptación al sitio (Krauss 1999).

Para *Colletotrichum musae*, otro patógeno altamente diverso, se ha mostrado que hasta micoparásitos de amplio rango de hospederos, que atacan dos o más géneros de patógenos, difieren significativamente entre cepas de *C. musae* (Krauss *et al.* 1998). La discriminación de cepas fue observada a todos los niveles de interacción celular con *C. musae*. Los antagonistas actuaron por diferentes mecanismos, como parasitismo, antibiosis, competencia simultáneamente (Krauss *et al.* 2001), lo cual concuerda con las observaciones hechas por Elad (1996) en diferentes sistemas de control biológico.

La importancia relativa de cada mecanismo, difirió en los micoparásitos individualmente. La discriminación de cepas fue correlacionada con la susceptibilidad diferenciada de las cepas de *C. musae* a uno o más mecanismos menores. Observaciones similares han sido hechas para micoparásitos con amplio rango de hospederos, contra aislados de *Phytophthora palmivora* de cacao en Perú, pero en menor grado contra *C. pernicioso* y *M. roreri*.

Para los últimos hongos, eso es una sorpresa porque se cree que estos organismos tienen una base genética relativamente estrecha. Indicando que es necesario estudiar más este fenómeno y la variabilidad de patógenos (Krauss *et al.* 2001).

2. 5. 2. Mezclas de cepas de bio-controladores

Uno de los principales problemas del control biológico es la inconsistencia en la actuación de los controladores biológicos bajo condiciones de campo sin razón aparente. Posiblemente, el procedimiento de desarrollo puede ser un factor que contribuye. En la mayoría de los tamizados de control biológico, se prueba un gran número de candidatos contra una sola cepa de referencia del patógeno, incluso en un estado avanzado de las evaluaciones. Poca atención es puesta a las poblaciones de patógenos. Los antagonistas más promisorios se prueban mas tarde en el campo donde son expuestos no sólo a la entera biodiversidad de poblaciones de patógenos contra los que nunca han sido evaluados, sino que también a un amplio rango de condiciones ambientales que en el laboratorio no pueden ser simuladas. Como resultado, estos controlan la enfermedad en algunos experimentos pero en otros no (Krauss *et al.* 2001).

Cualquier cepa de antagonista está adaptada a un nicho particular. Una cepa, por si misma, no puede esperarse que actúe igualmente en diferentes zonas climáticas, microclimas y estaciones (Krauss 1999).

2. 5. 2. 1. Ventajas de las mezclas de cepas

Bio-inóculo mezclado ha sido, probablemente, pionero en el control de enfermedades del suelo (Sivasithamparam y Paker 1978, citado por Krauss 1999) y desde entonces han sido aplicado exitosamente en el campo y en situaciones de post-cosecha.

En un estudio para el control biológico de la pudrición de la corona en banano, se seleccionaron y pre-tamizaron micoparásitos usando 12 cepas de patógenos del complejo de la enfermedad. Se encontraron diferencias entre los diferentes antagonistas. Más aún, en las interacciones de cepas de patógenos con ambos antagonistas y experimento, fueron altamente significativas. Esto significa que el control de diferentes cepas de *C. musae* difiere entre cepas de antagonistas, así como también entre experimentos repetidos. Sin embargo, el descubrimiento interesante es que cada antagonista exhibió un comportamiento consistente, como puede ser concluido de la falta de interacción significativa entre antagonista y experimento. Por otro lado, el factor "cepa de patógeno" interactuó con ambos antagonista y experimento. La inconsistencia se debió entonces a

la variabilidad del patógeno *C. musae*, por ejemplo el grado particular de susceptibilidad de cada cepa de *C. musae* a un antagonista individual (Krauss *et al.* 2001).

De acuerdo a lo anterior, se evaluaron combinaciones de antagonistas en un intento por superar la inconsistencia en el control de pudrición de la corona. En bioensayos, las mezclas de hasta cuatro hongos antagonistas fueron más efectivas controlando infecciones mezcladas causadas por cuatro cepas de *C. musae*. Cuando estas mezclas fueron usadas para tratar racimos de banano que fueron infectados en forma natural por una multitud de patógenos, otra vez, el biocontrol fue más eficiente con inóculo conteniendo tres o cuatro antagonistas (Krauss *et al.* 2001).

2. 5. 2. 2. Compatibilidad de antagonistas

No todos los intentos por combinar agentes de control biológico han sido exitosos (Raupach y Kloepper 1998). Estudios han reportado incompatibilidad entre antagonistas (Leibenger *et al.* 1997). Sin embargo, a pesar de que los antagonistas probados en estudios de la pudrición de la corona fueron antagonistas de amplio rango de hospederos, no parecieron antagonizarse entre sí a ningún nivel marcado, en agar agua o en cáscara de banano. El porcentaje de recuperación de antagonistas de discos de cáscara inoculados incrementó con el número de cepas de bioinóculo, mientras que la frecuencia de reisolamiento del patógeno disminuyó. En realidad, a partir de discos tratados con cepas individuales de antagonistas siempre se pudo aislar el patógeno aunque la pudrición de corona hubiera sido reducida significativamente. Pese a esto, la compatibilidad contra antagonistas debe ser probada para cada caso. Recientemente, Fukui *et al.* (1999, citado por Krauss 1999) sugirieron que el enfoque más práctico es iniciar la evaluación de agentes de control biológico con una mezcla de muchos antagonistas y eliminar los incompatibles o no efectivos.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización

Los experimentos se realizaron en el invernadero y en el laboratorio de Fitopatología de la Unidad de Fitoprotección, en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), en Turrialba, Costa Rica, localizado a 9°52'N y 83°38'O y 640 msnm, donde las variables climáticas son de 22°C, 2479 mm, 87% HR y 11,82 uJ/m², en promedio (Jiménez 1994).

3.2. Cultivo del patógeno *Rosellinia* spp.

3.2.1. Colección del patógeno *Rosellinia* spp.

Para establecer la colección del patógeno se visitaron diferentes zonas y productores. Se localizaron los focos de infección del patógeno y se tomaron al azar, plantas infectadas naturalmente que presentaban los síntomas típicos de la enfermedad como marchitez. Se colectaron muestras de la colección de cacao del CATIE. En el caso de café, con el apoyo de técnicos extensionistas de ICAFE, se visitaron fincas de la zona del Sauce. Además se tomaron muestras de cafetales del CATIE. En el caso de papa, se visitó Tierra Blanca de Cartago, zona altamente productora de papa y con alta incidencia de *Rosellinia*.

Las muestras de plantas enfermas procedentes del campo se llevaron al laboratorio del área de Fitopatología del CATIE, se cortaron en trozos pequeños y se lavaron con agua potable para retirar el suelo de las raíces y el tallo de las plantas afectadas. Posteriormente se dio una segunda lavada utilizando agua esterilizada y se dejaron secando a temperatura ambiente para reducir el exceso de humedad y evitar la contaminación.

3.2.2. Metodología de aislamiento

Durante el proceso de aislamiento del patógeno se probaron tres métodos diferentes los cuales se describen a continuación: 1) Papel Kraft, 2) Siembra directa y 3) Vermiculita (figura 2):

3.2.2.1. Papel Kraft

El papel Kraft que se utilizó para llevar a cabo el aislamiento se envolvió con papel aluminio y se esterilizó en la autoclave durante 40 minutos a 121 °C, se dejó enfriar y se humedeció con agua esterilizada. Una vez que las muestras fueron secadas a temperatura ambiente se envolvieron con el papel Kraft y se ubicaron sobre una malla colocada dentro de una bandeja con agua esterilizada en el fondo, para formar una cámara húmeda y se mantuvo cerrada para evitar la contaminación (figura 2A).

3.2.2.2. Siembra directa

Para la inoculación directa en los medios específicos, las muestras procedentes del campo fueron cortadas en trozos pequeños y se sumergieron en una solución de hipoclorito al 1 % v/v durante un minuto. Después se enjuagaron rápidamente con agua esterilizada y se dejaron secando en la cámara de transferencia durante tres horas. Posteriormente se quitó la corteza con un bisturí y se hicieron cortes finos para ser inoculados directamente sobre los medios *CZAPEK-DOX AGAR* (CDA) con Rosa de Bengala (figura 2B) y papa dextrosa agar acidificado (PDAA) figura 2C. La inoculación se hizo en la cámara de flujo laminar para evitar la contaminación.

3.2.2.3. Vermiculita

La vermiculita es un tipo de arcilla expandible. En una bolsa autoclavable se echaron aproximadamente dos libras de vermiculita y se agregaron 100 ml de agua destilada con el fin de humedecerla. Luego se autoclavó durante dos horas. Se dejó enfriar en la cámara de transferencia y se pasó a cajas plásticas.

Se introdujeron trozos pequeños de muestras de plantas enfermas y se cubrieron totalmente con la vermiculita. Se roció con agua esterilizada hasta humedecer y la caja se mantuvo cerrada para evitar la contaminación (figura 2D).

Para la preparación del PDAA, se agregaron 500 ml de agua destilada en un erlenmeyer con capacidad de un litro. Se pesaron 39 g de Papa Dextrosa Agar (PDA) y 5 g de agar solidificante y se echaron al erlenmeyer. Finalmente se agregó el resto de agua hasta completar 1000 ml. Para lograr una buena disolución del medio y tener una buena homogenización se dejó agitando con un magneto mas calor durante un periodo de tiempo de 15-20 minutos hasta lograr una solución transparente. Luego el volumen total se dividió entre cuatro erlenmeyers con capacidad de 250 ml y se sellaron con papel aluminio, se autoclavaron a 121 °C durante un periodo de 25-30 minutos, finalmente se dejaron enfriar a una temperatura manejable en la cámara de transferencia y con un gotero se agregó el ácido láctico (25 % v/v, pH = 0.6) a una dosis de 50 gotas para un litro de PDA, finalmente tener un medio con un pH = 3.5 y evitar el crecimiento de bacterias.

El CDA con Rosa de Bengala es un tipo de medio específico para hongos de crecimiento lento. Para preparar la solución el procedimiento es el siguiente: en un litro de agua esterilizada se agregaron 0.4 g de Rosa de Bengala. Se autoclavó una sola vez; cuando se tiene preparado se guarda en una botella color ámbar para evitar la foto irradiación, y se recomienda no usarlo después de un mes de preparado (Pady *et al.* 1960).

Para la preparación del CDA con Rosa de Bengala, se agregaron 500 ml de agua destilada en un erlenmeyer con capacidad de un litro. Se pesaron 35 g CZAPEK-DOX + 20 g de agar + 10 ml de la solución madre de Rosa de Bengal, luego se agregó el resto de agua hasta completar el litro.



Figura 2. Métodos para el aislamiento del patógeno *Rosellinia* spp.

Para lograr una buena homogenización del medio CDA se puso a agitar con un magneto más calor hasta lograr una buena dilución del medio. Luego se autoclavó durante 20 minutos y a 1 bar de presión. Finalmente el medio se mantuvo por un baño de María durante a una temperatura entre 40 – 50 °C y en la cámara de transferencia de flujo laminar se adicionaron los antibióticos (ciclohexamida 0.5 g/L y cloramfenicol 1 g/L). Para la adición de los antibióticos se usaron filtros milipor de 0.2 µm. Durante este proceso es importante mantener la temperatura del medio en 40 °C para evitar que los antibióticos no se desnaturalicen.

Los éxitos de aislamiento logrado con cada uno de los métodos se compararon con la prueba Chi-cuadrado.

3.2.3. Identificación de *Rosellinia*.

Rosellinia es un género que se caracteriza por tener un crecimiento muy lento en comparación con otros hongos del suelo como *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. por lo que se revisaron las muestras periódicamente después de la inoculación y se transfirió el crecimiento de *Rosellinia* antes de que se contaminara.

Para tener seguridad que el hongo que estaba creciendo era *Rosellinia*, el micelio se observó al microscopio compuesto y se comprobó la característica típica del micelio en forma de hueso (ver figura 3, PROCAFE 1996). Cuando se tuvo seguridad que se trataba de *Rosellinia*, se transfirió el crecimiento a PDAA el cual es un medio que inhibe el crecimiento de bacterias y favorece el crecimiento de *Rosellinia*.

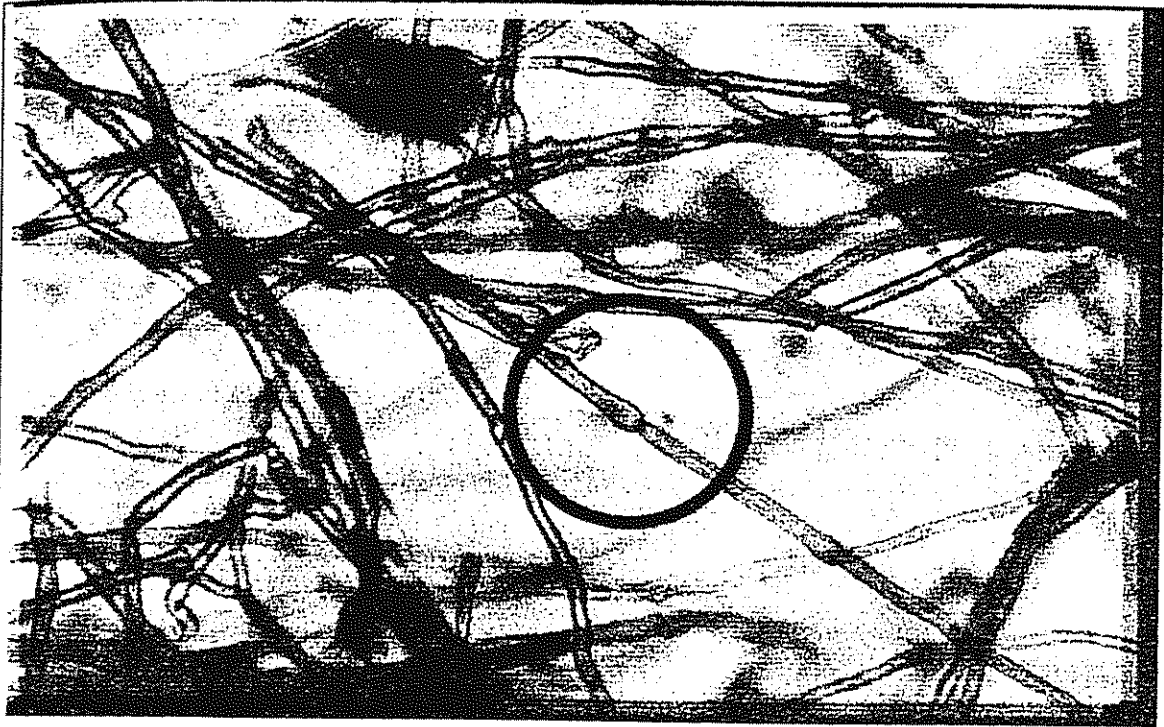


Figura 3. Forma típica del micelio de *Rosellinia* sp. Fuente: PROCAFE (1996)

3.2.4. Crecimiento de *Rosellinia* spp.

Cuando los patógenos se obtuvieron en cultivos puros, se comparó el crecimiento radial de ambas cepas (RB0001 y RB0002) en dos condiciones luz y oscuridad. Las cepas sembradas en PDAA se ubicaron en una cámara incubadora a una temperatura constante de 25 °C. Después de 8 días de la inoculación se evaluó su tasa de crecimiento en milímetros por día. Las tasas de crecimiento se comparó con ANDEVA de dos factores (cepas e iluminación) con 27 repeticiones.

3.3. Aislamiento de micoparásitos

El aislamiento de los antagonistas se llevo a cabo en dos fases:

3.3.1. Fase de campo

Para obtener los micoparásitos antagonistas se tomaron muestras de plantas sanas que estaban creciendo alrededor de los sitios donde se presentaba la enfermedad, para garantizar una alta presión de inóculo. Esto representa una mejor garantía de que el control biológico está funcionando. Esto se hizo también para garantizar una buena adaptación al hábitat, y por ende, su supervivencia y actividad fisiológica requerida para el control biológico (Krauss y Bustamante 1999).

Para el aislamiento de los antagonistas ya sea en cacao o papa, se colectaron cinco sub muestras de suelo del área de la rizósfera de las plantas a 30 cm de la base del tallo hacia fuera y 30 cm de profundidad. Antes de extraer la muestra se limpió toda la hojarasca de la zona de goteo de la planta y con la ayuda de un palín se sacó el suelo. Se mezcló bien y se llevó al laboratorio aproximadamente 454 g, se sacaron todos aquellos materiales extraños como piedras y raíces.

3.3.2. Fase de laboratorio

El aislamiento de los micoparásitos se realizó usando la técnica de cebo *llamada métodos de placas precolonizadas* (Foley y Deacon 1985, ver figura 4). El método consiste en precolonizar platos petri con el hongo patógeno, dejarlo incubar hasta que llene completamente. El suelo antes colectado del campo en el laboratorio, se partió en pedazos pequeños para aumentar el área de superficie. Estos pedazos se dejaron secar al aire a temperatura ambiente, de un día para otro, para reducir la humedad y evitar la contaminación por bacterias. Luego cuidadosamente se inocularó sobre la superficie del micelio de hospedero (patógeno). Para lograr un buen contacto un buen contacto con el micelio pero no con el agar. Cuando los platos no estaban completamente precolonizados, fue necesario remover las partes no colonizadas del agar. Después de la inoculación se dejaron incubando por periodo de cinco días y con la ayuda del

estereoscopio se aislaron en cultivos puros. Los organismos que crecieron sobre el micelio de las placas precolonizadas por el patógeno. Por la agresividad de los micoparásitos, fue posible obtenerlos en cultivos puros en solamente uno o dos pasos (Krauss y Bustamante 1999).

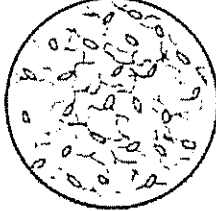
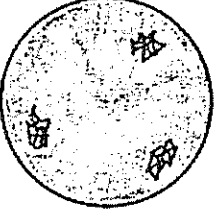
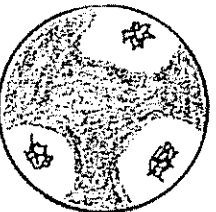
<ul style="list-style-type: none"> • Se cultivaron placas de PDAA con micelio del hongo hospedero <i>Rosellinia</i> spp. Se dejó incubar a la oscuridad a 25 °C hasta que las placas petri estuvieran bien colonizadas. 	
<ul style="list-style-type: none"> • Se colocó suavemente sobre el micelio de platos precolonizados por el hongo hospedero <i>Rosellinia</i> spp. aproximadamente 1 g de suelo seco que es la fuente de inóculo de los antagonistas. 	
<ul style="list-style-type: none"> • Se dejó incubar hasta que el parasitismo de los antagonistas fue visible. • Finalmente con la ayuda del estereoscopio los micoparásitos fueron aislados en cultivo puro en medio de PDAA. 	

Figura 4. Presentación esquemática del método de placas precolonizadas.

