

Empleo de Bacterias Antagonistas en el Combate de la Enfermedad Ojo de Gallo del Cafeto Causada por *Mycena citricolor* (Berk & Curt) Sacc¹

F. Mora*, C. Ramirez**, E. Vargas***, T. Rodriguez****

ABSTRACT

Fifty-eight leaf bacterial isolates were obtained from coffee trees (*Coffea arabica*) planted in areas where American coffee leaf spot is endemic, namely, Turrialba, Montes de Oca and Los Santos, Costa Rica. Antagonism against the fungus was tested by inoculating bacterial isolates on healthy leaves of coffee cv. 'Arabica' that were subsequently inoculated with propagules of *M. citricolor* and on diseased leaves that showed typical symptoms and bore galls of the fungus. The criteria for antagonism were: an inhibition of disease development, and the prevention or destruction of propagule formation on the lesions. With this in mind, two antagonistic isolates were obtained from Turrialba, four from Montes de Oca and three from Los Santos. For microscopic studies, one of the most antagonistic bacterium (isolate No. 5) was utilized. Galls of the fungus, as observed with the naked eye and under the stereomicroscope, were destroyed in about 2-3 days upon inoculation with a suspension of the antagonistic bacteria. The profound alteration of the fungal tissue was confirmed under the scanning electron microscope. This change was also associated with the presence of numerous bacteria on the surface of the galls. The ultrastructural changes suggested a maceration of the fungal hyphae by bacterial hydrolytic exoenzymes possibly involved in the utilization of the fungal biomass by the bacteria. The antagonistic bacterial isolate grew well in peat; furthermore, bacterial suspensions obtained from this carrier and sprayed on leaves prevented the development of the disease.

COMPENDIO

Se aislaron 58 cepas bacterianas de hojas de plantas de café (*Coffea arabica*) procedentes de las zonas cafetaleras de Turrialba, Montes de Oca y Los Santos, Costa Rica. Se evaluó su antagonismo en cámara húmeda inoculándolas sobre hojas de cafeto sanas que luego se inocularon con propágulos de *M. citricolor* y sobre hojas con lesiones típicas de la enfermedad y con gemas del hongo en la superficie. El criterio de antagonismo, en el primer caso, fue evitar el desarrollo de la enfermedad y en el segundo, impedir la producción de propágulos sobre las lesiones así como la destrucción de los ya formados sobre las mismas. De esta manera, se aislaron dos cepas antagonistas de la zona de Turrialba, cuatro de Montes de Oca y tres de los Santos. Para el estudio final y los estudios de microscopía se escogió la cepa más antagonista. Observaciones al microscopio estereoscópico mostraron una maceración muy rápida de las gemas, lo cual fue confirmado con observaciones al microscopio electrónico de barrido, las cuales, además, mostraron la presencia de abundantes bacterias sobre las estructuras reproductoras del hongo. Los cambios estructurales del mismo sugieren el maceramiento por exoenzimas bacterianas con aparente provecho para las mismas. La bacteria antagonista se reprodujo en el medio acarreador de turba y las suspensiones de bacterias preparadas a partir del mismo y rociadas sobre la superficie de hojas inoculadas con el hongo, impidieron el desarrollo de la enfermedad.

INTRODUCCION

La enfermedad conocida como ojo de gallo, causada por el hongo *Mycena citricolor* (Berk & Curt) Sacc, ataca las hojas y frutos del cafeto y puede reducir la producción hasta en un 50%.

Este basidiomiceto rara vez produce en la naturaleza el estado perfecto (6). Durante la época lluviosa se pueden apreciar a simple vista las "gemas" o "cabecitas", estructuras asexuales del hongo, de color amarillo salmón y 0.5 mm en diámetro, sobre las lesiones producidas en hojas y frutos. Estos propágulos, que constituyen el inóculo primario, mantienen la enfermedad en el campo (5, 6). Las cabecitas adheridas al tejido enfermo por el pedicelo cuando están secas, se

¹ Recibido para publicación el 8 de agosto 1989
Este trabajo fue financiado parcialmente por el IDRC del Canadá.