3.4. Rango de Hospedantes de Micoparásitos en Placas Precolonizadas

Los micoparásitos que resultaron en el proceso de aislamiento, se le determinó el rango de hospedante y se escogieron los más promisorios. Se precolonizaron platos de PDAA con cada una de las cepas del hospedero *Rosellinia* spp. se inocularon con los micoparásitos y se dejaron crecer por cinco semanas. El crecimiento de los micoparásitos se midió indirectamente de la siguiente manera: Se marcaron cinco franjas paralelas, cada una de cinco milímetros de ancho, en la base de los platos. Cada siete días se removió una de las franjas con un bisturí, cortando desde el extremo distal hacia la fuente de inóculo del micoparásito para evitar la contaminación cruzada (figura 5). Las franjas de agar se cortaron en quince pedazos sucesivos de cinco milímetros, de manera que la

presencia del micoparásito será en un bloque particular de agar de 5X5 mm, el cual tiene una distancia conocida hasta la franja de inóculo original, y se relacionó con el crecimiento que el hiperparásito ha tenido cada semana, a través de la placa precolonizada (figura 5). Para cada micoparásito, se compararon las tasas de crecimiento en ambas cepas mediante la prueba t-student. La susceptibilidad general de las cepas se comparó mediante la prueba t-pareada.

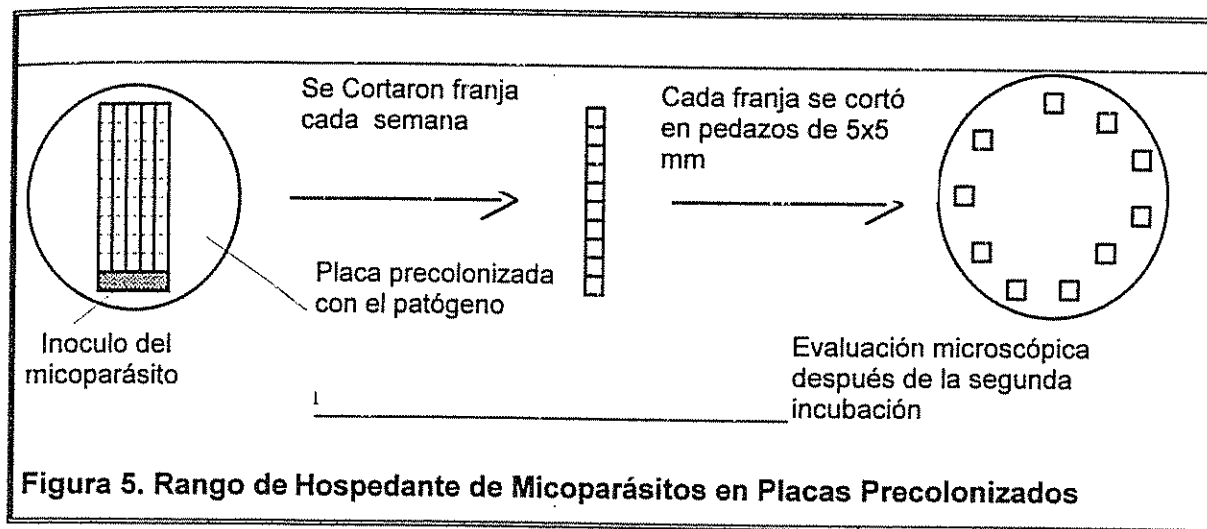


Figura 5. Rango de Hospedante de Micoparásitos en Placas Precolonizados

3.5. Compatibilidad de micoparásitos

3.5.1. Pruebas preliminares de patogenicidad

Previo a realizar los bioensayos de control biológico de *Rosellinia* se realizaron pruebas de patogenicidad con plantas de cacao de diferentes edades. El objetivo de las pruebas fue para conocer si el hongo tenía capacidad para afectar plantas de cacao en diferentes etapas del cultivo. Además se probó diferentes dosis de arena con crecimiento micelial de *Rosellinia* para conocer la dosis necesaria en la cual el patógeno es capaz de producir enfermedad.

En el primer ensayo, se colocó en una bandeja 500 g de arena de río más 150 g de avena Quaker, se mezcló y se esterilizó durante 45 minutos. Luego se enfrió y se dejó en un lugar aséptico, se humedeció con agua esterilizada hasta capacidad de campo y en la cámara de transferencia se inoculó con 10 discos de medios de agar con crecimiento de

Rosellinia (cepa RB0001). Se dejó incubando en la oscuridad en una cámara a temperatura constante de 25 °C durante un periodo de 14 días, período en el cual el patógeno mostró un buen crecimiento del micelio sobre la arena. Cuando el hongo presentó un buen crecimiento, a la bandeja se le agregó 500 g más de arena de río esterilizada y se mezcló bien con la arena donde creció el patógeno (testigo positivo). El testigo absoluto fue una bandeja con arena de río sin inóculo. En cada bandeja se sembraron 25 semillas de cacao y después de 18 días se evaluó el porcentaje de germinación.

El segundo ensayo, se realizó con el propósito de conocer la dosis necesaria en la cual el patógeno es capaz de causar enfermedad, y para saber si las plantas de cacao a mayor edad son más susceptibles a *Rosellinia*. Se seleccionaron plantas de tres meses de edad, se sembraron en bolsas de dos kilogramos de capacidad y se inocularon con diferentes dosis de arena con inóculo. Se compararon cuatro tratamientos: Testigo absoluto, 100 g, 200 g, y 250 g de arena con inóculo de *Rosellinia*, respectivamente. Después de tres meses de inóculo se evaluó la altura de las plantas (cm), número de hojas, peso seco de hojas (g), peso seco de raíces (g) y la presencia de la enfermedad en cada tratamiento.

3. 5. 2. Preparación del inóculo

Se probaron dos métodos para la producción de inóculo de *Rosellinia* (cepa RB0001), arena de río mezclada con avena Quaker y semilla de trigo. En ambos métodos se autoclavó durante 45 minutos. En el método de la arena de río mezclado con avena Quaker, se observó mucho problema ya que el hongo mostró un crecimiento lento y se contaminaba con mucha facilidad. El método usando semilla de trigo fue mejor ya que el hongo creció más rápido y sin problema de contaminación. Estas observaciones concuerdan con estudios realizados por (Sztejnberg *et al.* 1987), los cuales comprobaron que el método funciona bien para producir inóculo de *Rosellinia*. Por lo tanto, para la producción de inóculo de *Rosellinia* se decidió poner en práctica esta metodología.

Se pesaron 100 g de semilla de trigo y se colocaron en una botella cuadrada de capacidad de un litro y se agregaron 150 ml de agua. Se autoclavó durante 45 minutos y se dejó enfriando en la cámara de flujo laminar durante tres horas. El agua sobrante dentro de la botella se drenó para reducir la contaminación por bacterias. Cuando la semilla de trigo se enfrió, cada botella se le inóculó con 6 trozos de PDAA con crecimiento

joven de *Rosellinia* (7 días de edad) de un diámetro aproximado 5x5 mm. Las botellas se dejaron incubando en la oscuridad a una temperatura constante de 25 °C durante un periodo de tiempo de 14 días, periodo en el cual el hongo mostró un crecimiento evidente.

Los antagonistas como *Trichoderma* y *Gliocladium* tienen una producción abundante de conidias sobre medios ricos en nutrientes, además son hongos fáciles de manipularlos y obtener el inóculo necesario. En ese sentido, el inóculo de los antagonistas se obtuvo de platos precolonizados previamente, de 8 días después de haberse inoculado. A cada plato se agregó 10 ml de agua destilada y con un pincel se hizo un lavado de las conidias. Para conocer la cantidad de conidia por cada plato, de los diez mililitros se sacó una alícuota y a través del método de conteos con el hemacitómetro se determinó la cantidad de esporas disponible por cada plato precolonizado (French y Hebert 1982) y luego se estimó la concentración necesaria por mililitro de agua para cada tratamiento.

3.5.3. Bioensayo de compatibilidad de hiperparásitos

Se observó que el patógeno afecta las plantas de cacao indistintamente de la edad, por lo que se decidió trabajar con plantas de 15 días después de germinada. Para establecer el ensayo de compatibilidad de los antagonistas, se seleccionó suelo del mismo lote donde se aislaron los antagonistas y el patógeno, esto con el propósito de tener la misma microflora en el suelo donde se inocularon los antagonistas. No obstante, se tuvo el cuidado de seleccionar las áreas donde la enfermedad no estaba presente, para garantizar un suelo libre del patógeno. La tierra se zarandeó y se llenaron bolsas plásticas de dos kilogramo de capacidad, con suelo natural sin esterilizar, y se sembraron las semillas de cacao.

Los antagonistas más promisorios que resultaron del proceso de pretamizado se aplicaron en forma individual y en mezcla. Tanto el patógeno como los antagonistas se inocularon a la misma vez. El patógeno se aplicó a una dosis de 250 g de semilla de trigo con inóculo de *Rosellinia* por bolsa de 2 Kg. de suelo. Los antagonistas en forma individual se aplicaron una concentración de 1×10^6 conidias por mililitros de agua, en cambio cuando se aplicaron en mezcla de dos y tres se bajó la concentración de cada antagonista a 5×10^5 conidias por mililitros de agua para no aumentar el inóculo total.

Para el ensayo de compatibilidad de antagonista, se utilizó un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) con 9 tratamientos, 5 repeticiones como se detalla en el (cuadro 1), la unidad experimental consistió en cada una de las plántulas de cacao.

3.5.3.1. Tratamientos

Se usaron 9 tratamientos y se aplicaron en forma individual y en mezcla con el propósito de conocer su compatibilidad (ver cuadro1).

Cuadro 1. Tratamientos de antagonistas aplicados de manera individual y en mezcla para el manejo de *Rosellinia* sp.

Tratamientos Individuales (5)	Tratamientos en mezclas de dos antagonistas (3)	Tratamientos en mezclas de tres antagonistas (1)
Testigo absoluto	RB0001+ ARB0004 + ARB0011	RB0001 + ARB0004 + ARB0011+ T-22
Testigo positivo	RB0001 + ARB0004 + T-22	
RB0001+ARB0004	RB0001 + ARB0011 + T-22	
RB0001+ARB0011		
RB0001 + T-22		

Testigo absoluto = Sin inóculo

Testigo positivo = Solo inóculo de *Rosellinia* (RB0001)

ARB0004 = *Trichoderma* sp. aislado del suelo de la rizósfera de plantas de cacao

ARB0011 = *Gliocladium roseum* aislado del suelo de la rizósfera de plantas de papa

T-22 = *Trichoderma harzianum* aislado de Root Shield^{RM} producto comercial

3.5.3.2. Modelo estadístico

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

donde:

Y_{ij} = es la variable aleatoria de respuesta,

μ = la media verdadera poblacional,

τ_i = el efecto del tratamiento i ésimo, y

ε_{ij} = el error experimental.

3.5.3.3. Análisis de la información

Para la variable severidad los datos son fueron paramétricos por lo que se analizaron usando el área bajo la curva propuesta por Jeger (1983) que expresa la acumulación de la enfermedad en el tiempo.

$$ABC = \sum(Y_i + Y_{i+1}) / 2 \times dt_i$$

Donde:

ABC = Area Bajo la Curva

Σ = a la sumatoria de n observaciones

Y_i = Severidad de la enfermedad afectado en la iésima observación

dt_i = Tiempo (días) después de la inoculación en la iésima observación.

El ABC y las demás variables, excepto mortalidad, se analizó mediante ANDEVA.

Los datos expresado en porcentaje, como la mortalidad para el primer ensayo de compatibilidad de antagonistas, fueron analizados usando la metodología propuesta por Cochran para datos binarios según Zar (1996), la cual considera datos aleatorizados en bloques o con medidas repetidas que puede contener dos posibles valores (vivo o muerto). Para el análisis, el valor muerto se registra con "1" y para valores vivo se registra con "0".

3.6. Eficiencia de los micoparásitos en función de la materia orgánica (M.O) y el pH del suelo.

Para conocer el efecto de la M.O y del pH del suelo a nivel de bioensayo, se seleccionaron las mejores mezclas que resultaron del experimento de compatibilidad. Se encontró que las mezclas más promisorias fueron **ARB0004+ARB0011** y **ARB0004+ARB0011+T-22**. Por lo tanto, se decidió trabajar con estas mezclas y conocer su eficiencia sobre en el control biológico de *Rosellinia*.

Para el establecimiento del ensayo se colectó suelo de la misma área donde se aislaron los antagonistas y el patógeno, esto con el propósito de obtener microorganismos adaptados a la misma condición del patógeno. Los elementos minerales fueron determinados por el laboratorio de suelo del CATIE. El contenido de materia orgánica (MO) establecido a través del método de digestión húmeda Walkley y Black (Bornemiza et al. 1979). Se encontró que el suelo de Cabiria tiene (6.14 % M.O). A partir de este

porcentaje, se ajustó a los otros dos niveles deseados para el estudio. Para lograr los niveles propuestos de materia orgánica (6, 9 y 12 %), fue necesario agregar 0, 63 y 126 g de bocachi por bolsas de dos kilogramos de suelo, respectivamente.

También al mismo suelo se le midió el pH, siguiendo la metodología propuesta por Díaz y Hunter (1978), la cual se basa en la determinación del pH a través de la extracción en agua usando una relación suelo / solución 1:2.5. Se encontró que el suelo de Cabiria tiene un pH de 4.17. A partir de este nivel de pH, se ajustó a los otros dos niveles deseados para el estudio adicionando carbonato de calcio (CaCO_3). Previo a instalar el experimento fue necesario medir nueve muestras de 100 g de suelo seco y se agregaron cantidades de 50 hasta 450 mg con intervalos de 50 g de CaCO_3 . Eso se hizo con el propósito de establecer una curva y poder determinar la cantidad necesaria de CaCO_3 para lograr los niveles de pH deseados para el estudio. Para lograr los niveles propuestos de pH (4, 5 y 6) se adicionaron 0, 2.04 y 6.12 g de CaCO_3 por bolsas de dos kilogramos de suelo, respectivamente.

3.6.1. Diseño experimental

Se utilizó un Diseño factorial completamente aleatorizado de la forma 4 X 3 (factor A = 4 tratamientos: dos testigos y las dos mejores mezclas de antagonistas; factor B = 3 diferentes contenidos de materia orgánica o pH, 5 repeticiones). La unidad experimental consistió en cada plántula de cacao.

3.6.2. Tratamientos evaluados

A nivel de bioensayo, se seleccionaron las mezclas de dos antagonistas **ARB0004+ARB0011** y mezclas de tres antagonistas **ARB0004+ARB0011+T-22**, las cuales resultaron ser las más promisorias durante el ensayo de compatibilidad de antagonistas, y se comparó con un testigo positivo (solamente *Rosellinia* RB0001) y un testigo absoluto (sin inóculo). Además se evaluó el efecto de las características del suelo materia orgánica y pH, sobre la eficiencia de las mezclas de antagonistas para suprimir la presencia de *Rosellinia*. Los tratamientos, tanto el patógeno como los antagonistas, se aplicaron a la misma vez. El patógeno se aplicó a una dosis de 250 g de semilla de trigo con inóculo de *Rosellinia* por bolsa de 2 Kg. de suelo y los antagonistas se aplicaron una

concentración 5×10^5 conidias por mililitros de agua (concentración total con iguales proporciones de cada antagonista).

3.6.3. Modelo estadístico

$$Y_{ij} = \mu + A_{(i)} + B_{(j)} + AB_{(ij)} + E_{(ij)}$$

donde:

- Y_{ij} = Es la variable aleatoria de respuesta.
- μ = La media verdadera poblacional.
- $A_{(i)}$ = Efecto de la i-ésima cepas de micoparásitos.
- $B_{(j)}$ = Efecto del j-ésimo nivel de materia orgánica o pH.
- $AB_{(ij)}$ = Efecto de interacción entre $A_{(i)}$ y $B_{(j)}$
- $E_{(ij)}$ = Error Experimental

3.6.4. Variables de respuestas

En todos los experimento se evaluaron las siguientes variables: severidad de los síntomas usando una escala no paramétrica de 0 a 5, de la misma se construyó la curva de severidad en el tiempo y se calculó el área bajo la curva (ABC), mortalidad de plántulas (%), días de sobrevivencia de planta, altura de plantas (cm), número de hojas, área foliar (cm^2), longitud de raíces (cm), peso seco de hojas (g) y peso seco de raíz (g).

3.6.4. Análisis de la información

Todos los datos fueron analizados a través de programa estadístico SAS. Previos a los análisis se realizaron pruebas univariadas para conocer si los datos se ajustaban a los supuestos del análisis de varianza (ANDEVA). Las variables como: Severidad ABC, días de sobrevivencia de planta, altura de planta (cm), número de hojas, área foliar (cm^2), longitud de raíces (cm), peso seco de hoja (g) y peso seco de raíz (g), su distribución tendió hacia una distribución normal. Por lo tanto fueron comparado a través del ANDEVA, seguido por la prueba de Tukey (probabilidad 0.05) para hacer separaciones de medias.

Para el ensayo con arreglo factorial para materia orgánica y pH, donde tenemos dos factores que constituyen una replicación oculta, los datos de mortalidad de plantas fueron transformados al ARCSEN ($y_2 = \arcseno \sqrt{y_1}$) y luego se realizó un ANDEVA. Como no hubo replicación verdadera no se incluyó la interacción entre $A_{(i)}$ y $B_{(j)}$ en el modelo.

4. Resultados y discusión

4.1. Resultados

4.1.1. Análisis de suelo.

Los resultados del análisis de suelo demuestran que los suelos procedentes del lote de Cabiria de las plantaciones de cacao del CATIE y Tierra Blanca de Cartago, fueron muy similares en relación a los macro y micro elementos, los niveles de fósforo son menores de 40 ppm, un nivel que favorece el patógeno (Merchán 1990). No obstante, con respecto al pH y el porcentaje de materia orgánica que son las características del suelo de interés en este estudio, se puede observar que el suelo de Cabiria fue más ácido, con mayor porcentaje de materia orgánica y acidez extraíble que el suelo de tierra blanca de Cartago (cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis de suelo de dos diferentes localidades: suelo de plantaciones de cacao del CATIE y suelo de cultivo de papa Tierra Blanca de Cartago.

Procedencia Muestras	Profun (cm)	PH agua	Acidez Extra	Ca/cmole/l	Mg/cmole/l	K/cmole/l	P/mg/l	Cu/mg/l	Zn/mg/l	Mn/mg/l	M.O %
Cabiria	0-30	4.7	3.0	2.8	0.9	0.6	38.9	23.7	4.9	27.9	6.1
Tierra Blanca	0-30	5.5	0.3	3.4	0.5	0.8	33.7	9.2	1.3	3.2	5.4

4.1.2. Aislamiento de *Rosellinia* spp

4.1.2.1. Comparación de aislamiento entre cultivos

Se colectaron muestras con síntomas típicos de la enfermedad en tres cultivos: cacao, café y papa. Sin embargo, solo se pudo aislar una cepa de cacao (RB0001) y otra de papa (RB0002); para el caso de café no se logró el aislar el patógeno.

Al hacer una comparación estadística entre cultivos (figura 6), se puede observar que los mayores porcentajes ($\chi^2 = 21.74$, $gl = 2$, $P < 0.001$) de éxitos de aislamiento se obtuvieron en el cultivo de cacao, seguido por papa y sin ningún resultado para el cultivo de café.

4.1.2.2. Métodos de aislamiento

A través de la prueba de Chi cuadrado se compararon diferentes métodos para el aislamiento de *Rosellinia* spp. Los resultados demuestran que hay diferencias significativas ($\chi^2 = 7.4$, gl = 2, $P < 0.05$) entre los métodos evaluados (cuadro 3).

Se encontró que la cepa de *Rosellinia* sp. en el cultivo de cacao presentó los mayores porcentajes de éxitos de aislamiento usando el método vermiculita, seguido por el método de papel y los peores porcentajes de éxito se presentaron con el método directo.