* Ingeniera Agrónoma, Centro de Investigaciones Agronómicas; Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica.

** Profesor Investigador, Microbiología de Suelos, Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales, CATIE, Turrialba 7170, Costa Rica

Catedrático, Laboratorio de Fitopatología, Escuela de Fitotecnia, Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica.

Instructora Licenciada, Escuela de Química, Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica.

desprenden con el agua; mediante el salpique se transportan a las hojas vecinas. Sobre el tejido sano y si hay agua libre, la cabecita inicia la infección del tejido foliar. Las gemas se pueden adherir a diversos animales (6), lo cual favorece su diseminación a largas distancias. El hongo sobrevive en las lesiones durante la época seca y se activa con los primeros aguaceros, fructifica y perpetúa la enfermedad dentro de la plantación. El hongo infecta hojas y frutos donde forma manchas circulares, bien definidas de 0.5 a 1 cm de diámetro. La enfermedad aparece en zonas de altura media y de alta humedad o en zonas más bajas, cuando hay abundantes lluvias, neblinas y temperaturas bajas. El hongo eventualmente causa la caída de las hojas y los frutos (6).

Esta enfermedad, de combate obligado en las plantaciones bien manejadas, se controla con fungicidas de alta toxicidad de uso restringido (13). De ahí la importancia de buscar alternativas efectivas de control, para reducir la producción del inóculo y la infección del hongo, como el combate biológico, objetivos alcanzables y de gran potencial con base en antecedentes encontrados en la literatura científica (1, 2, 7, 9). El presente trabajo explora la posibilidad de utilizar bacterias antagonistas aisladas de distintas localidades de Costa Rica contra la enfermedad "Ojo de Gallo".

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento de las bacterias. Se recolectaron hojas de café al inicio de la estación lluviosa (Mayo, 1976), en tres sitios de Costa Rica en donde la enfermedad es endémica: cerca de la ciudad de Turrialba, cantón del mismo nombre, provincia de Cartago; Sabanilla de Montes de Oca, cantón de San Pedro, provincia de San José y la zona de Los Santos, cantón de Acosta, provincia de San José. El mismo está situado a 634 msnm, tiene una temperatura media anual de 20.8°C, humedad relativa de 88% y una precipitación media mensual, para mayo, de 285 mm. Según la clasificación de zonas de vida elaborada por de Tossi (12), el primer sitio pertenece al bosque tropical muy húmedo. El segundo sitio está ubicado a 1 035 msnm, temperatura media de 18.3°C, humedad relativa media anual de 80% y precipitación media mensual de 52 mm, clasificada como perteneciente al bosque subtropical húmedo. El último sitio está localizado a 1 429 msnm, no se poseen datos meteorológicos y pertenece al bosque muy húmedo montañoso bajo.

Las hojas colectadas mostraron síntomas de ojo de gallo y en el laboratorio se procesaron como sigue: con un sacabocados esteril de 1 cm de diámetro se obtuvieron 10 discos por hoja (10 hojas por sitio) que

tenían tanto tejido enfermo como sano. Los discos se colocaron en un erlenmeyer de 600 ml con 100 ml de solución nutritiva diluida 1:10 (K_2PO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, NaCl 0.1 g, manitol 10 g, extracto de levadura 2 g y agua destilada 1 litro) se agitó mecánicamente por 2 min. con perlas de vidrio de 0.25 cm de diámetro, se hicieron diluciones decimales en el mismo medio hasta $1:10^{-10}$. Luego se tomó 0.1 ml de cada una de las diluciones y se sembraron en platos Petri con agar nutritivo (extracto de carne 3 g, peptona 5 g, agar 18 g y agua destilada 1 litro). Los platos se incubaron a temperatura ambiente por 4 días. Cada día se hicieron observaciones para constatar la aparición de colonias las que se sembraban de inmediato por rayado, en el mismo medio, con el propósito de mejorar su pureza antes de pasarlas a tubos inclinados con agar nutritivo (AN) para su mantenimiento.

Prueba de antagonismo. Se colectaron hojas de café de mediana edad y plagiotrópicas, de cafetales cv "Arabica" situados en los alrededores de la Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, en Sabanilla de Montes de Oca. Las hojas se inocularon con la bacteria y el hongo en la siguiente forma: a partir del crecimiento superficial bacteriano de 48 h, en tubos AN inclinado, se preparó una suspensión bacteriana de aproximadamente 1×10^9 ml⁻¹ en solución salina tamporada (KH_2PO_4 0.43 g, Na_2HPO_4 1.48 g, NaCl 7.2 g y H_2O destilada 1 l), la cual se roció hasta el punto de escurrimiento sobre las hojas, 48 h antes de la inoculación con el hongo. La inoculación se realizó, con ayuda de una aguja esteril, se hicieron 10 grupos de inoculación, consistentes en 5 perforaciones puntuales a ambos lados de la vena central de la hoja. Luego, se colocaron, con la ayuda de un pincel, 10 cabecitas del hongo por sitio de inoculación. Las hojas se rociaron con agua destilada con el aspersor de *DeVilbis*, procedimiento que se repitió cada 2 días, para mantener la humedad sobre las hojas. En los tratamientos testigo, este procedimiento de inoculación del hongo aseguró el 100% de infección. Las hojas se incubaron por 8 días en cámara húmeda y se hicieron observaciones diarias. Además, se trajeron hojas infectadas del campo que presentaban lesiones del hongo y gemas. Las bacterias se rociaron sobre las hojas, como ya fue descrito. En este caso, también se utilizó cámara húmeda y 5 hojas por aislamiento bacteriano. La cámara húmeda consistió en una armazón de alambre maleable, en forma de caja rectangular, de 45 x 32 x 13 cm. Dicha armazón fue colocada dentro de una bolsa plástica transparente; en el fondo, se colocó una lámina de espuma de poliuretano de 1.5 cm de espesor de longitud y anchura igual a la armazón. Cuando las hojas estuvieron dentro de la bolsa plástica, se cerró con una banda de caucho. En todos los casos, el número de repeticiones fue de 5 hojas; la

unidad experimental fue la hoja, así, el número total de lesiones fue de 50. Además de los tratamientos con las bacterias en estudio, se incluyeron dos testigos: el absoluto (hojas rociadas con solo agua) y el relativo (hojas inoculadas solo con el hongo). En este estudio se consideraron únicamente como antagonistas aquellas bacterias que inhibieron totalmente el desarrollo de las lesiones y que, además, maceraron las gemas del hongo tanto en las hojas inoculadas como las infectadas traídas del campo. En este último caso, se impidió también la formación de nuevos propágulos.

Procesamiento y observación de las muestras. Las hojas se inocularon con una suspensión bacteriana de un aislamiento antagonista y con el hongo, en la manera ya descrita. Las hojas se muestrearon a los 3 días, cuando los propágulos del hongo mostraban un frasco deterioro de su estructura. La preparación de las muestras se hizo de acuerdo con los procedimientos descritos por Parson *et al.* (10), Baum *et al.* (4) y Heslop-Harrison (8). Las hojas se fijaron en glutaraldehído al 4% y posteriormente se colocaron en tetróxido de osmio y luego se deshidrataron en una serie ascendente de alcohol etílico. Las muestras deshidratadas se llevaron a punto de secado crítico en un

deseCADador Hitachi HCP-2 y luego se cubrieron con una capa de oro durante 3 min. en un cobertor iónico Eiko 18-3. Las observaciones se hicieron en un microscopio electrónico de rastreo (MER) Hitachi modelo S-570 y se tomaron las fotografías empleando película Verichrome Pan, Kodak VP-120.