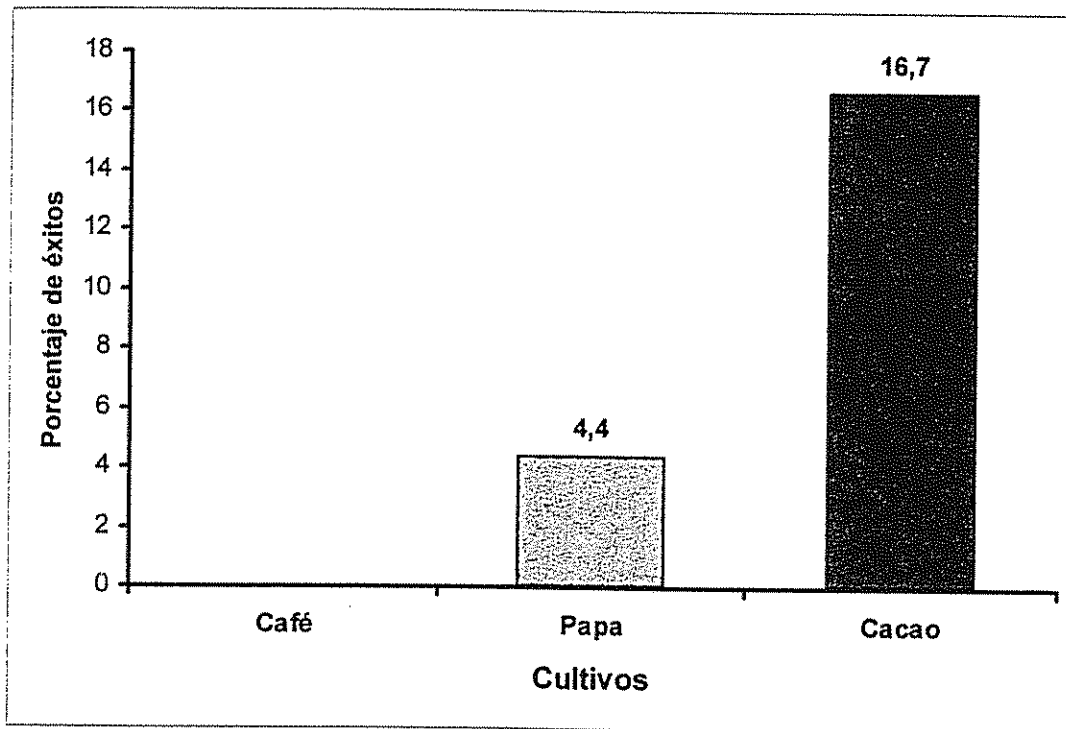


Figura 6. Porcentajes de éxitos de aislamiento de *Rosellinia* spp. en tres cultivos diferentes.

La cepa de *Rosellinia* sp. en el cultivo de papa (RB0002) mostró un comportamiento contrario a lo encontrado en cacao (RB0001), ya que el método directo fue el que presentó el mayor porcentaje de éxito y sin ninguna respuesta en vermiculita y papel. Para el caso de café no fue posible aislar el patógeno en ninguno de los métodos aplicados (cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentajes de éxitos de aislamiento de *Rosellinia* spp. usando tres diferentes métodos.

Cultivos	Métodos de aislamiento			χ^2	P
	Papel Kraft	Vermiculita	Directo		
Cacao	18.0	25.0	4.0	7.4	0.05
Papa	0.0	0.0	6.7	na	na
Café	0.0	0.0	0.0		

na = no aplica por números bajos.

4.1.2.3. Tipos de Medios

Durante el aislamiento de *Rosellinia* sp. de cacao, se probaron diferentes tipos de medios. Según la prueba de Chi cuadrado, los resultados demuestran que hay diferencias significativas ($\chi^2 = 13.8$, gl = 2, $P < 0.01$) entre los diferentes medios evaluados, encontrando que el medio Papa Dextrosa Agar Acidificado (PDAA) fue el único que presentó éxito; no hubo respuesta en los medios Czapek-Dox Agar (CDA) y otros como papa dextrosa agar (PDA) o agar agua (AA). *Rosellinia* sp. en papa mostró igual comportamiento, ya que en el medio PDAA fue el único donde se obtuvo éxito. Sin embargo, la prueba de Chi cuadrado no aplica por números bajos de observaciones (cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentajes de éxitos de aislamiento de *Rosellinia* spp. en diferentes medios de crecimiento.

Cultivos	Tipos de medios			χ^2	P
	PDAA	CDA	OTROS ¹		
Cacao	23.0	0.0	0.0	13.8	0.01
Papa	4.4	0.0	0.0	na ²	na

¹= Papa Dextrosa Agar y Agar Agua

²= no aplica por números bajos

4.1.2.4. Crecimiento de *Rosellinia*

Rosellinia es un hongo habitante natural del suelo. A nivel del laboratorio se trató de simular dicha condición, haciendo crecer las cepas de *Rosellinia* bajo oscuridad y se comparó el crecimiento bajo condicione de luz.

Los resultados del análisis de varianza (ANDEVA) demuestran que hay diferencias altamente significativas entre el comportamiento de ambas cepas de *Rosellinia* (RB0001 cacao y RB0002 de papa) (F = 97.56; P = 0.000). En relación a la condición luz / oscuridad no se encontraron diferencias significativas (F = 1.09; P = 0.298). Sin embargo, la interacción fue altamente significativa (F = 38.66; P = 0.000), esto significa que las dos cepas tienen una reacción diferente al cambio de luz y oscuridad.

La prueba de separación de media (DMS) demuestra que RB0001 alcanzó un mayor crecimiento en ambas condiciones en comparación con RB0002 y tuvo mayor crecimiento bajo la oscuridad que a la luz. En cambio, RB0002 mostró un comportamiento contrario a la cepa RB0001, ya que tuvo mayor crecimiento bajo la condición de luz que a la oscuridad (cuadro 5).

Cuadro 5. Promedio de la tasa de crecimiento (en mm/día) \pm error estándar de *Rosellinia* spp. de cacao y papa, bajo condiciones de oscuridad y luz.

Cepas de <i>Rosellinia</i>	Condición	
	Oscuridad	Luz
RB0001	3.87 \pm 0.11 ^a	2.84 \pm 0.16 ^b
RB0002	1.59 \pm 0.32 ^d	2.32 \pm 0.15 ^c

^{a,b,c,d} Medias con las mismas letras no son diferentes significativamente de acuerdo a la prueba de ANDEVA y DMS (P<0.05).

4.1.2.5. Prueba de patogenicidad

El primer ensayo que se realizó con el objetivo de conocer si *Rosellinia* afecta plantas de cacao durante la germinación. Se sembraron 25 semillas de cacao en cada una de las bandejas (testigo absoluto y testigo negativo). Se encontró que en la bandeja que contenía inóculo de *Rosellinia* (500 g de arena de río más 150 g de avena Quaker e inóculo con 10 discos de PDA con crecimiento del patógeno) solo logró germinar una planta, que representa un cuatro por ciento de germinación; no obstante, la planta que logró germinar al cabo de ocho días después de la germinación comenzó a manifestar síntomas de marchitez y finalmente murió (ver figura 7). En cambio en el testigo absoluto se logró un 100 % de germinación y las plantas se mostraron vigorosas hasta la finalización de la prueba que duro un periodo de un mes (ver figura 7).

En el segundo ensayo, cuando se inocularon plantas de tres meses de edad con diferentes dosis de arena con inóculo de *Rosellinia* (0, 100, 200, 250 g), se encontró que

en la medida que se aumentó la cantidad de inoculo, la altura de las plantas, peso seco de hojas y el peso seco de raíces fue menor en comparación con el testigo negativo (figura 8). En todas las variables, la regresión fue significativa y la ecuación muestra una pendiente negativa (ver cuadro 6). Se observó una reducción de la biomasa en un cincuenta por ciento.

Estos resultados permitieron conocer la dosis en la cual el patógeno era capaz de provocar enfermedad, además, conocer la capacidad que tiene *Rosellinia* para afectar plántulas de cacao dentro de un rango de edades. A partir de estos resultados, en los siguientes bioensayos de control biológico de *Rosellinia* a nivel invernadero, se decidió inocular las plantas con la dosis más alta (250 g) y en plántulas de 15 días después de germinadas.

Cuadro 6. Ecuaciones de regresión, relacionando la dosis de inoculo vs. altura, peso seco raíz y peso seco hoja.

Variabes	Ecuación de regresión	R ²	P
Altura (cm)	$Y = 39.69 - 0.07(\text{dosis de inoculo})$	0.77	0.008
Peso seco hoja (g)	$Y = 10.00 - 0.02(\text{dosis de inoculo})$	0.98	0.001
Peso seco raíz (g)	$Y = 3.68 - 0.08(\text{dosis de inoculo})$	0.63	0.020

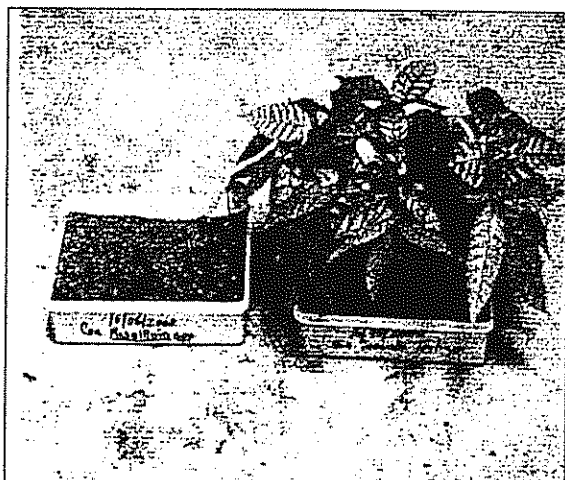


Figura 7. Inoculación en plantas germinando, de izquierda a derecha (500 g de inoculo y sin inoculo)

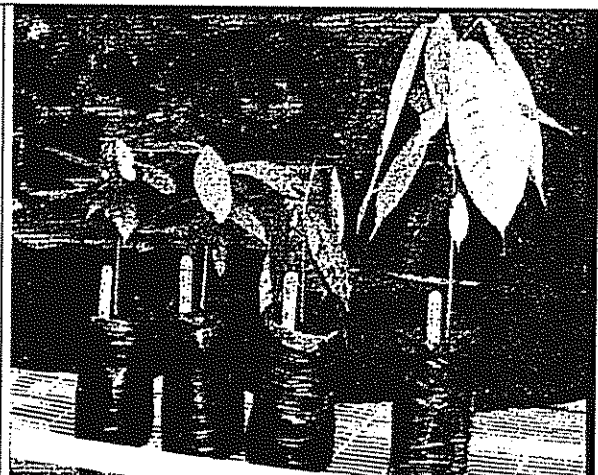


Figura 8. Inoculación en plantas de tres meses de edad de izquierda a derecha (100, 200, 250 g de inoculo y sin inoculo respectivamente).

4.1.3. Aislamiento de Micoparásitos

De un total de diez placas precolonizadas por *Rosellinia*, cinco por cada cepa (RB0001 y RB0002), se lograron obtener un total de doce micoparásitos. De ellos, cuatro cepas que se lograron aislar pertenecen al género *Trichoderma*, ya que al observarlas al microscopio compuesto presentaban característica similar a las figuras 9A y B. Se aislaron dos cepas de *Gliocladium roseum*, con características muy similares a las figuras 9C y D, cuatro cepas de *Fusarium* sp. similar a las figuras 9E y F y con diferentes pigmentaciones del medio, un *Penicillium* sp. y un micoparásito que no se logró identificar (cuadro 7).

A pesar que para ambos cultivos se hicieron iguales intento de placas precolonizadas, en el suelo donde se cultiva cacao se logró aislar un mayor número de antagonistas (10), comparado con el suelo donde se cultiva papa del cual solo se aislaron dos (cuadro 7). Según la prueba de Chi cuadrado, con corrección de Yates hay diferencias significativas ($\chi^2 = 5.42$, gl = 1, $P < 0.021$) entre ambos suelos donde se aislaron los antagonistas.

4.1.4. Rango de hospedantes de micoparásitos

La prueba de rango de hospedantes se realizó con un total de trece micoparásitos, de los cuales nueve fueron aislados del suelo de la rizósfera de plantas de cacao, dos del suelo de la rizósfera de plantas de papa y dos micoparásitos que se aislaron de productos que ya existen en forma comercial (Root Shield y Soil Guard) y que se han reportado como antagonistas exitosos para el manejo de patógenos del suelo (Larkin y Fravel 1998).

Los resultados demuestran que nueve micoparásitos mostraron diferencias significativas en relación al grado de hiperparasitismo en las dos cepas de *Rosellinia* (prueba t student, cuadro 8). El grado de hiperparasitismo se midió indirectamente con respecto a su tasa de crecimiento para cada patógeno. ARB0004 y ARB0011 no mostraron diferencias estadísticas, por lo tanto su comportamiento como hiperparásitos fue igual en ambas cepas del patógeno (negritas cuadro 9). GL-21 y el hiperparásito no identificado ARB0010 no mostraron ningún efecto sobre las cepas de *Rosellinia* spp. (cuadro 8).

En promedio (última línea, cursiva y negrita) se puede observar que la cepa RB0001 de *Rosellinia* sp. de cacao es más susceptible al micoparasitismo que la de cepa RB0002 de papa. Esto se explica ya que en promedio la cepa RB0001 soporta un crecimiento significativamente mayor independientemente del micoparásito usado (cuadro 8, prueba t pareada, $t = 4.487$; $gl = 12$, $P < 0.05$).

Cuadro 7. Caracterización de micoparásitos aislados de placas precolonizadas de *Rosellinia* en cacao y papa.

Micoparásitos		Origen			Características de los antagonista	
Especies	Cepas	Sitio	Cultivo	Cepas de <i>Rosellinia</i> spp.	Característica del crecimiento en el medio de cultivo	Fecha de aislamiento
<i>Trichoderma</i> sp.	ARB0001	Cabiria Sitio 2	Cacao	RB0001	micelio blanco algodonoso, con el tiempo se pone color verde claro cubre el plato	29-03-2000
<i>Trichoderma</i> sp.	ARB0002	Cabiria sitio 1	Cacao	RB0001	micelio blanco algodonoso, anillos concéntricos con capas compactas	29-03-2000
<i>Trichoderma</i> sp.	ARB0003	Cabiria sitio 1	Cacao	RB0001	Micelio blanco algodonoso cubre completamente el plato sin formar anillos concéntricos	31-03-2000
<i>Trichoderma</i> sp.	ARB0004	Cabiria sitio 2	Cacao	RB0001	Micelio blanco algodonoso, anillo concéntrico de coloración verde compacto, ralo hacia el extremo.	31-03-2000
<i>Fusarium</i> sp.	ARB0005	Cabiria sitio 2	Cacao	RB0001	Micelio con crecimiento algodonoso blanco rosado	30-03-2000
<i>Fusarium</i> sp.	ARB0006	Cabiria sitio 2	Cacao	RB0001	Micelio con crecimiento bajo en el medio blanco a rosado	31-03-2000
<i>Fusarium</i> sp.	ARB0007	Cabiria sitio 2	Cacao	RB0001	Micelio algodonoso blanco a rosado	31-04-2000
<i>Fusarium</i> sp.	ARB0008	Cabiria sitio 2	Cacao	RB0001	Micelio algodonoso color rosado	31-03-2000
<i>Penicillium</i> sp.	ARB0009	Cabiria sitio 2	Cacao	RB0001	Micelio color verde claro con anillos concéntricos	27-03-2000
No identificado	ARB0010	Tierra Blanca	Papa	RB0002	Micelio color blanco crecimiento extendido	6-04-2000
<i>Gliocladium roseum</i>	ARB0011	Tierra Blanca	Papa	RB0002	Micelio de color rosado	31-03-2000
<i>Gliocladium roseum</i>	ARB0012	Cabiria sitio 2	Cacao	RB0001	Micelio de color rosado	29-03-2000
<i>Gliocladium virens</i>	GL 21 ¹	EUA	Producto comercial	na ²	Micelio blanco algodonoso con anillos concéntricos color verde claro	13-04-2000
<i>Trichoderma harzianum</i>	T-22 ³	EUA	Producto comercial	na	Micelio formando una pigmentación color verde olivo	13-04-2000