Efecto de los aislamientos bacterianos sobre los propágulos del hongo en lesiones. Para estudiar este efecto se colectaron hojas infectadas de la zona de Turrialba, en las cuales había lesiones bien desarrolladas y algunas de las cuales, al momento de la colecta, presentaban las gemas típicas del hongo. Al inicio del experimento se hizo un recuento del número total de lesiones por hoja, el número de cabecitas y el número total de cabecitas y al final del periodo de incubación solo se contó el número total de cabecitas. También, se utilizaron 5 hojas por tratamiento que incluyó un testigo sin bacteria, y las bacterias bajo investigación. Las hojas se rociaron con las bacterias en la manera ya descrita y se colocaron en cámaras húmedas. Se hizo un recuento de las cabecitas a los 2, 4, y 6 días después de rociadas las hojas. Luego del cuarto recuento de cabecitas, se eliminaron las existentes con un pincel y se colocaron de nuevo las hojas en cámaras húmedas, a los 6 días se hizo un recuento para determi-

Cuadro 1. Efecto de diferentes aislamientos bacterianos antagonistas sobre la infección del hongo *Mycena citricolor* en hojas de café (*Coffea arabica*).

Procedencia	Número de aislamiento	Número total de lesiones ¹	Días después de la inoculación								
			2			4			6		
			CAMBIOS EN LAS GEMAS ²								
Deshidratación	Descoloración	Maceración	Deshidratación	Descoloración	Maceración	Deshidratación	Descoloración	Maceración			
Turrialba	1	1/50		+		++	++			+	
	5	1/50	+	+		++	++			+	
Montes de Oca	2	0/50	+							+	
	3	9/50	+	+		++	++			+	
	4	2/50	+	+		++	++			+	
	6	2/50	+	+						+	
Los Santos	8	1/50	+	+						+	
	0	1/50	+	+		++	++			+	
	10	0/50		+		++	++			+	
Testigo inoculado ³		50								Aparición de lesiones	

1 Número de lesiones observadas / Número de lesiones en testigo inoculado con el hongo.

2 Deshidratación – Pérdida de la turgencia de la gema
Descoloración – Cambio drástico de amarillo limón a marrón oscuro
Maceración – Gema no era visible al ojo desnudo.

3 Número total de hojas por tratamiento. 5, 10 lesiones por hoja inoculada total de 50 lesiones causadas por el hongo.

nar si las bacterias remanentes sobre la lesión eran capaces de impedir la formación de nuevas gemas. Los tratamientos empleados en esta fase fueron: 9 cepas antagonistas y un testigo que consistió en hojas con cabecitas que no fueron tratadas con bacterias. Se emplearon 5 repeticiones por tratamiento.

Preparación de inoculante en turba e inoculación de hojas infectadas. Para estudiar la posibilidad de utilizar el suelo de turba como un portador de las bacterias antagonistas, de la misma manera que se hace con *Rhizobium*, se preparó un inoculante como sigue: se cultivó un aislamiento bacteriano antagonista (la número 5 aislada de la zona de Turrialba) en tubos de agar nutritivo que se incubaron a temperatura ambiente por 48 h. Seguidamente, se suspendieron las bacterias en solución salina y se inoculó en bolsa plástica con turba esteril y neutralizada con carbonato de calcio a razón de 7.5% en una proporción de 5 ml de caldo por 10 g de turba. El recuento bacteriano se hizo mediante dilución y siembra en platos de Petri con AN. Para determinar la efectividad de este preparado, a los 3 días de inoculada la turba se agregó solución salina tamponada, a razón de 10:1 y la suspensión resultante se aplicó a las hojas infectadas. Se utilizaron 5 hojas por tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSION

Aislamiento de las cepas. A partir de las hojas de café, se obtuvieron 34 cepas bacterianas de la zona de Turrialba, 14 de Sabanilla de Montes de Oca y 10 de Los Santos. El número de bacterias en el tejido foliar fue alto, pues se obtuvieron colonias aisladas a partir

de las diluciones 10^{-6} , lo cual sugiere que estas son de importancia en la comunidad microbiana de la filósfera. Se muestreó tejido con síntomas de la enfermedad para lograr el aislamiento de bacterias antagonistas (parásitas) que pudieran estar asociadas al micelio del patógeno.

Prueba de antagonismo. Se probó el antagonismo de los aislamientos bacterianos contra el hongo sobre las hojas de café y no *in vitro*, buscando condiciones similares a las naturales, pues a menudo, el antagonismo encontrado bajo las condiciones un tanto artificiales de un medio de cultivo no correlaciona con el antagonismo *in vivo* (11).

En las hojas inoculadas con el hongo mostraron un 100% de infección, ya que todos los puntos de inoculación en todas las hojas desarrollaron lesiones, bajo las condiciones de experimentación (Cuadro 1). Así, las condiciones de incubación en la cámara húmeda fueron apropiadas para el desarrollo de la enfermedad.

Para seleccionar a las bacterias antagonistas se escogieron aquellas que inhibían drásticamente el desarrollo de la enfermedad. De esta manera, del total de cepas evaluadas 9 se comportaron como antagonistas (Cuadro 1). Se aislaron bacterias antagonistas de las muestras de todas las zonas cafetaleras estudiadas. Las bacterias rociadas sobre las hojas inhibieron la infección por el hongo y el desarrollo de la enfermedad y alteraron drásticamente las gemas del hongo que se

Cuadro 2. Efecto de diferentes aislamientos bacterianos antagonistas sobre la producción de gemas del hongo *Mycena citricolor* en hojas infectadas de café (*Coffea arabica*).

Procedencia	Número de aislamiento bacteriano	Días después de la inoculación ¹			
		0	2	4	6
		Número promedio de gemas por hoja ²			
Turrialba	1	14.4	3.6	1.2	1.2
	5	16.8	1.4	1.0	0.0
Montes de Oca	2	15.8	4.4	0.8	0.8
	3	14.6	1.4	0.8	0.6
	4	17.0	0.4	0.4	0.4
	6	16.8	2.8	3.8	4.4
Los Santos	8	13.6	0	0	0
	9	14.4	1.2	0.4	0
	10	14.6	0	0	0
Testigo sin bacteria		14.6	16.0	19.2	21

1 Se asperjó la suspensión bacteriana sobre las hojas al punto de escurrimiento con un número aproximado de 10^9 bacterias ml^{-1} .

2 Promedio de 5 hojas infectadas.

habían utilizado como fuente del inóculo. En el Cuadro 1 se presentan los cambios visuales que experimentaron los propágulos del hongo.

Dos días después de la inoculación, 7 de 9 cepas provocaron deshidratación severa y descoloración de las cabecitas del hongo. A los 4 días se habían acentuado los síntomas y en algunos casos, como en la cepa 2 y la 8, se había macerado totalmente el tejido del hongo pues visualmente no era posible distinguir la identidad de las gemas. A los 6 días, todas las bacterias antagonistas habían macerado el tejido del hongo hasta destruirlo. Estas observaciones sugirieron una acción parasítica directa de las bacterias sobre el hongo que en última instancia impidió el desarrollo de la enfermedad. Como hubo un efecto similar en los aislamientos provenientes de zonas diferentes, los resultados sugieren la existencia de una flora bacteriana que coexiste con el hongo en las zonas endémicas estudiadas y que posiblemente ejerza, bajo condiciones naturales, un efecto antagónico al hongo el cual parece ser insuficiente pues no controla la enfermedad.

La metodología de aislamiento, que incluyó tanto tejido sano como enfermo (con micelio del hongo), parece haber asegurado el aislamiento de estas bacterias de todos los sitios.

Las observaciones realizadas al MER arrojaron luz sobre la naturaleza de la acción de las bacterias sobre el hongo (Fig 1a, b). Además de los cambios visuales, la pérdida de turgencia y descoloración, se observó también el desarrollo masivo de las bacterias sobre las estructuras fúngicas, las que mostraron una desorganización drástica, sugiriendo la utilización de la biomasa del hongo por las mismas. Las bacterias produjeron posiblemente enzimas hidrolíticas que maceraron el tejido del hongo previo a su utilización; dicha maceración causó eventualmente los cambios ultraestructurales observados.

En el tratamiento testigo inoculado con el hongo, la enfermedad se desarrolló normalmente. Al tercer día después de la inoculación, se observó una área necrótica color café oscuro alrededor de las cabecitas, que mantenían su turgor y color inicial. Además, se pudo observar el desarrollo de micelio alrededor de las mismas. Siete días después de la inoculación, las lesiones del hongo estaban bien desarrolladas sobre los puntos de inoculación en la hoja.