¹ Aislado del producto comercial Soil Guard™

² no aplica

³ Aislado del producto comercial Root Shield™

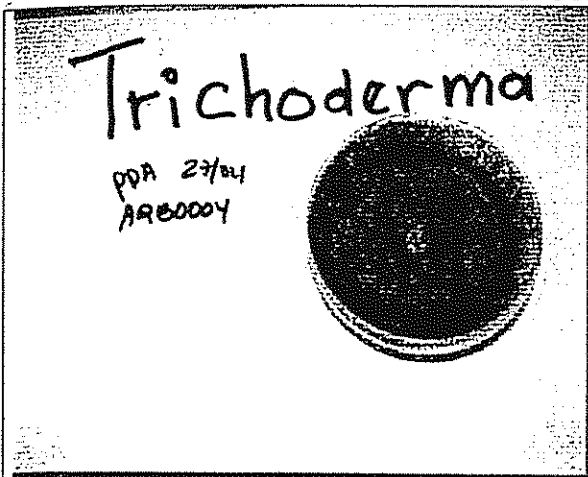


Figura 9A. Crecimiento de *Trichoderma* ARB0004

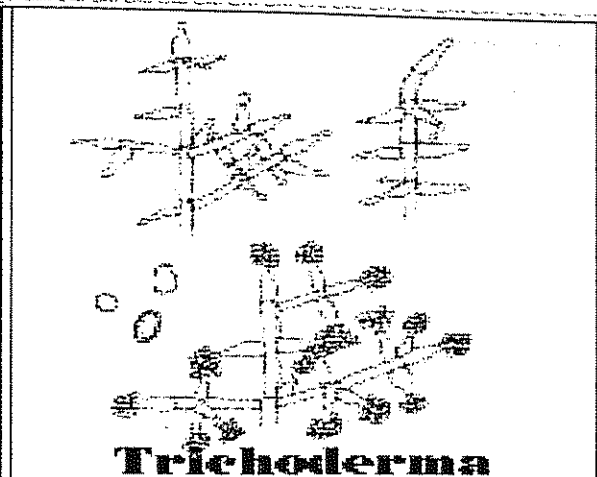


Figura 9B. Conidióforos y conidias de *Trichoderma*

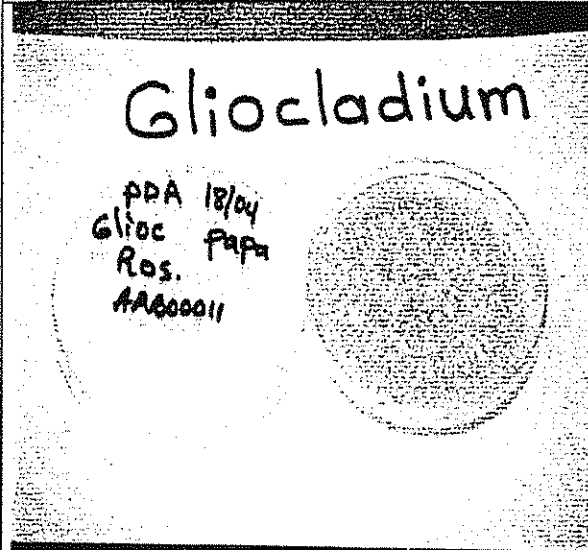


Figura 9C. Crecimiento de *Gliocladium* ARB0011

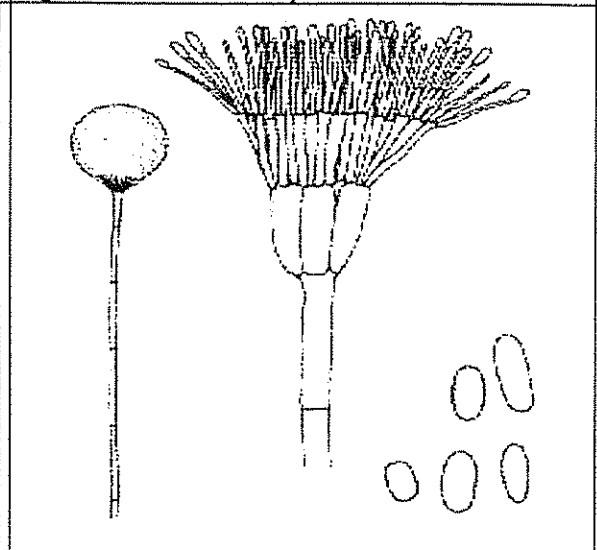


Figura 9D. Conidióforos y conidias de *Gliocladium*

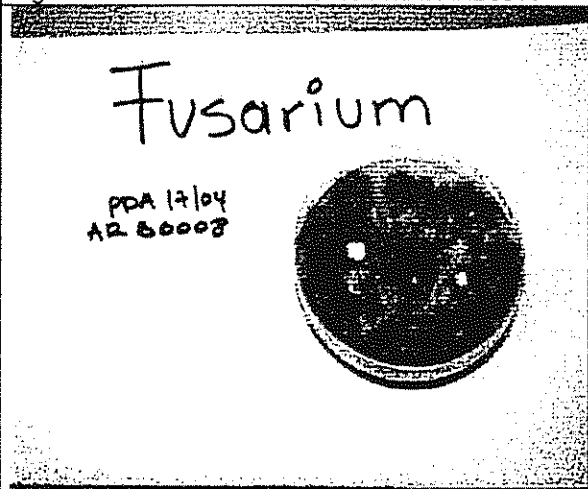


Figura 9E. Crecimiento de *Fusarium*

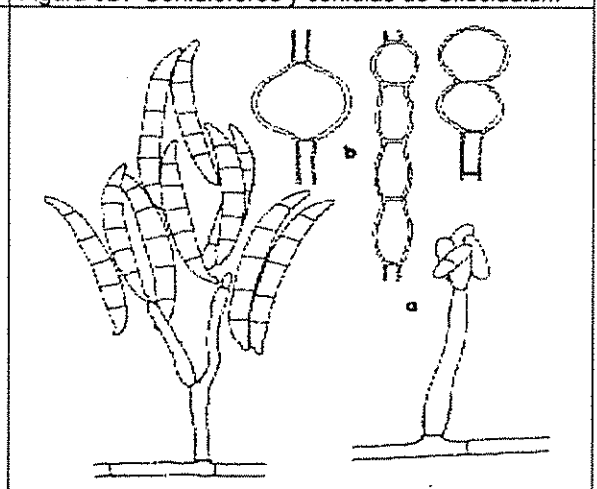


Figura 9F. Conidióforo y conidias de *Fusarium*

Figura 9ACD... Hongos antagonistas que se aislaron durante el estudio de control biológico de *Rosellinia*

Cuadro 8. Resultados del análisis de la prueba t student de los datos de crecimiento en mm/día de diferentes antagonista encima de las cepas de *Rosellinia* spp.

Micoparásitos	Cepas de <i>Rosellinia</i> spp.		Valor t	Probabilidad ¹
	RB0001	RB0002		
ARB0001	8.2 ± 0.6	1.6 ± 0.3	8.832	0.002 **
ARB0002	7.9 ± 1.4	1.9 ± 0.3	4.122	0.007 **
ARB0003	5.2 ± 0.5	1.8 ± 0.7	3.960	0.008 **
ARB0004	3.1 ± 1.2	1.6 ± 0.1	1.236	0.142 NS
ARB0005	6.9 ± 0.3	1.0 ± 0.1	18.043	0.000 ***
ARB0006	6.2 ± 0.7	2.0 ± 0.2	5.624	0.002 **
ARB0007	5.1 ± 0.4	1.9 ± 0.4	6.132	0.002 **
ARB0008	6.4 ± 0.3	0.9 ± 0.3	13.239	0.000 ***
ARB0009	1.3 ± 0.2	0.1 ± 0.0	5.537	0.003 **
ARB0010	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	na	Na ²
ARB0011	3.0 ± 0.6	3.0 ± 0.3	0.118	0.456 NS
T-22	9.9 ± 0.7	1.4 ± 0.1	11.339	0.000 ***
GL-21	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	na	Na
Promedio	4.9 ± 0.88	1.3 ± 0.25	4.487	< 0.000³

¹ Según prueba de t-student valor crítico = 3.747, ** P<0.01, *** P< 0.001

NS = no significativo

² na = no aplica por falta de crecimiento

³ Según prueba t pareada, valor crítico = 1.782

4.1.5. Bioensayo sobre compatibilidad de antagonistas

Para la prueba de compatibilidad de los antagonistas se seleccionaron aquellos que no mostraron diferencias estadística (ARB0004 y ARB0011) en relación al grado de hiperparasitismo con respecto a las cepas del patógeno. También se seleccionó el T-22 aunque no mostró diferencias altamente significativas, dado que es un antagonista que se ha reportado como muy promisorio para manejar patógenos del suelo (Harman 2000). Además que tubo un efecto importante sobre la cepa RB0001 que se utilizó para los bioensayos. En el (cuadro 9) se presentan los resultados de la eficiencia de los antagonistas en forma individual y en mezcla, sobre el grado de supresión de *Rosellinia* RB0001.

Cuadro 9. Eficiencia de los antagonistas aplicados individualmente y en mezcla sobre la supresión de *Rosellinia* RB0001.

Tratamientos ¹	Mortalidad (%)		Día de sobrevivencia ²	Severidad ABC	Altura (cm)	Area Foliar (cm ²)	Peso seco		Número de Hojas	Peso seco		Longitud de raíces (cm)
							hojas (g)	Raíz (g)		hojas (g)	Raíz (g)	
Testigo absoluto	0 ^a		79.0 ^a	0 ^a	23.2 ^{ab}	116.9 ^a	2.7 ^a	2.1 ^{ab}	9.4 ^a	2.7 ^a	2.1 ^{ab}	29.1 ^{ab}
ARB0004+ARB0011+T-22	0 ^a		79.0 ^a	0 ^a	24.9 ^a	108.9 ^{ab}	2.7 ^a	3.4 ^a	10.4 ^a	2.7 ^a	3.4 ^a	27.6 ^{ab}
ARB0011+T-22	0 ^a		79.0 ^a	0 ^a	23.2 ^{ab}	91.4 ^{bc}	2.4 ^{ab}	3.1 ^a	8.8 ^{ab}	2.4 ^{ab}	3.1 ^a	23.4 ^{abc}
ARB0004+ARB0011	0 ^a		79.0 ^a	0 ^a	21.1 ^{ab}	81.9 ^{abc}	1.9 ^{abc}	2.9 ^a	8.6 ^{ab}	1.9 ^{abc}	2.9 ^a	25.5 ^{abc}
T-22	0 ^a		79.0 ^a	0 ^a	25.0 ^a	99.9 ^{abc}	2.7 ^a	2.5 ^a	8.8 ^{ab}	2.7 ^a	2.5 ^a	32.0 ^a
ARB0004 +T-22	60 ^b		67.0 ^{ab}	9.1 ^{ab}	19.5 ^{abc}	96.5 ^{cd}	1.6 ^{bc}	1.9 ^{abc}	7.0 ^{ab}	1.6 ^{bc}	1.9 ^{abc}	19.5 ^{abc}
AB0011	80 ^b		47.0 ^b	25.4 ^b	16.9 ^{abc}	68.9 ^d	1.3 ^c	0.8 ^{bc}	5.0 ^b	1.3 ^c	0.8 ^{bc}	12.08 ^c
ARB0004	80 ^b		35.8 ^b	22.0 ^b	15.7 ^{bc}	67.3 ^d	1.2 ^c	0.6 ^c	5.0 ^b	1.2 ^c	0.6 ^c	16.2 ^{bc}
Testigo positivo	80 ^b		31.0 ^b	27.8 ^b	12.9 ^c	66.0 ^d	1.0 ^c	0.6 ^c	4.6 ^b	1.0 ^c	0.6 ^c	11.9 ^c
Probabilidad	0.0001 ⁵		0.0001	0.0001 ⁴	0.0001 ³	0.0001 ³	0.0001 ³	0.0001 ³	0.0001 ³	0.0001 ³	0.0001 ³	0.0001 ³

a, b, c, d Medias con las mismas letras no son diferentes significativamente de acuerdo al ANDEVA seguido por la prueba de Tukey a P<0.05.

¹ Testigo absoluto = sin inóculo

ARB0004 = *Trichoderma* sp. aislado del suelo de la rizósfera de plantas de cacao

ARB0011 = *Gliricidium roseum* aislado del suelo de la rizósfera de plantas de papa

T-22 = *Trichoderma harzianum* aislado de Root Shield™ producto comercial

Testigo positivo = Solo inóculo de *Rosellinia*

² Máximo: 79 días (fin del ensayo)

³ Según ANDEVA para datos normales

⁴ Según ANDEVA para datos expresados como área bajo la curva (ABC)

⁵ Según prueba de Cochran para datos binarios

La eficiencia de los antagonistas se comparó con dos testigos en la presencia y ausencia del patógeno. En relación al porcentaje de mortalidad, se puede observar que hay una tendencia clara entre los tratamientos. Los antagonistas aplicados en mezclas redujeron mejor la enfermedad que cuando se aplicaron individualmente, a excepción de T-22 que aplicado en forma individual no mostró diferencias estadísticas con respecto al testigo absoluto, pero sí mostró diferencias altamente significativas con respecto al testigo positivo. Mientras que, las cepas ARB0004 y ARB0011 aplicados en forma individual y la mezcla ARB0004+T-22 no mostraron diferencias estadísticas con respecto al testigo positivo, pero sí mostraron diferencias significativas con respecto al testigo absoluto. Es importante señalar que las plantas en el testigo positivo manifestaron síntomas de marchitez más rápido, y murieron en un periodo más corto que las plantas tratadas con las cepas de antagonistas. Esta tendencia fue significativa para la cepa T-22 y todas las mezclas excepto la mezcla ARB0004+T-22 la cual no fue tan efectiva. La misma tendencia se observó para el área bajo curva del desarrollo de la enfermedad (cuadro 9).

Para las otras variables evaluadas como: altura de planta, área foliar, número de hojas, peso seco de hojas, peso seco de raíz y longitud de raíces, los resultados demuestran que hay diferencias altamente significativa entre tratamientos ($P < 0.0001$ cuadro 9). Todas las variables evaluadas, presentaron la misma tendencia, donde el mejor tratamiento fue la mezcla de tres antagonistas, ya que no difieren del testigo absoluto pero siempre del testigo negativo.

Las mezclas ARB0011+T-22, ARB0004+ARB0011 y T-22 aplicado individualmente mostraron un comportamiento intermedio con respecto al testigo absoluto. No difieren del testigo absoluto en ninguna de las variables, pero para las variables número de hojas (todos estos tres tratamientos), longitud raíces (ARB0011+T-22 y ARB0004+ARB0011) y peso seco de la hoja (ARB0004+ARB0011) no difieren del testigo positivo tampoco. La mezcla de ARB0004+T-22 y los antagonistas individuales ARB0004 y ARB0011 no difieren del testigo positivo para estas variables (cuadro 9).

Los tratamientos aplicados en mezclas, excepto la combinación de ARB0004+T-22, protegieron las plantas al reducir la enfermedad. El T-22 aplicado individualmente presentó un mismo comportamiento. Esto permitió que las plantas alcanzaran mayor crecimiento y por lo tanto mayor producción de biomasa. Se puede observar que la

producción de biomasa se incrementó en un 50% más comparado con el testigo positivo y con las cepas de antagonistas ARB0004 y ARB0011 aplicadas de forma individual. Con base en estos resultados, se seleccionaron los dos mejores tratamiento para las demás pruebas: ARB0004+ARB0011+T-22 y ARB0004+ARB0011.

De las nueve variables evaluadas, el porcentaje de mortalidad, días de sobrevivencia y severidad ABC, dieron los resultados más claro con pocos traslape entre los tratamiento que se comportan como el testigo positivo y el testigo absoluto. Estas variables también resultaron en la preselección menos estrictas de tratamientos, junto con altura, área foliar y peso seco de raíz.

El criterio más estricto fue número de hojas, la cual resultaría en la selección de un solo tratamiento (mezcla de tres antagonistas). El peso seco de la raíz fue seguido por la longitud de la misma y el peso seco de hoja.

4.1.6. Efecto de las características del suelo materia orgánica (M.O) y pH sobre la eficiencia de los antagonistas y patógeno.

4.1.6.1. Efecto de la materia orgánica sobre la eficiencia de los antagonistas

Al analizar la eficiencia de los tratamientos con respecto al porcentaje de mortalidad de plantas (cuadro 10). Se encontraron diferencias significativa según el ANDEVA para datos transformados (arcseno en grados) ($F= 34.29$, $P = 0.0004$) entre tratamientos pero no entre niveles de materia orgánica ($F = 3.0$, $P = 0.125$). Se puede observar que ambos tratamientos biológicos redujeron la mortalidad significativamente comparándolo con el testigo absoluto dentro del rango de niveles de materia orgánica (6% a 12%) evaluado. Aunque entre los niveles de materia orgánica no se alcanzó significancia estadística, los resultados demuestran una tendencia clara, a medida que se incrementa el contenido de materia orgánica en el suelo el porcentaje de mortalidad es mayor. En relación a la eficiencia del control biológico de *Rosellinia*, los resultados demuestran que las mezclas de antagonistas (dos o tres), tienen un mismo comportamiento en los diferentes niveles de materia orgánica (cuadro 10).

Para la variable peso seco de raíz, se encontró que hay diferencia altamente significativa entre tratamientos (última columna en negrilla, $F = 18.69$, $P < 0.0001$). La mezcla de tres antagonistas no mostró diferencias estadísticas con respecto al testigo absoluto, pero si mostró diferencia altamente significativa con respecto al testigo positivo. La mezcla de dos antagonista mostró un comportamiento intermedio con diferencias significativa en relación a ambos testigos (cuadro 11). Entre niveles de materia orgánica no se encontró diferencias significativa (última fila en cursiva, $F = 1.00$, $P < 0.377$), tampoco entre la interacción tratamiento con nivel, ($F = 1.20$, $P < 0.321$).

Cuadro 10. Mortalidad de plantas en porcentaje : efecto de diferentes niveles de materia orgánica

Tratamientos ¹	Niveles de M.O (%)			Promedio por Tratamiento
	6	9	12	
Testigo absoluto	0	0	0	0 ^a
ARB0004 + ARB0011 + T-22	60	80	100	80 ^b
ARB0004 + ARB0011	60	80	100	80 ^b
Testigo positivo	100	100	100	100 ^b
<i>Promedio por nivel</i>	<i>55^a</i>	<i>55^a</i>	<i>55^a</i>	

^{a, b, c} Medias dentro la última fila o última columna con las mismas letras no son diferentes significativamente según ANDEVA para datos transformados (arcseno en grados)

Cuadro 11. Peso seco de raíces (g) : efectos de diferentes niveles de materia orgánica

Tratamientos ¹	Niveles de M.O (%)			Promedio por tratamiento
	6	9	12	
Testigo absoluto	1.7	1.4	1.5	1.5 ^a
ARB0004 + ARB0011 + T-22	1.3	1.4	1.7	1.4 ^{ab}
ARB0004 + ARB0011	1.3	1.1	1.1	1.2 ^b
Testigo positivo	0.7	0.6	0.8	0.7 ^c
<i>Promedio por Nivel</i>	<i>1.3^a</i>	<i>1.2^a</i>	<i>1.3^a</i>	—

^{a, b, c} Medias dentro la última fila o última columna con las mismas letras no son diferentes significativamente de acuerdo al ANDEVA, seguido por la prueba de Tukey $P < 0.05$

¹ Testigo absoluto = sin inóculo

ARB0004 = *Trichoderma* sp. aislado del suelo de la rizósfera de plantas de cacao

ARB0011 = *Gliocladium roseum* aislado del suelo de la rizósfera de plantas de papa

T-22 = *Trichoderma harzianum* aislado de Root Shield™ producto comercial

Testigo positivo = Con inóculo de *Rosellinia*

Para las variables longitud de raíces y área foliar (cuadros 12 y 13), el análisis de varianza demuestra que hay diferencias significativas entre tratamientos (última columna en negrilla $F = 8.82$, $P < 0.0001$; $F = 12.51$, $P < 0.0001$ respectivamente). Los tratamientos biológicos no difieren del testigo positivo, pero sí difieren del testigo absoluto. Además se encontró una diferencia significativa entre niveles de materia orgánica (última fila en cursiva $F = 4.15$, $P < 0.0217$, $F = 3.08$, $P < 0.055$). La interacción de tratamiento con nivel en ambas variables no fue significativa (anexos 2 y 3). En ambas variables el óptimo crecimiento de la raíz y el área foliar, se dio en el nivel más bajo de materia orgánica (6%) y sin diferencia estadística en los niveles 9 y 12 % de materia orgánica.