Efecto de las bacterias sobre las gemas y su producción en hojas con lesiones de *Mycena citricolor*
Una característica deseable en un antagonista es que evite la infección del patógeno y el desarrollo de la enfermedad pero también que disminuya la producción de nuevos propágulos si se aplica sobre tejidos infectados. Para evaluar el efecto de las bacterias antagonistas sobre la producción de gemas de *M. citricolor* se rociaron las mismas sobre lesiones del hongo en

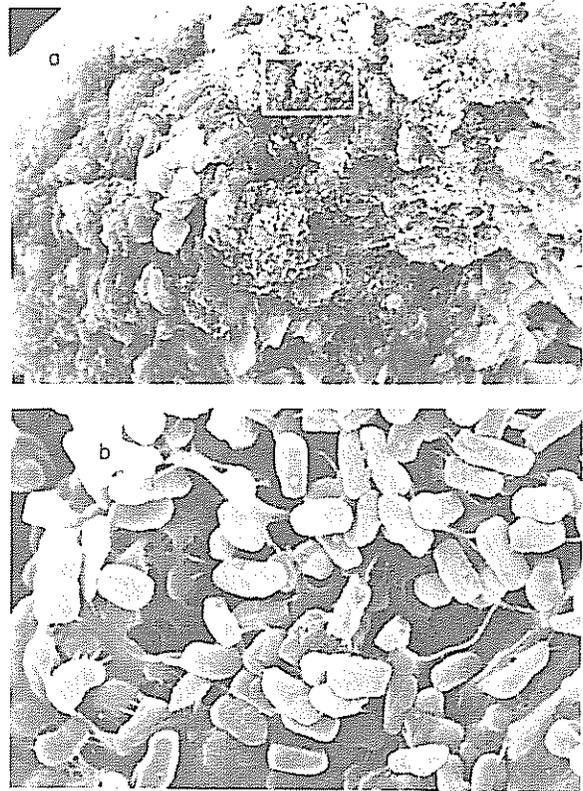


Fig 1. a) Gema de *Mycena citricolor* Bert & Curt Sacc, hongo causa del ojo de gallo del cafeto (*Coffea arabica* L.), tres días después de haber sido inoculada sobre hojas de cafeto con bacterias antagonistas. Nótese el gran número de bacterias sobre el estroma indiferenciado del hongo (MER 1 200 x) b) Acercamiento que muestra numerosas bacterias bacilares sobre un estroma macerado e indiferenciado de hongo. Nótese estructuras de adherencia (glicocalix) de las bacterias (MER 12 000 x)

hojas infectadas naturalmente. Los resultados de tal experimento se presentan en el Cuadro 2. Se observó en las hojas infectadas y no rociadas con las bacterias, el número de gemas aumentó de un promedio de 14.6 a 21 en un lapso de 6 días. Por otro lado todas las bacterias antagonistas ejercieron un efecto inmediato sobre las gemas ya producidas sobre las lesiones de las hojas a tal punto de disminuir, en un lapso de 2 días, el número de gemas de apariencia sana de un promedio de 15 a 4.4 en la bacteria menos antagonista (aislamiento 2 de Montes de Oca) y a 0 con los aislamientos 8 y 10 (de la zona de Los Santos). El efecto no se circunscribió a las gemas ya existentes sino también se evitó la producción de nuevos propágulos del hongo, lo cual refuerza el efecto antagonista de las células bacterianas remanentes sobre las lesiones. De rociar la bacteria en una plantación infectada se estarían eliminando no solamente los propágulos ya formados sino también la formación de nuevo inóculo. En el artículo adjunto se presenta información al respecto. Se es-

pera que, como resultado de la acción sobre las cabezitas existentes la población bacteriana, como lo evidencian las fotografías al MER haya aumentado y que este aumento quizás haya contribuido a evitar la salida de nuevos propágulos del hongo. Cabe mencionar que, bajo condiciones naturales, habría que determinar por cuanto tiempo las bacterias inoculadas sobre las lesiones son capaces de ejercer este efecto antagonista sobre hojas infectadas, pues Blakeman (3) menciona el posible decaimiento de la población bacteriana sobreviviente sobre las hojas como resultado de la competencia por substratos. Sería también de interés investigar el efecto de otros factores ambientales como la radiación, la humedad relativa y la temperatura sobre la sobrevivencia de las bacterias bajo condiciones de campo. De esta manera se podría conocer el efecto de sitio