Cuadro 12. Longitud de raíces (cm): efectos de diferentes niveles de materia orgánica

Tratamientos ¹	Niveles de M.O (%)			Promedio por tratamiento
	6	9	12	
Testigo absoluto	25.4	22.5	20.4	22.8^a
ARB0004 + ARB0011 + T-22	22.1	16.3	16.8	18.4^b
ARB0004 + ARB0011	21.1	16.3	16.9	18.1^b
Testigo positivo	14.4	14.9	14.9	14.8^b
<i>Promedio por Nivel</i>	<i>20.8^a</i>	<i>17.5^{ab}</i>	<i>17.2^b</i>	---

^{a, b} Medias dentro la última fila o última columna con las mismas letras no son diferentes significativamente de acuerdo al ANDEVA, seguido por la prueba de Tukey $P < 0.05$

Cuadro 13. Área foliar (cm²): efectos de diferentes niveles de materia orgánica

Tratamientos ¹	Niveles de M.O (%)			Promedio por tratamiento
	6	9	12	
Testigo absoluto	142.7	112.2	104.7	119.8^a
ARB0004 + ARB0011 + T-22	80.0	77.8	81.0	79.7^b
ARB0004 + ARB0011	84.8	74.5	71.5	77.7^b
Testigo positivo	69.9	58.8	71.4	66.4^b
<i>Promedio por Nivel</i>	<i>100.0^a</i>	<i>85.3^b</i>	<i>86.2^{ab}</i>	---

^{a, b} Medias dentro de la última fila o columna con las mismas letras no son diferentes significativamente de acuerdo al ANDEVA, seguido por la prueba de Tukey a $P < 0.05$

¹ Testigo absoluto = sin inoculo

ARB0004 = *Trichoderma* sp. aislado del suelo de la rizósfera de plantas de cacao

ARB0011 = *Gliocladium roseum* aislado del suelo de la rizósfera de plantas de papa

T- 22 = *Trichoderma harzianum* aislado de Root Shield™ producto comercial

Testigo positivo = Con inoculo de *Rosellinia*

Para las demás variables evaluadas como: Días de sobrevivencia de las plantas, severidad expresada como el área bajo la curva, altura de planta, número de hojas, peso seco de hojas, los resultados demuestran que hay diferencias altamente significativas entre tratamientos ($P < 0.0001$ última columna en negrilla) y no se encontraron diferencias

estadísticas entre niveles de materia orgánica (última fila en cursiva cuadros 14, 15, 16, 17 y 18) . En ninguno de estos casos se presentaron interacciones significativas entre tratamiento y nivel (Anexos 4, 5, 6, 7 y 8). Para la variable altura de planta (cuadro 16) los tratamientos biológicos no difieren del testigo absoluto. Por otro lado, la mezcla de tres antagonista no difieren del testigo positivo tampoco. Para las demás variables como: días de sobrevivencia, severidad expresada como ABC, número de hojas, peso seco de hojas, se encontró que los tratamientos biológicos no difieren del testigo positivo, pero si del testigo absoluto. Se puede observar en la última columna en negrilla, que a pesar que las mezclas de antagonista no mostraron diferencia significativa con respecto al testigo positivo, se mantiene una tendencia clara y consistente en todas las variables, las mezclas de antagonista siempre numéricamente superaron al testigo positivo (cuadros 14, 15, 17 y 18). En relación a la severidad de los síntomas, la mezcla de tres antagonista fue donde se acumuló menos enfermedad en el tiempo, superando a la mezcla de dos y al testigo positivo (cuadro 15), también se puede observar que en la mezcla de tres antagonistas, las plantas en este tratamiento sobrevivieron más días comparado con la mezcla de dos antagonista y el testigo positivo (cuadro 14).

Cuadro 14. Días de sobrevivencia (Máximo 48 días²): efectos de diferentes niveles de materia orgánica.

Tratamientos ¹	Niveles de M.O (%)			Promedio por tratamiento
	6	9	12	
Testigo absoluto	48.0	48.0	48.0	48.0^a
ARB0004 + ARB0011 + T-22	35.2	30.4	30.4	32.0^b
ARB0004 + ARB0011	36.8	22.4	28.8	29.3^b
Testigo positivo	33.6	27.2	25.6	28.8^b
Promedio por Nivel	38.4 ^a	32.0 ^a	33.2 ^a	—

^{a, b.} Medias dentro de la última fila o columna con las mismas letras no son diferentes significativamente de acuerdo al ANDEVA, seguido por a la prueba de Tukey P < 0.05

¹ Testigo absoluto = sin inóculo

² Máximo 48 días (fin del ensayo).

ARB0004 = *Trichoderma* sp. aislado del suelo de la rizósfera de plantas de cacao

ARB0011 = *Gliocladium roseum* aislado del suelo de la rizósfera de plantas de papa

T- 22 = *Trichoderma harzianum* aislado de Root Shield™ producto comercial

Testigo positivo = Con inóculo de *Rosellinia*

Cuadro 15. Severidad (ABC): efectos de diferentes niveles de materia orgánica

Tratamientos ¹	Niveles de M.O (%)			Promedio por tratamiento
	6	9	12	
Testigo absoluto	0	0	0	0 ^a
ARB0004 + ARB0011 + T-22	10.7	13.8	14.3	12.9 ^b
ARB0004 + ARB0011	10.1	14.6	16.5	13.7 ^b
Testigo positivo	15.1	17.1	18.7	16.9 ^b
Promedio por Nivel	8.9 ^a	11.4 ^a	12.4 ^a	—

^{a, b} Medias dentro de la última fila o columna con las mismas letras no son diferentes significativamente de acuerdo al ANDEVA, seguido por a la prueba de Tukey P < 0.05

Cuadro 16. Altura de planta (cm): efecto de diferentes niveles de materia orgánica

Tratamientos ¹	Niveles de M.O (%)			Promedio por tratamiento
	6	9	12	
Testigo absoluto	19.6	18.9	17.3	18.7 ^a
ARB0004 + ARB0011 + T-22	16.6	18.7	17.9	17.6 ^{ab}
ARB0004 + ARB0011	19.0	17.8	16.7	17.9 ^a
Testigo positivo	16.2	14.9	15.9	15.7 ^b
Promedio por Nivel	18.2 ^a	17.9 ^a	17.1 ^a	—

^{a, b} Medias dentro de la última fila o columna con las mismas letras no son diferentes significativamente de acuerdo al ANDEVA, seguido por a la prueba de Tukey P < 0.05

Cuadro 17. Número de hojas: efectos de diferentes niveles de materia orgánica

Tratamientos ¹	Niveles de M.O (%)			Promedio por tratamiento
	6	9	12	
Testigo absoluto	5.6	5.4	5.7	5.6 ^a
ARB0004 + ARB0011 + T-22	4.7	4.1	4.8	4.6 ^b
ARB0004 + ARB0011	4.8	4.8	3.7	4.5 ^b
Testigo positivo	4.4	3.9	4.6	4.3 ^b
Promedio por Nivel	5.0 ^a	4.8 ^a	4.9 ^a	—

^{a, b} Medias dentro de la última fila o columna con las mismas letras no son diferentes significativamente de acuerdo al ANDEVA, seguido por a la prueba de Tukey a P < 0.05

¹ Testigo absoluto = sin inoculo

ARB0004 = *Trichoderma* sp. aislado del suelo de la rizósfera de plantas de cacao

ARB0011 = *Gliocladium roseum* aislado del suelo de la rizósfera de plantas de papa

T-22 = *Trichoderma harzianum* aislado de Root ShieldTM producto comercial

Testigo positivo = Con inoculo de *Rosellinia*

Cuadro 18. **Peso seco de hojas (g):** efecto de diferentes niveles de materia orgánica

Tratamientos ¹	Niveles de M.O (%)			Promedio por tratamiento
	6	9	12	
Testigo absoluto	2.2	1.7	1.6	1.8 ^a
ARB0004 + ARB0011 + T-22	0.9	0.8	0.9	0.9 ^b
ARB0004 + ARB0011	1.1	0.8	0.8	0.9 ^b
Testigo positivo	0.7	0.7	0.7	0.7 ^b
<i>Promedio por Nivel</i>	0.7 ^a	0.8 ^a	0.9 ^a	----

^{a, b.} Medias dentro de la última fila o columna con las mismas letras no son diferentes significativamente de acuerdo al ANDEVA, seguido por a la prueba de Tukey a $P < 0.05$

¹ Testigo absoluto = sin inoculo

ARB0004 = *Trichoderma* sp. aislado del suelo de la rizósfera de plantas de cacao

ARB0011 = *Gliocladium roseum* aislado del suelo de la rizósfera de plantas de papa

T- 22 = *Trichoderma harzianum* aislado de Root ShieldTM producto comercial

Testigo positivo = Con inoculo de *Rosellinia*

4.1.6.2. Efecto del pH del suelo sobre la eficiencia de los antagonistas

Al analizar el efecto del pH con respecto a la mortalidad de planta expresada en porcentaje, según el ANDEVA para los datos transformado (arcseno en grados), los resultados muestran que los tratamientos biológicos no presentaron diferencias con el testigo positivo en ninguno de los niveles de pH, pero sí mostraron diferencias altamente significativa con respecto al testigo absoluto. Todas las plantas inoculadas se murieron independientemente del uso de antagonista e indistintamente del nivel de pH del suelo (cuadro 19). Además, los días de sobrevivencia de las plantas y la severidad varió como se detalla en los siguiente cuadros.

Cuadro 19. **Mortalidad de plantas (%) :** efecto de diferentes niveles de pH

Tratamientos ¹	Niveles de pH			Promedio por Tratamiento
	4	5	6	
Testigo absoluto	0	0	0	0 ^a
ARB0004 + ARB0011 + T-22	100	100	100	100 ^b
ARB0004 + ARB0011	100	100	100	100 ^b
Testigo positivo	100	100	100	100 ^b
<i>Promedio por nivel</i>	75 ^a	75 ^a	75 ^a	----

^{a, b, c} Medias dentro la última fila o columna con las mismas letras no son diferentes estadísticamente según ANDEVA para datos transformados (arcseno en grados)

¹ Testigo absoluto = sin inoculo

ARB0004 = *Trichoderma* sp. aislado del suelo de la rizósfera de plantas de cacao

ARB0011 = *Gliocladium roseum* aislado del suelo de la rizósfera de plantas de papa

T- 22 = *Trichoderma harzianum* aislado de Root ShieldTM producto comercial

Testigo positivo = Con inoculo de *Rosellinia*

Para las variables como: Severidad de la enfermedad expresada como el área bajo la curva, días de sobrevivencia de las plantas, área foliar y altura de planta, se encontró que hay efecto de interacción entre los tratamiento y los niveles de pH (Anexo 9, 10, 11 y 12). Para el caso de la severidad se puede observar que la mezcla de tres antagonistas no mostró diferencia con el testigo positivo y la mezcla de dos antagonista en los niveles más bajo de pH (4 y 5), pero si mostró diferencia en el nivel mas alto (pH 6). La mezcla de dos antagonista no mostró diferencia en con el testigo positivo en ninguno de los niveles. Ambas mezclas de antagonistas y el testigo positivo mostraron diferencias significativas con respecto al testigo absoluto (cuadro 20). Para la sobrevivencia de plantas, se observa la misma tendencia que se encontró para la severidad. Eso significa que solamente la mezcla de tres antagonista redujo la severidad de la enfermedad y prolongó la vida de la plántulas. El control biológico fue más eficaz en suelos menos ácidos.

Cuadro 20. Severidad como área bajo la curva :efecto de diferentes niveles de pH

Tratamientos ¹	Niveles de pH		
	4	5	6
Testigo absoluto	0 ^a	0 ^a	0 ^a
ARB0004 + ARB0011 + T-22	17.1 ^{cd}	12.5 ^{bc}	9.5 ^b
ARB0004 + ARB0011	18.5 ^d	17.9 ^d	17.5 ^d
Testigo positivo	20.1 ^d	17.7 ^d	17.9 ^d

a, b, c, d. Medias con las mismas letras no son diferentes significativamente de acuerdo al ANDEVA, seguido por la prueba de Tukey a P<0.05

Cuadro 21. Días de sobrevivencia (Máximo 48²) : efecto de diferentes niveles de pH

Tratamientos ¹	Niveles de pH		
	4	5	6
Testigo absoluto	48.0 ^a	48.0 ^a	48.0 ^a
ARB0004 + ARB0011 + T-22	25.6 ^c	32.0 ^{bc}	38.4 ^b
ARB0004 + ARB0011	24.0 ^c	24.0 ^c	24.0 ^c
Testigo positivo	24.0 ^c	27.0 ^c	24.0 ^c

a, b, c. Medias con las mismas letras no son diferentes significativamente de acuerdo al ANDEVA, seguido por la prueba de Tukey a P<0.05

- ¹ Testigo absoluto = sin inculo
 ARB0004 = *Trichoderma* sp. aislado del suelo de la rizósfera de plantas de cacao
 ARB0011 = *Gliocladium roseum* aislado del suelo de la rizósfera de plantas de papa
 T- 22 = *Trichoderma harzianum* aislado de Root ShieldTM producto comercial
- ² Testigo positivo = Con inculo de *Rosellinia*
 Máximo 48 días (Fin del ensayo)

0

En el caso del área foliar también se encontró una interacción significativa entre tratamiento y niveles (Anexo 11) pero las tendencias fueron menos pronunciadas. Al realizar la separación de medias se puede observar que la mezcla de antagonista no mostró diferencias estadística con respecto al testigo positivo en ninguno de los niveles de pH. Solamente en el suelo de pH = 6, la mezcla de tres antagonistas efectuó un control intermedio; el área foliar no difiere de ninguno de los dos testigos (cuadro 22).

Para la altura de plantas, la mezcla de dos antagonista no aumentó el crecimiento de la planta sobre el nivel del testigo positivo en ningún pH (cuadro 23). La mezcla de tres antagonista no mostró diferencias significativa con el testigo absoluto en todos los niveles de pH. Solamente se observa una ligera tendencia (no significativa) de plantas más altas en niveles altos de pH para la mezcla de tres antagonistas. Por otro lado, las plántulas sin inoculo (testigo absoluto) crecieron mejor en condiciones de acidez. Por lo tanto, la diferencia entre el testigo y la mezcla de tres antagonista se disminuye cuando el pH aumenta.

Cuadro 22. Área foliar (cm²): efecto de diferentes niveles de pH

Tratamientos ¹	Niveles de pH		
	4	5	6
Testigo absoluto	107.5 ^a	108.9 ^a	104.8 ^{ab}
ARB0004 + ARB0011 + T-22	62.8 ^{bc}	63.7 ^{bc}	77.2 ^{abc}
ARB0004 + ARB0011	48.4 ^c	52.7 ^c	60.9 ^c
Testigo positivo	52.6 ^c	53.3 ^c	48.4 ^c

a, b, c. Medias con las mismas letras no son diferentes significativamente de acuerdo al ANDEVA, seguido por la prueba de Tukey a P<0.05

Cuadro 23. Altura de planta (cm): efecto de diferentes niveles de pH

Tratamientos ¹	Niveles de pH		
	4	5	6
Testigo absoluto	21.7 ^a	20.5 ^{ab}	18.8 ^{abc}
ARB0004 + ARB0011 + T-22	17.2 ^{abcd}	17.4 ^{abcd}	17.9 ^{abc}
ARB0004 + ARB0011	16.4 ^{bcd}	14.4 ^{cd}	13.7 ^d
Testigo positivo	13.3 ^d	16.5 ^{cbd}	14.8 ^{cd}

a, b, c, d. Medias con las mismas letras no son diferentes significativamente de acuerdo al ANDEVA, seguido por la prueba de Tukey a P<0.05

¹ Testigo absoluto = sin inoculo

ARB0004 = *Trichoderma* sp. aislado del suelo de la rizósfera de plantas de cacao

ARB0011 = *Gliocladium roseum* aislado del suelo de la rizósfera de plantas de papa

T- 22 = *Trichoderma harzianum* aislado de Root ShieldTM producto comercial

Testigo positivo = Con inoculo de *Rosellinia*

Para la demás variables evaluadas como: número de hojas, peso seco de hojas, longitud de raíces y peso seco de raíces, los resultados demuestran que hay diferencias altamente significativa entre tratamientos, última columna en negrilla ($P < 0.0001$ Anexos 13, 14, 15 y 16). Los tratamientos biológicos difieren del testigo del testigo absoluto pero no del positivo. De toda manera, para las tres variables (número de hojas, longitud de raíz y peso seco de raíz), la mezcla de tres antagonista superó la de dos y el testigo positivo, numéricamente, mientras para el peso seco de hojas esa tendencia fue al revés.

En las variables número de hojas, peso seco de hojas y longitud de raíz no se encontraron diferencias entre nivel (Anexo 13, 14 y 15). Solamente el peso seco de raíz aumentó con valores de pH mas alto (cuadro 27). Y tampoco se encontró efecto de interacción (Anexo 16).

Resumiendo la presente sección, se puede concluir que el factor más importante para el éxito del control biológico de *Rosellinia* fue el uso de la mezcla de tres antagonista, la cual resultó más consistente en el control. El control biológico fue más eficiente en suelos de bajo contenido de materia orgánica (6%) y de alto pH (6). El último factor fue de mayor importancia, ya que se detectó su efecto con cinco de las nueve variables evaluadas, mientras el efecto de la materia orgánica en solamente tres variables.

Cuadro 24. Número de hojas: efecto de diferentes niveles de pH

Tratamientos ¹	Niveles de pH			Promedio por tratamiento
	4	5	6	
Testigo absoluto	5.3	5.3	4.7	5.1 ^a
ARB0004 + ARB0011 + T-22	3.6	3.8	4.3	3.9 ^b
ARB0004 + ARB0011	3.6	3.4	3.8	3.6 ^b
Testigo positivo	3.7	3.9	3.7	3.8 ^b
Promedio por Nivel	4.4 ^a	4.4 ^a	4.3 ^a	—

^{a, b} Medias dentro la última fila o columna con las mismas letras no son diferentes significativamente de acuerdo al ANDEVA, seguido por la prueba Tukey a $P < 0.05$

¹ Testigo absoluto = sin inculo

ARB0004 = *Trichoderma* sp. aislado del suelo de la rizósfera de plantas de cacao

ARB0011 = *Gliocladium roseum* aislado del suelo de la rizósfera de plantas de papa

T- 22 = *Trichoderma harzianum* aislado de Root Shield™ producto comercial

Testigo positivo = Con inculo de *Rosellinia*



Cuadro 25. Peso seco de hojas (g): efecto de diferentes niveles de pH

Tratamientos ¹	Niveles de pH			Promedio por tratamiento
	4	5	6	
Testigo absoluto	1.5	1.5	1.5	1.5 ^a
ARB0004 + ARB0011 + T-22	1.1	0.9	0.9	0.9 ^b
ARB0004 + ARB0011	1.0	0.9	1.1	1.0 ^b
Testigo positivo	0.8	0.9	0.9	0.9 ^b
Promedio por Nivel	1.1 ^a	1.0 ^a	1.1 ^a	---

^{a, b} Medias dentro la última fila o columna con las mismas letras no son diferentes significativamente de acuerdo al ANDEVA, seguido por la prueba Tukey a P<0.05

Cuadro 26. Longitud de raíces (cm): efecto de diferentes niveles de pH

Tratamientos ¹	Niveles de pH			Promedio por tratamiento
	4	5	6	
Testigo absoluto	27.3	26.0	27.4	26.9 ^a
ARB0004 + ARB0011 + T-22	16.3	15.5	18.5	16.8 ^b
ARB0004 + ARB0011	14.2	15.3	14.6	14.7 ^b
Testigo positivo	13.9	14.7	14.9	14.6 ^b
Promedio por Nivel	17.9 ^a	17.9 ^a	18.8 ^a	---

^{a, b} Medias dentro la última fila o columna con las mismas letras no son diferentes significativamente de acuerdo al ANDEVA, seguido por la prueba Tukey a P<0.05

Cuadro 27. Peso seco de raíz (g) : efecto de diferentes niveles de pH

Tratamientos ¹	Niveles de pH			Promedio por tratamiento
	4	5	6	
Testigo absoluto	1.1	1.3	1.7	1.4 ^a
ARB0004 + ARB0011 + T-22	0.6	0.8	0.8	0.7 ^b
ARB0004 + ARB0011	0.6	0.7	0.7	0.6 ^b
Testigo positivo	0.4	0.5	0.6	0.5 ^b
Promedio por Nivel	0.7 ^b	0.8 ^{ab}	0.9 ^a	---

^{a, b} Medias dentro la última fila o columna con las mismas letras no son diferentes significativamente de acuerdo al ANDEVA, seguido por la prueba Tukey a P<0.05

¹ Testigo absoluto = sin inoculo

ARB0004 = *Trichoderma* sp. aislado del suelo de la rizósfera de plantas de cacao

ARB0011 = *Gliricium roseum* aislado del suelo de la rizósfera de plantas de papa

T-22 = *Trichoderma harzianum* aislado de Root ShieldTM producto comercial

Testigo positivo = Con inoculo de *Rosellinia*

4.2. Discusión

4.2.1. Aislamiento de *Rosellinia* spp.

En general el género *Rosellinia* es difícil de aislar, ya que es un hongo que se caracteriza por tener un crecimiento muy lento en comparación con otros hongos que habitan en el suelo. En café fue imposible aislar el patógeno, mientras que en papa el aislamiento del patógeno fue más difícil en comparación con cacao (figura 6); ya que este cultivo se encontró asociado con otros hongos como *Fusarium* y *Rhizoctonia*, los cuales tienen un crecimiento más rápido lo que dificulta aún más su aislamiento. En cambio, en el cacao se tuvo más éxito de aislamiento ya que mayormente no se encontró asociado con otros organismos, lo que sugiere que el hongo es un parásito primario (Waterston 1941).

A pesar que ya se ha trabajado con el género *Rosellinia* en otros cultivos (Sztejnberg *et al.* 1987), durante la revisión bibliográfica no fue posible encontrar una metodología detallada que facilitara el proceso aislamiento de dicho patógeno. Esto implicó poner en práctica algunos métodos que se han aplicado con otros hongos que son difíciles de aislar y que presentan características de crecimientos similares a *Rosellinia*. En ese sentido, se usó la vermiculita y papel Kraft, los cuales han sido métodos muy eficientes para el aislamiento de patógenos (Dra. Vera Sánchez Garita, comunicación personal).

Sin embargo, los resultados encontrados en este estudio demuestran la dificultad de aislar *Rosellinia* spp. Se puede observar en la figura 6 que a pesar de hacer los mismos intentos durante la etapa de aislamiento en todos los cultivos, solamente fue posible aislarlo en cacao y papa y, en el último caso, con porcentajes muy bajos. Por lo tanto, no se logró establecer una colección representativa de todos los cultivos que actualmente afecta dicho patógeno (objetivo uno).

De cacao se logró el mayor porcentaje de éxito de aislamiento cuando se usó vermiculita. Este comportamiento, quizás se explica por el hecho que la vermiculita es un tipo de arcilla expandible y que generalmente, por el tamaño de las partículas, forma grandes espacios porosos que facilitan la entrada de aire, de manera que hay buena oxigenación. Al mismo tiempo la vermiculita tiene capacidad para absorber agua y no se seca fácilmente. Esto implica que mantiene la humedad óptima para lograr un buen crecimiento del patógeno. En cambio, el papel con facilidad pierde la humedad, de manera que el micelio puede deshidratarse más rápido y morir, o por lo menos retarda su crecimiento al no existir la humedad necesaria. También hay que señalar que una vez

que el hongo logra un buen crecimiento sobre las partículas de la vermiculita, el aislamiento con la ayuda de una aguja fina es mucho más fácil, en comparación cuando esta creciendo sobre el papel. Por otro lado, la cepa de *Rosellinia* de papa no se pudo aislar ni con vermiculita ni con papel pero solamente a través del aislamiento directo en PDAA. Obviamente esta cepa difiere mucho de la de cacao (RB0001).

Por lo tanto, consideramos que las dos cepas aisladas representan mucho de la variabilidad que se encuentra en el género *Rosellinia*. Esta observación esta de acuerdo con la hipótesis uno que existe mucha variabilidad entre cepas de *Rosellinia*. También es un paso importante hacia lograr el objetivo uno. Como se explicará más adelante, se encontraron diferencias adicionales que soportan esta afirmación.

A pesar de esas dificultades, esta parte del estudio fue muy importante, ya que se evaluaron diferentes métodos de aislamiento, de manera que permite recomendar una metodología sencilla y bien detallada sobre el procedimiento a seguir para aislar con éxito el patógeno. En el futuro, otros investigadores puedan lograr una colección más representativas de todos los cultivos de importancia que actualmente esta afectando el genero *Rosellinia*.

4.2.2. Crecimiento de *Rosellinia*

Con respecto a los diferentes medios y las condiciones de luz vs. Oscuridad en las cuales se puso a crecer *Rosellinia*, se puede observar en el cuadro 5 que el patógeno tuvo un mejor crecimiento cuando se usó papa dextrosa agar acidificados. Esto se debe principalmente al hecho que el crecimiento del hongo se ve favorecido cuando se encuentra bajo condiciones de pH ácido. Esta hipótesis se comprueba a nivel de campo, ya que los resultados del análisis de suelo demuestran que el pH del suelo donde fue aislado el patógeno es muy ácido (cuadro 2). A nivel del laboratorio, el medio acidificado inhibe el crecimiento de bacterias, de manera que reduce la competencia y favorece el crecimiento de *Rosellinia*.

A pesar que las dos cepas aisladas, RB0001 y RB0002, son habitantes naturales del suelo, ambas mostraron un comportamiento diferenciado con respecto a su crecimiento.

La cepa RB0001 creció mejor en la oscuridad y a una temperatura constante de 25 °C, estos resultados concuerdan con lo encontrado por Merchán 1990, quien reporta que el hongo se desarrolla mejor en ausencia de luz. Una interpretación posible es que el cacao

por si solo brinda cierto auto sombramiento, además mayormente se asocia con árboles de sombra que botan una gran cantidad de hojarasca (Fassbender 1993), de manera que el patógeno en el suelo recibe poca luz. Esto ha permitido que el patógeno se adapte mejor a este tipo de condiciones. En cambio, la cepa RB0002 creció mejor en la luz, posiblemente por que la papa es una planta de porte bajo, con un crecimiento erecto, de manera que durante el día probablemente el patógeno recibe cierta cantidad de luz ya que no hay nada que obstruya la entrada. A pesar de que el hongo se encuentra en el suelo, el sistema radicular de una planta de papa es más superficial que el de una planta de cacao. Quizás estas condiciones son las que han permitido que el patógeno se adapte y tenga un mejor crecimiento en la luz. Las diferencias de preferencias con respecto a luz, dan todavía más apoyo a la hipótesis uno.

4.2.3. Aislamiento de micoparásitos

En este estudio se puso en practica el método de placas precolonizadas desarrollado por Foley y Deacon (1985) especialmente para hongos que habitan en suelo. El método ha demostrado ser muy eficaz para aislar hongos hiperparásitos. Los resultados del estudio comprueban que el método funciona bien para diferentes cepas de *Rosellinia* y que se puede lograr el aislamiento de una colección representativa de los hongos antagonistas que habitan de manera natural en el suelo (figura 10). En ese sentido, se cumplió con el objetivo específico número dos.

A pesar de la importancia que representa el método de placas precolonizadas, ya que es sencillo y se adapta más a la realidad en el campo, durante la revisión de literatura que se hizo, no se encontraron estudios que hagan referencia a esta metodología para el aislamiento de antagonistas que controlen *Rosellinia*. Por lo tanto, es el primer estudio que pone en practica los procedimientos para llevar a cabo el aislamiento de hongos hiperparásitos contra este hongo.

A través del método de placas precolonizadas se lograron aislar antagonistas que habitan en forma natural en el suelo, y que con mucha facilidad pueden encontrarse en diferentes sistemas de producción (Foley y Deacon 1985). Diversos estudios indican que especies de *Trichoderma* y *Gliocladium* son los hongos antagonistas más estudiados y que tienen un potencial de gran utilidad como agente de control biológico para manejar

enfermedades ocasionadas por hongos del suelo (Howell 1991). Los mecanismos de control que usan estos hongos es a través del hiperparasitismo y como antagonistas productores de compuestos antibióticos que inhiben el crecimiento de otros hongos patógenos de plantas.



Figura 10. Crecimiento de hiperparásitos sobre placas precolonizadas por *Rosellinia*

También se encontraron especies micoparasíticas de *Fusarium* que durante la prueba de rango de hospedante mostraron crecimiento significativo sobre las placas precolonizadas por cepas de *Rosellinia*. Esto podría ser un indicativo que son hiperparásitos con potencial como agentes de control biológicos. Estos resultados concuerdan con lo encontrados por otros investigadores (Park *et al.* 1988; Duijff *et al.* 1999) quienes reportan la abundancia de especies de *Fusarium* no patógeno en los cultivos, y que evidentemente son potenciales supresores de *Fusarium* spp. patógenos de las plantas y de otros hongos del suelo.

A pesar que se hizo iguales intentos durante la fase de aislamiento de antagonistas a través del método de placas precolonizadas, se encontró que del suelo de cacao se logró aislar más antagonista que el suelo de papa. Ante estos resultados encontrado surge la interrogante ¿ Si esto es producto de las características del suelo / cultivo o de la susceptibilidad de las cepas usada?. Algo que no podemos contestar con nuestro diseño, que tuvo como objetivo aislar antagonistas contra el mismo patógeno y no tanto la abundancia de antagonista en cada suelo.

El cultivo de papa generalmente es manejado de forma intensiva haciendo uso de una diversidad de agroquímicos principalmente fungicidas de alta residualidad y que puede influir negativamente sobre la microbiología del suelo. Además son suelos con poca rotación de cultivos; cada año están cultivando el mismo cultivo como un monocultivo y los aporte de materia orgánica (cuadro 2) y la actividad microbiana son muy pobres.

Otro aspecto importante, es que el cacao es un ecosistema más estable, ya que es un menos perturbado por la actividad del hombre en comparación con el ecosistema de papa. Esto permite que el sistema mantenga un equilibrio. Foley y Deacon (1985) bajo condiciones de zonas templadas, encontraron que las especies micoparasíticas de *Pythium* se presentaron con mayor frecuencia en suelos perturbados que en suelos no perturbado. Pero en relación a *Trichoderma* y *Gliocladium*, que son los géneros de mayor interés en este estudio, no encontraron diferencias significativas en relación a sitios perturbados y no perturbados.

El cacao es un cultivo mayormente establecido en suelos ácidos, generalmente asociado con una gran diversidad de plantas que sirven como sombra y que constantemente están aportando y reciclando al ecosistema una gran cantidad de materia orgánica (Fassbender 1993). Esta hipótesis se comprueba con los resultados del análisis de suelo, se encontró que el suelo donde se cultiva cacao tiene mayor contenido de materia orgánica y pH más ácido en comparación con el suelo donde se cultiva papa (cuadro 2). En relación a las características del suelo (materia orgánica y pH), los resultados encontrados en este estudio concuerdan con las observaciones hechas a nivel de campo por Lewis y Papavizas (1984) y por Foley y Deacon (1985) quienes sugieren que *Trichoderma* y *Gliocladium* son hongos antagonistas que se presentan con mayor frecuencia en suelos con pH ácidos y con abundante contenido de materia orgánica. Estos aspectos podrían ser la razón que justifica el porque en este estudio se encontró mayor diversidad, y se logró aislar más antagonistas de suelos donde se cultiva cacao que suelos donde se cultiva papa.

4.2.4. Susceptibilidad de Cepas de *Rosellinia*

Para el trabajo con micoparásitos, es muy útil determinar el rango de hospedantes de los candidatos. En este diseño, se comparan hospedantes, no los antagonistas. Es decir, la tasa de crecimiento absoluta no es relevante sino la variabilidad de tasas de crecimiento entre hospedantes. Uno puede comparar géneros diferentes de un complejo de una enfermedad para seleccionar hiperparásitos de amplio rango de hospedante, o comparar cepas diferentes de una especie de patógenos para estimar el efecto de biodiversidad del patógeno en control biológico, o inocular hongos benéficos con el antagonista para eliminar antagonistas con efecto negativo a estos hongos (Krauss *et al.* 1999).

Según los resultados de la prueba de rango de hospedante se puede observar en el cuadro 9 que la cepa RB0001 de cacao es más susceptible que la RB0002 de papa. Estos resultados apoyan a la hipótesis dos. En promedio la tasa de crecimiento de los antagonistas fue 3.8 veces mayor en RB0001 comparado con RB0002. Por lo tanto, la alta susceptibilidad de RB0001 definitivamente contribuyó al hecho que se logró aislar cinco veces más micoparásitos en esa cepa, aunque razones elaboradas anteriormente tienen que jugar un papel adicional para explicar una diferencia tan grande.

Es difícil encontrar en la naturaleza antagonistas "perfectos" para el control de un patógeno en particular, producto de las interacciones complejas que se dan entre los microorganismos que habitan en el suelo. Sin embargo, es posible mejorar su capacidad para controlar los patógenos mediante la selección de aquellos con características más efectivas. Tales características incluyen aumento del antagonismo contra los patógenos, capacidad para competir contra la microflora presente en el suelo, mayor habilidad para multiplicarse bajo condiciones favorables y persistir bajo condiciones desfavorables sobre la superficie del hospedero, y la capacidad para afectar un amplio rango de hospederos (Blakeman y Fokkema 1982).

Generalmente para el control biológico de patógenos de plantas, el investigador debe seleccionar aquellos antagonistas que no discriminan entre cepas, es decir aquellos que muestran características de ser controladores generales. En este estudio se encontró que ARB0004 y ARB0011, son cepas de antagonistas que presentaron características de ser controladores generales, ya que no mostraron diferencias significativas (cuadro 9, prueba t-student) en cuanto a su hiperparasitismo. Por lo tanto, esta fue la razón del porque se

decidió trabajar con estos antagonistas en los siguientes ensayos de control biológico de *Rosellinia*.

4.2.5. Control biológico de *Rosellinia* sp. a nivel de invernadero

4.2.5.1. Pruebas de patogenicidad

Se realizó el aislamiento de *Rosellinia* y el hongo se estudió en cultivo puro en condiciones controlada para establecer pruebas de patogenicidad y determinar bajo que rango de condiciones el hongo se comporta como un parásito.

Antes de establecer los ensayos de control biológico de *Rosellinia*, se realizaron pruebas preliminares para comprobar la patogenicidad del hongo usando plántulas de cacao dentro de un rango de edades: se usaron plantas de 15 días de germinadas y tres meses de edad. La literatura generalmente asocia la presencia de este hongo con plantas de consistencia leñosa y cita que mayormente se presenta cerca de árboles que han sido cortados o que están en proceso de descomposición (Aránzazu *et al.* 1999). Los resultados de este estudio demuestran que *Rosellinia* es un hongo con capacidad para afectar plantas de cacao indistintamente de la edad, una vez que se aumentó el inoculo. Esto justifica porque no es recomendable sembrar plántulas en lugares donde se presentan los focos de infección sino hasta un lapso de tiempo de 6-12 meses (Aránzazu *et al.* 1999; Herrera y Grillo 1989).

Se observó que las plántulas comenzaron a manifestar síntomas entre un lapso de tiempo de 15-20 días después de inoculado. Inicialmente las plantas mostraron marchitez y luego en la base de la planta se formó un micelio blanco, que es la forma de reproducción del hongo. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Waterston (1941) quien encontró que plántulas de tres semanas de edad manifestaron síntomas a los 14 días después de ser inoculadas, el cual es el periodo normal para el hongo provoque infección.

4.2.5.2. Bioensayos

Los bioensayos son simulaciones a pequeña escala que representan condiciones naturales específicas. Generalmente se realizan en el laboratorio o invernadero y normalmente no toman en cuenta las fluctuaciones climáticas y la variabilidad inherente que ocurre en el suelo, las cuales juegan un papel importante en el campo. A pesar de esa limitante, los bioensayos representan más la realidad objetiva que ocurre en el campo que cualquier otro método de pretamizado (Krauss *et al.* 1999).

En el campo del control biológico de patógenos de plantas, tradicionalmente muchos estudios publicados sobre la eficiencia de hongos antagonista, hacen referencia a las pruebas *in vitro*, en las cuales el patógeno y el antagonista se ubican en lados opuestos dentro de platos petri con medios de laboratorio ricos en nutrientes y se mide la inhibición del crecimiento del patógeno. La inhibición *in vitro* está mediada por la producción de antibióticos, que dependen fuertemente del substrato usado (Whipps 1987). La mayoría de los medios de laboratorio no son representativos de los substratos naturales limitados de nutrientes. Tal interacción *in vitro* ha sido criticada por alrededor de 30 años (Huber y Watson 1966). Desafortunadamente, a pesar de modernas reiteraciones de la advertencia, las interacciones *in vitro* son ampliamente utilizadas en la selección de agentes de control biológico (Whipps 1987).

Las diferencias entre el comportamiento *in vitro* y en el suelo se explica porque en las pruebas *in vitro* se suministran los nutrimentos adecuados para la producción de antibióticos para un antagonista en particular, lo que no sucede en muchas ocasiones en el suelo. El antagonista está libre de competencia en las pruebas de laboratorio pero en el suelo la producción de antibióticos puede ser suprimida e inhibir su efecto sobre el patógeno. Además en el suelo los patógenos pueden presentar estructuras de resistencia las cuales no se ven afectadas por el antagonismo. Por lo tanto, es preferible trabajar con bioensayo (Baker y Cook 1982). Por lo tanto, en este estudio, se utilizaron bioensayos con suelo no estéril. Además, los antagonistas y el patógeno se aplicaron en forma simultánea y se usó un inoculo relativamente alto del último como lo recomiendan Krauss *et al.* (1999).

4.2.5.3. Compatibilidad de antagonistas

Los resultados de la prueba de compatibilidad a nivel de bioensayo demuestran una tendencia clara, que los antagonistas cuando son aplicados en mezcla de tres lograron una mejor control de la enfermedad comparado con el testigo absoluto, y para todas las variables evaluados la respuesta fue más consistente en comparación que cuando se aplicaron en mezclas de dos y solo (cuadro 10). Las mezclas de dos antagonistas y el T-22 aplicado solo mostraron un comportamiento intermedio en comparación a los tratamientos con ausencia y presencia del patógeno. Los antagonistas aplicados individualmente se comportaron estadísticamente igual al testigo positivo. Estos resultados están de acuerdo con estudios realizados por Pierson y Weller (1994), quienes argumentan que muchas investigaciones sobre control biológico de patógenos de raíces se han enfocado sobre la aplicación de microorganismos solo. Sin embargo, cuando los microorganismos son aplicados en combinación proporciona una supresión mayor y más consistente de la enfermedad en comparación cuando las cepas son usadas individualmente. Este resultado es en acuerdo con la hipótesis tres. Se confirmó todavía más en los ensayos de materia orgánica y pH donde la mezcla de tres antagonistas superó la de dos. Este es el primer estudio, donde se empleó mezclas de micoparásitos contra *Rosellinia* sp.