Por otro lado, sería importante explorar el mecanismo de acción de las bacterias, los factores que afectan su fisiología y la estabilidad genética de esta característica. Además, se debería investigar el efecto de tratamientos coadyuvantes como protectores de la luz ultravioleta y substratos sobre la efectividad de las bacterias en el control de este patógeno. Esta característica haría a las bacterias candidatas potenciales para el combate biológico de esta enfermedad. Las bacterias se rociaron relativamente en gran cantidad (alta densidad de inóculo) y habría que investigar el número mínimo de bacterias capaz de evitar la infección y la producción de propágulos bajo condiciones de campo. Los resultados de tales investigaciones se informan en el texto adjunto

Preparación de inóculo de bacteria antagonista y su efecto sobre el desarrollo de gemas del hongo producidas sobre las lesiones en hojas de cafeto. Se utilizó turba procedente de la zona de Los Chiles de Upala, Costa Rica, previamente evaluada y seleccionada como material buen portador de *Rhizobium* en la preparación de inoculantes para leguminosas, como acarreador de las bacterias antagonistas. Después de 6 días el número de bacterias fue de $2 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$, número adecuado para un inoculante bacterial. Es decir, la turba aparentemente podría ser un acarreador adecuado de las bacterias para su aplicación a nivel de campo. Las preparaciones hechas con el aislamiento bacteriano no. 5 en este acarreador, tal como se describe en el presente trabajo, resultaron muy efectivas cuando se rociaron sobre hojas infectadas con el hongo, pues el 65% de las gemas mostraron cambios visuales drásticos después de 2 días de la inoculación; a los 4 días no había una sola cabezita sana sobre las hojas

Los resultados anteriormente descritos subrayan el potencial real del uso de bacterias antagonistas en el control biológico de esta enfermedad, pues no solo hubo un excelente control de la misma cuando se rociaron suspensiones de las bacterias obtenidas de cultivos sino también con este material acarreador, lo que habría la posibilidad de la reproducción y formulación de gran escala para, previas pruebas, su aplicación en el campo. El artículo adjunto evalúa, a nivel de campo la efectividad de tal estrategia.

LITERATURA CITADA

- ANDREWS, J.H. 1985. Strategies for selecting antagonistic microorganisms from the phylloplane. In Biological control on the phylloplane. Ed. by C.E. Windells; S.E. Lindow. Saint Paul, The American Phytopathological Society. p. 31-34.
- BAKER, C.J.; THOMAS, C.A.; SASSER, M.; MACFALL, J. 1983. Inhibitory effects of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. *Phytopathology* 73:1 148-1 152.
- BLAKEMAN, J.P. 1985. Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control on the phylloplane. In Biological control on the phylloplane. Ed. by C.E. Windells; S.E. Lindow. Saint Paul, The American Phytopathological Society p. 6-30.
- BAUM, B.R.; TULLOCH, A.P.; BAILEY, L.G. 1980. A survey of epicuticular waxes among genera of Triticeae. I. Ultrastructure of glumes and some leaves as observed with the scanning electron microscope. *Canadian Journal of Botany* 58:2 467-2 480.
- COSTA RICA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA. OFICINA DEL CAFE. 1978. Manual de recomendaciones para cultivar café. 3 ed. 68 p.
- GONZALEZ, L.C. 1974. Principales enfermedades de los cultivos en Costa Rica. San José, Universidad de Costa Rica. 150 p.
- HENIS, Y.; CHET, I. 1975. Microbiological control of plant pathogens. *Adv. Appl. Microbiol.* 19:85-111.
- HESLOP-HARRISON, Y. 1970. Scanning electron microscopy of fresh leaves of *Pinguicula*. *Science* 167:172-174.
- LINDOW, S.E.; ARNY, D.C.; UPPER, C.D. 1983. Biological control of frost injury: establishment and effects of an isolate of *Erwinia herbicola* antagonistic to ice nucleation active bacteria on corn in the field. *Phytopathology* 73:1 102-1 106.