Estudios actuales demuestran que, en general, cierta combinación de cepas tienen mayor potencial de actividad de control biológico comparada con las mismas cepas aplicadas individualmente (Krauss *et al.* 2001; Baker y Cook 1982). De igual forma, la combinación de cepas a nivel de invernaderos también han proporcionado mayor control biológico que las cepas probadas individualmente. Sin embargo, en este estudio no todas las combinaciones fueron efectivas. Se encontró que la mezcla de ARB0004 más T-22, ambos *Trichoderma*, mostraron cierta incompatibilidad ya que su protección a las plantas no fue muy promisorio y con resultados inconsistentes en las variables evaluadas. Probablemente son organismo con un mismo mecanismo de acción y compiten por el mismo sustrato, de manera que su eficiencia se reduce por la competencia. Este resultado esta de acuerdo con lo planteado por Raupach y Kloepper (1998), los cuales establecen que no todos los intentos por combinar agentes de control biológico han sido exitosos y se ha reportado incompatibilidad entre antagonistas (Leibenger *et al.* 1997). Muchos estudios publicados sobre las propiedades fisiológicas y la actividad

biocontroladora de *Trichoderma* spp. indican que hay una gran variación entre diferentes cepas aisladas. Los mecanismos antagónico y los niveles de control biológico alcanzados dependen de las especies y los patógenos aislados de plantas, del cultivo y si la enfermedad ocurre en el campo en el invernadero o post cosecha (Thrane *et al.* 2000). Ante esta situación, que no todos los agentes de control biológico funcionan de manera exitosa, ya sea de forma individual o en mezcla, surge la pregunta ¿cómo lograr una mayor eficiencia de los agentes biológicos? Hay varias posibilidades que pueden considerarse para una mayor actividad biocontroladora de ciertas combinaciones de cepas, comparadas con cepas individuales: Una es que al existir mayor diversidad de fenotipos introducidos, resulta una comunidad más diversa en la rizósfera y potencialmente más estable, capaz de colonizar completamente las raíces y ser más capaz de sobrevivir a cambios biológicos, químicos y físicos que ocurren en la rizósfera. La colonización rápida y persistente en la rizósfera es un aspecto importante en control biológico, principalmente en cultivos que son susceptibles a infecciones en todos los estados de desarrollo, lo cual es el caso del cacao. Segundo, que al existir mayor diversidad de fenotipos en las mezclas, comparado con cepas solas, también probablemente resulta en una mayor variedad de características o mecanismos responsables para suprimir la enfermedad, incluyendo diversos productos metabólicos secundarios capaces de suprimir hongos patógenos (Raupach y Kloepper 1998). La importancia de lograr un espectro más amplio de mecanismos de biocontrol en mezclas complementarias ha sido demostrado por Krauss *et al.* (2001). En esa manera, los autores controlaron un complejo de diversos patógenos. Dado que *Rosellinia* es un patógeno con mucha variabilidad en su susceptibilidad a antagonistas, parece prudente el empleo de muchas mezclas para aumentar la probabilidad de controlar cepas de patógenos que aun no se logró aislar pero que deben existir en diferentes suelos y cultivos.

Para llevar a cabo mezclas de agentes biocontroladores es importante considerar los siguientes factores: el tipo de suelo, el cultivo, niveles de materia orgánica y el potencial de inóculo del patógeno (Pierson y Weller 1994). Además, que al formar una mezcla es importante incluir organismos con diferentes patrones de colonización, mezclar antagonistas con diferentes mecanismos de supresión de la enfermedad, mezclar organismos diferentes taxonómicamente, o mezclar antagonistas con diferentes óptimas de temperatura, pH o condiciones de humedad para proteger las plantas en cualquier situación que se presente en el campo (Raupach y Kloepper 1998).

4.2.6. Efecto de las característica del suelo materia orgánica (MO) y pH sobre la eficiencia de los antagonistas

El uso de materia orgánica, además de mejorar las características físicas y químicas del suelo, influye directa o indirectamente el desarrollo y la eficiencia de los microorganismos, los cuales pueden suprimir la propagación de patógenos en el suelo (Baker 1987). Al analizar el efecto de la materia orgánica sobre la eficiencia de los antagonista, los resultados demuestran una tendencia clara, en la medida que se incrementó el contenido de materia orgánica en el suelo el porcentaje de mortalidad de plantas fue mayor (ver cuadro 11). Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Ruiz y Caycedo (1996), quienes establecieron que los suelos con alto contenido de materia orgánica favorecen el desarrollo del patógeno e incrementan su tasa de infección. Aunque también encontraron que la densidad poblacional de los agentes biocontroladores especialmente *Trichoderma* se incrementó de forma proporcional. Dado que el patógeno como sus antagonistas están favorecidos por altos contenido de materia orgánica, es de gran interés a quienes lo favorece más cuando están presente ambos grupos de microorganismos.

A nivel de invernadero no podemos demostrar esta hipótesis, si los antagonistas aumentaron su densidad poblacional, en la medida que se aumentó el contenido de materia orgánica, debido a que no se hizo ninguna cuantificación posterior a su inoculación. Pero si es evidente que las mezclas de antagonistas fueron más eficiente en el control de *Rosellinia*, en el nivel más bajo de materia orgánica esta observación esta de acuerdo con la hipótesis cuatro y cinco. Por lo tanto, en un manejo integrado de *Rosellinia*, donde se combinan varias estrategias para el control de una enfermedad, la adición de bocachi no es recomendable, independiente del uso de biocontrol. Más bien sugiere que en el futuro se debería considerar la remoción de materia orgánica como hojarasca o plantas muertas en descomposición para crear un ambiente más a favor de los antagonistas. Esta recomendación es de acuerdo con las de Merchán (1989).

La literatura cita que una alternativa no química para manejar *Rosellinia* es aplicar cal en los focos de infección con el propósito de incrementar el pH del suelo (Herrera y Grillo 1989). Esto crea condiciones desfavorable para el patógeno, ya que generalmente pH ácidos favorecen su desarrollo. En este estudio se probaron diferentes niveles de pH (4,

5 y 6) con el objetivo de conocer si el pH influye el comportamiento de *Rosellinia* y la eficiencia del control biológico de los antagonista, los cuales también son favorecidos por pH bajos (Lewis y Papavizas 1984; Foley y Deacon 1985).

Al analizar la relación entre el pH y la eficiencia de los antagonista, los resultados demuestran que para el caso de la mortalidad de plantas, la mezclas de antagonistas no mostraron diferencias significativas con respecto al testigo negativo, aunque si hay diferencia con respecto al testigo absoluto. Tampoco se encontró diferencias significativas entre niveles de pH evaluados, de manera que la enfermedad no presentó una tendencia definida en relación al pH. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Waterston (1941), el cual no encontró ninguna correlación entre la concentración del ion hidrogeno del suelo (pH) y la incidencia de la enfermedad y plantea que *Rosellinia* parece ser tolerante a un amplio rango de pH, lo cual es confirmado por observaciones a nivel campo. Otro estudio realizado por Duque y Borrero (1966), quienes encontraron que el mayor porcentaje de mortalidad ocurrió en suelo con pH natural (pH 5.2), por encima o por debajo de este rango el hongo causó notablemente menos la mortalidad. Estos resultados difieren a los encontrado en este estudio ya que la mortalidad de planta fue igual en todos los pH evaluados (4, 5, 6).

En cuanto a la severidad de la enfermedad analizada como el área bajo la curva que expresa la acumulación de enfermedad en el tiempo, se encontró que hay una interacción altamente significativa entre tratamientos y nivel, y se puede observar que en el nivel más bajo de pH no hay diferencia significativa entre las mezcla de antagonista y el testigo positivo. En cambio, se encontró diferencia en los niveles cinco y seis de pH (ver cuadro 21). También se puede observar que, a pesar que estadísticamente no hay diferencia significativa entre los niveles, hay una tendencia clara que la enfermedad es más severa en el nivel más bajo de pH. Aunque las plántulas de cacao se adaptaron bien a suelos de bajos pH, la acidez favoreció al patógeno y desfavoreció los antagonistas. Por lo tanto, la práctica común de agregar cal al suelo afectados por *Rosellinia*, no solamente es una estrategia recomendable en sí, sino también un manejo compatible con el control biológico. Futuras investigaciones podrían seleccionar antagonistas que se adapten mejor a suelos ácidos.

De acuerdo a la hipótesis cinco, se observó el efecto de las características del suelo en la enfermedad y control biológico. El efecto del pH se detectó en forma más consistente

que el efecto de la materia orgánica. Esto sugiere que el nivel del pH es más importante que el contenido de materia orgánica. Por otro lado, uno tiene que tomar en cuenta que la escala de pH es una escala logarítmica ($\log(\text{concentración } H^+)$) mientras los niveles de materia orgánica sugieren un incremento lineal. Por lo tanto, el rango de pH fue muy amplio comparado con el rango de materia orgánica. Sin embargo, ambos rangos corresponden a valores realistas en el campo. Sería interesante investigar el efecto de otras características del suelo reportadas en la literatura como el contenido de fósforo (Merchán 1990).

Los resultados encontrados en este estudio cumplen con el objetivo específico tres pero también nos llevan a ciertas interrogantes, ya que en el primer ensayo sobre la compatibilidad de antagonista, los tratamientos biológicos aplicados en mezcla mostraron una tendencia más clara y consistente en todas las variables evaluadas. En cambio, en los siguientes ensayos sobre el efecto de las características del suelo (MO y pH), las respuestas no fueron tan evidentes, aunque son experimentos diferentes y no se puede esperar la misma respuesta. Sin embargo, hay elementos importantes para que en estudios futuros se tomen en consideración y entre estos podemos mencionar los siguientes: ¿si aplicar conidias de antagonistas al suelo es la forma más eficiente para controlar el patógeno? Las conidias, especialmente de *Trichoderma* y *Gliocladium*, han sido usadas extensivamente en estudios de control biológico porque ellos son producidos abundantemente sobre medios de agar y son fáciles para manipularlas. Sin embargo, excepto para posible uso como tratamiento a semilla, algunos estudios sugieren que las conidias son inapropiadas para introducir antagonistas dentro del suelo para el control biológico (Papaviza y Lewis 1985). Los mismos autores encontraron que la preparación micelial de *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* conteniendo hifas de crecimiento joven formulada en una base de afrecho como fuente de alimento, fue más efectiva que la preparación de conidia. Esto sugiere que para futuros estudios sobre el control biológico de *Rosellinia*, sería muy importante incluir otros tratamientos que consideren la forma de preparación de inóculo de los antagonistas y evaluar su eficiencia en cuanto al control del patógeno.

Otra interrogante es ¿si la cantidad de inóculo que se puso por bolsa de dos kilogramos de suelo para el patógeno fue excesiva y se dio cierta ventaja con respecto a los antagonistas? En nuestro estudio se inocularon plántulas de cacao con 250 g de trigo con

crecimiento micelial del patógeno por bolsa de dos kilogramo de suelo. En cambio, un estudio realizado por Freeman *et al.* (1986), usando la misma metodología inoculando semilla de trigo con crecimiento micelial *Rosellinia*, encontró que con cuatro g de trigo por kilogramo de suelo fue suficiente para que el patógeno provocara enfermedad. En el presente trabajo, se seleccionó un nivel de inóculo muy alto del patógeno por dos razones: (1) para obtener un sistema de evaluación muy estricta, lo cual permite identificar el mejor tratamiento y (2) para asegurar que *Rosellinia* produzca síntomas medibles en menos de dos meses, algo importante para la redacción de una tesis de maestría pero atípico para la muerte lenta que se observa en el campo. De toda manera, es necesario seguir investigando y perfeccionando la dosis óptima en la cual el patógeno puede provocar enfermedad, pero de manera que pueda darse una mejor correlación entre el comportamiento del patógeno y la eficiencia del control biológico de los antagonistas. En este sentido, el presente trabajo contribuyó un primer paso en el manipuleo y la producción de *Rosellinia*, que sigue siendo un patógeno poco estudiado.

Otro aspecto que hay que considerar, es que la inoculación se hizo al mismo tiempo tanto para los antagonistas como el patógeno. Como en el campo, el patógeno ya está presente antes de aplicación de los antagonistas, sería importante estudiar si se puede agregar antagonistas a un suelo ya contaminado con *Rosellinia* y bajo que condiciones. Además, para este tipo de estudio, donde el objetivo principal era ver el efecto de las características del suelo sobre el comportamiento del patógeno y la eficiencia de los antagonistas, sería bueno que en próximos estudios, la materia orgánica y la cal se aplique al suelo con anticipación y hacer evaluaciones continuas para asegurarse si realmente se logró un cambio en las características del suelo que alcanzan los niveles deseados.

Consideramos que los resultados de este estudio son preliminares, y que hay muchas interrogantes que dan pauta para mejorar los métodos y alcanzar mayor éxito en el control biológico de *Rosellinia*. De toda manera, se estableció una colección de micoparásitos muy promisorios para el control biológico de *Rosellinia* sp. y, por lo tanto se cumplió con el objetivo general.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- *Rosellinia* es un hongo difícil de aislar ya que presenta un crecimiento lento. Está favorecido en medio papa dextrosa agar acidificado .
- *Rosellinia* presenta una alta variabilidad entre diferentes cepas, algo que se afirmó en casi todas las variables medidas, incluso su susceptibilidad a antagonistas.
- El método de placas precolonizadas por *Rosellinia* funciona muy bien para aislar hongos hiperparásitos y lograr una colección representativa.
- En el suelo de Cabiria se encontró un mayor número de hongos antagonistas en comparación con el suelo de tierra Blanca de Cartago.
- El suelo del lote de Cabiria cuenta con un alto potencial de microorganismos que pueden ser agentes biocontroladores para *Rosellinia*. Especialmente los género *Trichoderma* y *Gliocladium* reconocido mundialmente por sus características benéficas y que pueden ser incluidos en el contexto del manejo integrado de la enfermedad.
- La cepa RB0001 fue más susceptible al hiperparasitismo de los antagonistas que la cepa RB0002, ya que en promedio los antagonistas mostraron una mayor tasa de crecimiento.
- La mezcla de tres antagonistas presentó mejor eficiencia en cuanto al control biológico de *Rosellinia* a nivel de invernadero en comparación cuando son aplicado individualmente o en mezclas de dos, y su respuesta fue más consistente en todas las variables evaluadas.
- La enfermedad fue más severa en suelos de alto contenido de materia orgánica, mientras el control biológico fue menos eficiente bajo esas condiciones.

- La enfermedad fue más severa en suelos ácidos. El control biológico fue más eficiente en suelos con niveles de pH alto. Este factor es más importante que materia orgánica.

5.2. Recomendaciones

- Hacer la colección de *Rosellinia* spp. en Costa Rica que abarque diferentes sitios y cultivos.
- Producir *Rosellinia* spp. en papa dextrosa agar acidificado o en trigo a nivel del laboratorio, tomando en cuenta que diferentes cepas difieren en su preferencia referente la iluminación.
- Calibrar el nivel de inóculo de *Rosellinia* necesario para provocar síntomas en bioensayos en plántulas sembradas en suelos no estériles.
- Investigar métodos alternativos al riego con conidia para la aplicación de hongos antagonistas al suelo.
- Investigar mecanismos de (in)compatibilidad entre micoparásitos con el fin de llegar a una estrategia racional para su uso.
- Investigar el efecto de fertilización con fosfato en la interacción entre *Rosellinia* y su antagonistas.
- Buscar antagonistas tolerantes a suelos ácidos mediante el método de placas precolonizadas.
- Investigar el efecto de mezclas de antagonistas bajo condiciones del campo donde el patógeno ya esté presente antes de la aplicación de biocontroladores.
- Remover material orgánica (hojarasca, madera en descomposición) y aplicar cal para el manejo integrado de *Rosellinia* sin o con la aplicación de antagonistas.

6. LITERATURA CITADA

- Aránzazu, H. F. 1996. Comportamiento de la llaga estrellada *Rosellinia pepo* Pat. Sobre raíces de cacao. *Fitopatología Colombiana* 20(1):7-10.
- Aránzazu, H. F. 1997. Control de la llaga estrellada en cacao causada por *Rosellinia pepo* Pat. *Fitopatología Colombiana* 21(1):5-9.
- Aránzazu, H. F.; López, J. C.; Quiroga, G. R. 1999. Manejo de las llagas radicales (*Rosellinia* sp). *Boletín de Sanidad Vegetal* No. 23.
- Baker, F. K.; Cook, J. R. 1982. Biological control of plant pathogens. St. Paul Minnesota American Phytopathological Society. 433 p.
- Baker, F. K. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 25:67-85.
- Borda, F.; Arbelaez, G. 1985. Control de marchitamiento vascular del pepino ocasionado por *Fusarium oxysporum* Schl. con el aislamiento T-95 de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Fitopatología Colombiana* 11(2):10-15.
- Bornemiza, E.; Constenla, M.; Alvarado, A.; Ortega, E.J.; Vásquez, A.J.; 1979. Organic carbon determination by the Walkley-Black and dry combustion methods in surface soils and depth profiles from Costa Rica. *Soil Sci. Soc. Amer. Jour.* 43:78-83.
- Blakeman, J. P.; Fokkema, N. J. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annual Review of Phytopathology* 20:167-192.
- Castro, L. B. 1995. Antagonismo de algunos aislamientos de *Trichoderma koningii*, originados en suelo colombiano contra *Rosellinia bunodes*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Pythium ultimum*. *Fitopatología Colombiana* 19(2):7-18.
- Cháves, A. V. 1996. Mortalidad de cafetos en la Península de Nicoya. In Encuentro Regional de Consulta sobre Factores Condicionantes de la Marchitez Lenta del Cafeto (1, 1996, Masatepe, Nicaragua). Memoria Tegucigalpa, Honduras, IICA – PROMECAFE. 9 p. (Ponencia de resultados recomendaciones de eventos técnicos A1/HN 96-004).
- Díaz, R. R.; Hunter, A. 1978. Metodología de muestreo de suelos, análisis químico de suelos y tejido vegetal e investigación en invernaderos. Turrialba, Costa Rica CATIE. 65 p.
- Duijff, B. J.; Recorbet, G.; Bakker, P.A. H. M.; Loper, J. E.; Lemanceau, P. 1999. Microbial antagonism at the root level is involved in the suppression of *Fusarium* wilt by the combination of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358. *Phytopathology* 89:1073-1079.

- Duque, L. S.; Borrero, F. O. 1966. Llagas radicales negra (*Rosellinia bunodes*) y estrellada (*Rosellinia pepo*) del cafeto. II. Efecto de la humedad y el pH del suelo en el desarrollo micelial e infección. *Cenicafé* (Colombia) 17:61-69.
- Elad, Y. 1996. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *European Journal of Plant Pathology* 102:719-732.
- Elad, Y.; Katan, J. 1980. *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70:119-121.
- Foley, M. F. y Deacon, J. W. 1985. Isolation of *Pythium oligandrum* and other necrotrophic mycoparasites from soil. *Transactions of the British Mycological Society* 85:631-639.
- Fassbender, H. W. 1993. Modelos edafológicos de sistemas agroforestales. 2. ed. Turrialba Costa Rica: CATIE 530 p.
- Fravel, D. R. 1988. Role of antibiosis in biological control of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* 26:75-91.
- Freeman, S.; Szejnberg, A.; Chet I. 1986. Evaluation of *Trichoderma* as a biocontrol agent for *Rosellinia necatrix*. *Plant and Soil* 94:163-170.
- French, R. E.; Hebert, T. T. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. San José Costa Rica. IICA. 290 p.
- Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84:377-393.
- Herrera, I. L.; Grillo, R. H. 1989. La pudrición negra de las raíces del cafeto en la región del Escambray. *Centro Agrícola* 16(1) 53-59.
- Hernández, P. M. 1967. Pudrición de la raíz. *Revista Cafetalera ANACAFE* No. 69: 16-17.
- Howell, C. R. 1991. Biological control of *Pythium* damping-off of cotton with seed-coating preparation of *Gliocladium virens*. *Phytopathology* 81:738-741.
- Huber, D. M.; Watson, R. D. 1966. How valid is the agar plate inhibition test for determining antagonism between soil micro-organisms? *Phytopathology* 56:882.
- Jacobsen, B.; Backman, P. 1993. Biological and cultural plant disease control: alternatives and supplements to chemicals in IPM systems. *Plant Disease* 77(3): 311-315.
- Jeger, M.J. 1983. Analysing epidemics in time and space. *Plant Pathology* 32:5-11.

- Jiménez, O. F. 1994. Resumen acumulado de datos agro climáticos. Turrialba, Costa Rica, CATIE. s.p. (Mimeografiado).
- Johnson, K. B.; Dileone J. A. 1999. Effect of antibiosis on antagonist dose-plant disease response relationships for the biological control of crown gall of tomato and cherry. *Phytopathology* 89(10):974-980.
- Kannan, N. 1986. Root diseases of coffee. *Indian Coffee* 50(12): 21-24.
- Krauss, U. 1996. Establishment of a bioassay for testing control measures against crown rot of banana. *Crop Protection* 15:269-274.
- Krauss, U.; Bidwell, R.; Ince, J. 1998. Isolation and preliminary evaluation of mycoparasites as biocontrol agents against crown rot of banana. *Biological Control - Theory and Application* 13:111-119.
- Krauss, U.; Bustamante, E. 1999a. Mecanismo de antagonismo. In Documentos mimeografiado del Taller de Control Biológico de Plagas Agrícolas y Forestales con agentes microbiológicos. Manual teórico práctico. Turrialba, Costa Rica, CATIE.
- Krauss, U. 1999b. Mezclas de cepas de controladores biológicos. In Documentos mimeografiado del Taller de Control Biológico de Plagas Agrícolas y Forestales con agentes microbiológicos. Manual teórico práctico, Turrialba, Costa Rica, CATIE.
- Krauss, U.; Martínez, A.; y Hidalgo, E. 1999c. Pretamizado de hongos hiperparasítico de patógenos de plantas. In Documentos mimeografiado del Taller de Control Biológico de Plagas Agrícolas y Forestales con agentes microbiológicos. Manual teórico práctico, Turrialba, Costa Rica, CATIE.
- Krauss, U.; Matthews, P.; Bidwell, R.; Hocart, M.; Anthony, F. 2001. Strain discrimination by fungal antagonists of *Colletotrichum musae*: implications for biocontrol of crown rot of banana. *Mycological Research*. 105:67-76.
- Larkin, R. P.; Fravel, D. R. 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium wilt* of tomato. *Plant Disease* 82:1022-1028.
- Leibinger, W.; Beuker, B.; Hahn, M.; Mendgen, K. 1997. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology* 87:1103-1110.
- Lewis, J. A.; Papavizas, G.C. 1984. Proliferation of *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Phytopatolgy* 74(7):836.
- Lewis, J. A.; Papavizas, G.C. 1985. Effect of mycelial preparations of *Trichoderma* and *Gliocladium* on populations of *Rhizoctonia solani* and incidence of damping-off. *Phytopathology* 75:812-817.

- López, J. C.; Bustamante, R. E.; Rivas, G. G.; Rivillas, C. A.; Pérez, C. M. 1998. Aislamiento de *Pseudomonas fluorescentes* antagonista potencial de *Rosellinia bunodes* en raíces de café en Colombia. *Revista Manejo Integrado de Plagas* 49:35-41.
- Merchán, V. M. 1989. Manejo de enfermedades del cacao. *ASCOLFI Informa* 15(2):10-14.
- Merchán, V. M. 1990. La *Rosellinia* del cacao. *El Cacaotero Colombiano* 13 (38):13-19 p.
- Merchán, V. M. 1993. Experiencia en el manejo de *Rosellinia*. *ASCOLFI informa* 19(3):23-24.
- Park, C. S.; Paulitz, T. C.; Baker, R. 1988. Biocontrol of *Fusarium* wilt of cucumber resulting from interactions between *Pseudomonas putida* and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporium*. *Phytopathology* 78:190-194
- Papavizas, G. C. 1973. Status of applied biological control of soil-borne plant pathogens. *Soil Biological and Biochemistry* 5:709-720.
- Pady, S. M.; Kramer, C. L.; Pathak, V. K. 1960. Suppression of fungi by light on media containing rose bengal. *Mycologia* 52:347-350.
- Pierson, E. A.; Weller, D. M. 1994. Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve the growth of wheat. *Phytopathology* 84:940-947.
- PROCAFE, 1996. Manejo integrado de la podredumbre negra de la raíz del caféto (*Rosellinia* sp.). Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Caféto. *Boletín Técnico* No. 6. 7 p.
- Raupach, G. S.; Kloepper, J. W. 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology* 88:1158-1164.
- Rincón, A. A. Leguizamon, C. J. E.; Arbeláez, T. G. 1992. Control biológico de *Rhizoctonia solani* con *Trichoderma* en semillero de café. *Cenicafé* 43 (3):73 -84.
- Rojas, E. V.; Caycedo, L. J.; Arbeláez T. G. 1992. Búsqueda y evaluación de antagonista a *Rosellinia bunodes* agente causante de la llaga negra del caféto. *Cenicafé*, 43(2): 33-42.
- Ruiz, S. L. Caycedo, L. J. 1996. Efecto del contenido de materia orgánica del suelo sobre el control de *Rosellinia bunodes* con *Trichoderma* spp. *Cenicafé*, 47(4):179-186.
- Sztejnberg, A.; Freeman, S. Chet, I.; Katan, J. 1987. Control de *Rosellinia necatrix* In soil and in apple orchard by solarization and *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease* 71:365-369.

- Thrane, C.; Funck Jensen, D.; Tronsmo, A. 2000. Substrate colonization, strain competition, enzyme production *in vitro*, and biocontrol of *Pythium ultimum* by *Trichoderma* spp. isolates P1 and T3. *European Journal of Plant Pathology* 106:215-225.
- Waterston, J. M. 1941. Observation on the parasitism of *Rosellinia pepo* Pat. *Tropical Agriculture (Trinidad)* 18 (9):174-184.
- Whipps, J. M. 1987. Effect of media on growth and interactions between a range of soil-born glasshouse pathogens and antagonistic fungus. *New Phytologist* 107: 127-142.
- Zar, J.H. 1996. *Biostatistical analysis*. 3 ed. New York, Prentice Hall. 121 p.

7. ANEXOS

7.1. Salidas de análisis estadísticos

Anexo 1. ANDEVA, Peso seco de raíces (g): Efecto de diferentes niveles de materia orgánica.

Dependent Variable: Peso seco de raíces (g)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	5.65892500	1.88630833	18.69	0.0001
NIV	2	0.20100000	0.10050000	1.00	0.3770
TRAT*NIV	6	0.72884000	0.12147333	1.20	0.3209
Error	48	4.84532000	0.10094417		
Corrected Total	59	11.43408500			

R-Square	C.V.	Root MSE	MOSECRA Mean
0.576239	25.82016	0.317717	1.230500

Anexo 2. ANDEVA Longitud de raíces (cm): Efecto de diferentes niveles de materia orgánica.

Dependent Variable: Longitud de raíces (cm)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	485.6138333	161.8712778	8.82	0.0001
NIV	2	152.3523333	76.1761667	4.15	0.0217
TRAT*NIV	6	85.3796667	14.2299444	0.78	0.5929
Error	48	880.4840000	18.3434167		
Corrected Total	59	1603.8298333			

R-Square	C.V.	Root MSE	MOLRAIC Mean
0.451012	23.14884	4.282922	18.50167

Anexo 3. ANDEVA, Area foliar (cm²): Efecto de diferentes niveles de materia orgánica.

Dependent Variable: Area foliar en (cm²)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	78176.2620	26058.7540	29.96	0.0001
NIV	2	12838.3328	6419.1664	7.38	0.0008
TRAT*NIV	6	13317.4647	2219.5775	2.55	0.0205
REP(TRAT*NIV)	48	99998.2250	2083.2964	2.39	0.0001
FECHA	3	28996.3651	9665.4550	11.11	0.0001
TRAT*FECHA	9	22096.0518	2455.1169	2.82	0.0036
NIV*FECHA	6	9946.8631	1657.8105	1.91	0.0804
TRAT*NIV*FECHA	14	5686.5347	406.1810	0.47	0.9488
Error	248	215735.2750	869.9003		
Corrected Total	339	674409.8941			

R-Square	C.V.	Root MSE	MOAREA Mean
0.680113	32.48877	29.49407	90.78235

Tests of Hypotheses using the Type III MS for REP(TRAT*NIV) as an error term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	78176.26201	26058.75400	12.51	0.0001
NIV	2	12838.33281	6419.16640	3.08	0.0551
TRAT*NIV	6	13317.46472	2219.57745	1.07	0.3963

Anexo 4 . ANDEVA Días de sobrevivencia (máximo 48 días): Efecto de diferentes niveles de materia orgánica

Dependent Variable: Días de sobrevivencia (máximo 48 días)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	3715.200000	1238.400000	21.70	0.0001
NIV	2	462.933333	231.466667	4.06	0.0236
TRAT*NIV 0.4918	6	313.600000	52.266667	0.92	
Error	48	2739.200000	57.066667		
Corrected Total	59	7230.933333			

R-Square	C.V.	Root MSE	DIAMUEMO Mean
0.621183	21.87524	7.554248	34.53333

Anexo 5 . ANDEVA Severidad (ABC) Efecto de diferentes niveles de materia orgánica

Dependent Variable: Severidad (ABC)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	2516.645833	838.881944	27.96	0.0001
NIV	2	122.133333	61.066667	2.04	0.1417
TRAT*NIV	6	56.466667	9.411111	0.31	0.9267
Error	48	1440.000000	30.000000		
Corrected Total	59	4135.245833			

R-Square	C.V.	Root MSE	AUC Mean
0.651774	50.21139	5.477226	10.90833

Anexo 6. ANDEVA, Altura de plantas (cm): Efecto de diferentes niveles de materia orgánica.

Dependent Variable: Altura de plantas (cm)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	17.4565712	5.8188571	14.10	0.0001
NIV	2	3.1464129	1.5732064	3.81	0.0249
TRAT*NIV	6	84.0814864	14.0135811	33.96	0.0001
REP(TRAT*NIV)	48	775.0968333	16.1478507	39.13	0.0001
FECHA	5	166.0591527	33.2118305	80.49	0.0001
TRAT*FECHA	14	19.4058522	1.3861323	3.36	0.0001
NIV*FECHA	10	2.9234013	0.2923401	0.71	0.7150
TRAT*NIV*FECHA	20	7.6644948	0.3832247	0.93	0.5525
Error	118	48.690000	0.412627		
Corrected Total	226	1750.415507			

R-Square	C.V.	Root MSE	MOALTUR Mean
0.972184	3.617451	0.642361	17.75727

Tests of Hypotheses using the Type III MS for REP(TRAT*NIV) as an error term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	17.45657122	5.81885707	0.36	0.7819
NIV	2	3.14641289	1.57320644	0.10	0.9073
TRAT*NIV	6	84.08148640	14.01358107	0.87	0.5254

Anexo 7. ANDEVA, Número de hojas: Efecto de diferentes niveles de materia orgánica.

Dependent Variable: Número de hojas

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	69.7642721	23.2547574	81.54	0.0001
NIV	2	2.9901765	1.4950883	5.24	0.0066
TRAT*NIV	6	17.5119398	2.9186566	10.23	0.0001
REP(TRAT*NIV)	48	103.9908802	2.1664767	7.60	0.0001
FECHA	5	214.0323684	42.8064737	150.10	0.0001
TRAT*FECHA	14	10.9770760	0.7840769	2.75	0.0015
NIV*FECHA	10	3.9551125	0.3955113	1.39	0.1946
TRAT*NIV*FECHA	20	8.1826652	0.4091333	1.43	0.1198
Error	118	33.6527778	0.2851930		
Corrected Total	226	465.0572687			

R-Square Mean	C.V.	Root MSE	MOHOJA
0.927637	10.88204	0.534035	4.907489

Tests of Hypotheses using the Type III MS for REP(TRAT*NIV) as an error term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	2.06668653	0.68889551	0.61	0.6098
NIV	2	1.39794538	0.69897269	0.62	0.5411
TRAT*NIV	6	13.78716579	2.29786097	2.05	0.0777

Anexo 8. ANDEVA, Peso seco de hojas (g): Efecto de diferentes niveles de materia orgánica.

Dependent Variable: Peso seco de hojas (g)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	12.46507167	4.15502389	31.03	0.0001
NIV	2	0.67782333	0.33891167	2.53	0.0902
TRAT*NIV	6	0.87512333	0.14585389	1.09	0.3824
Error	48	6.42740000	0.13390417		
Corrected Total	59	20.44541833			

R-Square Mean	C.V.	Root MSE	MOSECHO
0.685631	34.23632	0.365929	1.068833

Anexo 9 . ANDEVA, Severidad expresada como (ABC) : Efecto de diferentes niveles de pH

Dependent Variable: Severidad expresada como ABC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	3347.645833	1115.881944	253.13	0.0001
NIV 0.0006	2	76.933333	38.466667	8.73	
TRAT*NIV 0.0071	6	89.866667	14.977778	3.40	
Error	48	211.600000	4.408333		
Corrected Total	59	3726.045833			

R-Square	C.V.	Root MSE	AUC Mean
0.943211	16.94367	2.099603	12.39167

Anexo 10 . ANDEVA, Días de sobrevivencia (máximo 48 días): Efecto de diferentes niveles de pH

Dependent Variable: Días de sobrevivencia (Máximo 48 días)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	5516.800000	1838.933333	127.70	0.0001
NIV	2	110.933333	55.466667	3.85	0.0281
TRAT*NIV	6	332.800000	55.466667	3.85	0.0032
Error	48	691.200000	14.400000		
Corrected Total	59	6651.733333			

R-Square Mean	C.V.	Root MSE	DIAMUEPH
0.896087	11.76054	3.794733	32.26667

Anexo 11. ANDEVA, Area foliar (cm²): Efecto de diferentes niveles de pH

Dependent Variable: Area foliar (cm²)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	187804.4046	62601.4682	90.50	0.0001
NIV	2	665.5292	332.7646	0.48	0.6187
TRAT*NIV	6	5726.1532	954.3589	1.38	0.2235
REP(TRAT*NIV)	48	18831.3081	392.3189	0.57	0.9898
FECHA	3	55808.3574	18602.7858	26.89	0.0001
TRAT*FECHA	5	8120.9107	1624.1821	2.35	0.0419
NIV*FECHA	6	3977.0202	662.8367	0.96	0.4543
TRAT*NIV*FECHA	7	79.9201	11.4172	0.02	1.0000
Error	233	161171.7500	691.7242		
Corrected Total	313	442185.3535			

R-Square	C.V.	Root MSE	PHAREA Mean
0.635511	34.08761	26.30065	77.15605

Tests of Hypotheses using the Type III MS for REP(TRAT*NIV) as an error term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	64146.06384	21382.02128	57.06	0.0001
NIV	2	1418.03660	709.01830	1.89	0.1619
TRAT*NIV	6	5449.57076	908.26179	2.42	0.0398

Anexo 12. ANDEVA, Altura de plantas (cm): Efecto de diferentes niveles de pH

Dependent Variable: Altura de plantas en (cm)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	217.4472746	72.4824249	198.76	0.0001
NIV	2	18.4073345	9.2036672	25.24	0.0001
TRAT*NIV	6	121.0739258	20.1789876	55.33	0.0001
REP(TRAT*NIV)	48	199.9367778	4.1653495	11.42	0.0001
FECHA	5	140.1740053	28.0348011	76.87	0.0001
TRAT*FECHA	9	35.2385751	3.9153972	10.74	0.0001
NIV*FECHA	10	4.2457769	0.4245777	1.16	0.3227
TRAT*NIV*FECHA	11	12.2885137	1.1171376	3.06	0.0013
Error	110	40.114889	0.364681		
Corrected Total	204	2014.280780			

R-Square	C.V.	Root MSE	PHALTUR Mean
0.980085	3.362862	0.603888	17.95756

Tests of Hypotheses using the Type III MS for REP(TRAT*NIV) as an error term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	217.4472746	72.4824249	17.40	0.0001
NIV	2	18.4073345	9.2036672	2.21	0.1208
TRAT*NIV	6	121.0739258	20.1789876	4.84	0.0006

Anexo 13. ANDEVA, Número de hojas: Efecto de diferentes niveles de pH

Dependent Variable: Número de hojas

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	85.47528559	28.49176186	213.36	0.0001
NIV	2	0.05872426	0.02936213	0.22	0.8030
TRAT*NIV	6	12.32657774	2.05442962	15.38	0.0001
REP(TRAT*NIV)	48	35.12803030	0.73183396	5.48	0.0001
FECHA	5	97.02612782	19.40522556	145.32	0.0001
TRAT*FECHA	9	11.67387218	1.29709691	9.71	0.0001
NIV*FECHA	10	3.06615385	0.30661538	2.30	0.0173
TRAT*NIV*FECHA	11	0.87829060	0.07984460	0.60	0.8270
Error	110	14.6888889	0.1335354		
Corrected Total	204	260.3219512			

R-Square Mean	C.V.	Root MSE	PHHOJA
0.943574	8.342105	0.365425	4.380488

Tests of Hypotheses using the Type III MS for REP(TRAT*NIV) as an error term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	11.17751932	3.72583977	5.13	0.0037
NIV	2	0.25614619	0.12807310	0.18	0.8389
TRAT*NIV	6	4.06424745	0.67737458	0.93	0.4807

Anexo 14. ANDEVA, Peso seco de hojas (g) : Efecto de diferentes niveles de pH

Dependent Variable: Peso seco de hojas (g)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	3.54112500	1.18037500	37.23	0.0001
NIV	2	0.01972333	0.00986167	0.31	0.7341
TRAT*NIV	6	0.41793000	0.06965500	2.20	0.0594
Error	48	1.52184000	0.03170500		
Corrected Total	59	5.50061833			

R-Square	C.V.	Root MSE	PHSECHO Mean
0.723333	16.60740	0.178059	1.072167

Anexo 15. ANDEVA, Longitud de raíces (cm): Efecto de diferentes niveles de pH

Dependent Variable: Longitud de raíces (cm)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	1549.991167	516.663722	56.06	0.0001
NIV	2	11.775000	5.887500	0.64	0.5323
TRAT*NIV	6	23.146333	3.857722	0.42	0.8630
Error	48	442.384000	9.216333		
Corrected Total	59	2027.296500			

R-Square	C.V.	Root MSE	PHLRAIC Mean
0.781786	16.66671	3.035841	18.21500

Anexo 16. ANDEVA, Peso seco de raíces (g) : Efecto de diferentes niveles de pH

Dependent Variable: Peso seco de raíces (g)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	6.37873333	2.12624444	46.17	0.0001
NIV	2	0.59180333	0.29590167	6.42	0.0034
TRAT*NIV	6	0.33375667	0.05562611	1.21	0.3187
Error	48	2.21068000	0.04605583		
Corrected Total	59	9.51497333			

R-Square	C.V.	Root MSE	PHSECRA Mean
0.767663	26.47281	0.214606	0.810667

7.2. Cronograma de actividades

AÑO	2000											
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Presentación de anteproyecto		X										
Búsqueda de patógenos y antagonistas	X	X										
Aislamiento de patógeno		X										
Revisión de literatura	X	X	X	X	X	X	X	X				
Ensayos de invernadero			X	X	X	X	X	X				
Organización y análisis de datos			X	X	X	X	X	X	X	X		
Discusión de resultados									X	X		
Presentación del primer borrador										X	X	
Presentación del documento final											X	
Presentación de tesis de grado												X

7.3. Cuadro presupuesto de tesis

CONCEPTO	COSTO EN \$ DOLARES
Búsquedas de patógenos y antagonistas	250
Material y equipos de laboratorios	1000
Material y equipos de invernadero	100
Pago de mano de obra	170
Material de oficina	140
Cajas de disquetes	40
Rollos de slides y revelado	100
Fotocopias y encuadernado	200
Total	2000