- 10 PARSON, E.; BOLE, B.; HALL, D.J.; THOMAS, W.D.E. 1973. A comparative survey of techniques for preparing plant surfaces. *Journal of Microscopy* 101:59-75.
- 11 SCHROTH, M.N.; LOPER, J.E.; HILDEBRAND, D.C. 1983. Bacteria as biocontrol agents of plant disease. In current perspectives in microbial ecology. Ed. by M.J. Klug; C.A. Reddy. Washington, American Society for Microbiology. p. 362-369.
- 12 TOSSI, J.A. 1969. Mapa ecológico de la República de Costa Rica. San José, C.R.; Instituto Geográfico Nacional. Escala 1:750.000. Color.
- 13 VARGAS, E. 1984. Interacción del tratamiento biológico y químico en el combate de ojo de gallo (*Myce-
na citricolor*) en el café. *Agronomía Costarricense* 8:91-97.

Caracterización Morfológica del Nematodo Nodulador del Café *Meloidogyne exigua* (Nemata: Heteroderidae). I. Hembras y Huevos¹

L. Flores*, R. López*

ABSTRACT

A morphological, morphometrical and allometrical study of 30 females and 30 eggs from each of four populations of the coffee root-knot nematode, *Meloidogyne exigua*, collected in different locations of Costa Rica, was carried out. In females, all quantitative characters were highly variable, as their coefficients of variability were greater than 10%. The female perineal pattern was considered the most reliable character for the precise identification of this important species. The presence of five nuclei in the glandular, basal portion of the esophagus is reported for the first time. In eggs, both length and diameter had low variability.

COMPENDIO

Se hizo un estudio morfológico, morfométrico y alométrico de 30 hembras y 30 huevos en cada una de cuatro poblaciones del nematodo nodulador del café, *Meloidogyne exigua*, provenientes de varias localidades de Costa Rica. En las hembras, todas las características cuantitativas tuvieron una alta variabilidad, dado que sus coeficientes de variación fueron superiores al 10%. El diseño perineal fue considerado como el carácter cualitativo más importante para la identificación precisa de esta importante especie. Por primera vez se informa sobre la presencia de cinco núcleos en la porción glandular basal del esófago de las hembras. En los huevos, la longitud y el diámetro tuvieron una baja variabilidad.

INTRODUCCION

La economía de Costa Rica se basa principalmente en la exportación de café (*Coffea arabica* L.); debido a ello, es necesario conocer los diferentes factores que puedan reducir su producción; el daño que causan los nematodos es uno de los problemas con que se enfrenta este cultivo. Son numerosas las especies de nematodos fitoparásitos que pueden

afectar al café; entre ellas, *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887, es la más comúnmente asociada al cultivo (12, 13, 17)

Uno de los aspectos más importantes en Fitoneematología es el conocimiento exhaustivo de la morfología de las especies con el fin de identificarlas en forma precisa y distinguirlas de otras; con este conocimiento se logra una mayor efectividad en las tácticas de manejo, como la rotación de cultivos y el uso de cultivares resistentes, las cuales contribuyen a reducir el daño causado por nematodos (4, 14).

La literatura a nivel mundial referente a la descripción de caracteres morfológicos en *M. exigua* es poca; la descripción original y otros trabajos posteriores carecen, en su mayoría, de estudios estadísticos comple-

¹ Recibido para su publicación el 19 de diciembre de 1989. Parte de una tesis de grado presentada por el primer autor ante la Escuela de Fitotecnia de la Universidad de Costa Rica.

* Laboratorio de Nematología, Escuela de Fitotecnia, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. Los autores desean agradecer la ayuda del Ing. Luis A. Salazar F. y de la Sra. Suria Sánchez.